

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 428**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/09** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.07.2006 E 06788711 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.01.2015 EP 1945755**

54 Título: **Perfiles de anticuerpos específicos de un estado tuberculoso**

30 Prioridad:

**26.07.2005 US 702757 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**22.04.2015**

73 Titular/es:

**RUTGERS, THE STATE UNIVERSITY OF NEW  
JERSEY (100.0%)  
Old Queen's, Somerset Street  
New Brunswick, NJ 08909 , US**

72 Inventor/es:

**GENNARO, MARIA LAURA**

74 Agente/Representante:

**LÓPEZ CAMBA, María Emilia**

**ES 2 534 428 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Perfiles de anticuerpos específicos de un estado tuberculoso.

5 **ÁMBITO TECNICO**

Esta invención se refiere a los ensayos para *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*).  
ANTECEDENTES

10 El diagnóstico para la tuberculosis (TB) incluye tradicionalmente una combinación de la evidencia clínica, bacteriológica y radiográfica, típicamente las pruebas de cultivos y frotis, la prueba cutánea de la tuberculina (TST) y la radiografía de tórax.

15 Los anticuerpos específicos para un número de proteínas expresadas mediante la *M. tuberculosis* son detectables en el suero humano. Los ensayos de anticuerpos son rápidos y relativamente baratos y por lo tanto son un diagnóstico potencialmente valioso y una técnica de cribado. Existen varias categorías de diagnóstico de la tuberculosis (TB): enfermedad activa, TB inactiva (pasado) y dos categorías caracterizadas mediante la ausencia de anomalía radiográfica en el tórax: la infección latente y la libre de infección. La detección de la TB activa es, por supuesto, clínicamente importante. La detección de la tuberculosis inactiva es clínicamente significativa, porque las personas con TB inactiva son de más de un orden de magnitud más propensas a desarrollar la TB activa que las personas que tienen la TB latente. La distinción entre TB activa de la tuberculosis inactiva es significativa desde el punto de vista de la salud pública, tal como permite la concentración de los recursos, que están a menudo muy limitados en los países más gravemente afectados por la tuberculosis, donde el peligro es mayor. La distinción de la TB inactiva de los estados caracterizados por radiografías de tórax normales es similarmente importante desde un punto de vista de la salud pública.

20 Los intentos de utilizar la detección de anticuerpos del suero para diagnosticar un estado de TB se han centrado en encontrar un antígeno o unos antígenos cuyo enlace se correlaciona positivamente con ese estado en particular, por ejemplo, los antígenos para quienes los resultados positivos de los ELISA (ensayo por inmuno absorción ligado a enzimas) señalan la TB activa. El diagnóstico de los estados de TB mediante pruebas de anticuerpos del suero ha sufrido de la falta de precisión.

30 Silva V M C et al., en el documento titulado "Factors associated with humoral response to ESAT-6, 38kDa and 14kDa in patients with a spectrum of tuberculosis" INTERNATIONAL JOURNAL OF TUBERCULOSIS AND LUNG DISEASE, 1UATLD, PARIS, FR, vol. 5, de 1 de mayo de 2003, páginas 478-484, mide la respuesta humoral informe a los tres antígenos de *M. tuberculosis* 38kDa, 14kDa y ESAT-6 medidos con ELISA en pacientes con un espectro de condiciones relacionadas con la tuberculosis.

40 Un aspecto de esta invención son los ensayos para la detección de anticuerpos del suero humano con capacidad mejorada de predicción de los estados de TB de forma precisa, especialmente para discriminar entre la TB activa y la TB inactiva.

**RESUMEN**

45 Los estados de TB incluyen cinco clases reconocidas. Clase 1 (denominada a veces Clase 0-1) indica la ausencia de infección. En esta solicitud nos referimos a ese estado como "libre de infección". La Clase 2 es la infección latente. Las dos clases anteriores se caracterizan ambas por la ausencia de anomalía radiográfica del tórax, a los cual algunas veces nos referimos como "tórax normal por rayos X" o, abreviadamente, "CXR normal". La Clase 3 es la tuberculosis activa. La Clase 4 es la tuberculosis inactiva. La Clase 5 es la tuberculosis sospechada, pendiente de diagnóstico. Este sistema de cinco clases fue adoptado por la Junta Directiva de la American Thoracic Society en Julio de 1999, en una declaración conjunta con los U.S. Centers for Disease Control (CDC) titulada "Targeted Tuberculin Testing and Treatment of Latent Tuberculosis Infection." La clasificación ha sido avalada por el Council of the Infectious Diseases Society of América. Véase Am. J. Respir. Crit. Care Med. (April 2000) 164 (4 pt 2): S221-47. La Clase 4, la tuberculosis inactiva, tal y como está definida es "Tuberculosis; no clínicamente activa. Esta clasificación está definida por una historia de episodio(s) previos de la tuberculosis o de resultados radiográficos anormales estables en una persona con una reacción positiva a la prueba cutánea de la tuberculina, estudios bacteriológicos negativos (si se han realizado) y sin evidencia clínica y/o radiográfica de enfermedad actual. Las personas en la Clase 4 pueden no haber recibido quimioterapia, pueden estar recibiendo tratamiento para la infección latente o pueden haber completado un tratamiento previamente prescrito de quimioterapia."

60 Esta invención es un ensayo de anticuerpo del suero humano para la TB que es capaz de distinguir la TB inactiva de la TB activa tal como se define en la reivindicación 1. Los ensayos de acuerdo con esta invención se basan y utilizan la bien conocida reacción antígeno-anticuerpo. El tipo de protocolo, es decir, el análisis sándwich (ensayo de captura de antígeno y detección mediante inmuno complejos) o el análisis competitivo, no es crítico. Utilizo un ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) que es un formato sándwich que incluye como un primer antígeno inmovilizado reactivo y como un segundo reactivo un anti-anticuerpo etiquetado que se une a anticuerpos

inmovilizados por el primer reactivo. Sin embargo, pueden ser utilizados otros formatos para la detección de anticuerpos de suero. Véase, por ejemplo, Estados Unidos Números Re 3.654.090, 3.791.932, 3.850.752, 3.839.153 y 3.879.262.

5 Los ensayos de esta invención utilizan proteínas de *M. tuberculosis* como reactivos, tanto como el primer reactivo  
 antígeno con el fin de inmovilizar los anticuerpos del suero o como los reactivos antígenos etiquetados o ambos. Los  
 ensayos de esta invención están caracterizados por el uso de por lo menos 3 antígenos y por la inclusión de los  
 10 antígenos de por lo menos dos tipos: en primer lugar, por lo menos un antígeno que es específico para un  
 anticuerpo cuya presencia es un indicador de la tuberculosis inactiva en relación con la TB activa y, segundo, por lo  
 menos un antígeno que es específico para un anticuerpo cuya ausencia es un indicador de la tuberculosis inactiva  
 en relación con la TB activa. Cuando son utilizados en mi ensayo preferente de sándwich, una respuesta positiva  
 desde un antígeno o antígenos del primer tipo acoplada con una respuesta negativa (es decir, la ausencia de una  
 respuesta positiva) desde un antígeno o antígenos del segundo tipo es indicativa de tuberculosis inactiva como  
 15 distinción de la TB activa. Los ensayos incluyen uno o más antígenos terceros seleccionados del grupo formado por  
 el primer tipo y el segundo tipo.

Los ensayos de acuerdo con esta invención pueden ser realizados usando reacciones separadas en diferentes  
 ubicaciones o recipientes, por ejemplo, puntos separados en una superficie de una tarjeta o palillo o pocillos  
 separados de placas de microtitulación. En tal formato, es posible la utilización de una etiqueta de formación de color  
 20 tal como la peroxidasa de rábano ya que puede decir que antígeno o antígenos lideran una respuesta positiva, es  
 decir en color. Los ensayos de acuerdo con esta invención también pueden ser realizados utilizando reacciones  
 separadas comúnmente en distintos lugares de una sola matriz, tal como ocurre cuando los primeros reactivos  
 antígenos están inmovilizados en posiciones identificables, separadas en la superficie de una matriz y la matriz  
 completa está expuesta al suero, lavado, expuesto al segundo reactivo común, lavado de nuevo y leído. En este  
 25 enfoque el segundo reactivo se etiqueta con una etiqueta de señalización, por ejemplo, una molécula fluorescente o  
 un isótopo radiactivo, de tal manera que pueden ser detectados resultados positivos en las localizaciones  
 individuales de varios primeros reactivos antígenos.

Los ensayos preferentes de acuerdo con esta invención están contruidos de tal manera con el fin de tener dos  
 30 resultados, el resultado positivo o el resultado negativo, para cada antígeno. Para el tipo de sándwich de ELISA que  
 he utilizado y que se describe en esta solicitud, se establece el punto de división (punto de corte) entre positivo y  
 negativo y se ajusta la concentración del antígeno u otras condiciones en el ensayo para que solamente resultados  
 por encima del corte proporcionen un resultado positivo. Esto puede ser ilustrado mediante la referencia a la Tabla 3.  
 En la Tabla 3, cuatro antígenos AlaDH, los resultados promedio fueron: para los casos de TB activa, 0,199; para los  
 35 casos de TB inactiva, 0,140; y para los casos que fueron CXR normales, 0,106. En el diseño de un ensayo la  
 concentración del antígeno puede ser ajustada con el fin de proporcionar el corte deseado, es decir, de modo tal que  
 sólo los casos de TB activa producirán suficiente color para ser juzgados "positivos". Todos los demás casos darán  
 color insuficiente (o no) y serán juzgados "negativos" en el ensayo. Por lo tanto, el resultado de antígeno AlaDH, si  
 es positivo, será consistente con la TB activa pero no con la TB inactiva y también será consistente con la TB activa,  
 40 pero no con una clase CXR normal. Sin embargo, un resultado positivo o negativo no distinguirá las clases TB  
 inactiva de la CXR normal, porque resultados para todos ellos serían negativos. En esta solicitud, incluyendo las  
 reivindicaciones, tales resultados positivos están considerados con el fin de que signifiquen reconocimiento  
 serológico por parte de un antígeno. Buscando en las medianas los ESAT-6 y 16kDa, puede observarse que una  
 concentración ajustada de manera adecuada para el corte significará que un resultado positivo es consistente con la  
 45 TB inactiva pero inconsistente con ambas clases la TB activa y la CXR normal. En este caso un resultado negativo  
 no distinguirá las clases TB activa de la CXR normal.

Para que un resultado sea considerado positivo, cada primer reactivo antígeno debe conducir a la señal apropiada.  
 Por ejemplo, para que un ensayo sea considerado indicativo de la TB inactiva, de los antígenos enumeradas en la  
 50 Tabla 4, aquellos con un valor de momios (odds ratio) superior a 1 (OR) deben dar una señal "alta" y aquellos con un  
 OR por debajo de 1 deben dar una señal Baja (en el caso de 38kDa Ag una señal baja o Mediana); y de los  
 antígenos enumerados en la Tabla 5, todos deben dar una señal "Alta" con el fin de distinguir un estado de TB  
 inactiva de un estado de CXR normal.

55 Con el fin de mejorar la confianza en los resultados, se pueden incluir más antígenos, utilizar antígenos cuyo OR  
 difiere grandemente de más de 1,0, utilizar un valor alfa diferente o una combinación de dos o más de los anteriores.

Con la finalidad de desarrollar un ensayo de acuerdo con esta invención, se puede empezar con un grupo de  
 60 muestras de suero caracterizadas y un putativo conjunto serie de antígenos y obtener los datos de tal manera como  
 se muestra en la Tabla 3. Para subconjuntos o para todos los antígenos, se realiza entonces un análisis estadístico,  
 por ejemplo, el análisis discutido en relación con las Tablas 4 y 5. Con el fin de aportar otro antígeno "(antígeno X")  
 a la mezcla sin tener que generar los datos de la Tabla 3 para antígenos ya probados, simplemente se guardan las  
 muestras de suero originalmente utilizado y prueba el antígeno X contra ellas. Únicamente con esa prueba adicional  
 puede ser analizado estadísticamente un nuevo conjunto o nuevos subconjuntos con el fin de realizar la ampliación  
 65 de las Tablas 4 y 5. Puede realizarse de manera rutinaria la evaluación de otra proteína de *M. tuberculosis* para la  
 inclusión en los ensayos de esta invención de acuerdo con el ensayo y los procedimientos de análisis de datos

establecidos en el presente documento. Los procedimientos incluyen la medición de los niveles séricos de anticuerpos de acuerdo con el ELISA descrito en este documento, expresada convencionalmente como "densidad óptica" o absorbancia (como OD<sub>450</sub>), con la finalidad de obtener datos tales como los registrados en la Tabla 3, en donde las diferencias se consideran significativas solamente en  $p < 0,05$  con y sin control para múltiples comparaciones usando el enfoque Bonferroni; estimando modelos de regresión logística multivariada utilizando solamente aquellos antígenos identificados como estadísticamente significativos; y utilizando la eliminación regresiva para que los ratios de momios (odds ratio) estén asociados con todos y cada uno de los antígenos sean estadísticamente significativos (CI no incluyendo 1,0) utilizando un modelo o el otro tal y como se muestra en la Tabla 4.

En los ejemplos descritos más abajo está el trabajo con un panel inicial de ocho antígenos. Mientras que los resultados son impresionantes con este panel, ningún intento se ha hecho todavía para optimizar nuestro procedimiento de ensayo mediante el cambio del panel. Sin embargo, son conocidos muchos antígenos de la TB. Del trabajo divulgado con sueros de ratones, los primates y los seres humanos utilizando otros antígenos de la TB, tengo identificados varios candidatos para la evaluación en ensayos de acuerdo con esta invención. Estos incluyen Rv0440, Rv3881c y Rv2195 (Havlir D. V., et al (1991). Infect. Immun. 59, 665-670); Lodes, M. J. et al (2001) J Clin Microbiol 39, 2485-2493); Rv2495c, Rv2195, Rv2700 y Rv3763 (Bothamley (2003) Lancet 361, 2082); (Bothamley, G H. (2004) Clin Diagn Lab Immunol 11, 942-951); y Rv1837c y Rv3803c (Singh, K. K. et al (2005) Clin Diagn Lab Immunol 12, 354-358).

El trabajo experimental registrado en esta solicitud fue realizado con el suero de una población de personas especial y particularmente difícil. Los casos de TB más activos fueron negativos al analizarse por bacteria en frotis de esputo. Diagnosticar correctamente tales individuos mediante radiografía de tórax es muy difícil y requiere juicio subjetivo de un médico altamente calificado. Para este grupo de casos activos, los antígenos individuales son bastante ineficientes en la identificación de los casos activos en una población que incluye clases inactivas y CXR normal de la tuberculosis. Tal y como se muestra en la Tabla 6 y se describe a continuación, los antígenos indican los casos activos de manera correcta solamente el 6-15% de las veces. El ensayo de esta invención, incluyendo un panel que incluye ambos antígenos que correlacionan positivamente la TB inactiva y los antígenos que correlacionan negativamente la TB inactiva, lo hizo tres veces mejor, tanto como el 43% de las veces. Esta mejora es prácticamente significativa. Por ejemplo, si se utiliza para el control de los inmigrantes, casi la mitad de los casos de la TB activa que de lo contrario no serían detectados podrían ser detectados, utilizando incluso el panel de antígenos no optimizado probado inicialmente.

Los detalles de una o más realizaciones de la invención están establecidos en los dibujos adjuntos y en la descripción de más abajo. Otras características, objetos y ventajas de la invención serán evidentes de la descripción y los dibujos y de las reivindicaciones.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA

Las estrategias conocidas para los ensayos de anticuerpo del suero para la TB están caracterizados por una estrategia de búsqueda de respuestas positivas de uno o más que uno antígenos de la proteína de M. tuberculosis, mientras que la presente invención busca respuestas negativas así como la distinción de la TB inactiva de la TB activa y, preferiblemente, también de las clases CXR normal.

Incluido a continuación como parte de esta solicitud se encuentra un informe de trabajo experimental y análisis estadístico realizado bajo mi dirección. El informe presenta datos y análisis que apoyan y describen los aspectos de esta invención. Se describe el trabajo utilizando ocho diferentes proteínas de la TB conocidas como antígenos utilizando muestras de sueros de una población evaluada clínicamente de 353 sujetos humanos.

Los modelos fueron diseñados basándose en los análisis de resultados de ensayo (que se muestran en la Tabla 3), con el propósito de distinguir un estado de TB de otro calculando un ratio de momios (odds ratio) ("OR") y el intervalo de confianza ("CI") que el resultado fue indicativo de un estado como opuesto a otro estado. Fueron utilizados tres modelos analíticos para la regresión logística. Los modelos difieren en el valor de alfa utilizado. Los valores de alfa fueron seleccionados de acuerdo con el criterio de Bonferroni. Fueron utilizados dos modelos con la finalidad de distinguir la TB inactiva de la TB activa: el modelo 1, basado en los resultados para un antígeno dado que son significativos en alfa igual a 0,003; y el modelo 2, basado en los resultados para un antígeno dado que son significativos en alfa igual a 0,05. Un modelo fue usado con el fin de distinguir la TB inactiva de la radiografía de tórax normal: el modelo 3, basado en los resultados para un antígeno dado que son significativos para un valor de alfa igual a 0,003. (El valor alfa de 0,003 se obtiene por la división 0,05 entre 16, que es el producto de los números de antígenos en el panel (8) veces los estados para ser distinguido (2 en todos los casos)).

Consultando la tabla 4, el análisis presenta un ratio de momios (odds-ratio) (OR) para cada uno de los cinco antígenos utilizando el modelo 1 y el modelo 2. El análisis también presenta el intervalo de confianza calculado (CI). Un intervalo de confianza que incluye 1,0 indica una correlación que es demasiado ambigua. Utilizando el modelo 1 la CI para Rv2626c fue 0,2-0,8, que no es demasiado ambigua, pero utilizando el modelo 2 la CI fue 0,2-1,4, que es demasiado ambigua. Podrían obtenerse resultados inequívocos en la mayoría de los casos mediante la

dicotomización de los resultados simplemente en "Bajo" y "Alto" donde "Alto" significa la respuesta de anticuerpos fuerte y "Bajo" cuando no lo es. Sin embargo, en el caso del antígeno 38kDa, fue necesario utilizar el modelo 2 para tricotomizar los resultados en "Bajo", "Medio" y "Alto", donde solamente "Alto" significa una respuesta de anticuerpos fuerte para los propósitos de un ensayo de acuerdo con esta invención. La Tabla 4 muestra que el intervalo de confianza para los resultados "Medio" con el antígeno 38kDa fue 0,2-1,6, que fue ambiguo, mientras que el intervalo de confianza para los resultados "Alto" con el mismo antígeno fue 0,1-0,7, que no era ambiguo.

En el análisis presentado en la Tabla 4, un ratio odds mayor que 1 para los resultados "Alto" (donde el punto de "corte" para un resultado positivo debe ser establecido mayor que el límite superior del rango "Baja" o, si es tricotomizado, mayor que el límite superior del rango "Medio") indica resultados que son más propensos a ocurrir si la muestra es de alguien con TB inactiva que si la muestra es de alguien con TB activa. Cuanto mayor sea el OR, mayores los momios o probabilidad que esa sea el caso. Por el contrario, un OR para los resultados "Alto" que es de menos de 1,0 indica resultados son menos probables de ocurrir si la muestra es de alguien con TB inactiva que de alguien con TB activa. Este es el caso, por ejemplo, con AlaDH. Se puede ver en la Tabla 3 que para AlaDH un resultado positivo, diseñado para estar solamente en el rango "Alto" por un apropiado corte también diferencia las clases de la TB activa de la CXR normal. El análisis presentado en la Tabla 5 se interpreta de manera similar, aunque los resultados "Alto" indican siempre una muestra más probable de haber venido de alguien con TB inactiva que de alguien con un estado de radiografía de tórax normal (o por encima de 1,0 en todos los casos).

Comparando la Tabla 4 con la Tabla 5, debe ser señalado que dos de los antígenos probados, 16kDa y ESAT-6, aparecen en ambas Tablas. Para estos antígenos un resultado "Alto" indica que la muestra es más probable que sea TB inactiva debido a que tanto una TB activa o un estado (infección latente o libre de infección) carecen de anomalía radiográfica.

Debe ser entendido que la alta/baja o alta/media/baja son las categorías para cada anticuerpo que reflejan el NIVEL de respuesta, es decir, cuánto anticuerpo está presente en el suero. El ratio OR, mayor o menor que 1, indica que la probabilidad que una persona con un nivel de anticuerpo particular es tanto activa o inactiva (Tabla 4) y tanto inactiva o CXR normal (Tabla 5). Es decir, primero se realizan las categorías de nivel de anticuerpos y luego son analizados estadísticamente por correlación con un estado de la TB mediante la estimación del ratio de momios (odds ratio).

De la Tabla 4, he identificado las varias combinaciones de antígeno para los ensayos de acuerdo con esta invención con la intención de distinguir la TB inactiva de la TB activa. Utilizando el análisis del modelo 1 la combinación es Rv2626c, 16kDa y ESAT 6. Usando el análisis del modelo 2, las combinaciones son tres o más antígenos del grupo 16kDa, ESAT-6, AlaDH y 38kDa Ag, en donde al menos uno tiene un OR por encima de 1,0 y al menos uno tiene un OR por debajo de 1,0. Los ejemplos incluyen 16kDaAg, ESAT-6 y uno o ambos de AlaDH y 38kDa Ag; y AlaDH, Ag 38kDa y uno o ambos de 16kDa Ag y ESAT-6. De la Tabla 4 y la Tabla 5, un análisis preferente que incluye la diferenciación de la TB inactiva de los estados CRX normal incluiría asimismo los antígenos FdxA, ESAT-6, 16kDa Ag y uno o ambos de AlaDH y 38kDa Ag, es decir o cuatro o los cinco antígenos del grupo probado. El antígeno FdxA podría ser incluido como un antígeno adicional en cualquier combinación de estos. Más preferentes son los ensayos que incluyen al menos dos antígenos para diferenciar la TB inactiva desde los estados CRX normal, es decir, al menos dos de 16kDa Ag, ESAT-6 y FdxA.

## TRABAJO EXPERIMENTAL Y ANALISIS

### Materiales y métodos

**Población de estudio.** El estudio se realizó con muestras de suero almacenado obtenidas entre 1995 y 1998 de inmigrantes referentes al Montreal Chest Institute, Montreal, Canadá como sospechosos de TB y de personas nacidas en Canadá con la TB pulmonar. Se obtuvo consentimiento informado de los pacientes; en la realización de este trabajo fueron seguidas las directrices de la experimentación con seres humanos del US Department of Health and Human Services y/o de aquellas instituciones de los autores (Montreal Chest Institute Research Ethics Board y del New York University Institutional Review Board)

Se recolectaron sueros de cuatro grupos: (i) *tuberculosis activa*: 53 personas diagnosticadas como que tienen TB activa pulmonar, basado en la evaluación clínica y los datos microbiológicos (7 cultivos y frotis positivos, 31 cultivos positivos y frotis negativo y los restantes 15 negativos a ambas pruebas). (ii) *tuberculosis inactiva*: esta categoría fue definida por una respuesta positiva a la prueba cutánea de tuberculina (TST) (> 10 mm), anormal pero resultados estables de radiografía de tórax (CXR) consistentes con TB pasada y la ausencia de evidencia clínica, bacteriológica o radiográfica de la enfermedad actual (1). La TB inactiva fue diagnosticada en 218 personas, ninguna de las cuales tenía un historial de TB tratada. (iii) *TST positiva*: 32 sujetos fueron positivos a la TST (>10 mm) y tenían una radiografía de tórax normal y (iv) *TST negativa*: 50 sujetos del estudio fueron negativos a la TST.

**Antígenos.** Fueron seleccionadas proteínas de *M. tuberculosis* tanto debido a que eran conocidas por generar respuestas a los anticuerpos, por ejemplo, 38kDa Ag (8), ESAT-6 (22), glutamina sintasa (GluS) (9), alanina deshidrogenasa (AlaDH) (11), superóxido dismutasa A (SodA) (30), 16kDa Ag (29) o bien porque se esperaba que

ellas expresarán preferencialmente en bacilos non replicantes. El antígeno conocido en el presente documento como "16kDa" es el producto del gen rv2031c y a veces se ha referido a él la literatura como "14kDa". "El Ag 16k Da ( $\alpha$ -cristalino, Acr), ferredoxina A (FdxA) y Rv2626c están todos ellos codificados mediante los genes encontrados en la también conocida como regulon dormancia (dosR) (18, 25). Las proteínas de *M. tuberculosis* fueron expresadas como productos recombinantes en *Escherichia coli* y purificadas a cerca de homogeneidad mediante la cromatografía en columna secuencial, tal y como está descrito (5). Para mayor claridad, puede ser útil correlacionar los antígenos con los genes que los producen. Esta correlación es: Antígeno 16kDa, gen rv 2031 c; ESAT-6, gen rv 3875; AlaDH, gen rv 2780; 38kDa, gen rv 0934; FDXa, gen rv2007c.

**Ensayo de inmuno absorción ligado a enzimas (ELISA).** Fueron recubiertas placas de microtitulación de poliestireno de 96 pocillos (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) a 4° C durante la noche con 2,0  $\mu$ g/ml (0,2 ml/pocillo) del antígeno purificado en tampón carbonato-bicarbonato (pH 9,6). Las placas fueron bloqueadas con 1% de leche descremada sin grasa en solución salina con tampón fosfato (pH 7,4) que contenía 0,05% de Tween 20 (PBS-T) durante 3 h a 37° C y lavadas dos veces con PBS-T. El suero fue diluido 1:50 en PBS-T que contenía 1% de leche descremada y 0,2 ml de suero diluido fue añadido a los pocillos recubiertos con antígeno por duplicado y fue incubado durante 30 min a 37 ° C. Los sueros de control positivo y negativo fueron incluidos por duplicado para controlar las variaciones inter - e intra - función. Después del lavado con PBS-T, las placas fueron incubadas con 0,2 ml/pocillo de conjugado de cabra anti-humano IgG con peroxidasa de rábano (Dako, Glostrup, Dinamarca) diluido 1: 20.000 en PBS-T mas 1% de leche descremada durante 30 min a 37 ° C. Las placas fueron lavadas con PBS-T, y la actividad enzimática fue probada mediante la incubación durante 30 min a temperatura ambiente con 0,2 ml/pocillo del kit de sustrato de peroxidasa TMB (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Las reacciones fueron detenidas mediante la adición de 0,05 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N. Fue medida la densidad óptica a 450 nm (OD<sub>450</sub>) con un lector de micro placas automático (Spectra Shell, Tecan Systems Inc., San José, CA, USA).

**Análisis de los datos serológicos.** Se utilizaron pruebas de ji-cuadrado ( $\chi^2$ ) para evaluar las asociaciones entre la demografía y las categorías de diagnóstico. Las comparaciones de las respuestas del anticuerpo por estado de la tuberculosis se realizaron usando pruebas no paramétricas, tales como la suma de rango de Wilcoxon para dos variables independientes y la prueba de Kruskal-Wallis para tres o más variables independientes.

Un modelo de regresión logística fue estimado por separado para los casos de la TB activa vs la TB inactiva y para CXR normal (es decir, para los sujetos que no tenían signos radiográficos de TB activa o inactiva) vs los casos de la TB inactiva vía la eliminación regresiva de un modelo completo que contenía las respuestas de los anticuerpos identificadas como estadísticamente significativas mediante el análisis descrito en el párrafo anterior, ajustando para la vacunación de BCG (Bacillus de Calmette y Guérin) y la región del origen en el Mundo. Los resultados de los anticuerpos fueron dicotomizados en las categorías "bajo y alto" de acuerdo con ser superiores o inferiores a la mediana o tricotomizados en "bajo, medio y alto" de acuerdo con los textiles de la distribución de anticuerpos. El enfoque de modelado inicial utilizó una parametrización de los anticuerpos tricotomizados; cuando las diferencias en riesgo eran pequeñas entre dos categorías de anticuerpos contiguas, fue seleccionada una parametrización de dicotomizados.

## Resultados

*Características de la población de estudio.* Los 353 sujetos incluidos en el estudio fueron divididos en cuatro categorías --TB activa, TB inactiva, infección latente por *M. tuberculosis* (TST positivo) y libre de infección por *M. tuberculosis* (TST negativo) -- (Tabla 1). Las características demográficas de la población del estudio se describen en la Tabla 2. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas por la prueba de ji-cuadrado entre las cuatro categorías de diagnósticos para los factores asociados con el riesgo de tuberculosis (1), tanto con el grupo de edad ( $p = 0,29$ ), género ( $p = 0,07$ ), país de origen ( $p = 0,12$ ), estado de vacunación con *M. bovis* BCG (Bacillus de Calmette y Guérin) ( $p = 0,19$ ) o años en Canadá (menos de 1, mayor que 1;  $p = 0,53$ ).

*La distribución de los niveles de anticuerpos.* Se midieron los niveles de suero de los anticuerpos específicos IgG mediante ELISA y expresados como OD<sub>450</sub>. Sólo el anticuerpo Rv2626c fue aproximadamente normal después de transformación de registro (datos no mostrados). Por lo tanto, las mediciones de los ELISA de los niveles de anticuerpos en el suero para todos los 353 sujetos están presentados como mediana y rango (mínimo y máximo) (Tabla 3).

Las comparaciones de las distribuciones de anticuerpos se realizaron mediante métodos estadísticos no paramétricos, tales como la suma de rango de Wilcoxon y la prueba de Kruskal-Wallis, en lugar de ANOVA unidireccional, que requiere una asunción de normalidad. No se encontró ninguna diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de la TST positiva y la TST negativa para cualquiera de los anticuerpos considerado ( $p > 0,50$  para todos) (los datos no están mostrados). Este resultado está de acuerdo con la idea de que la infección latente *per se* falla para proporcionar suficiente estímulo antigénico para provocar una respuesta de anticuerpos fuerte (3, 12, 24). De esta manera, estas dos categorías fueron combinadas para su subsecuente análisis en un grupo único, radiográfico normal ("CXR normal"), independientemente de la infección de *M. tuberculosis*.

Las respuestas del anticuerpo fueron analizadas por estado, es decir, TB activa, TB inactiva y CXR normal; las

diferencias entre los estados fueron encontradas ser estadísticamente significativa en  $p < 0,05$  para todos los anticuerpos. El hallazgo de que los grupos de la TB inactiva y CXR normal fueron serológicamente distinguibles fuertemente implica que las personas que tienen tuberculosis inactiva son más capaces de soportar una mayor carga de antígeno que aquellos que tienen la infección latente sin anomalías CXR. Esta interpretación es consistente con el mayor riesgo de reactivación de la enfermedad asociada con la TB inactiva que con la infección latente con CXR normal (6, 7, 16).

En las comparaciones *post-hoc*, la significancia estadística fue declarada en un alfa de 0,003, tal modo controlando para comparaciones múltiple con el método de Bonferroni (8 antígenos y 2 comparaciones entre estados de la enfermedad implica  $\alpha = 0,003 \approx 0,05 / [8 \times 2]$ ). La tuberculosis inactiva fue tomada arbitrariamente como el estado de referencia para este análisis (Tabla 3). Los anticuerpos a AlaDH, 38kDa Ag, ESAT-6 y 16kDa Ag distinguían la TB inactiva de ambas, la TB activa y el estado CXR normal. El anticuerpo a Rv2626c distinguía la TB inactiva de la TB activa, mientras que el anticuerpo a FdxA distinguía la TB inactiva del estado CXR normal. No se encontraron diferencias en los niveles de anticuerpos a SodA y GluS en los tres estados (datos no mostrados). Por lo tanto estos dos anticuerpos fueron excluidos de análisis adicionales.

Los resultados de la regresión logística. Debido a que los perfiles de anticuerpo diferenciaron entre los tres estados de la TB (TB activa, TB inactiva y CXR normal), fueron estimados modelos de regresión logística para predecir el estado de la TB como una función de los anticuerpos identificados como estadísticamente significativos en el análisis presentado en la figura 3. La eliminación regresiva fue utilizada para todos los modelos. Fueron estimados dos modelos de la TB inactiva vs la TB activa: el modelo 1 fue basado en los anticuerpos identificados como estadísticamente significativos en  $\alpha = 0,003$ , y el modelo 2 fue basado en los anticuerpos identificados como estadísticamente significativos en  $\alpha = 0,05$  (Tabla 4). De acuerdo con el modelo 1, los altos niveles de anticuerpos a 16kDa Ag y ESAT-6 y los niveles bajos de anticuerpos a Rv2626c aumentaron las probabilidades de la TB inactiva en comparación con la TB activa. El modelo 2 indicó adicionalmente que los bajos niveles de anticuerpos a AlaDH y 38kDa Ag aumentan las probabilidades de la TB inactiva sobre la TB activa. Con el último modelo, la contribución del anticuerpo a Rv2626c perdió la significación estadística.

Un solo modelo se estimó para la TB inactiva vs CXR normal (modelo 3), debido a que para esa comparación todos los anticuerpos fueron estadísticamente significativos tanto en  $\alpha = 0,003$  y en  $\alpha = 0,05$  (Tabla 5). De acuerdo con el modelo 3, los niveles altos de anticuerpos 16kDa Ag, ESAT-6 y FdxA incrementan las probabilidades de la TB inactiva vs CXR normal. Una tendencia de incremento de probabilidad fue detectada en las tres categorías de los niveles de anticuerpos, reforzando aún más los resultados de esta comparación.

Los perfiles de los anticuerpos asociados con la TB inactiva diferían de aquellos asociados con la TB activa, sugiriendo fuertemente que los objetivos de la respuesta de los anticuerpos durante la infección latente difieren de aquellos que ocurren durante la enfermedad activa. Estos datos muestran que, en los seres humanos, cada estado de la tuberculosis está caracterizado por las firmas de antígenos bacterianos. Estas firmas reúnen "códigos de barras", es decir, combinaciones particulares de *simulación* y *ausencia* de marcadores específicos del antígeno. La idea de los códigos de barras revela una falla en las estrategias actuales de desarrollo para el inmuno diagnóstico de la TB, que se han estado basadas únicamente en marcadores que se identifican *positivamente* asociados a un estado en particular.

Otros aspectos de los perfiles de anticuerpos generados en el estudio son menos directos. Los perfiles de anticuerpos a los 16kDa Ag, FdxA y Rv2626c son específicos para los estados diferentes de la tuberculosis. Sin embargo, estos tres antígenos están codificados por los genes (*acr*, *fdxA* y *rv2626c*) que son miembros del mismo regulon "dormancia" (18, 25). Los perfiles de anticuerpo diferentes a estos antígenos son por lo tanto sugestivos de regulación diferencial de estos genes bacterianos en seres humanos o de diferencias en la inmuno dominancia relativa, la afinidad del anticuerpo o la regulación inmune. Por ejemplo, a diferencia de FdxA y el 16kDa Ag, Rv2626c puede no alcanzar los niveles de umbral para la producción de los anticuerpos en la TB inactiva, convirtiéndose de esta manera detectable solamente en la TB activa, que está asociada con una mayor carga bacteriana. Más intrigante, la detección de los anticuerpos a FdxA y Rv2626c en la TB activa indica suficiente estímulo antigénico, sugiriendo que la carencia concurrente de respuestas de anticuerpo al 16kDa Ag es probable debido tanto a una regulación selectiva de *acr* en microambientes particulares de anfitrión humano o bien a un fallo de este antígeno para provocar la producción de anticuerpos en las formas de la enfermedad caracterizadas por el crecimiento de tubérculo de bacilos en baja multiplicidad [los casos de tuberculosis más activos en el presente estudio tuvieron frotis negativo, enfermedad pulmonar]. Una interpretación similar puede ser dada a los datos sobre el anticuerpo anti-ESAT-6, que se correlaciona fuertemente con la TB inactiva. De hecho, los anticuerpos anti-16kDa-Ag y anti-ESAT-6 correlacionan uno con cada otro (datos no mostrados).

El presente estudio tiene algunas limitaciones. Una está ligada a la composición del banco de suero, que fue caracterizado por demografías muy diversas y por un gran predominio de casos de TB inactiva. Otra es que el actual análisis fue limitado a sólo ocho perfiles de anticuerpo. Sin embargo, filtrando estadísticamente los datos serológicos con la prueba de Kruskal-Wallis con el fin de seleccionar los anticuerpos para el uso en modelos de regresión logística subsecuentes utiliza una estrategia que puede ser empleada con una muy amplia cantidad de anticuerpos, tales como aquellos como los que podrían detectarse por el uso de micro matrices de proteínas de *M. tuberculosis*.

Además, las correlaciones medidas entre los perfiles de anticuerpos y el estado de la tuberculosis en el presente estudio tendrán que ser validadas en poblaciones independientes.

La identificación de los perfiles inmunes de las características de estado de la tuberculosis sugiere esa progresión de *M. tuberculosis* latente a infección activa, que presumiblemente está acompañada por la multiplicación bacteriana resumida, puede estar también acompañada por cambios de la composición antigénica bacteriana. De esta manera, asintóticamente, los individuos infectados que están progresando hacia la reactivación de la enfermedad pueden ser serológicamente distinguibles de aquellos que no lo están. La identificación de "progresores" a través de pantallas inmunológicas ayudaría grandemente al objetivo del tratamiento de la tuberculosis latente.

## Referencias

1. American Thoracic Society. 2000. Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children. *Am J Respir Crit Care Med* 161:1376-95.
2. Bifani, P. J., B. Mathema, N. E. Kurepina, and B. N. Kreiswirth. 2002. Global dissemination of the *Mycobacterium tuberculosis* W-Beijing family strains. *Trends Microbiol* 10:45-52.
3. Bothamley, G. H. 1995. Serological diagnosis of tuberculosis. *Eur. Respir. J.* 8, suppl. 20:676s-688s.
4. Bothamley, G. H., J. S. Beck, R. C. Potts, J. M. Grange, T. Kardjito, and J. Ivanyi. 1992. Specificity of antibodies and tuberculin response after occupational exposure to tuberculosis. *J Infect Dis* 166:182-6.
5. Colangeli, R., A. Heijbel, A. Williams, C. Manca, J. Chan, K. Lyashchenko, and M. L. Gennaro. 1998. Three-step purification of lipopolysaccharide-free, polyhistidine-tagged recombinant antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Chromatogr. B* 714:223-235.
6. Grzybowski, S., N. McKinnon, L. Tuters, G. Pinkus, and R. Philipps. 1966. Reactivation in inactive pulmonary tuberculosis. *Am Rev Resp Dis* 93:352-360.
7. Grzybowski, S., H. Fishaut, J. Rowe, and A. Brown. 1971. Tuberculosis among patients with various radiologic abnormalities, followed by the chest clinic service. *Am Rev Resp Dis* 104:605-608.
8. Harboe, M., and H. G. Wiker. 1992. The 38-kDa protein of *Mycobacterium tuberculosis*: a review. *J. Infect. Dis.* 166:874-884.
9. Harth, G., D. L. Clemens, and M. A. Horwitz. 1994. Glutamine synthetase of *Mycobacterium tuberculosis*: extracellular release and characterization of its enzymatic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:9342-6.
10. Honer zu Bentrup, K., and D. G. Russell. 2001. *Mycobacterial* persistence: adaptation to a changing environment. *Trends Microbiol* 9:597-605.
11. Hutter, B., and M. Singh. 1999. Properties of the 40 kDa antigen of *Mycobacterium tuberculosis*, a functional L-alanine dehydrogenase. *Biochem J* 343 Pt 3:669-72.
12. Kaplan, M. H., and M. W. Chase. 1980. Antibodies to mycobacteria in human tuberculosis. I. Development of antibodies before and after antimicrobial therapy. *J Infect Dis* 142:825-34.
13. Manca, C., L. Tsenova, C. E. Barry, 3rd, A. Bergtold, S. Freeman, P. A. Haslett, J. M. Musser, V. H. Freedman, and G. Kaplan. 1999. *Mycobacterium tuberculosis* CDC1551 induces a more vigorous host response in vivo and in vitro, but is not more virulent than other clinical isolates. *J Immunol* 162:6740-6.
14. McKinney, J. D., K. Honer zu Bentrup, E. J. Munoz-Elias, A. Miczak, B. Chen, W. T. Chan, D. Swenson, J. C. Sacchetti, W. R. Jacobs, Jr., and D. G. Russell. 2000. Persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase. *Nature* 406:735-8.
15. Monack, D. M., A. Mueller, and S. Falkow. 2004. Persistent bacterial infections: the interface of the pathogen and the host immune system. *Nat Rev Microbiol* 2:747-65.
16. Nolan, C., and E. AM. 1988. Tuberculosis in a cohort of Southeast Asian refugees. *Am Rev Resp Dis* 137:805-809.
17. Segal, W. 1984. Growth dynamics of in vivo and in vitro grown mycobacterial pathogens, p. 547-573. In G. P. Kubica and L. G. Wayne (ed.), *The Mycobacteria. A sourcebook*. Marcel Dekker, Inc., New York.
18. Sherman, D. R., M. Voskuil, D. Schnappinger, R. Liao, M. I. Harrell, and G. K. Schoolnik. 2001. Regulation of the *Mycobacterium tuberculosis* hypoxic response gene encoding alpha-crystallin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:7534-9.
19. Shi, L., Y. J. Jung, S. Tyagi, M. L. Gennaro, and R. J. North. 2003. Expression of Th1-mediated immunity in mouse lungs induces a *Mycobacterium tuberculosis* transcription pattern characteristic of nonreplicating persistence. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:241-6.
20. Shi, L., R. North, and M. Gennaro. 2004. Effect of growth state on transcription levels of genes encoding major secreted antigens of *Mycobacterium tuberculosis* in mouse lung. *Infect. Immun.* 72:2420-2424.
21. Silva, V. M. C., G. Kanaujia, M. L. Gennaro, and D. Menzies. 2003. Factors associated with humoral response to ESAT-6, 38kDa and 14kDa antigens in patients with a spectrum of tuberculosis. *Int. J. Tub. Lung Dis* 7:478-484.
22. Sørensen, A. L., S. Nagai, G. Houen, P. Andersen, and Å. B. Andersen. 1995. Purification and characterization of a low-molecular-mass T-cell antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 63:1710-1717.
23. Stewart, G. R., B. D. Robertson, and D. B. Young. 2003. Tuberculosis: a problem with persistence. *Nat Rev Microbiol* 1:97-105.



24. Turneer, M., J. P. Van Vooren, J. De Bruyn, E. Serruys, P. Dierckx, and J. C. Yernault. 1988. Humoral immune response in human tuberculosis: immunoglobulins G, A, and M directed against the purified P32 protein antigen of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin. *J Clin Microbiol* 26:1714-9.

25. Voskuil, M. I., D. Schnappinger, K. C. Visconti, M. I. Harrell, G. M. Dolganov, D. R. Sherman, and G. K. Schoolnik. 2003. Inhibition of respiration by nitric oxide induces a *Mycobacterium tuberculosis* dormancy program. *J Exp Med* 198:705-13.

26. Wayne, L. G. 1994. Dormancy of *Mycobacterium tuberculosis* and latency of disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 13:908-14.

27. Weber, I., C. Fritz, S. Ruttkowski, A. Kreft, and F. C. Bange. 2000. Anaerobic nitrate reductase (narGHJ) activity of *Mycobacterium bovis* BCG in vitro and its contribution to virulence in immunodeficient mice. *Mol Microbiol* 35:1017-25.

28. Wilkins, E. G. L. 1994. The serodiagnosis of tuberculosis. p. 367-380. In P. D. O. Davies (ed.), *Clinical tuberculosis*. Chapman and Hall Medical, London.

29. Wilkinson, R. J., K. A. Wilkinson, K. A. De Smet, K. Haslov, G. Pasvol, M. Singh, I. Svarcova, and J. Ivanyi. 1998. Human T- and B-cell reactivity to the 16kDa alpha-crystallin protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Scand J Immunol* 48:403-9.

30. Zhang, Y., R. Lathigra, T. Garbe, D. Catty, and D. Young. 1991. Genetic analysis of superoxide dismutase, the 23 kilodalton antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Microbiol.* 5:381-391.

31. Zuber, P., M. McKenna, N. Binkin, I. Onorato, and K. Castro. 1997. Long-term risk of tuberculosis among foreignborn persons in the United States. *JAMA* 278:304-307.

**Tabla 1. Diagnóstico con respecto al estado de TB**

Diagnóstico	Frecuencia	Porcentaje
TB activa	53	15.0
TB Inactiva	218	61.8
TST positiva	32	9.1
TST negativa	50	14.2
Total	353	100.0

Las definiciones de diagnóstico son proporcionadas por *Materials and Methods*. TB, tuberculosis; TST, tuberculin skin test (prueba de tuberculina en la piel)

**Tabla 2. Demografías**

Categoría	Frecuencia	Porcentaje
<i>Edad</i>		
25 y menos	29	8.2
25 a 34 años	106	30.0
35-44	88	24.9

(continuación)

<b>Categoría</b>	<b>Frecuencia</b>	<b>Porcentaje</b>
<i>Edad</i>		
45-54	40	11.3
55 y mayores	90	25.5
<i>Género</i>		
Mujeres	126	35.7
<b>Hombres</b>	<b>227</b>	<b>64.3</b>
<i>Región de nacimiento en el Mundo</i>		
Canadá y Europa Occidental	31	8.8
Europa oriental	30	8.5
África y Oriente Medio	67	19.0
Sur de Asia	83	23.5
Sudeste de Asia	62	17.6
Caribe y América Latina	80	22.7
<i>Años en Canadá*</i>		
Menos de 1 año	233	66.0
Mas de 1 año	76	21.5
No disponible o desconocido	44	12.5
<i>Vacuna BCG **</i>		
No	169	47.9
Desconocido	76	21.5
Si	108	30.6
<b>Total</b>	<b>353</b>	<b>100.0</b>
*Una marca de un año fue seleccionada debido a que existe una evidencia sustancial de que ocurre una gran proporción de TB entre inmigrantes nada más llegar al nuevo país (31)		

**Tabla 3. Mediana sin ajustar de respuestas de anticuerpos por estado de la enfermedad**

Antígeno	Estado de la enfermedad	Mediana	Rango		Valor p
			min	max	
Rv2626c	Activa	0.245	0.09	1.09	< 0.001**
	Inactiva	0.178	0.02	1.38	n.a.
	CXR normal	0.185	0.02	1.15	0.356
FdxA	Activa	0.176	0.06	1.76	0.284
	Inactiva	0.164	0.01	1.95	n.a.
	CXR normal	0.107	0.02	0.81	< 0.001**
AlaDH	Activa	0.199	0.07	1.23	0.005*
	Inactiva	0.140	0.01	3.56	n.a.
	CXR normal	0.106	0.01	1.08	0.001**
38kDa Ag	Activa	0.510	0.01	3.90	0.020*
	Inactiva	0.260	0.01	3.99	n.a.
	CXR normal	0.155	0.01	2.01	0.002**
ESAT-6	Activa	0.090	0.01	3.86	< 0.001**

(continuación)

Antígeno	Estado de la enfermedad	Mediana	Rango		Valor p
			min	max	
	Inactiva	0.210	0.02	3.98	n.a.
	CXR normal	0.065	0.01	2.26	< 0.001**
16kDa Ag	Activa	0.050	0.01	3.81	< 0.001**
	Inactiva	0.140	0.01	3.60	n.a.
	CXR normal	0.050	0.01	0.58	< 0.001**

Los valores de mediana y rango (mínimo y máximo) son mostrados debido a que las distribuciones de anticuerpos no estaban normalmente distribuidas. Los valores p que comparan TB activa a TB inactiva y CXR normal a TB inactiva estaban basados en la prueba de Kruskal-Wallis. , n.a. no aplicable.

•Denota las diferencias que son estadísticamente significativas a alfa= 0,05

\*\*Denota las diferencias que son estadísticamente significativas a alfa=0,003

Alfa fue seleccionado de acuerdo con el criterio Bonferroni, puesto que el análisis incluyó ocho anticuerpos y dos comparaciones: inactiva vs. activa e inactiva vs. CXR normal [0,003 ~ 0,5 / (2 x 8)].

**Tabla 4. Modelos de TB inactiva vs TB activa, ajustados para estado de vacunación BCG y lugar de nacimiento**

Anticuerpo a	Categoría	Rango	OR [CI]: Modelo 1	OR [CI]: Modelo 2
16kDa Ag	Bajo	≤0.11	1.0 (Ref.)	1.0 (Ref.)
	Alto	0.12-3.81	5.5 [2.4, 12.5]	7.3 [3.0, 17.9]
Rv2626c	Bajo	≤0.19	1.0 (Ref.)	1.0 (Ref.)
	Alto	0.19-1.38	0.4 [0.2, 0.8]	0.6 [0.2, 1.4]
ESAT-6	Bajo	≤0.15	1.0 (Ref.)	1.0 (Ref.)
	Alto	0.15, 3.98	3.0 [1.4, 6.6]	2.7 [1.2, 6.1]
AlaDH	Bajo	≤0.15	n.a.	1.0 (Ref.)
	Alto	0.15-3.56	n.a.	0.3 [0.1, 0.7]
38kDa Ag	Bajo	≤0.14	n.a.	1.0 (Ref.)
	Medio	0.14-0.49	n.a.	0.6 [0.2, 1.6]
	Alto	0.50-3.99	n.a.	0.3 [0.1, 0.7]

5 Los resultados de los ELISA fueron divididos aproximadamente en categorías "bajo y alto" de acuerdo con ser superiores o inferiores que la mediana o divididos en "baja, media y alta" de acuerdo con los terciles de la distribución de anticuerpos.

10 El Modelo 1 está basado en una eliminación regresiva de un modelo usando solamente los anticuerpos significativos en alfa = 0,003 en la Tabla 3; El Modelo 2 está derivado de una eliminación regresiva desde un modelo que utiliza anticuerpos significativos en alfa = 0,05 en la Tabla 3.

OR, odds-ratio (ratio de momios); CI, intervalo de confianza; Ref., rango de referencia; n.a., no es aplicable.

**Tabla 5. Modelos de TB inactiva vs. CR normal, ajustados para estado de vacunación BCG y lugar de nacimiento**

Anticuerpo a	Categoría	Rango	OR [CI]: Modelo 3	Prueba para tendencia
16kDa Ag	Bajo	≤0.06	1.0 (Ref.)	P < 0.001
	Medio	0.07, 0.14	4.0 [1.9, 8.5]	
	Alto	0.15, 3.60	11.7 [4.9, 34.0]	
ESAT-6	Bajo	≤0.09	1.0 (Ref.)	

(continuación)

Anticuerpo a	Categoría	Rango	OR [CI]: Modelo 3	Prueba para tendencia
	Medio	0.09-0.2	1.9 [0.8, 4.1]	P = 0.001
	Alto	0.2-4.0	5.9 [2.0, 17.6]	
FdxA	Bajo	≤0.11	1.0 (Ref.)	P = 0.016
	Medio	0.11-0.19	1.5 [0.7, 3.2]	
	Alto	0.19-1.95	2.8 [1.2, 6.4]	

15 Los resultados de los ELISA fueron tricotomizados en las categorías "bajo, medio y alto" de acuerdo con los terciles de distribución de los anticuerpo totales. El modelo 3 basado en la eliminación regresiva de los anticuerpos encontrados significativos en alfa = 0,003 en la Tabla 3.

20

Basado en los análisis anteriores, la evaluación fue realizada para comparar los resultados de llevar a cabo los ELISA descritos más arriba con los antígenos individuales o en el panel de ocho antígenos probado. Las predicciones de un sujeto basadas en modelos fueron obtenidas mediante la sustitución de los valores de anticuerpos del sujeto en el modelo de regresión logística estimado y mediante resolviendo la probabilidad del resultado de interés, es decir, la probabilidad de ser diagnosticado con TB inactiva. Si esta probabilidad excede el 50%, entonces está hecha la predicción de la TB inactiva; de lo contrario, la predicción es el diagnóstico alternativo.

25

"TB activa solamente" indica el porcentaje de sujetos con la TB activa que se predijo correctamente que tenían la TB activa y "CXR normal solamente" es el porcentaje de sujetos con CXR normal que se predijeron correctamente que tenían una clase CXR normal. Los resultados están presentados en la Tabla 6.

30

**Tabla 6. Concordancia entre predicciones y observaciones**

Modelo	Concordancia, %	
	Solo TB activa	Solo CXR normal
<b>Modelo 1</b>	35.8	<b>Modelo 3</b> 57.3
<b>Modelo 2</b>	43.4	FdxA solamente 9.8
Rv2626c solamente	5.7	ESAT-6 sol.te. 58.5
ESAT-6 solamente	11.3	14kDa Ag sol.te. 62.2
14kDa Ag solamente	15.1	
AlaDH solamente	13.2	
38kDa Ag solamente	11.3	

5 Refiriéndose al lado derecho de la Tabla 6 se verá que el panel elegido no lo hizo mejor que los antígenos individuales ESAT-6 ó 16kDa, incluso aunque el panel contenga ambos. La razón es que los anticuerpos contra estos antígenos tienden a ir juntos. De acuerdo con esto, combinando dos antígenos cuyo enlace se correlaciona con la TB inactiva proporcionó poca mejoría. Refiriéndose al lado izquierdo de la Tabla 6, se verá que el panel elegido lo hizo mucho mejor que cualquier antígeno individual en la identificación de casos activos.

10 Se han descrito varias realizaciones de la invención. No obstante, se entenderá que podrán realizarse varias modificaciones sin apartarse del ámbito de las siguientes reivindicaciones.

**REIVINDICACIONES**

- 5
1. Un ensayo para los anticuerpos de la tuberculosis en una muestra de suero humano que es capaz de distinguir la tuberculosis activa de la tuberculosis inactiva, que comprende:
- (a) Exposición de los anticuerpos en la muestra a por lo menos tres diferentes antígenos de proteína de *M. tuberculosis* separadamente inmovilizados en diferentes lugares, en donde los tres diferentes antígenos *M. tuberculosis* incluyen:
- 10 (i) por lo menos un antígeno de un primer tipo cuyo reconocimiento serológico es consistente con la tuberculosis inactiva pero no la tuberculosis activa,  
(ii) por lo menos un antígeno de un segundo tipo cuyo reconocimiento serológico es consistente con la tuberculosis activa pero no la tuberculosis inactiva y  
15 (iii) por lo menos uno antígeno adicional seleccionado del grupo formado por el primero y el segundo tipo,
- (b) Detección de la presencia o ausencia de anticuerpos séricos a dichos antígenos y (c) La determinación de una firma de antígenos bacterianos de la muestra como una combinación de la presencia y la ausencia de respuestas de anticuerpos ambiguas en donde la firma es una indicación de que la muestra es más que probable que contenga anticuerpos de la TB inactiva o la TB activa.
- 20
2. El ensayo de acuerdo con la reivindicación 1 que incluye al menos un antígeno del primer tipo seleccionado del grupo consistente del antígeno 16kDa (producto del gen rv2031 c) y el antígeno ESAT-6 (producto del gen rv 3875).
- 25
3. El ensayo de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2 que incluye por lo menos un antígeno del segundo tipo seleccionado en el grupo formado por el antígeno Rv2626c, el antígeno AlaDH (producto del gen rv 2780) y el antígeno 38kDa (producto de gen rv 0934).
- 30
4. El ensayo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 3 que incluye por lo menos dos antígenos del primer tipo y por lo menos dos antígenos del segundo tipo.
- 35
5. El ensayo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 4 que incluye por lo menos tres antígenos de un tercer tipo cuyo reconocimiento serológico es compatible con la tuberculosis inactiva y la TB activa pero no con las muestras de la tuberculosis latente o libre de infección, en donde las señales fuertes con los dichos por lo menos tres antígenos del tercer tipo es una indicación de que la muestra contiene con toda seguridad anticuerpos para la tuberculosis activa o la tuberculosis inactiva que la tuberculosis latente o que es una muestra libre de infección.
- 40
6. El ensayo de la reivindicación 5 en donde por lo menos un antígeno del tercer tipo también es un antígeno del primer tipo.
- 45
7. El ensayo de la reivindicación 5 ó 6 en donde los antígenos del tercer tipo incluyen por lo menos un antígeno seleccionado desde el grupo formado por el antígeno 16kDa, el antígeno ESAT-6 y el antígeno FdxA (producto del gen rv 2007c).