

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 584 871**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/569** (2006.01)

**C07K 14/35** (2006.01)

**A61K 39/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.05.2007 E 07724975 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.06.2016 EP 2142931**

54 Título: **Método para el diagnóstico de la tuberculosis**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**29.09.2016**

73 Titular/es:

**PRIONICS AG (100.0%)  
Waigstrasse 27a  
CH-8952 Schlieren, CH**

72 Inventor/es:

**OESCH, BRUNO;  
SCHILLER, IRENE y  
VORDERMEIER, MARTIN**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 584 871 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

Método para el diagnóstico de la tuberculosis

- 5 La invención se refiere a un método para el diagnóstico de la tuberculosis, en especial de la tuberculosis bovina, mediante ensayos de detección de la respuesta inmunológica celular y de detección de anticuerpos en animales, incluyendo seres humanos.
- La tuberculosis está provocada por micobacterias que pertenecen al grupo del complejo de micobacterias de la tuberculosis (MTC), que comprende *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), *Mycobacterium caprae* (*M. caprae*), *Mycobacterium africanum* (*M. africanum*), *Mycobacterium microti* (*M. microti*) y *Mycobacterium pinnipedii*.
- 10 En los métodos que forman la invención se analizan muestras, en especial muestras de sangre, procedentes de un ser humano o de un animal, para la presencia de una respuesta inmunológica mediada por células a antígenos micobacterianos o a anticuerpos micobacterianos, respectivamente, y la presencia de una respuesta inmunológica mediada por células o de anticuerpos se toma como una indicación de la tuberculosis.
- 15 Los métodos conocidos comprenden incubar una muestra de sangre procedente de un animal con antígenos micobacterianos, y detectar la presencia de una respuesta inmunológica mediada por células que resulta de la incubación, o detectar anticuerpos contra antígenos micobacterianos, respectivamente.
- 20 El documento EP 0 296 158 describe un método para el diagnóstico de infecciones, que incluyen la tuberculosis, en muestras procedentes de seres humanos o animales. En una primera etapa, una muestra de sangre completa procedente de un ser humano o animal probablemente infectado se incuba con antígenos micobacterianos, por ejemplo, un derivado de la proteína de la tuberculina purificado (PPD). Después de la incubación, la muestra se analiza para detectar la presencia de gamma-interferón (IFN- $\gamma$ ) liberado por linfocitos sensibilizados para indicar una respuesta inmunológica mediada por células al antígeno.
- El PPD tiene una alta sensibilidad, aunque su especificidad es limitada. Por tanto, se han intentado identificar otros reactivos de ensayo de la tuberculosis adecuados para los ensayos.
- 25 El documento EP 0 408 625 describe ensayos de anticuerpos y celulares que emplean la proteína MPB-70 de *Mycobacterium bovis* como antígeno.
- Los documentos US 2006/0115847 y WO 2006/117538 describen diferentes péptidos, que pueden utilizarse como antígenos en ensayos celulares y que se seleccionan principalmente por su propiedad para distinguir entre una infección por tuberculosis y una vacunación con una cepa de BCG.
- 30 Por último, el documento EP 0 706 571 describe el uso de un antígeno denominado ESAT-6, y el documento WO2004/099771 describe el uso de un antígeno denominado CFP-10 en ensayos para el diagnóstico de la tuberculosis.
- 35 ESAT-6 y CFP-10 son, hasta la fecha, los antígenos más inmunogénicos con una especificidad superior, comparado con PPD, para estimular la producción de IFN- $\gamma$  *in vitro* por las células T. Sin embargo, se produce una reactividad cruzada con *Mycobacterium kansasii* (*M. kansasii*), puesto que los genes ESAT-6 y CFP-10 de *M. bovis* y *M. kansasii* son altamente idénticos. *M. kansasii*, que no está incluido en el MTC, puede aislarse de individuos y ganado sano, así como, en ocasiones excepcionales, de individuos y ganado enfermo. La gestión de la tuberculosis a menudo se complica por la interpretación falsa de ensayos previstos para el MTC.
- 40 Sin embargo, ha resultado que diferentes antígenos detectan una población de animales infectados de tuberculosis parcialmente distinta. La sensibilidad de estos antígenos parece ser menor que la sensibilidad de la tuberculina. Como consecuencia, en algunas situaciones, los ensayos que emplean los antígenos pueden producir resultados falsos negativos.
- 45 A la vista de lo anterior, un objeto de la invención es proporcionar un antígeno que permite el diseño de métodos para el diagnóstico de la tuberculosis con una mayor especificidad y, en el caso de combinación con otros antígenos, con una mayor sensibilidad.
- El objeto se logra mediante un método para el diagnóstico de la tuberculosis provocada por micobacterias que pertenecen al MTC, en un animal susceptible que incluye a un ser humano, que comprende la detección *in vitro* de una respuesta inmunológica mediada por células a OmpAtb y/o a anticuerpos contra una proteína de la membrana externa bacteriana, denominada OmpAtb, en una muestra.
- 50 OmpAtb es una proteína de la membrana externa presente, por ejemplo, en *M. tuberculosis* y *M. bovis*<sub>[sc1]</sub>. Forma poros permeables a sustancias hidrófilas. OmpAtb es muy específica para *M. bovis* y *M. tuberculosis*. Las investigaciones realizadas por los solicitantes indican que OmpAtb es inmunogénica en ganado infectado por tuberculosis. Además, los ensayos realizados por los solicitantes revelan que OmpAtb muestra una reacción positiva en algunos casos positivos a tuberculosis, que dieron un resultado negativo cuando se emplea ESAT-6 o CFP-10, o

sus mezclas, respectivamente.

La secuencia de OmpAtb de *M. tuberculosis* H37Rv ha sido descrita por Camus *et al.* (2002), y la secuencia de OmpAtb de *M. bovis* AF2122/97 ha sido descrita por Garnier *et al.* (2003). Las secuencias de OmpAtb en *M. tuberculosis* y *M. bovis* son idénticas, y se muestra un ejemplo de la secuencia (SEQ ID NO: 1) en la figura 1.

5 La función de OmpAtb está asociada con su presencia en la pared celular micobacteriana. Se ha descubierto que OmpAtb es una proteína similar a porina. Su actividad formadora de poros depende del pH, y permite a las micobacterias sobrevivir en condiciones ambientales ácidas, tales como dentro de fagosomas de macrófagos (Senaratne *et al.*, 1998; Raynaud *et al.*, 2002; Molle *et al.*, 2006). Hasta la fecha, los solicitantes no han conocido ninguna publicación que emplee las propiedades inmunogénicas de OmpAtb para el diagnóstico de una infección micobacteriana.

10 Preferiblemente, la invención se realiza poniendo en contacto una muestra de sangre procedente de un ser humano o un animal infectado por tuberculosis con un reactivo de ensayo que incluye un antígeno que presenta la antigenicidad de OmpAtb, en el que el antígeno es OmpAtb. También se puede emplear otro material de muestra, tal como, por ejemplo, suero, plasma, nódulos linfáticos, piel, saliva, orina, fluido cerebroespinal, y leche, por poner solo algunos ejemplos. En principio, cualquier material de muestra o tejido, respectivamente, puede utilizarse para un análisis que permita la detección de anticuerpos o una respuesta inmunológica mediada por células tras un contacto con OmpAtb.

15 La presente invención cubre también un ensayo de piel que emplea OmpAtb o un reactivo de ensayo que incluye OmpAtb como antígeno. Aparte del uso de una nueva sustancia antigénica, puede emplearse cualquier tipo de ensayo de piel para la tuberculosis conocido en la técnica. La modificación o adaptación necesaria del reactivo de ensayo para su uso en un ensayo de piel es una medida habitual para los expertos en la técnica y no se analizará en detalle.

En el método según la invención, el antígeno o reactivo de ensayo utilizado puede estar en forma sólida o como un líquido.

25 Por regla general, la muestra se recoge en un recipiente para recolectar muestras adecuado, tal como, por ejemplo, viales de cultivos celulares o un tubo de recolección de muestras. El antígeno o el reactivo de ensayo puede añadirse al vial de cultivo celular o tubo de recolección de muestras antes o después de la aplicación de la muestra.

30 Los métodos dentro de tubo permiten que la preparación de antígeno o el reactivo de ensayo esté contenido ya en el recipiente de recolección de muestras utilizado. La ventaja es que se acortan los tiempos de incubación, puesto que el contacto de la muestra y el antígeno se produce inmediatamente después de tomar la muestra cuando se emplean recipientes de muestra con el antígeno ya incluido. La invención también cubre expresamente dichos métodos o recipientes de recolección de muestras.

35 A lo largo del texto, el término "animal" también incluye a seres humanos. Preferiblemente, el método se empleará para ensayar ganado, así como otras especies animales, por ejemplo, ovejas, cabras, ciervos, cerdos, caballos, tejones, perros, gatos, primates no humanos, elefantes, oposums, búfalos, llamas, alpacas y otros animales exóticos.

Además, en el presente contexto, el término "antigenicidad" significa que el reactivo de ensayo o el antígeno incluido tiene la capacidad de evocar una respuesta inmunológica diagnósticamente significativa en forma de una respuesta mediada por células o en forma de anticuerpos que se unen a OmpAtb.

40 Según la invención, el antígeno es OmpAtb.

45 El término "OmpAtb" comprende la forma nativa de la proteína en micobacterias, así como las proteínas recombinantes producidas en cualquier tipo de vectores de expresión que transforme a cualquier tipo de hospedante y/o también péptidos o proteínas sintetizados químicamente. También incluye proteínas análogas, es decir, proteínas con pequeñas variaciones que no afectan a la antigenicidad de OmpAtb, por ejemplo, proteínas que tengan al menos 70% de identidad de secuencia con la secuencia de OmpAtb. También se incluyen péptidos y proteínas de fusión que incluyen OmpAtb o una de sus subsecuencias.

Una "subsecuencia" significa cualquier péptido que tenga una antigenicidad comparable con la antigenicidad de OmpAtb. El término también incluye fracciones de péptidos y agrupaciones de péptidos que incluyen una serie de péptidos.

50 Cuando se emplean péptidos o subsecuencias de OmpAtb, respectivamente, cada uno de los fragmentos de péptidos o subsecuencias pueden presentarse como entidades separadas, o algunos o todos se condensan opcionalmente a través de conectores o espaciadores, tales como un aminoácido o una secuencia de aminoácidos.

Las proteínas de fusión incluidas en la invención incluyen una porción de polipéptido que es OmpAtb y a menos otra porción de polipéptido. En una realización preferida analizada a continuación, la otra porción de polipéptido puede

tener la antigenicidad de otro antígeno específico para infecciones micobacterianas. Sin embargo, también es posible proporcionar cualquier otra porción de polipéptido que mejore las propiedades de la proteína de fusión, tal como, por ejemplo, su selectividad o sensibilidad. También se incluyen porciones de polipéptidos, tales como la proteína de unión a la maltosa, que permiten un mejor aislamiento de la proteína de fusión durante la preparación.

- 5 El término "péptido" incluye péptidos cortos, oligopéptidos y también polipéptidos. Comprende las formas nativas de péptidos en micobacterias, así como péptidos recombinantes y péptidos sintetizados químicamente.

La presencia de anticuerpos contra OmpAtb en una muestra se detecta ensayando si se produce o no una reacción de unión de los anticuerpos en la muestra con el antígeno en el reactivo de ensayo. Los ensayos preferidos son inmunoensayos, que incluyen los inmunoensayos ligados a enzimas (ELISA) y las técnicas de inmunotransferencia.

- 10 Sin embargo, también es posible emplear ensayos de unión de anticuerpos no ligados a enzimas, tales como RIA, polarización de fluorescencia, citometría de flujo y otros procedimientos. Otros ejemplos no limitantes para los ensayos adecuados son: aglutinación de látex, ensayo de flujo lateral, ensayo inmunocromatográfico, inmunochips, inmunoensayos de inmersión de varillas, la tecnología basada en esferas en combinación con cualquier otro método (por ejemplo, quimioluminiscencia, Luminex), la determinación de la codificación del ARN para el producto celular pertinente (por ejemplo, una citoquina) mediante el uso de una técnica de amplificación de ácidos nucleicos.

Una posible respuesta inmunológica mediada por células puede detectarse mediante todos los métodos adecuados conocidos en la técnica. Resultan especialmente adecuados los ensayos de proliferación de linfocitos o los ensayos basados en la liberación de IFN- $\gamma$  y otros productos celulares inducidos por la antigenicidad micobacteriana.

- 20 Los productos celulares que indican una respuesta inmunológica mediada por células pueden detectarse mediante cualquier paquete de programas. Los ejemplos no limitantes para los ensayos adecuados son: ELISA, técnicas de inmunotransferencia, RIA, citometría de flujo, polarización de fluorescencia, aglutinación de látex, ensayo de flujo lateral, ensayo inmunocromatográfico, inmunochips, inmunoensayos de inmersión de varillas, la tecnología basada en esferas en combinación con cualquier otro método (por ejemplo, quimioluminiscencia, Luminex), y la determinación de la codificación del ARN para el producto celular pertinente mediante el uso de una técnica de amplificación de ácidos nucleicos.

En los ensayos de detección de anticuerpos, los antígenos empleados según la invención pueden acoplarse opcionalmente a vehículos sólidos o semisólidos o estar en disolución.

- 30 En especial, los antígenos que tienen la antigenicidad de OmpAtb permiten el diseño de ensayos con alta especificidad. Según la invención, la sensibilidad del ensayo puede aumentar proporcionando un reactivo de ensayo que incluya al menos otro antígeno específico para infecciones micobacterianas.

La invención también incluye un reactivo de ensayo para el diagnóstico de la tuberculosis mediante ensayos de anticuerpos o celulares, que incluye un antígeno que tiene la antigenicidad de OmpAtb, en el que el antígeno es OmpAtb y, opcionalmente, otro antígeno específico para infecciones micobacterianas.

- 35 Un reactivo de ensayo preferido en este contexto incluye el antígeno OmpAtb, junto con al menos otro antígeno seleccionado del grupo que comprende: tuberculina (PPD), ESAT-6, CFP-10, MPB83 (Buddle *et al.*, 2003), TB10.4 (Aagaard *et al.*, 2006), TB27.4 (Aagaard *et al.*, 2006), por citar solo algunos ejemplos de antígenos preferidos. En principio, puede utilizarse cualquier proteína o péptido antigénico específico para la tuberculosis como el otro antígeno.

- 40 El antígeno OmpAtb y al menos otro antígeno pueden incluirse en forma de una mezcla en el reactivo de ensayo. Sin embargo, en otra realización preferida de la invención, también es posible condensar los antígenos en forma de una proteína de fusión, e incluir esta proteína de fusión en el reactivo de ensayo.

La invención también incluye una proteína de fusión adecuada que incluye una porción de polipéptido que es OmpAtb y otra porción de polipéptido. Preferible, pero no necesariamente, la otra fracción de polipéptido tiene la antigenicidad de un antígeno adicional específico para infecciones micobacterianas.

- 45 La invención también describe un ensayo de piel mejorado y un reactivo para este, tal como un ensayo de piel sobre un animal, que incluye un ser humano, con la composición mencionada anteriormente.

Por último, la invención se dirige a un kit para el diagnóstico o la exclusión de una infección de tuberculosis provocada por micobacterias que pertenecen al MTC en una muestra tomada de un animal, que comprende el reactivo de ensayo descrito anteriormente, y un medio para la detección de anticuerpos contra OmpAtb y/o un medio para la detección de una respuesta inmunológica mediada por células contra OmpAtb suscitada por el animal.

- 50

### Ejemplos

Los siguientes ejemplos demuestran el uso preferido de OmpAtb en ensayos que analizan ganado infectado por tuberculosis (figuras 2, 3, 4) y ganado no infectado (figuras 5 y 6).

Los diferentes ejemplos representan diferentes clases de animales. El ejemplo 1 se refiere a animales infectados por

tuberculosis positivos con PPD y otros antígenos, así como con OmpAtb (figura 2), que demuestra que OmpAtb es igual a otros métodos en estos animales. El ejemplo 2 se refiere a animales infectados por tuberculosis que reaccionan como falsos negativos con ESAT6/CFP10 (figura 3), pero que reciben un diagnóstico correcto con OmpAtb. El ejemplo 3 se refiere a animales infectados por tuberculosis que son falsos negativos con PPD (figura 4), pero que reciben un diagnóstico correcto con OmpAtb, el ejemplo 4 se refiere a animales negativos para la tuberculosis (figura 5), y el ejemplo 5 se refiere a animales no infectados que reaccionan como falsos positivos con PPD (figura 6), pero que reciben un diagnóstico correcto con OmpAtb.

**Ejemplo 1: Ensayo comparativo de animales infectados en la naturaleza que responden a ESAT-6 y CFP-10**

*Animales y muestras*

Se recogieron muestras de sangre en tubos heparinizados de 4 vacas positivas al ensayo de piel (ensayo de tuberculina cervical comparativo). Los animales eran de la raza Holstein Friesian y tenían de 13 a 15 meses de edad.

*Antígenos*

El OmpAtb se obtuvo de una fuente comercial (Proteix, Praga, República Checa). Se produjo una versión trunca de la proteína según Senaratne *et al.* (1998), como una proteína de fusión con la proteína de unión a la maltosa. Después de la síntesis del gen sintético, se insertaron fragmentos de ADN en el sitio BstBI del vector de expresión pET28b-MalE en el C-terminal de la proteína MalE. La producción a gran escala se realizó en *E. coli* BL24 lambda DE3.

La OmpAtb se empleó a una concentración de 5 µg/ml en cultivo de sangre completa.

La proteína purificada derivada de *M. bovis* (PPD-B) o de *M. avium* (PPD-A) se empleó a una concentración de 10 µg/ml. PPD-B y PPD-A se obtuvieron de the Veterinary Laboratory Agency, Weybridge, Reino Unido.

Se sintetizaron péptidos con una longitud de entre 16 y 20 aminoácidos y se formularon en un cóctel de péptidos ESAT-6/CFP-10 según se describe en Cockle *et al.*, 2002, y se emplearon a una concentración de 5 µg/ml/péptido.

La proteína de unión a maltosa obtenida en Proteix (Praga, República Checa) a una concentración de 5 µg/ml y el medio (RPMI, Invitrogen/Gibco, Basilea, Suiza) se emplearon para la simulación como controles negativos.

Se empleó la enterotoxina estafilocócica B (Sigma), 1 µg/ml, como control positivo.

*Cultivos*

Los cultivos se prepararon dentro de las 5 hr después de la recolección de la sangre. Se introdujeron 250 µl de sangre completa por pocillo en placas de microtitulación de 96 pocillos y se estimularon mediante la adición de antígenos. Los sobrenadantes se recolectaron después de 24 hr de cultivo a 37 °C y 5% de CO2 en un incubador humidificado.

*ELISA de IFN-γ*

La concentración de IFNγ en los sobrenadantes del cultivo se midió empleando el kit de ELISA BOVIGAM (Prionics AG, Zurich, Suiza). La densidad óptica se determinó a 450 nm (OD<sub>450</sub>). Un resultado positivo se define como:

OD<sub>450</sub> PPD-B menos PPD-A = 0,1, y OD<sub>450</sub> PPD-B menos nulo = 0,1

OD<sub>450</sub> antígenos menos nulo = 0,1.

*Resultados*

Todos los animales reaccionaron claramente positivos con PPD, ESAT-6/CFP-10 y OmpA empleados como antígenos estimulantes. Los resultados de los valores de OD corregidos para la nulidad (ESAT-6/CFP-10 y OmpA) y los valores de OD PPD-B menos PPD-A se muestran en la figura 2.

**Ejemplo 2: Ensayo comparativo de animales infectados en la naturaleza que no responden a ESAT-6 ni CFP-10**

*Animales y muestras*

Se recogieron muestras de sangre en tubos heparinizados de 4 vacas positivas al ensayo de piel (ensayo de tuberculina cervical comparativo). Los animales eran de la raza Holstein Friesian y tenían de 13 a 15 meses de edad.

Los antígenos fueron los mismos que los descritos en el ejemplo 1. Los cultivos y los procedimientos de ELISA de IFN-γ se realizaron como se describe en el ejemplo 1.

*Resultados*

Todos los animales reaccionaron claramente positivos con PPD. Debido a la baja respuesta a PPD-A en estos animales, los valores de OD de PPD-B corregidos por PPD-A tienen un nivel alto. Las respuestas a ESAT-6/CFP-10 en las cuatro vacas estaban por debajo del punto de corte. Sin embargo, la reacción a OmpA fue positiva (figura 3).

5 **Ejemplo 3: Ensayo comparativo de animales infectados de forma experimental que reaccionan como falsos negativos con PPD**

*Animales y muestras*

10 Se infectaron cinco vacas con  $10^5$  CFU de *M. bovis* cepa 95-1315. Los animales tenían 6 meses de edad y eran de la raza Holstein Friesian. Se recogieron muestras de sangre en tubos heparinizados 14 días después de la infección (animales 1, 5, 77) y 29 días después de la infección (animal 76).

*Antígenos*

El OmpA fue el mismo que el descrito en el ejemplo 1.

ESAT-6/CFP-10 se construyeron como una proteína de fusión según Waters *et al.*, 2004.

15 PPD-B y PPD-A se obtuvieron en Prionics AG (Zurich, Suiza) y se emplearon a una concentración de 20 µg/ml. Se empleó el mitógeno de fitolaca (Sigma), 10 µg/ml, como control positivo para la estimulación.

Los cultivos y los procedimientos de ELISA de IFN-γ se realizaron como se describe en el ejemplo 1.

*Resultados*

20 Todos los animales reaccionaron como falsos negativos con PPD debido a que las respuestas de PPD-A exceden a la reactividad de PPD-B. ESAT-6/CFP-10 estuvo por debajo del punto de corte en los animales 1 y 5, y resultó positivo en las vacas 77 y 76. OmpA produjo resultados positivos en las 4 vacas (figura 4).

**Ejemplo 4: Ensayo comparativo de animales negativos a la tuberculosis**

*Animales y muestras*

Se extrajo sangre completa de 7 vacas negativas a la tuberculosis. Los animales eran de la raza Holstein Friesian y tenían aproximadamente 12 meses de edad.

25 Los antígenos fueron los mismos que los descritos en el ejemplo 1. Los cultivos y los procedimientos de ELISA de IFN-γ se realizaron como se describe en el ejemplo 1.

*Resultados*

Cuatro animales (figura 5) resultaron negativos con todos los antígenos. Sin embargo, tres vacas (figura 6) reaccionaron como falsos positivos con PPD, pero como negativos con ESAT-6/CFP-10 y OmpA.

30 **References**

Aagaard C, Govaerts M, Meikle V, Vallecillo AJ, Gutierrez-Pabello JA, Suarez-Guemes F *et al.* Optimizing antigen cocktails for detection of *Mycobacterium bovis* in herds with different prevalences of bovine tuberculosis: ESAT6-CFP10 mixture shows optimal sensitivity and specificity. *J Clin Microbiol* Diciembre 2006; 44(12):4326-35.

35 Buddle BM, McCarthy AR, Ryan TJ, Pollock JM, Vordermeier HM, Hewinson RG *et al.* Use of mycobacterial peptides and recombinant proteins for the diagnosis of bovine tuberculosis in skin test-positive cattle. *Vet Rec* 15 de Noviembre de 2003; 153(20):615-20.

Cockle PJ, Gordon SV, Lalvani A, Buddle BM, Hewinson RG, Vordermeier HM. Identification of novel *Mycobacterium tuberculosis* antigens with potential as diagnostic reagents or subunit vaccine candidates by comparative genomics. *Infect Immun* Diciembre 2002;70(12):6996-7003.

40 Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D *et al.* Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 11Junio de 1998; 393(6685):537-44.

Garnier T, Eiglmeier K, Camus JC, Medina N, Mansoor H, Pryor M *et al.* The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 24 Junio 2003;100(13):7877-82.

45 Molle V, Saint N, Campagna S, Kremer L, Lea E, Draper P *et al.* pH-dependent pore-forming activity of OmpA from *Mycobacterium tuberculosis* and characterization of the channel by peptidic dissection. *Molecular microbiology* Agosto 2006; 61(3):826-37.

Raynaud C, Papavinasundaram KG, Speight RA, Springer B, Sander P, Bottger EC et al. The functions of OmpA<sub>tb</sub>, a pore-forming protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* Octubre 2002; 46(1):191-201.

Senaratne RH, Mobasher H, Papavinasundaram KG, Jenner P, Lea EJ, Draper P. Expression of a gene for a porin-like protein of the OmpA family from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *J Bacteriol* Julio 1998;180(14):3541-7.

- 5 Waters WR, Nonnecke BJ, Palmer MV, Robbe-Austermann S, Bannantine JP, Stabel JR et al. Use of recombinant ESAT-6:CFP-10 fusion protein for differentiation of infections of cattle by *Mycobacterium bovis* and by *M. avium* subsp. *avium* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. *Clin Diagn Lab Immunol* Julio 2004; 11(4):729-35.

**Listado de secuencias**

<110> PrioniCS AG

5 <120> MÉTODO DE DIAGNÓSTICO DE LA TUBERCULOSIS

<130> 04338ep

<160> 1

10 <170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 326

15 <212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 1

Met Ala Ser Lys Ala Gly Leu Gly Gln Thr Pro Ala Thr Thr Asp Ala  
 1 5 10 15  
 Arg Arg Thr Gln Lys Phe Tyr Arg Gly Ser Pro Gly Arg Pro Trp Leu  
 20 25 30  
 Ile Gly Ala Val Val Ile Pro Leu Leu Ile Ala Ala Ile Gly Tyr Gly  
 35 40 45  
 Ala Phe Glu Arg Pro Gln Ser Val Thr Gly Pro Thr Gly Val Leu Pro  
 50 55 60  
 Thr Leu Thr Pro Thr Ser Thr Arg Gly Ala Ser Ala Leu Ser Leu Ser  
 65 70 75 80  
 Leu Leu Ser Ile Ser Arg Ser Gly Asn Thr Val Thr Leu Ile Gly Asp  
 85 90 95  
 Phe Pro Asp Glu Ala Ala Lys Ala Ala Leu Met Thr Ala Leu Asn Gly  
 100 105 110  
 Leu Leu Ala Pro Gly Val Asn Val Ile Asp Gln Ile His Val Asp Pro  
 115 120 125  
 Val Val Arg Ser Leu Asp Phe Ser Ser Ala Glu Pro Val Phe Thr Ala  
 130 135 140  
 Ser Val Pro Ile Pro Asp Phe Gly Leu Lys Val Glu Arg Asp Thr Val  
 145 150 155 160  
 Thr Leu Thr Gly Thr Ala Pro Ser Ser Glu His Lys Asp Ala Val Lys  
 165 170 175  
 Arg Ala Ala Thr Ser Thr Trp Pro Asp Met Lys Ile Val Asn Asn Ile  
 180 185 190  
 Glu Val Thr Gly Gln Ala Pro Pro Gly Pro Pro Ala Ser Gly Pro Cys  
 195 200 205  
 Ala Asp Leu Gln Ser Ala Ile Asn Ala Val Thr Gly Gly Pro Ile Ala  
 210 215 220  
 Phe Gly Asn Asp Gly Ala Ser Leu Ile Pro Ala Asp Tyr Glu Ile Leu  
 225 230 235 240  
 20 Asn Arg Val Ala Asp Lys Leu Lys Ala Cys Pro Asp Ala Arg Val Thr



## REIVINDICACIONES

- 5 1.- Un método para el diagnóstico de una infección de tuberculosis provocada por micobacterias que pertenecen al grupo del complejo de micobacterias de la tuberculosis (MTC) en un animal, que incluye a un ser humano, que comprende la detección *in vitro* de una respuesta inmunológica mediada por células contra OmpAtb y/o anticuerpos contra OmpAtb en una muestra tomada de ese animal, en el que la muestra se pone en contacto con un reactivo de ensayo que incluye un antígeno que tiene la antigenicidad de OmpAtb y en el que el antígeno es OmpAtb.
- 2.- El método según la reivindicación 1, en el que el reactivo de ensayo incluye al menos otro antígeno micobacteriano.
- 10 3.- El método según la reivindicación 2, en el que el otro antígeno se selecciona del grupo que incluye la tuberculina (PPD), ESAT-6, CFP-10, MPB83, TB 10.4, TB27.4.
- 4.- El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el animal se selecciona del grupo que incluye ganado, ovejas, cabras, ciervos, cerdos, caballos, tejones, perros, gatos, primates no humanos, elefantes, oposums, búfalos, llamas y alpacas.
- 15 5.- El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la muestra se selecciona del grupo de tejidos que incluye sangre, suero, plasma, nódulos linfáticos, piel, saliva, orina, fluido cerebroespinal, leche y otras muestras de tejido.
- 6.- El método según las reivindicaciones 1 a 5, en el que se detecta una posible respuesta inmunológica mediada por células mediante un ensayo basado en la liberación de gamma-interferón u otros productos celulares que señalan una inmunidad micobacteriana o un ensayo de proliferación de linfocitos.
- 20 7.- El método según la reivindicación 6, en el que los productos celulares que indican una respuesta inmunológica mediada por células se detectan mediante uno de los siguientes ensayos: ELISA, técnicas de inmunotransferencia, RIA, citometría de flujo, polarización de fluorescencia, aglutinación de látex, ensayo de flujo lateral, ensayo inmunocromatográfico, inmunochips, inmunoensayos de inmersión de varillas, la tecnología basada en esferas, y la determinación de la codificación del ARN para el producto celular pertinente mediante el uso de una técnica de amplificación de ácidos nucleicos.
- 25 8.- El método según la reivindicación 1 a 5, en el que la presencia de anticuerpos contra OmpAtb en una muestra se detecta ensayando si se produce o no una reacción de unión de los anticuerpos en la muestra con el antígeno en el reactivo de ensayo.
- 30 9.- El método según la reivindicación 8, en el que una posible reacción de unión se detecta mediante uno de los siguientes ensayos: ELISA, técnicas de inmunotransferencia, RIA, citometría de flujo, polarización de fluorescencia, aglutinación de látex, ensayo de flujo lateral, ensayo inmunocromatográfico, inmunochips, inmunoensayos de inmersión de varillas, la tecnología basada en esferas, y la determinación de la codificación del ARN para el producto celular pertinente mediante el uso de una técnica de amplificación de ácidos nucleicos.
- 35 10.- Un kit para el diagnóstico de una infección de tuberculosis provocada por micobacterias que pertenecen al grupo del complejo de micobacterias de la tuberculosis en una muestra tomada de un animal, que comprende un reactivo de ensayo para el diagnóstico de la tuberculosis mediante ensayos de anticuerpos o celulares, que incluyen un antígeno que tiene la antigenicidad de OmpAtb, en el que el antígeno es OmpAtb y/o un medio para la detección de una respuesta inmunológica mediada por células contra OmpAtb suscitada por el animal, en el que el reactivo de ensayo incluye al menos otro antígeno seleccionado del grupo que incluye la tuberculina (PPD), ESAT-6, CFP-IO, MPB83, TB10.4, TB27.4.
- 40 11.- Un kit según la reivindicación 10, en el que el reactivo de ensayo ya está incluido en los recipientes de recolección de muestras antes de la toma de muestras.
- 45 12.- El uso de un reactivo de ensayo para el diagnóstico de la tuberculosis mediante ensayos de anticuerpos o celulares, que incluye un antígeno que tiene la antigenicidad de OmpAtb, en el que el antígeno es OmpAtb, para la fabricación de una preparación de diagnóstico para la tuberculosis.

1 maskaglgqt pattdarrtq kfyrgspgrp wligavvipl liaaigygaf erpqsvtgpt  
 61 gvlptltpts trgasalsls llsisrsgnt vtligdfpde aakaalmtal ngllapgvnv  
 121 idqihvdppv rslfssaep vftasvipd fglkverdtv tltgtapsse hkдавkraat  
 181 stwpmkivn nievtgqapp gppasgpcad lqsainavtg gpiafgndga slipadyeil  
 241 nrvadklkac pdarvtingy tdntgsegin iplsagraki vadylvargv agdhiatvgl  
 301 gsvnpiasna tpegraknrr veivvn

Fig. 1

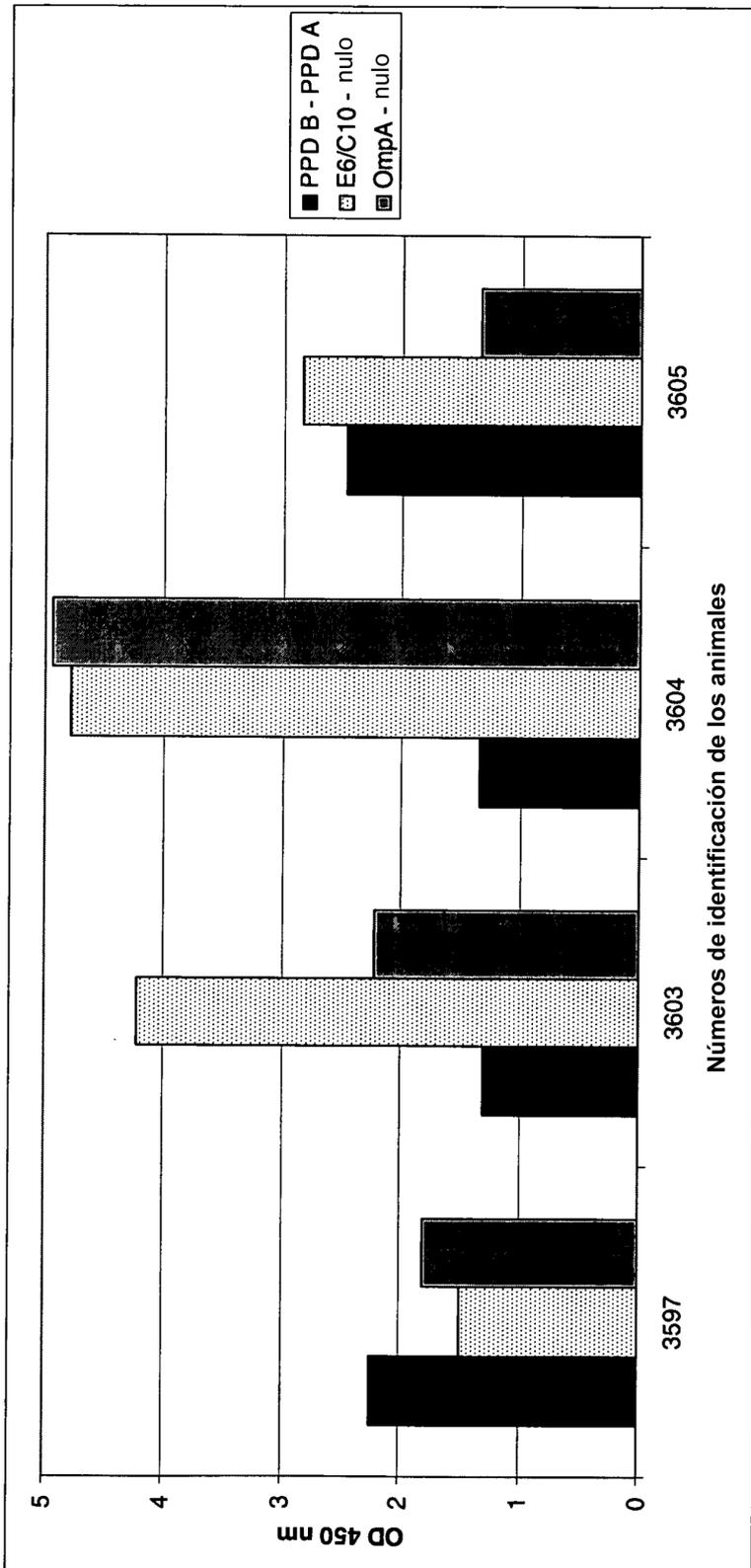


Fig.2

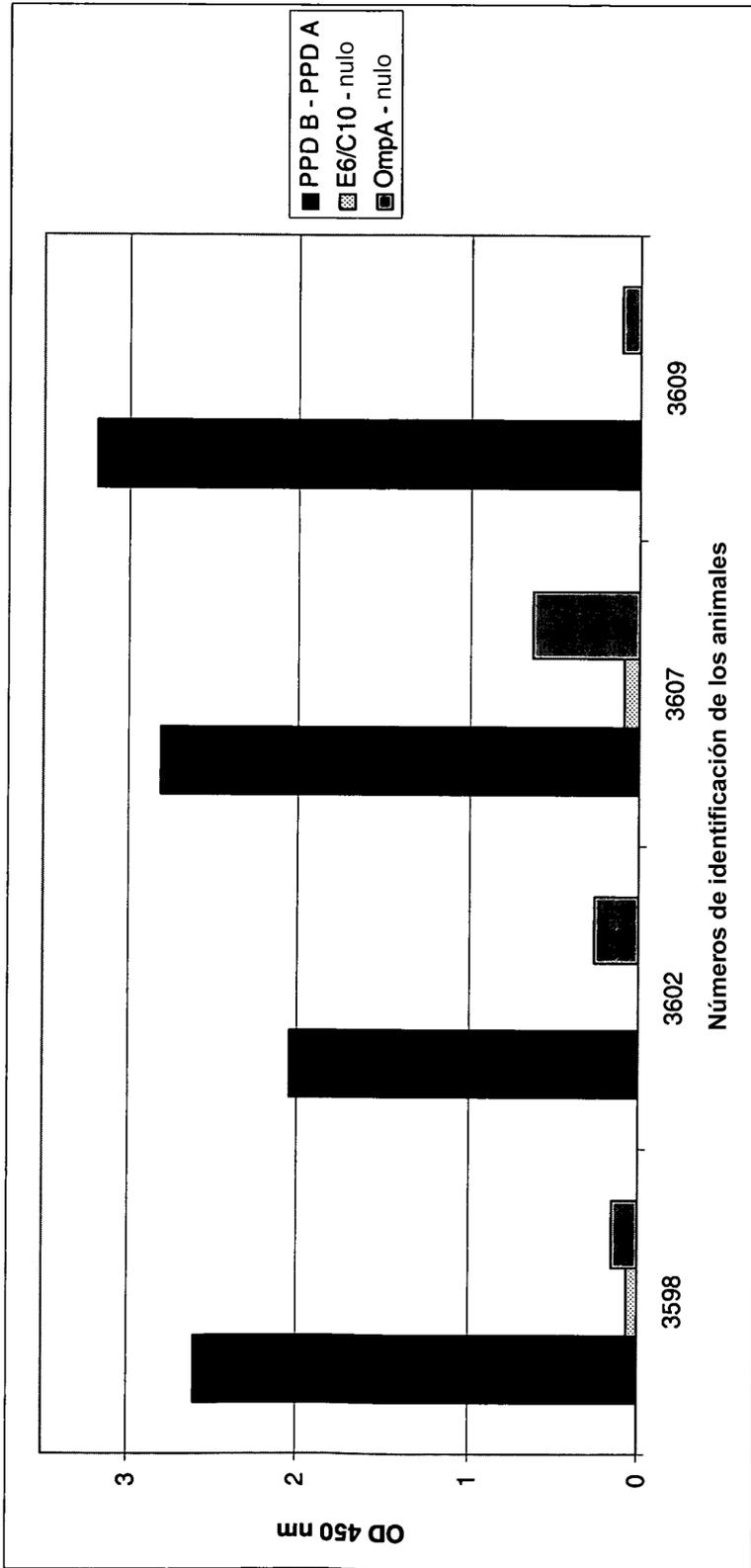


Fig.3

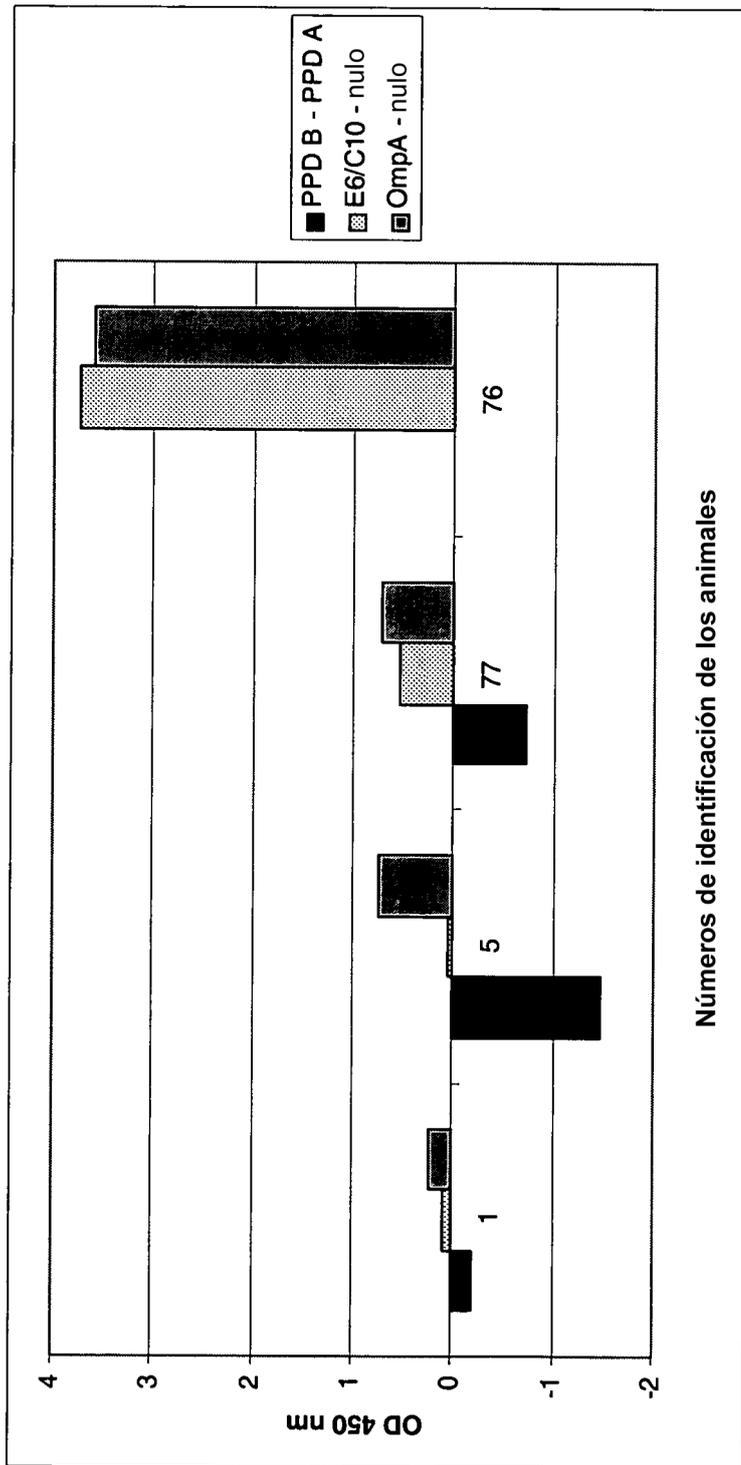


Fig.4

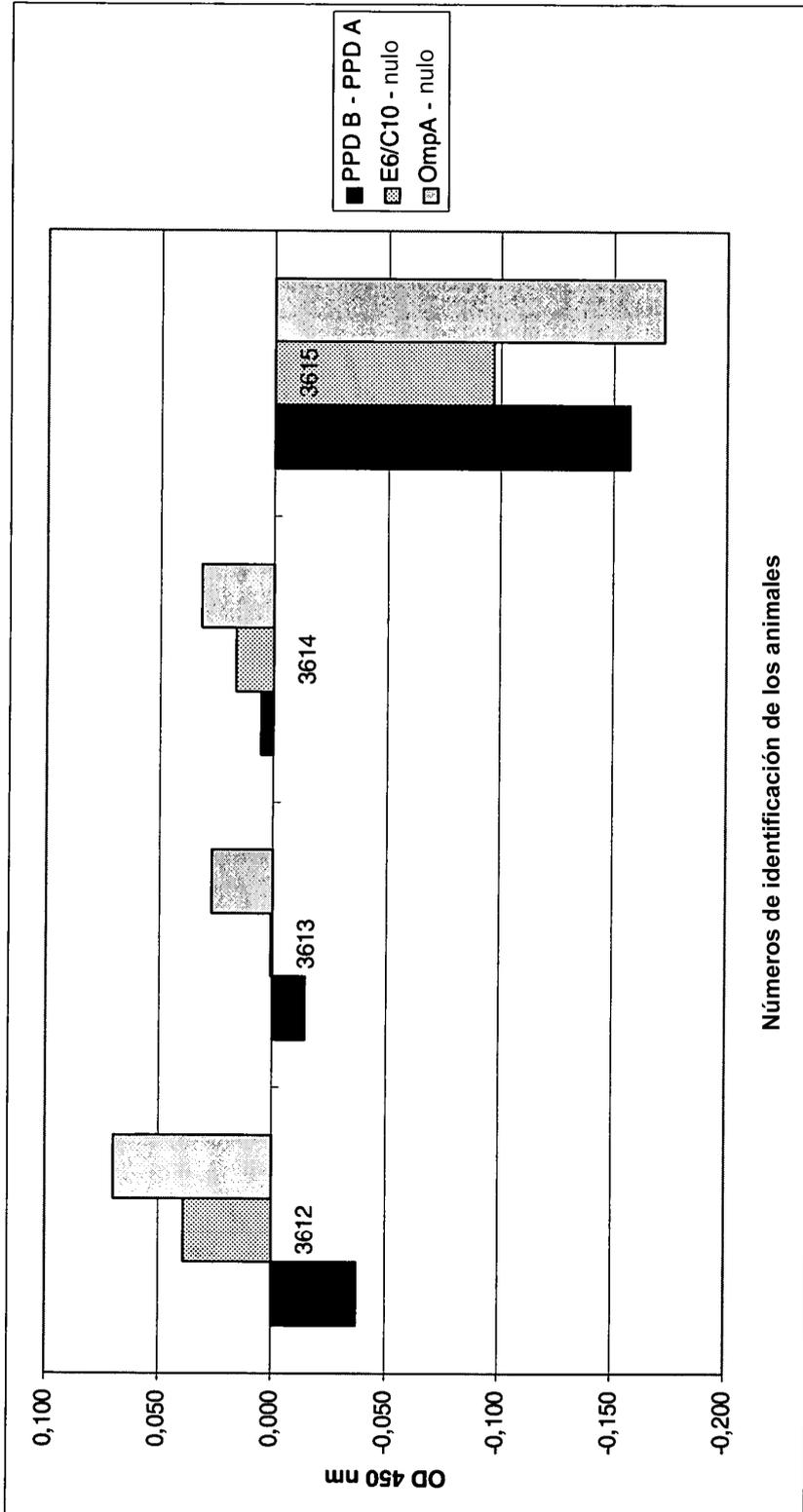
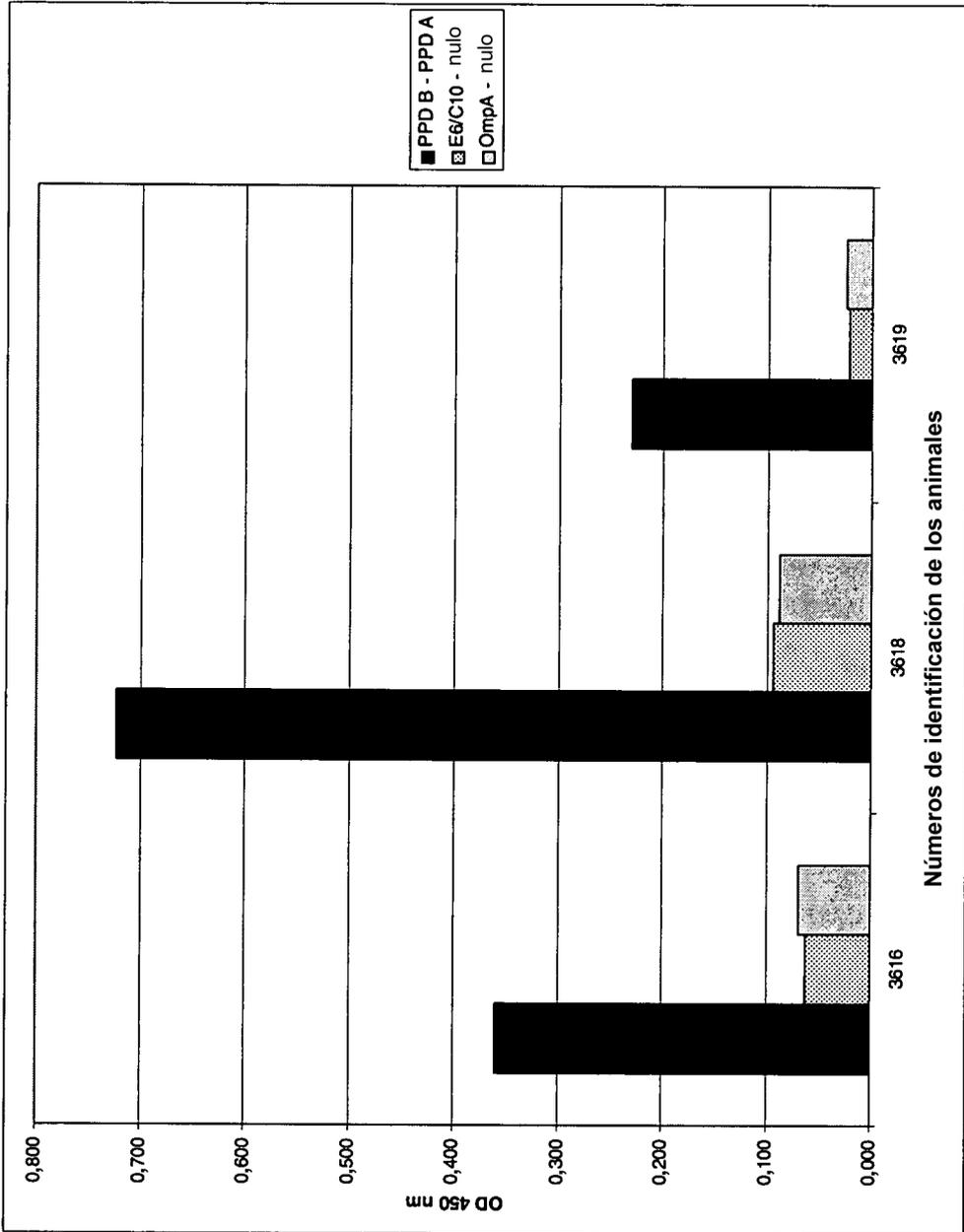


Fig.5



**Fig.6**