

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 637 590**

51 Int. Cl.:

A61K 49/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.04.2011** **PCT/GB2011/050843**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.11.2011** **WO11135369**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.04.2011** **E 11721638 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.07.2017** **EP 2563407**

54 Título: **Reactivos de diagnóstico**

30 Prioridad:

28.04.2010 GB 201007075

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

13.10.2017

73 Titular/es:

**THE SECRETARY OF STATE FOR
ENVIRONMENT, FOOD & RURAL AFFAIRS,
ACTING THROUGH ANIMAL AND PLANT
HEALTH AGENCY (100.0%)
Woodham Lane
Addlestone, Surrey, KT15 3NB, GB**

72 Inventor/es:

**VORDERMEIER, HANS y
WHELAN, ADAM**

74 Agente/Representante:

CAMPELLO ESTEBARANZ, Reyes

ES 2 637 590 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

Reactivos de diagnóstico

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a reactivos para su uso en una prueba cutánea para la detección de infecciones por micobacterias, particularmente *Mycobacterium tuberculosis* y *M. bovis*, en mamíferos tales como bovinos.

Antecedentes

- 10 *M. tuberculosis* y *M. bovis* son patógenos importantes del hombre y de los animales. Se piensa que *M. tuberculosis* infecta hasta a un tercio de la población humana mundial, permaneciendo sin ser detectado durante una fase latente de infección y reactivándose para causar 10 millones de casos de tuberculosis y otras enfermedades al año, dando lugar a 2 millones de muertes (Corbett et al., (2003) Arch. Intern. Med. vol. 163, págs. 1009-1021). El *M. bovis*, que tiene más del 99,9 % de identidad de secuencia con *M. tuberculosis*, es el agente causal de la tuberculosis bovina (TBB) y también causa la enfermedad en humanos. La TBB representa una carga económica significativa para las industrias agrícolas de diversos países, incluido el Reino Unido (Krebs (1997) "Bovine Tuberculosis in Cattle & Badgers" HMSO, Londres, Reino Unido).

- 15 La prueba diagnóstica primaria usada en el control y vigilancia de la TB bovina es la prueba cutánea de la tuberculina, una prueba que ha permanecido a la vanguardia del diagnóstico de TB tanto en el hombre como en bovinos durante más de 100 años. El desarrollo de la prueba surgió después de la preparación de la primera "tuberculina" por Robert Koch en 1890. Aunque la tuberculina de Koch no cumplió con sus pretensiones iniciales de tener propiedades curativas, su potencial de diagnóstico se alcanzó rápidamente. Los formatos más comunes de la prueba usada en bovinos son la prueba en el pliegue caudal (PPC), la prueba de tuberculina intradérmica cervical simple (SIT) y la prueba comparativa de la tuberculina intradérmica cervical simple (SICCT) (Monaghan et al., 1994) Vet. Microbiol vol. 40, págs. 111-24). Estos formatos de ensayo usan una tuberculina derivada de proteína purificada (DPP) preparada a partir de un cultivo de *M. bovis* (DDP-B) como antígeno diagnóstico primario. Además, la prueba SICCT incluye el uso de un DPP derivado de *M. avium* (DPP-A) para proporcionar una medida de la sensibilización ambiental. Es la más específica de las pruebas (Plum (1931), Cornell Vet. vol. 21, págs. 68-76; Stenius (1938) Veterinary Record, vol. 50, págs. 633-7) y, por lo tanto, es el formato de prueba adoptado en el Reino Unido.

- Además de las pruebas cutáneas, también se están considerando los ensayos de diagnóstico basados en la sangre que miden la producción de linfocinas inducida por antígenos, tales como la prueba de interferón gamma (IFN- γ). La citoquina IFN- γ parece ser crítica en el desarrollo de la inmunidad a *M. tuberculosis*. Por ejemplo, ratones con un gen de IFN- γ interrumpido y también seres humanos con un receptor de IFN- γ mutado son altamente susceptibles a infecciones micobacterianas. Sin embargo, las restricciones de especificidad se asocian al uso de DPP en tales ensayos. Estas surgen debido a la mezcla bruta de proteínas de *M. bovis* que contiene la DPP, muchas de las cuales son reactivos cruzados con la cepa vacuna BCG y especies micobacterianas ambientales, tales como *M. avium* y *M. intracelular*.

- 35 La TB bovina es un problema significativo y continuo en el Reino Unido (<http://www.defra.gov.uk/food-farm/animals/diseases/tb/>, consultado el 18 de abril de 2011). La vacunación bovina se ha identificado como una de las estrategias de control del Reino Unido más prometedoras a largo plazo (Krebs (1997), "Bovine Tuberculosis in Cattle & Badgers" HMSO) y el desarrollo de una vacuna eficaz sigue siendo una prioridad de investigación. En la actualidad, las vacunas prometedoras contra la TB bovina se basan en combinaciones heterólogas prime-boost que incluyen la cepa vacuna *M. bovis* atenuada viva Bacille Calmette-Guerin (BCG) como uno de sus componentes (Hogarth et al., (2006) J. Pharm. Pharmacol, vol. 58, págs. 749-57). Sin embargo, como en el caso de los seres humanos, la vacunación de bovinos con BCG compromete la especificidad de la prueba cutánea de la tuberculina, ya que DPP contiene antígenos reactivos cruzados compartidos tanto por cepas patógenas como vacunales (Berggren (1981) Br. Vet. J. vol. 137, págs. 88-94; Buddle et al., (1999) Clin. Diagn. Lab. Immunol. vol. 6, págs. 1-5; Waddington y Ellwood (1972) Br. Vet. J. vol., 128, págs. 541-52). Por lo tanto, el desarrollo de pruebas diagnósticas que pueden diferenciar a los animales vacunados de los infectados, las llamadas pruebas DIVA, son un requisito previo esencial para permitir la inclusión de la vacunación basada en BCG como parte de las estrategias de control de la TB bovina.

- 50 Estudios previos han demostrado que los reactivos de diagnóstico que distinguen entre bovinos vacunados e infectados pueden desarrollarse usando antígenos específicos definidos que están presentes en *M. bovis* virulenta pero ausentes del BCG. El análisis genético de BCG ha revelado que varias regiones genómicas grandes se han suprimido durante la atenuación y posterior propagación prolongada en cultivo. Estas regiones se han caracterizado y los antígenos de una de estas regiones, RD1, se han estudiado extensamente en varias especies, incluidos los

seres humanos y bovinos. Por ejemplo, se ha demostrado que se pueden usar cócteles de proteínas o polipéptidos compuestos de dos antígenos de la región RD1, ESAT-6 y CFP-10 para distinguir entre el ganado infectado por *M. bovis* y el vacunado con BCG.

Hasta la fecha, la aplicación práctica de tales reactivos DIVA se ha logrado en gran parte a través de su uso en ensayos de liberación de interferón- γ (IFN- γ) basados en sangre (IGRA). Por ejemplo, el documento WO2009/060184 y Sidders et al., (2008; Infect. Immun. vol. 76, págs. 3932-3939) divulgó varios polipéptidos que incluían epítomos de Rv3615c que demostraron ser útiles para detectar la infección por *M. bovis* utilizando dicho ensayo. También se ha confirmado que este polipéptido es útil para detectar la infección por *M. tuberculosis* en seres humanos (Millington et al., (2011) Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU vol. 108, págs. 5730-5735). En el presente documento, se hace referencia a Rv3615c utilizando la anotación del genoma de *M. tuberculosis* (<http://genolist.pasteur.fr/TubercuList/>, consultado el 18 de abril de 2011). En el genoma de *M. bovis*, se anota como Mb3645c (<http://genolist.pasteur.fr/BoviList/>, consultado el 18 de abril de 2011). MacGurn et al., (Mol. Microbiol. (2005), vol.57, págs. 1653-63) trata el impacto de una inserción de transposón en el gen Rv3615c de la secreción Snm.

Dado el elevado nivel de familiaridad y la amplia aplicación de la prueba cutánea de la tuberculina por veterinarios y clínicos, un formato de prueba cutánea DIVA proporcionaría una valiosa plataforma de prueba adicional. Esto podría ser especialmente el caso en el que la logística del acceso a los recursos basados en laboratorio sea problemática. También cabe destacar que, en los últimos años, también se ha renovado el interés en una prueba DIVA basada en la prueba cutánea para la TB humana con varios informes que demuestran el potencial de la prueba cutánea de ESAT-6 (Aggerbeck & Madsen (2006) Tuberculosis (Edinb.). vol.86, págs. 363-73; Arend et al., (2000) J. Infect. Dis. vol. 181, págs. 1850-4, Wu et al., (2008) Clin. Exp. Immunol. vol. 152, págs. 81-7). Sin embargo, Whelan et al., (Infect. Immun. (2003), vol.71, págs. 6420-6425) encontró que ESAT-6 no era eficaz por sí solo como reactivo de prueba cutánea en bovinos evaluados usando la medida de induración de la piel en el sitio de inyección. La adición de un adyuvante lipopeptídico bacteriano sintético era necesaria antes de que ESAT-6 resultara útil en bovinos. Es preferible evitar el uso de adyuvantes en un reactivo de prueba cutánea, ya que las repetidas inyecciones de prueba cutánea (como se requiere para controlar la salud de, por ejemplo, un rebaño de ganado lechero) pueden conducir a la sensibilización de animales infectados sin tuberculosis, de modo que la prueba cutánea dejaría de ser útil para diferenciar entre animales infectados y animales no infectados pero vacunados.

Por consiguiente, la presente invención aborda el problema de proporcionar reactivos de diagnóstico discriminatorios para la detección de infecciones micobacterianas usando un formato de prueba cutánea DIVA.

Sumario de la invención

Según un primer aspecto de la invención, se proporciona un reactivo de diagnóstico de prueba cutánea en forma de preparación inyectable estéril que comprende los polipéptidos de epítomos de CFP-10 que consisten en secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 1-10; los polipéptidos de epítomos de ESAT-6 que consisten en secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 11-21; y los polipéptidos de epítomos de Rv3615c que consisten en secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 23-34. El reactivo de diagnóstico es capaz de provocar un resultado positivo cuando se administra en una prueba cutánea a un animal infectado con *Mycobacterium bovis* o *Mycobacterium tuberculosis*. En una realización, el reactivo no comprende un adyuvante, es decir, un reactivo que ayude a propagar una respuesta inmune para potenciar el efecto del reactivo de diagnóstico pero que no induzca por sí mismo una respuesta inmune. Un ejemplo es un lipopéptido bacteriano y el experto en la materia puede fácilmente determinar la identidad de un adyuvante adecuado en un contexto dado.

Esta invención surge del descubrimiento de los inventores de que esta combinación particular de polipéptidos proporciona resultados inesperadamente buenos cuando se usa en una prueba cutánea de tuberculosis bovina. CFP-10 no se ha evaluado previamente para su uso en una prueba cutánea. Además, los inventores han encontrado que ESAT-6 solo es útil en una prueba cutánea en bovinos cuando se usa junto con un adyuvante. De manera ventajosa, el reactivo según las reivindicaciones permite el uso de una prueba cutánea que puede distinguir entre animales infectados con *M. bovis* y/o *M. tuberculosis* que han sido vacunados contra la infección por *M. bovis* y/o *M. tuberculosis*, por ejemplo, con una vacuna BCG.

El animal puede ser un mamífero, como una vaca, un tejón o un ser humano.

El término "polipéptido de epítopo", tal como se usa a lo largo de esta memoria descriptiva, indica un polipéptido que incluye uno o más (o todos los) epítomos de la proteína en cuestión. El término "epítopo" se refiere a los aminoácidos (típicamente, un grupo de aproximadamente 5 o más aminoácidos) dentro de una secuencia polipeptídica que son esenciales en la generación de una respuesta inmune y que, por lo tanto, se pueden usar en una prueba diagnóstica. La respuesta inmune puede ser una respuesta inmune mediada por anticuerpos, pero también puede ser una respuesta inmune mediada por no anticuerpos, por ejemplo, una respuesta inmune que puede ser detectada

mediante un ensayo de inmunidad mediada por células (IMC). Por lo tanto, el epítipo puede ser uno que sea reconocible por una célula T, por ejemplo, por unión de un receptor de células T al epítipo.

- La prueba cutánea a la que se hace referencia en el presente documento puede ser cualquiera de una prueba PPC, SIT o SICCT, según se describe en el Manual de pruebas de diagnóstico y vacunas para animales terrestres de la Oficina Internacional de Epizootias (OIE) (ISBN-10:92-9044-718-4; http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/a_summry.htm, consultado el 18 de abril de 2011). El manual proporciona información, definiciones y directrices sobre los criterios de prueba positivos. Por lo tanto, cuando el reactivo de diagnóstico descrito en el presente documento provoca un resultado positivo cuando se administra en una prueba cutánea, tal como una de las mencionadas anteriormente, esto se determina, por ejemplo, mediante la detección de un espesor y/o una induración aumentada de la piel en el sitio en el que se ha inyectado el reactivo de diagnóstico, por ejemplo, usando calibradores. El espesor de la piel puede determinarse idealmente, por ejemplo, antes de la inyección (para proporcionar un espesor inicial de comparación después de la inyección) y en una o más de, por ejemplo, aproximadamente 24, 36, 48, 72, 96 o aproximadamente 120 horas después de la inyección del reactivo de diagnóstico. Es típica la determinación del espesor de la piel a las 72 horas de la inyección. El espesor se puede determinar en cualquier período de tiempo después de la inyección, siempre que, cuando se comparen los resultados de diferentes pruebas, se comparen después de sustancialmente el mismo período de tiempo después de la inyección (p. ej., entre 1 y 10 horas antes o después de uno de los puntos temporales mencionados anteriormente, tales como el punto temporal de 72 horas, por ejemplo, entre 3 y 7 horas antes o después o aproximadamente 5 horas antes o después).
- El reactivo de diagnóstico de la invención puede comprender adicionalmente uno o más de los tres polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 35, 36 y 38, es decir, CFP-10 de longitud completa, ESAT-6 y Rv3615c, respectivamente. En una realización, el reactivo de diagnóstico comprende todas las SEQ ID NO: 35, 36 y 38.
- El reactivo de diagnóstico comprende las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 1-10. Estas secuencias son polipéptidos que son fragmentos que se solapan de CFP-10 que son polipéptidos de epítomos de CFP-10, es decir, cada uno de ellos contiene al menos un epítipo de CFP-10.
- El reactivo de diagnóstico comprende las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 11-21. Estas secuencias son polipéptidos que son fragmentos que se solapan de ESAT-6 que son polipéptidos de epítomos de ESAT-6, es decir, cada uno de ellos contiene al menos un epítipo de ESAT-6.
- El reactivo de diagnóstico comprende las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 23-34. Estas secuencias son polipéptidos que son fragmentos que se solapan de Rv3615c que son polipéptidos de epítomos de Rv3615c, es decir, cada uno de ellos contiene al menos un epítipo de Rv3615c. El reactivo de diagnóstico puede comprender, adicionalmente, al menos uno de los polipéptidos que tienen las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 22 o 37.
- El reactivo de diagnóstico puede comprender además al menos un polipéptido de epítomos de MPB83, por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 37. Esta secuencia es la secuencia de aminoácidos de MPB83 (identificada en WO97/08322). Los inventores encontraron de manera sorprendente que la inclusión de esta proteína provocaba resultados más precisos y sensibles cuando se combinó con proteínas CFP-10 y ESAT-6, aunque la proteína MPB83 sola tiene una capacidad pobre de inducción de IFN- γ en comparación con CFP-10 y ESAT-6. Como alternativa o de forma adicional, el reactivo de diagnóstico puede comprender al menos un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 22. Esta secuencia es un polipéptido de epítomos de MPB83, es decir, contiene al menos un epítipo de MPB83.
- El reactivo de diagnóstico puede comprender adicionalmente al menos un polipéptido de epítomos de MPB70, por ejemplo, un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 39. Esta secuencia es la secuencia de aminoácidos de MPB70.
- Los polipéptidos pueden incluirse en el reactivo de diagnóstico en forma individual o en forma de una o más proteínas de fusión. Por ejemplo, un reactivo de diagnóstico puede comprender una proteína de fusión que comprende las SEQ ID NO: 35, 36 y 38.
- El reactivo de diagnóstico puede ser para uso en un método de detección de infección por *Mycobacterium bovis* o *Mycobacterium tuberculosis* en un animal que utilice una prueba cutánea.
- La preparación inyectable estéril puede ser una suspensión acuosa u oleaginosa, o una suspensión en un diluyente o disolvente no tóxico parenteralmente aceptable. La suspensión acuosa puede prepararse, por ejemplo, en manitol, agua, solución de Ringer o solución isotónica de cloruro de sodio. Como alternativa, puede prepararse en solución salina tamponada con fosfato. La suspensión oleaginosa puede prepararse en un monoglicérido sintético, un

diglicérido sintético, un ácido graso o un aceite natural farmacéuticamente aceptable. El ácido graso puede ser un ácido oleico o un derivado de glicérido de ácido oleico. El aceite natural farmacéuticamente aceptable puede ser un aceite de oliva, un aceite de ricino o un aceite de oliva o aceite de ricino polioxetilado. La suspensión oleaginosa puede contener un diluyente o dispersante de alcohol de cadena larga, por ejemplo, Ph. Helv.

- 5 En una realización, el reactivo de diagnóstico puede (y, por tanto, permite a un usuario) diferenciar entre un animal infectado por *M. bovis* y/o *M. tuberculosis* y un animal vacunado contra *M. bovis* o *M. tuberculosis* (por ejemplo, un animal vacunado con la vacuna viva atenuada BCG).

"Usar" y "el uso" de polipéptidos y reactivos de diagnóstico en la prueba cutánea implica típicamente una inyección intradérmica del polipéptido o polipéptidos y/o del reactivo de diagnóstico en el animal. Se puede realizar una prueba cutánea según se describe en el Manual de pruebas de diagnóstico y vacunas para animales terrestres de la OIE, como se ha mencionado anteriormente.

- 10 Según un segundo aspecto de la invención, se proporciona un kit de diagnóstico que comprende un reactivo de diagnóstico según el primer aspecto de la invención. El reactivo de diagnóstico puede estar en forma líquida, como se ha indicado anteriormente, o puede estar en forma sólida (por ejemplo, liofilizada). Puede incluirse en el kit en forma de al menos una alícuota de 0,05-0,15 ml que contiene 1-15 µg de cada polipéptido contenido en el reactivo de diagnóstico. Por ejemplo, el kit puede comprender alícuotas de aproximadamente 0,05 ml, aproximadamente 0,06 ml, aproximadamente 0,07 ml, aproximadamente 0,08 ml, aproximadamente 0,09 ml, aproximadamente 0,1 ml, aproximadamente 0,11 ml, aproximadamente 0,12 ml, aproximadamente 0,13 ml, aproximadamente 0,14 ml o aproximadamente 0,15 ml, que contienen 1-15 µg, por ejemplo, 3-12 µg o 5-10 µg de cada polipéptido de los epítomos, por ejemplo, aproximadamente 5 µg, aproximadamente 6 µg, aproximadamente 7 µg, aproximadamente 8 µg, aproximadamente 9 µg o aproximadamente 10 µg de cada polipéptido de los epítomos. Cada alícuota puede estar contenida en un dispositivo de inyección desechable. El kit puede comprender adicionalmente al menos una muestra de DPP. El reactivo de diagnóstico puede ser capaz de detectar una infección por *M. bovis* o *M. tuberculosis* en un mamífero y puede ser capaz de diferenciar entre un mamífero infectado con *M. bovis* o *M. tuberculosis* y un mamífero vacunado contra la infección por *M. bovis* o *M. tuberculosis*.

- 25 Según un tercer aspecto de la invención, se proporciona un reactivo de diagnóstico según un primer aspecto de la invención para su uso en un método para diagnosticar la infección de un animal por *Mycobacterium bovis* o *Mycobacterium tuberculosis*, comprendiendo el método las etapas de realizar una prueba cutánea en el animal utilizando el reactivo de diagnóstico y correlacionando un resultado positivo de la prueba cutánea con la infección del animal por *Mycobacterium bovis* o *Mycobacterium tuberculosis*, diagnosticando, por lo tanto, que el animal está infectado con *Mycobacterium bovis* o *Mycobacterium tuberculosis*

- 30 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones de la presente memoria descriptiva, las palabras "comprender" y "contener", así como variaciones de las palabras, por ejemplo, "que comprende" y "comprende", significan "que incluye, pero no se limita a" y no excluye otros restos, aditivos, componentes, números enteros o etapas. A lo largo de la descripción y las reivindicaciones de la presente memoria descriptiva, el singular abarca el plural, a menos que el contexto lo requiera de otra manera. En particular, cuando se usa el artículo indefinido, la memoria descriptiva debe entenderse que contempla tanto la pluralidad como la singularidad, a menos que el contexto lo requiera de otra manera.

- 35 Cualquier característica de cada aspecto de la invención puede ser como se describe en conexión con cualquiera de los otros aspectos.

- 40 Otras características de la presente invención resultarán evidentes a partir de los siguientes ejemplos. En general, la invención se extiende a cualquiera característica novedosa o cualquier combinación novedosa de las características divulgadas en la presente memoria descriptiva (incluidas las reivindicaciones adjuntas y los dibujos). Por tanto, las características, los números enteros, las particularidades, los compuestos o los restos químicos descritos junto con un aspecto, una realización o un ejemplo particular de la invención deben entenderse que son aplicables a cualquier otro aspecto, realización o ejemplo descrito en la presente memoria, a menos que sean incompatibles con la misma.

Además, a menos que se indique lo contrario, cualquier característica divulgada en el presente documento puede ser reemplazada por una característica alternativa que sirva al mismo fin o un fin similar.

Breve descripción de las figuras

- 50 A continuación se describirán ejemplos no limitativos de la presente invención con referencia a las siguientes figuras, en las que:

La Figura 1 muestra respuestas de la prueba cutánea inducida por cóctel de proteínas en bovinos, mostrando A las respuestas comparativas de DPP de SICCT [(PPD-B)-(PPD-A)] y B mostrando respuestas inducidas por un cóctel de 10 µg de cada una de las proteínas ESAT-6, CFP-10 y MPB70;

La Figura 2 muestra la capacidad *in vitro* de los antígenos para inducir el IFN-γ en la sangre de bovinos naturalmente expuestos a *M. bovis* (n=37), determinada para las proteínas ESAT-6, CFP-10, MPB70 y MPB83 individualmente (5 µg /ml) o como un cóctel combinado de proteínas (5 µg /ml por constituyente);

La Figura 3 muestra un cóctel de proteínas de la titulación de la dosis para la prueba cutánea que comprende proteínas ESAT-6, CFP-10, MPB70 y MPB83 en bovinos que fueron naturalmente expuestos a *M. bovis* (n=19);

La Figura 4 muestra la especificidad de la prueba cutánea del cóctel de proteínas que compromete proteínas ESAT-6, CFP-10, MPB70 y MPB83 (10 µg para cada componente) y para la prueba SICCT [(DPP-B) - (DPP-A)] en bovinos sin TB no tratados (n=19) y vacunados con BCG (n=20);

La Figura 5 muestra respuestas a la prueba cutánea inducidas por la prueba SICCT (DPP-B)-(DPP-A)] y una selección de proteínas y combinaciones de antígenos basados en polipéptidos de fragmentos de proteínas, determinadas en bovinos naturalmente expuestos a *M. bovis* (n=13);

La Figura 6 muestra respuestas a la prueba cutánea inducidas por las proteínas ESAT-6, CFP-10, MPB83 y Rv3615c, determinadas individualmente (10 µg) o en combinación (10 µg por proteína) en bovinos naturalmente expuestos a *M. bovis* (n=12);

La Figura 7 muestra el rendimiento de la prueba cutánea de un cóctel de polipéptidos de fragmentos de proteína de diagnóstico basado en ESAT6/CFP10 que incluye adicionalmente 11 polipéptidos de fragmentos de proteína Rv3615c, medidos en bovinos positivos (reactor) a la prueba de SICCT (n=15); y

La Figura 8 muestra el rendimiento de la prueba cutánea de un cóctel de proteínas ESAT6/CFP10/MPB83/Rv3615c, un cóctel de proteínas ESAT6/CFP10/Rv3615c, un cóctel de polipéptidos de fragmentos de proteína ESAT6/CFP10 y un cóctel de polipéptidos de fragmentos de proteína ESAT6/CFP10/Rv3615c, medido en bovinos positivos (reactor) a la prueba SICCT (n=15).

Ejemplos

Materiales y métodos

Animales

Para investigar el rendimiento de la prueba cutánea de los antígenos definidos en bovinos naturalmente expuestos a *M. bovis*, se reclutaron los bovinos reactivos a SICCT de granjas del Reino Unido con una historia confirmada de TB bovina (con un muestreo conveniente dependiendo de la disponibilidad). Se identificaron los animales durante las operaciones de vigilancia de rutina en las que su respuesta SICCT [(DPP-B)-(DPP-A)] > 2 mm y se alojaron en instalaciones de biocontención segregadas seguras en la Agencia de laboratorios veterinarios (VLA). Se utilizó en el estudio un total de 62 reactores que incluyó 21 machos y 41 hembras de 7 razas diferentes, incluidas lechería y carne de vacuno. La edad en el momento de las investigaciones de la prueba cutánea de estudio osciló entre 9 meses y 11 años, con una edad media de 21 meses. Todos los reactores se sometieron a un examen post mortem detallado para evaluar la presencia de infección por *M. bovis*, según los procedimientos descritos previamente (Vordermeier et al., (2002), Infect. Immun. vol. págs. 3026-32). En 55 de estos reactores se confirmaron lesiones visibles consistentes con TB bovina y/o aislamiento del cultivo de *M. bovis*.

Para los estudios de especificidad, el bovino macho castrado Holstein-Friesian (n=54) procedía de granjas libres de TB del Reino Unido y se alojaba en la VLA en alojamiento separado de los reactores. Una cohorte de estos terneros (n = 20) se vacunó al nacer con BCG para permitir la evaluación de DIVA de los reactivos. Se administró por vía subcutánea una dosis única de 1 x 10⁶ UFC de BCG danés (Staten Serum Institute, Suecia) a cada uno de estos terneros a las 4-6 semanas de edad. Cuando se realizó una segunda prueba cutánea en algunos bovinos durante el estudio, la segunda prueba cutánea se realizó no antes de 62 días después. Todos los experimentos a bovinos fueron autorizados por la revisión ética local y los procedimientos de animales bajo una licencia concedida por el Ministerio del interior británico.

Antígenos

Los DPP bovinos y aviares fueron suministrados por la Unidad de Producción de Tuberculina de VLA. Las proteínas recombinantes etiquetadas de histidina se expresaron en *Escherichia coli* y se purificaron por cromatografía de afinidad con níquel.

MPB70, MPB83, ESAT-6 y CFP-10 fueron suministrados por Lionex Diagnostics and Therapeutics GmbH (Alemania) y el Rv3615c fue producido en Agri-Food and Biosciences Institute (Belfast, Irlanda del Norte). Los polipéptidos del fragmento de proteína sintética Rv3615c (SEQ ID NO: 23-34) se sintetizaron mediante la química F-moc de fase sólida y se suministraron con una pureza > 90 % (Pepceuticals Ltd, UK). Se confirmó la identidad de cada polipéptido mediante espectrometría de masas. Para ESAT-6 y CFP-10 se usaron polipéptidos del fragmento de proteína 16mer con 8 solapamientos de aminoácidos de las secuencias completas de proteínas (21 polipéptidos en total, que tienen SEQ ID NO: 1-10 para polipéptidos CFP10 y SEQ ID NO: 11-21 para polipéptidos ESAT-6).

Para MPB83 se usó un único polipéptido del fragmento de proteína 20mer (SEQ ID NO: 22) que, previamente, había mostrado codificar un epítipo de células T bovinas (p195-214) (Vordermeier et al., (1999) Clin.Diagn. Lab. Immunol. vol. 6, págs. 675-82). De forma similar, en los experimentos iniciales se usaron para Rv3615c tres polipéptidos del fragmento de proteína 20mer que codifican al epítipo de células T bovinas (p65-84 (SEQ ID NO: 31), p73-92 (SEQ ID NO: 32) y p84-103 (SEQ ID NO: 34)) (Sidders et al., (2008) Infect. Immun. vol. 76, págs. 3932-9). En experimentos posteriores se usó un cóctel de SEQ ID NO: 23-33.

Todas las proteínas y los polipéptidos y cócteles se prepararon en solución salina tamponada con fosfato (PBS), pH 7,4, para su uso en los siguientes experimentos.

Procedimientos de prueba cutánea

La prueba de campo SICCT de la divulgación se realizó y se interpretó según el Manual de pruebas de diagnóstico y vacunas para animales terrestres de la OIE. Para la evaluación de las combinaciones de antígenos definidos en VLA, se usaron hasta 8 sitios de inyección intradérmica en cada animal, 4 en cada lado del cuello. En cada prueba se incluyeron siempre DPP-B y DPP-A (2500 UI) y se administraron todos los antígenos en un volumen de 0,1 ml. Se probaron antígenos definidos a una concentración de 10 µg, tanto si se usaban individualmente o como un componente de un cóctel, a menos que se indique lo contrario. La induración cutánea en los sitios de administración fue medida por el mismo operador para todos los experimentos usando calibradores. Las mediciones se registraron antes y a las 72 horas después de la prueba cutánea y, adicionalmente, a las 96 y a las 120 horas para algunos experimentos. Los resultados se expresan como la diferencia de espesor de la piel (mm) entre las lecturas de las pruebas cutáneas previas y posteriores.

IFN-γ en sangre completa determinado por ELISA

Se estimularon cultivos de sangre completa heparinizada con DPP-A (10 µg/ml), DPP-B (10 µg/ml), antígenos de proteína recombinante (5 µg/ml), cóctel de proteínas (5 µg/ml por constituyente), enterotoxina estafilocócica B (SEB) (1 µg/ml de Sigma-Aldrich, Reino Unido) o con control no antígeno. Los cultivos se establecieron dentro de las 8 horas de la recogida de sangre y se cultivaron a 37 °C/5 % de CO₂. El IFN-γ estimulado por antígeno se midió en sobrenadantes de cultivo de sangre completa de 24 horas usando BOVIGAM® ELISA (Prionics AG, Suiza), disponible en el mercado. Los resultados se expresan como la densidad óptica de fondo corregido medida a 450 nm (OD_{450nm}).

Análisis estadístico

Se compararon las diferencias de la magnitud de respuesta entre diferentes combinaciones de antígeno mediante ANOVA de medidas repetidas, con la aplicación de la prueba de análisis posterior de comparación múltiple de Bonferroni. Se analizaron las diferencias entre las frecuencias de respuesta del antígeno usando la prueba exacta de Fisher. Estos análisis estadísticos y el análisis de curvas receptor operador (ROC) se realizaron usando el programa de software Prism 5 (GraphPad Inc, EE.UU.).

Resultados

Un cóctel de proteínas definido de MPB70, MPB83, ESAT-6 y CFP-10 induce respuestas de prueba cutánea en bovinos naturalmente infectados.

Para evaluar el potencial de antígenos definidos como reactivos de diagnóstico de la prueba cutánea, los inventores formularon inicialmente un cóctel que comprende antígenos ESAT-6, CFP-10, MPB70 y MPB83 de la proteína *M. bovis*/*M. tuberculosis* recombinante purificada. Se incluyeron MPB70 y MPB83 en el cóctel, ya que habían demostrado potencial anterior de prueba cutánea DIVA en el modelo de cobaya de la infección por *M. bovis* (Vordermeier et al., (1999) Clin. Diagn. Lab. Immunol. vol. 6, págs. 675-82). En 37 bovinos positivos en SICCT, el cóctel de proteínas induce una respuesta en 29/37 (78 %) de estos bovinos a las 72 horas posteriores a la prueba (Figura 1). Se representa el aumento de la induración cutánea para cada animal mediante un círculo abierto. La línea horizontal proporciona la media (± SEM) con resultados expresados como la diferencia de espesor de la piel (mm) entre las lecturas de la prueba cutánea previa y posterior. Se determinó la diferencia estadística entre las respuestas mediante ANOVA (* p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001).

Además, se midieron reacciones de la piel a las 96 y a las 120 horas, ya que se ha informado previamente de que el desarrollo de las respuestas de la prueba cutánea de bovinos a ESAT-6 seguía aumentando después de 72 horas (Pollock et al., (2003) J. Clin. Microbiol. vol. 41, págs. 1856-1860). En comparación con las reacciones a las 72 horas, las respuestas SICCT se redujeron significativamente a las 96 y 120 horas posteriores a la prueba (Figura 1). La magnitud de las reacciones inducidas por cóctel de proteínas era comparable en cada punto temporal.

La medición de antígeno inducida por IFN- γ en cultivos de sangre completa establecidos en el día de la prueba cutánea demostró que ESAT-6 y CFP-10 fueron los antígenos constituyentes más fuertemente reconocidos en el cóctel de proteínas *in vitro* (Figura 2). Se determinó la capacidad *in vitro* de los antígenos de inducir IFN- γ en la sangre de bovinos naturalmente expuestos a *M. bovis* (n=37) para ESAT-6, CFP-10, MPB70 y MPB83, ya sea individualmente (5 μ g/ml) o como un cóctel de proteínas combinadas (5 μ g/ml por constituyente). También se determinaron las respuestas inducidas por DPP-B (10 μ g/ml), SEB (1 μ g/ml) o control no antígeno. La respuesta de IFN- γ inducida por antígeno para cada animal se representa mediante un círculo abierto. La línea horizontal proporciona la media ($\pm$ SEM) con resultados expresados como la densidad óptica de fondo corregido medida a 450 nm (OD_{450nm}).

Después, se probó el cóctel de proteínas a una concentración de dosis titulada de 10,5 y 1 μ g de cada componente del cóctel. Se muestran las respectivas respuestas en una cohorte de 19 de los reactores previamente probados en la Figura 3. Se determinó una titulación de la dosis de la prueba cutánea para el cóctel de proteínas que compromete ESAT-6, CFP-10, MPB70 y MPB83 en los bovinos que fueron naturalmente expuestos a *M. bovis* (n=19). Se administró el cóctel de proteínas a una concentración de 10, 5 y 1 μ g de cada componente antígeno. Se representan el cóctel de proteínas y las respuestas SICCT [(PPD-B) (PPD-A)] medidas a las 72 horas para cada animal mediante un círculo abierto. La línea horizontal proporciona la media ($\pm$ SEM) con los resultados expresados como la diferencia de espesor de la piel (mm) entre las lecturas de la prueba cutánea previa y posterior. Se determinó la diferencia estadística entre las respuestas inducidas por los cócteles de proteínas mediante ANOVA (* p <0,05, *** p <0,001). Las respuestas a la prueba cutánea fueron comparables entre la dosis de 10 y 5 μ g, pero se redujeron significativamente a la dosis de 1 μ g, lo que demuestra una respuesta de dosis. Para todos los experimentos adicionales se usó una concentración de prueba cutánea de 10 μ g por componente de antígeno definido.

La especificidad de este cóctel de proteínas se determinó por primera vez en bovinos no tratados (n=20). El cóctel no indujo ninguna respuesta medible en cualquiera de estos animales cuando las reacciones se leyeron a las 72 horas (Figura 4). Se midieron las respuestas a la prueba cutánea para el cóctel de proteínas que compromete ESAT-6, CFP-10, MPB70 y MPB83 (10 μ g de cada componente) y para la prueba SICCT [(DPP-B) - (DPP-A)] en bovinos sin TB no tratados (n=19) y vacunados con BCG (n=20). En la Figura 4, las respuestas medidas a las 72 horas para cada animal se representan mediante un círculo abierto. La línea horizontal proporciona la media ($\pm$ SEM) con resultados expresados como la diferencia de espesor de la piel (mm) entre las lecturas de prueba cutánea previa y posterior. Aunque las respuestas SICCT también fueron negativas, las respuestas medibles DPP-A sesgadas sí que indicaron alguna sensibilización de estos animales por micobacterias ambientales. Adicionalmente, se midieron las reacciones a las 96 y 120 horas. Para todos los demás experimentos, las reacciones solamente se registraron a las 72 horas posteriores a la prueba.

El potencial DIVA del cóctel de proteínas se evaluó usando terneros de 3 meses de edad que habían recibido una vacunación neonatal con BCG a las 4-6 semanas de edad (n=20). En estos terneros, solo un animal no indujo una prueba cutánea SICCT DPP-B sesgada, respuesta que confirma la fuerte sensibilización a la prueba cutánea de la tuberculina de la vacunación BCG (Figura 4). Por otro lado, el cóctel de proteínas definidas no indujo una respuesta en ninguno de estos animales vacunados. El cóctel de proteínas y las respuestas SICCT medidas en los bovinos naturalmente infectados o vacunados con BCG se usaron para generar curvas ROC para proporcionar estimaciones de la sensibilidad a la prueba cutánea DIVA y la especificidad. La Tabla 1 resume las estimaciones de sensibilidad y especificidad para un valor de corte de SICCT de >2 mm y de >4 mm, ya que estos representan valores de corte operativos de la prueba "graves" y "estándar", usados en las operaciones de vigilancia del Reino Unido (<http://www.defra.gov.uk/food-farm/animals/diseases/tb/>, consultado el 18 de abril de 2011). También se muestran las cifras de rendimiento para SICCT y los valores de corte de la prueba con cóctel de proteínas que proporcionan una especificidad DIVA del 100 % para las respectivas pruebas.

Tabla 1 Estimaciones de las curvas ROC de sensibilidad y especificidad DIVA para SICCT y pruebas cutáneas basadas en el cóctel de proteínas

Antígeno de diagnóstico	Valor de corte	Sensibilidad ^a (%)	Especificidad ^b (%)	Área bajo	IC del 95 %
-------------------------	----------------	-------------------------------	--------------------------------	-----------	-------------

	(mm)			la curva	
SICCT (DPP B-A)	>2	100	15,0	0,899	0,817-0,981
SICCT (DPP B-A)	>4	94,1	40,0	0,899	0,817-0,981
SICCT (DPP B-A)	> 10	55,9	100	0,899	0,817-0,981
Cóctel de proteína ⁰	> 1	73,6	100	0,882	0,791-0,974

^a Sensibilidad determinada usando bovinos "reactores" naturalmente infectados de la enfermedad confirmados por SICCT (n=34).

^b Especificidad determinada usando bovinos sin la enfermedad y terneros vacunados con BCG (n=20).

^c Cóctel de proteínas que comprende 10 µg de cada uno de ESAT-6 (SEQ ID NO: 36), CFP-10 (SEQ ID NO: 35), MPB70 (SEQ ID NO: 39) y MPB83 (SEQ ID NO: 37).

Optimización de los reactivos de prueba cutánea definidos que incluyen el uso de Rv3615c y polipéptidos sintéticos

La evaluación *in vitro* de la capacidad de los antígenos del cóctel de proteínas constituyentes de inducir IFN-γ sugirió la inmunodominancia de ESAT-6 y CFP-10 (Figura 2). Por ello, se investigó el beneficio aditivo de la inclusión de MPB70 y MPB83 a un cóctel que ya contiene ESAT-6 y CFP-10. En un grupo de 12 bovinos naturalmente infectados previamente no ensayados, de los cuales todos indujeron respuestas SICCT positivas (datos no mostrados), 6/12 bovinos indujeron una respuesta al cóctel que contiene los 4 antígenos (respuestas de 1-6 mm), mientras que solo 3 de estos bovinos respondieron al cóctel que contiene solo ESAT-6 y CFP-10 (respuestas de 2, 3 y 6 mm). Aunque la diferencia en la frecuencia de respuesta no fue significativa, el resultado sí que indicó un beneficio añadido de incluir MPB70 y/o MPB83 al cóctel.

Para determinar si la inclusión de MPB83 y MPB70 era necesaria para respuestas óptimas de la piel, se probaron los cócteles de proteínas formulados con y sin MPB70 en otros 13 bovinos naturalmente infectados. Adicionalmente, se usó este experimento como una oportunidad para evaluar dos novedosas formulaciones de antígeno definidas. En primer lugar, un cóctel de proteínas que contiene Rv3615c, un antígeno DIVA recientemente identificado que puede identificar bovinos infectados por *M. bovis* que no responden a ESAT-6 o CFP-10 (Documento WO2009/060184 y Sidders et al., (2008) Infect. Immun. vol. 76, págs. 3932-9). En segundo lugar, un cóctel de polipéptidos sintéticos que comprende polipéptidos solapados de ESAT-6 y CFP-10. Los resultados se muestran en la Figura 5, en la que las respuestas medidas a las 72 horas para cada animal están representadas mediante un círculo abierto, la línea horizontal proporciona la media (± SEM) con resultados expresados como la diferencia en el espesor de la piel (mm) entre las lecturas de la prueba cutánea previa y posterior. La diferencia estadística entre las respuestas inducidas por la proteína definida y los cócteles de polipéptidos se determinó usando ANOVA (***) p <0,001).

La inclusión de MPB70 no demostró mejoría en la frecuencia o magnitud de respuesta de las reacciones cutáneas en estos bovinos en comparación con las respuestas inducidas por el cóctel que contenía ESAT6, CFP-10 y MPB83 (Figura 5). Por otro lado, la adición de Rv3615c aumentó la frecuencia de respuesta de 10/13 a 13/13 y también dio lugar a respuestas significativamente más fuertes (Figura 5). Las combinaciones de proteínas de ESAT-6 (E6), CFP-10 (C10), MPB70, MPB83 (83) y/o Rv3615c se probaron en 10 µg por proteína constituyente.

El cóctel de polipéptidos ESAT-6 y CFP-10 (E6/C10) incluía 21 polipéptidos (SEQ ID NO: 1-21) a una concentración de 10 µg por polipéptido. Como muestra la Figura 5, el cóctel de polipéptidos ESAT-6/CFP-10 induce respuestas en 11/13 bovinos, demostrando por tanto su potencial como antígenos de prueba cutánea.

Posteriormente, se investigó la contribución de la prueba cutánea de los antígenos individuales presentes en el cóctel de proteínas que comprende ESAT-6, CFP-10, MPB83 y Rv3615c. La evaluación de las combinaciones de polipéptidos sintéticos se amplió mediante la prueba de un cóctel de polipéptidos derivados de CFP-10 (SEQ ID NO: 1-10), ESAT-6 (SEQ ID NO: 11-21), MPB83 (SEQ ID NO: 22) y Rv3615c (SEQ ID NO: 31, 32 y 34). Estos reactivos se probaron en 12 bovinos reactores que se seleccionaron de los usados en los 2 experimentos previos. Los 9 animales que respondieron a cualquier antígeno único reconocieron CFP-10 (valor de corte de positividad >1 mm), mientras que 7, 3, y 2 respondieron a ESAT-6, MPB83 y Rv3615c, respectivamente (Figura 6). En la Figura 6 se representan las reacciones medidas a las 72 horas para cada animal mediante un círculo abierto. La línea horizontal

proporciona la media ($\pm$ SEM) con resultados expresados como la diferencia en el espesor de la piel (mm) entre las lecturas de la prueba cutánea previa y posterior.

El cóctel de proteínas combinadas proporcionó máxima frecuencia de respuesta y tamaño de reacción, incluidos 3 animales que no respondieron a ninguna de las proteínas individuales. De modo alentador, el cóctel de polipéptidos indujo respuestas en 10/12 de estos bovinos, como se muestra en la Figura 6.

La especificidad de la combinación de proteínas de ESAT-6, CFP-10, MPB83 y Rv3615c, como se ha usado anteriormente, se evaluó en 14 nuevos bovinos no tratados y en 19 de los terneros que habían recibido una vacunación neonatal con BCG previamente probados. El cóctel de proteínas no indujo respuestas en ninguno de estos bovinos no tratados o vacunados. Aunque 16/19 de los vacunados con BCG todavía demostraron una respuesta de IFN- γ sesgada de DPP-B en este momento ([DPP-B]-DPP-A] $>0,1$ OD_{450nm}, datos no mostrados), debe indicarse, sin embargo, que solo 3/19 de los vacunados con BCG todavía provocaron una reacción cutánea sesgada de DPP-B en esta prueba, debido al prolongado periodo de casi 12 meses después de la vacunación neonatal en este momento (datos no mostrados). Por ello, el uso del cóctel proporciona un ensayo más específico incluso después de un período prolongado de hasta 12 meses después de la vacunación.

Los inventores también evaluaron el rendimiento de prueba cutánea de un cóctel de polipéptidos de diagnóstico basado en ESAT-6/CFP-10 que incluye adicionalmente 11 polipéptidos Rv3615c divulgados en el documento WO2009/060184 (SEQ ID NO: 23-33).

Estos 11 polipéptidos proporcionan cobertura completamente solapada de los restos 1-100 de la secuencia de la proteína Rv3615c. Por lo tanto, los polipéptidos en el cóctel fueron SEQ ID NO: 1-21 y 23-33. Las respuestas de la prueba cutánea se midieron en bovinos positivos (reactores) de la prueba SICCT (n=15). Estos animales se reclutaron previamente en granjas del Reino Unido durante las operaciones rutinarias de vigilancia de la TB. Las reacciones cutáneas se midieron 3 días después de la inyección intradérmica de antígenos (100 μ l de volumen de inyección). Cada uno de los cócteles de polipéptidos contenía una dosis administrada de 10 μ g de cada polipéptido componente.

El aumento del espesor de la piel 3 días después de la administración de antígenos se muestra en la Figura 7. Todos los animales tuvieron una prueba cutánea positiva a SICCT. La adición de los 11 polipéptidos Rv3615c a un cóctel basado en polipéptidos ESAT-6/CFP-10 dio como resultado respuestas a la prueba cutánea significativamente más fuertes en comparación con el cóctel que contenía polipéptidos de ESAT6 y CFP-10 solo (p=0,018, prueba t pareada).

Finalmente, los inventores determinaron que la combinación óptima de polipéptidos de epítomos (proteínas o fragmentos de polipéptidos de epítomos) fue ESAT-6, CFP-10 y Rv3615c. Como puede verse en la Figura 8, no se consiguió sensibilidad adicional de la prueba cutánea mediante la inclusión adicional de la proteína MPB83.

Análisis

Las investigaciones anteriores sobre el uso de reactivos de prueba cutánea bovina definidos sugerían que se pueden necesitar tanto reactivos inmunomoduladores (Whelan et al., (2003) Infect. Immun. vol. 71, págs. 6420-5) como altas dosis de antígeno ($\geq 400\mu$ g) (Pollock et al., (2003) J. Clin. Microbiol. vol. 41, págs. 1856-60) para proporcionar respuestas cutáneas sensibles. Por ello, es sorprendente que el presente trabajo demostrara reacciones cutáneas específicas del antígeno en el 78 % de los bovinos reactores SICCT cuando se usó una combinación proteína-antígeno de ESAT-6, CFP-10, MPB70 y MPB83 usando una concentración administrada de 10 μ g por proteína. De forma importante, esta es una dosis que se considera realista para aplicaciones prácticas en el campo. Además, este cóctel de prueba cutánea era muy específico, sin provocar respuesta en los terneros no tratados ni vacunados con BCG. Esta es la primera vez que se ha demostrado el potencial DIVA de los antígenos de prueba cutánea definidos en bovinos vacunados con BCG/infectados con *M. bovis*.

La evaluación del reconocimiento *in vitro* de los antígenos individuales en el cóctel inicial de proteínas mostró que MPB70 y MPB83 tenían una capacidad pobre de inducción de IFN- γ en comparación con ESAT-6 y CFP-10. Por ello, a pesar de su inmunogenicidad sub-dominante *in vitro* en los bovinos, es sorprendente que su inclusión en el cóctel de prueba cutánea aumentara la frecuencia de respuesta a la prueba cutánea en comparación con el uso de ESAT-6 y CFP-10 solos. En ratones, se ha demostrado que durante una respuesta de DTH (hipersensibilidad de tipo retardado), primero debe haber una fase de iniciación temprana que se necesita para reclutar células T específicas de antígeno que luego propagan la respuesta inflamatoria clásica de fase tardía (van Loveren et al., (1983) J. Exp. Med. vol. 157, págs. 1604-17). Además, los antígenos que inducen las etapas de iniciación y efectora pueden ser diferentes (Ptak et al., (1986) J. Immunol. vol. 136, págs. 1564-70). Por lo tanto, sin estar ligado a teoría alguna, es posible que los antígenos de células T efectoras subdominantes, como MPB70 y MPB83 puedan todavía tener un papel en el potenciamiento de la iniciación de la reacción, ayudando de este modo a obtener una mejor respuesta a los antígenos efectores dominantes, como ESAT-6 y CFP-10.

La optimización adicional del coctel de proteínas de prueba cutánea demostró que la inclusión de MPB70 no tenía ningún beneficio adicional sobre el uso de MPB83. Sin embargo, la adición de Rv3615c a un cóctel de proteínas que contiene ESAT-6, CFP-10 y MPB83 sí que dio lugar a una mejora significativa de las respuestas de la prueba cutánea y demostró ser la combinación de antígeno más óptima probada. El potencial de diagnóstico de Rv3615c solo se ha identificado recientemente, habiéndose encontrado que es reconocido por bovinos infectados que no respondían ni a ESAT-6 ni a CFP-10 (documento WO2009/060184 y Sidders et al., (2008) Infect. Immun. vol. 76, págs. 3932-9). La presente demostración de que también puede contribuir a mejorar las respuestas a la prueba cutánea sin comprometer la especificidad confirma aún más su importancia diagnóstica. Además, los inventores han demostrado que las ventajas descritas en el presente documento se obtienen usando una combinación de ESAT-6, CFP-10 y Rv3615c, sin necesidad de incluir MPB83 para obtener una sensibilidad óptima a la prueba cutánea cuando las tres proteínas (o fragmentos de polipéptidos de epítetos) están incluidas.

Una ventaja práctica importante de los polipéptidos sintéticos en comparación con las proteínas recombinantes como antígenos de diagnóstico es que, al estar sintetizados químicamente, el control de calidad se estandariza más fácilmente. La aplicación práctica de los polipéptidos sintéticos como reactivos de DIVA de TB bovina utilizando ensayos de sangre basados en IFN- γ (Vordermeier et al., (2001) Clin. Diagn. Lab. Immunol. vol. 8, págs. 571-8) ha sido previamente demostrada y, de forma análoga, estos también se han aplicado para el diagnóstico de la TB humana (Arend et al., (2000) J. Infect. Dis. vol. 181, págs. 1850-4; Lalvani et al., (2001) J. Infect. Dis. vol. 183, págs. 469-77). Sin embargo, este es el primer informe que demuestra el potencial de estos polipéptidos de fragmentos de proteína como antígenos para la prueba cutánea de TB en bovinos. Estos datos proporcionan una base para la futura optimización y mejora de una prueba cutánea basada en polipéptidos.

Al considerar por qué los resultados de estudios previos de la prueba cutánea de bovinos basada en ESAT-6 parecían menos prometedores que los datos actuales (Pollock et al., (2003) J. Clin. Microbiol. vol. 41, págs. 1856-60; Whelan et al., (2003) Infect. Immun. vol. 71, págs. 6420-5), es probable que una explicación sea la inclusión de CFP-10, que no se ha evaluado previamente como antígeno de la prueba cutánea bovina. En particular, las respuestas a la prueba cutánea inducidas por los antígenos de proteína individuales demostraron que CFP-10 era el antígeno definido más potente. Además, el uso de combinaciones de antígenos demostró claros beneficios de sensibilidad en el presente estudio y también habrá contribuido a la mejora de respuestas en comparación con el uso previo de ESAT-6 solo (Pollock et al., (2003) J. Clin. Microbiol. vol. 41, págs. 1856-60, Whelan et al., (2003) Infect. Immun. vol. 71, págs. 6420-5). Cuando se comparan las respuestas celulares inducidas por antígenos de proteínas recombinantes, también debería considerarse la presencia de endotoxina contaminante. Sin embargo, es improbable que la inmunomodulación de una posible contaminación por endotoxina pueda explicar las potentes respuestas a los antígenos de proteína en el presente estudio, ya que las reacciones cutáneas también fueron inducidas por los polipéptidos sintéticos que están exentos de endotoxina.

Pollock et al., también demostraron que las reacciones cutáneas de bovinos inducidas por DPP eran máximas a las 72 horas, mientras que la respuesta a ESAT-6 era a menudo mayor a las 96 horas (Pollock et al., (2003) J. Clin. Microbiol. vol. 41, págs. 1856-60). Los presentes datos confirmaron que las 72 horas son óptimas para la medición de la respuesta SICCT (Figura 1) y también se observaron aumentos de la frecuencia de respuesta del cóctel de proteínas cuando se leyeron las reacciones a las 96 o 120 horas, de manera que la frecuencia de respuesta aumentó de 29/37 a 31/37 y luego 32/37 para las 72, 96 y 120 horas, respectivamente. Sin embargo, el aumento de la frecuencia de respuesta no fue significativo (datos no mostrados) y no hubo aumento de la magnitud de las respuestas comparativas. Dado que se observaron reacciones muy específicas en la mayoría de los animales a las 72 horas usando los cócteles definidos optimizados, medir las respuestas en este momento tiene el beneficio práctico de permitir la opción de probar antígenos definidos y DPP en paralelo y luego leer la reacción en el mismo día.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> The Secretary of State for Environment, Food and Rural Affairs acting through the Veterinary Laboratories Agency Whelan, Adam O
Vordermeier, Hanns M
<120> Antigens
<130> RT/P1761PC00
<150> GB1007075.3
<151> 2010-04-28
<160> 39
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial

ES 2 637 590 T3

<220>
 <223> Fragment of full length protein
 <400> 1
 Met Ala Glu Met Lys Thr Asp Ala Ala Thr Leu Ala Gln Glu Ala Gly
 1 5 10 15

 5 Asn Phe
 <210> 2
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 10 <223> Fragment of full length protein
 <400> 2
 Gln Glu Ala Gly Asn Phe Glu Arg Ile Ser Gly Asp Leu Lys Thr Gln
 1 5 10 15
 <210> 3
 <211> 18
 15 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Fragment of full length protein
 <400> 3
 Glu Arg Ile Ser Gly Asp Leu Lys Thr Gln Ile Asp Gln Val Glu Ser
 1 5 10 15

 20 Thr Ala
 <210> 4
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial
 25 <220>
 <223> Fragment of full length protein
 <400> 4
 Ile Asp Gln Val Glu Ser Thr Ala Gly Ser Leu Gln Gly Gln Trp Arg
 1 5 10 15

 30 Gly
 <210> 5
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 35 <223> Fragment of full length protein
 <400> 5
 Gly Ser Leu Gln Gly Gln Trp Arg Gly Ala Ala Gly Thr Ala Ala Gln
 1 5 10 15

 40 Ala Ala
 <210> 6
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Fragment of full length protein
 <400> 6
 Ala Gly Thr Ala Ala Gln Ala Ala Val Val Arg Phe Gln Glu Ala Ala
 1 5 10 15

 45 Asn Lys
 <210> 7
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial

ES 2 637 590 T3

<220>
 <223> Fragment of full length protein
 <400> 7
 Val Val Arg Phe Gln Glu Ala Ala Asn Lys Gln Lys Gln Glu Leu Asp
 1 5 10 15

5
 Glu Ile
 <210> 8
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Fragment of full length protein
 <400> 8
 Gln Lys Gln Glu Leu Asp Glu Ile Ser Thr Asn Ile Arg Gln Ala Gly
 1 5 10 15

Val Gln Tyr Ser
 20
 <210> 9
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Fragment of full length protein
 <400> 9
 Asn Ile Arg Gln Ala Gly Val Gln Tyr Ser Arg Ala Asp Glu Glu Gln
 1 5 10 15

20
 Gln Gln
 <210> 10
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Fragment of full length protein
 <400> 10
 Arg Ala Asp Glu Glu Gln Gln Gln Ala Leu Ser Ser Gln Met Gly Phe
 1 5 10 15

30
 <210> 11
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Fragment of full length protein
 <400> 11
 Met Thr Glu Gln Gln Trp Asn Phe Ala Gly Ile Glu Ala Ala Ala Ser
 1 5 10 15

40
 <210> 12
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Fragment of full length protein
 <400> 12
 Ala Gly Ile Glu Ala Ala Ala Ser Ala Ile Gln Gly Asn Val Thr Ser
 1 5 10 15

45
 <210> 13
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Fragment of full length protein
 <400> 13
 Ala Ile Gln Gly Asn Val Thr Ser Ile His Ser Leu Leu Asp Glu Gly
 1 5 10 15

50
 <223> Fragment of full length protein
 <400> 13
 Ala Ile Gln Gly Asn Val Thr Ser Ile His Ser Leu Leu Asp Glu Gly
 1 5 10 15

ES 2 637 590 T3

<210> 14
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> Fragment of full length protein
 <400> 14
 Ile His Ser Leu Leu Asp Glu Gly Lys Gln Ser Leu Thr Lys Leu Ala
 1 5 10 15
 <210> 15
 10 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Fragment of full length protein
 15 <400> 15
 Lys Gln Ser Leu Thr Lys Leu Ala Ala Ala Trp Gly Gly Ser Gly Ser
 1 5 10 15
 <210> 16
 <211> 16
 <212> PRT
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> Fragment of full length protein
 <400> 16
 Ala Ala Trp Gly Gly Ser Gly Ser Glu Ala Tyr Gln Gly Val Gln Gln
 1 5 10 15
 25 <210> 17
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 30 <223> Fragment of full length protein
 <400> 17
 Glu Ala Tyr Gln Gly Val Gln Gln Lys Trp Asp Ala Thr Ala Thr Glu
 1 5 10 15
 <210> 18
 35 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Fragment of full length protein
 <400> 18
 Lys Trp Asp Ala Thr Ala Thr Glu Leu Asn Asn Ala Leu Gln Asn Leu
 1 5 10 15
 40 <210> 19
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 45 <220>
 <223> Fragment of full length protein
 <400> 19
 Leu Asn Asn Ala Leu Gln Asn Leu Ala Arg Thr Ile Ser Glu Ala Gly
 1 5 10 15
 50 <210> 20
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Fragment of full length protein
 55 <400> 20
 Ala Arg Thr Ile Ser Glu Ala Gly Gln Ala Met Ala Ser Thr Glu Gly
 1 5 10 15
 <210> 21
 <211> 15
 <212> PRT
 60 <213> Artificial

ES 2 637 590 T3

<220>
 <223> Fragment of full length protein
 <400> 21
 Gln Ala Met Ala Ser Thr Glu Gly Asn Val Thr Gly Met Phe Ala
 1 5 10 15
 5 <210> 22
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 10 <223> Fragment of full length protein
 <400> 22
 Gly Leu Val Cys Gly Gly Val His Thr Ala Asn Ala Thr Val Tyr Met
 1 5 10 15

 Ile Asp Thr Val
 20
 15 <210> 23
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Fragment of full length protein
 <400> 23
 Met Thr Glu Asn Leu Thr Val Gln Pro Glu Arg Leu Gly Val Leu Ala
 1 5 10 15

 Ser His His Asp
 20
 20 <210> 24
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial
 25 <220>
 <223> Fragment of full length protein
 <400> 24
 Pro Glu Arg Leu Gly Val Leu Ala Ser His His Asp Asn Ala Ala Val
 1 5 10 15

 Asp Ala Ser Ser
 20
 30 <210> 25
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Fragment of full length protein
 35 <400> 25
 Ser His His Asp Asn Ala Ala Val Asp Ala Ser Ser Gly Val Glu Ala
 1 5 10 15

 Ala Ala Gly Leu
 20
 40 <210> 26
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Fragment of full length protein
 <400> 26
 Asp Ala Ser Ser Gly Val Glu Ala Ala Ala Gly Leu Gly Glu Ser Val
 1 5 10 15

 Ala Ile Thr His
 20

ES 2 637 590 T3

5
 <210> 27
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Fragment of full length protein
 <400> 27
 Ala Ala Gly Leu Gly Glu Ser Val Ala Ile Thr His Gly Pro Tyr Cys
 1 5 10 15

 Ser Gln Phe Asn
 20
 10
 <210> 28
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Fragment of full length protein
 <400> 28
 Ala Ile Thr His Gly Pro Tyr Cys Ser Gln Phe Asn Asp Thr Leu Asn
 1 5 10 15

 Val Tyr Leu Thr
 20
 20
 <210> 29
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Fragment of full length protein
 <400> 29
 Ser Gln Phe Asn Asp Thr Leu Asn Val Tyr Leu Thr Ala His Asn Ala
 1 5 10 15

 Leu Gly Ser Ser
 20
 25
 <210> 30
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Fragment of full length protein
 <400> 30
 Val Tyr Leu Thr Ala His Asn Ala Leu Gly Ser Ser Leu His Thr Ala
 1 5 10 15

 Gly Val Asp Leu
 20
 35
 <210> 31
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Fragment of full length protein
 <400> 31
 Leu Gly Ser Ser Leu His Thr Ala Gly Val Asp Leu Ala Lys Ser Leu
 1 5 10 15

 Arg Ile Ala Ala
 20
 45
 <210> 32
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial

ES 2 637 590 T3

<220>
 <223> Fragment of full length protein
 <400> 32
 Gly Val Asp Leu Ala Lys Ser Leu Arg Ile Ala Ala Lys Ile Tyr Ser
 1 5 10 15

 Glu Ala Asp Glu
 20
 5 <210> 33
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 10 <223> Fragment of full length protein
 <400> 33
 Arg Ile Ala Ala Lys Ile Tyr Ser Glu Ala Asp Glu Ala Trp Arg Lys
 1 5 10 15

 Ala Ile Asp Gly
 20
 15 <210> 34
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Fragment of full length protein
 <400> 34
 Ala Lys Ile Tyr Ser Glu Ala Asp Glu Ala Trp Arg Lys Ala Ile Asp
 1 5 10 15

 Gly Leu Phe Thr
 20
 20 <210> 35
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium bovis
 25 <400> 35
 Met Ala Glu Met Lys Thr Asp Ala Ala Thr Leu Ala Gln Glu Ala Gly
 1 5 10 15

 Asn Phe Glu Arg Ile Ser Gly Asp Leu Lys Thr Gln Ile Asp Gln Val
 20 25 30

 Glu Ser Thr Ala Gly Ser Leu Gln Gly Gln Trp Arg Gly Ala Ala Gly
 35 40 45

 Thr Ala Ala Gln Ala Ala Val Val Arg Phe Gln Glu Ala Ala Asn Lys
 50 55 60

 Gln Lys Gln Glu Leu Asp Glu Ile Ser Thr Asn Ile Arg Gln Ala Gly
 65 70 75 80

 Val Gln Tyr Ser Arg Ala Asp Glu Glu Gln Gln Gln Ala Leu Ser Ser
 85 90 95

 Gln Met Gly Phe
 100
 30 <210> 36
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium bovis

ES 2 637 590 T3

<400> 36

Met Thr Glu Gln Gln Trp Asn Phe Ala Gly Ile Glu Ala Ala Ala Ser
1 5 10 15

Ala Ile Gln Gly Asn Val Thr Ser Ile His Ser Leu Leu Asp Glu Gly
20 25 30

Lys Gln Ser Leu Thr Lys Leu Ala Ala Ala Trp Gly Gly Ser Gly Ser
35 40 45

Glu Ala Tyr Gln Gly Val Gln Gln Lys Trp Asp Ala Thr Ala Thr Glu
50 55 60

Leu Asn Asn Ala Leu Gln Asn Leu Ala Arg Thr Ile Ser Glu Ala Gly
65 70 75 80

Gln Ala Met Ala Ser Thr Glu Gly Asn Val Thr Gly Met Phe Ala
85 90 95

<210> 37

<211> 220

<212> PRT

<213> Mycobacterium bovis

ES 2 637 590 T3

<400> 37

Met Ile Asn Val Gln Ala Lys Pro Ala Ala Ala Ser Leu Ala Ala
1 5 10 15

Ile Ala Ile Ala Phe Leu Ala Gly Cys Ser Ser Thr Lys Pro Val Ser
20 25 30

Gln Asp Thr Ser Pro Lys Pro Ala Thr Ser Pro Ala Ala Pro Val Thr
35 40 45

Thr Ala Ala Met Ala Asp Pro Ala Ala Asp Leu Ile Gly Arg Gly Cys
50 55 60

Ala Gln Tyr Ala Ala Gln Asn Pro Thr Gly Pro Gly Ser Val Ala Gly
65 70 75 80

Met Ala Gln Asp Pro Val Ala Thr Ala Ala Ser Asn Asn Pro Met Leu
85 90 95

Ser Thr Leu Thr Ser Ala Leu Ser Gly Lys Leu Asn Pro Asp Val Asn
100 105 110

Leu Val Asp Thr Leu Asn Gly Gly Glu Tyr Thr Val Phe Ala Pro Thr
115 120 125

Asn Ala Ala Phe Asp Lys Leu Pro Ala Ala Thr Ile Asp Gln Leu Lys
130 135 140

Thr Asp Ala Lys Leu Leu Ser Ser Ile Leu Thr Tyr His Val Ile Ala
145 150 155 160

Gly Gln Ala Ser Pro Ser Arg Ile Asp Gly Thr His Gln Thr Leu Gln
165 170 175

Gly Ala Asp Leu Thr Val Ile Gly Ala Arg Asp Asp Leu Met Val Asn
180 185 190

Asn Ala Gly Leu Val Cys Gly Gly Val His Thr Ala Asn Ala Thr Val
195 200 205

Tyr Met Ile Asp Thr Val Leu Met Pro Pro Ala Gln
210 215 220

<210> 38

<211> 103

<212> PRT

<213> Mycobacterium bovis

<400> 38

Met Thr Glu Asn Leu Thr Val Gln Pro Glu Arg Leu Gly Val Leu Ala

ES 2 637 590 T3

1 5 10 15
 Ser His His Asp Asn Ala Ala Val Asp Ala Ser Ser Gly Val Glu Ala
 20 25 30
 Ala Ala Gly Leu Gly Glu Ser Val Ala Ile Thr His Gly Pro Tyr Cys
 35 40 45
 Ser Gln Phe Asn Asp Thr Leu Asn Val Tyr Leu Thr Ala His Asn Ala
 50 55 60
 Leu Gly Ser Ser Leu His Thr Ala Gly Val Asp Leu Ala Lys Ser Leu
 65 70 75 80
 Arg Ile Ala Ala Lys Ile Tyr Ser Glu Ala Asp Glu Ala Trp Arg Lys
 85 90 95
 Ala Ile Asp Gly Leu Phe Thr
 100
 <210> 39
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium bovis
 <400> 39
 Met Lys Val Lys Asn Thr Ile Ala Ala Thr Ser Phe Ala Ala Ala Gly
 1 5 10 15
 Leu Ala Ala Leu Ala Val Ala Val Ser Pro Pro Ala Ala Ala Gly Asp
 20 25 30
 Leu Val Gly Pro Gly Cys Ala Glu Tyr Ala Ala Ala Asn Pro Thr Gly
 35 40 45
 Pro Ala Ser Val Gln Gly Met Ser Gln Asp Pro Val Ala Val Ala Ala
 50 55 60
 Ser Asn Asn Pro Glu Leu Thr Thr Leu Thr Ala Ala Leu Ser Gly Gln
 65 70 75 80
 Leu Asn Pro Gln Val Asn Leu Val Asp Thr Leu Asn Ser Gly Gln Tyr
 85 90 95
 Thr Val Phe Ala Pro Thr Asn Ala Ala Phe Ser Lys Leu Pro Ala Ser
 100 105 110
 Thr Ile Asp Glu Leu Lys Thr Asn Ser Ser Leu Leu Thr Ser Ile Leu
 115 120 125

5

ES 2 637 590 T3

Thr Tyr His Val Val Ala Gly Gln Thr Ser Pro Ala Asn Val Val Gly
 130 135 140

Thr Arg Gln Thr Leu Gln Gly Ala Ser Val Thr Val Thr Gly Gln Gly
 145 150 155 160

Asn Ser Leu Lys Val Gly Asn Ala Asp Val Val Cys Gly Gly Val Ser
 165 170 175

Thr Ala Asn Ala Thr Val Tyr Met Ile Asp Ser Val Leu Met Pro Pro
 180 185 190

Ala

REIVINDICACIONES

1. Reactivo de diagnóstico de prueba cutánea en forma de preparación inyectable estéril, que comprende:
 - a. los polipéptidos de epítomos de CFP-10 que consisten en las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 1-10;
 - b. los polipéptidos de epítomos de ESAT-6 que consisten en las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 11-21; and
 - c. los polipéptidos de epítomos de Rv3615c que consisten en las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 23-34.
2. Reactivo de diagnóstico según la reivindicación 1 que comprende uno o más de los polipéptidos que tienen las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 35, 36 y 38.
3. Reactivo de diagnóstico según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende adicionalmente, al menos, un polipéptido de epítomos de MPB83.
4. Reactivo de diagnóstico según la reivindicación 3, que comprende un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácido SEQ ID NO: 37 y/o que comprende un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácido SEQ ID NO: 22.
5. Reactivo de diagnóstico según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende una o más proteínas de fusión.
6. Reactivo de diagnóstico según cualquiera de las reivindicaciones anteriores para su uso en un método de detección de la infección por *Mycobacterium bovis* o *Mycobacterium tuberculosis* en un animal utilizando una prueba cutánea.
7. Reactivo de diagnóstico según cualquiera de las reivindicaciones anteriores para su uso en un método de diagnóstico de la infección de un animal por *Mycobacterium bovis* o *Mycobacterium tuberculosis*, en donde el método comprende las etapas de realizar una prueba cutánea en el animal utilizando el reactivo de diagnóstico y correlacionando un resultado de prueba cutánea positivo con la infección del animal por *Mycobacterium bovis* o *Mycobacterium tuberculosis*.
8. Kit de diagnóstico que comprende un reactivo de diagnóstico según cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
9. Kit de diagnóstico según la reivindicación 8, en donde el reactivo de diagnóstico está en forma líquida e incluido en, al menos, una alícuota de 0,05-0,15 ml que contiene 1-15 µg de cada polipéptido contenido en el reactivo de diagnóstico.
10. Kit de diagnóstico según la reivindicación 9, en donde cada alícuota está contenida en un dispositivo de inyección desechable.
11. Kit de diagnóstico según cualquiera de las reivindicaciones 8-10, en donde el reactivo de diagnóstico puede detectar una infección por *M. bovis* o *M. tuberculosis* en un mamífero.
12. Kit de diagnóstico según la reivindicación 11, en donde el reactivo de diagnóstico puede diferenciar entre un mamífero infectado por *M. bovis* o *M. tuberculosis* y un mamífero vacunado contra la infección por *M. bovis* o *M. tuberculosis*.

Figura 1

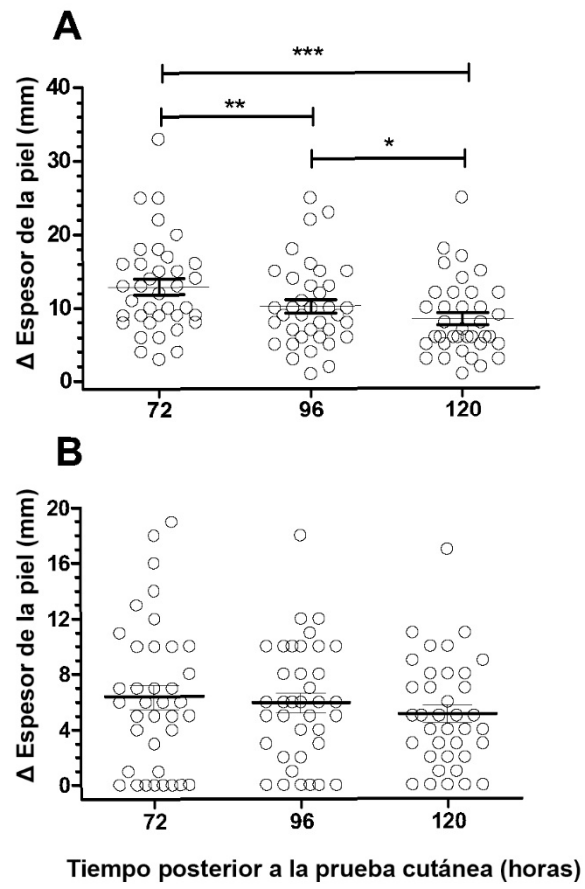


Figura 2

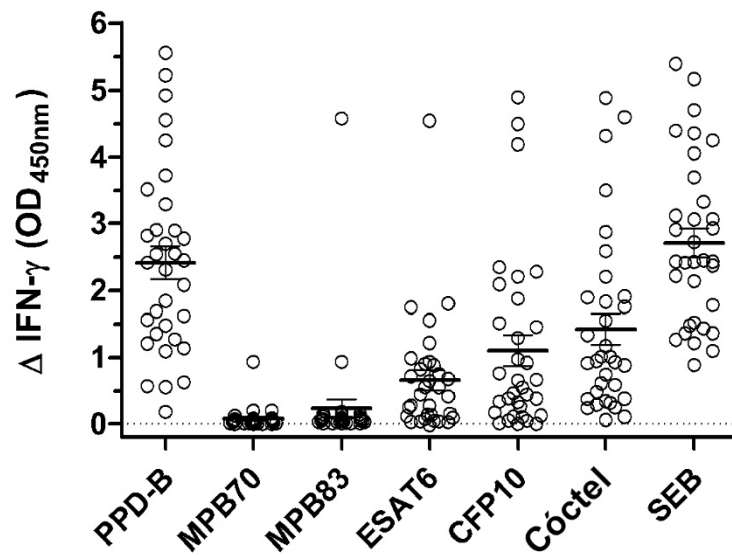


Figura 3

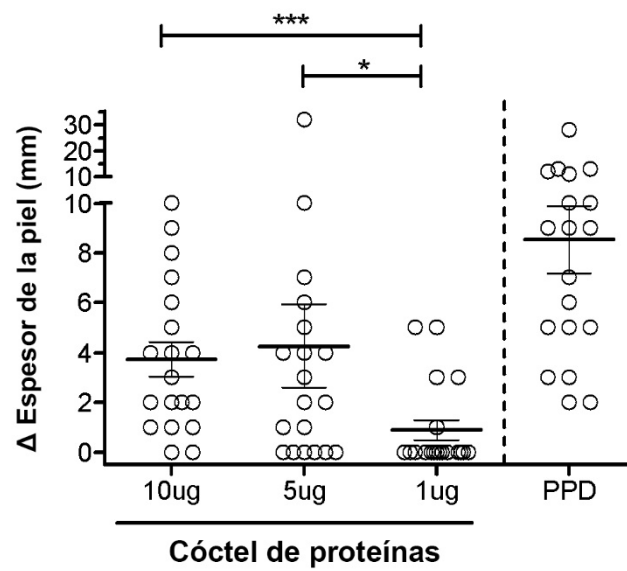


Figura 4

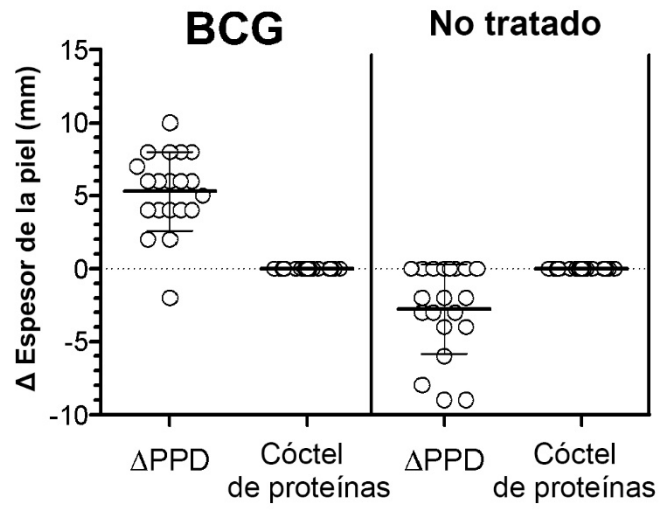


Figura 5

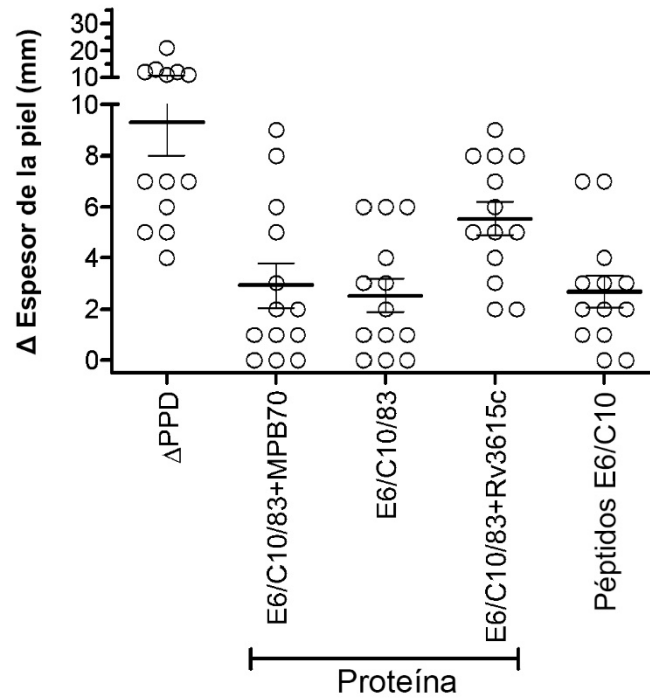


Figura 6

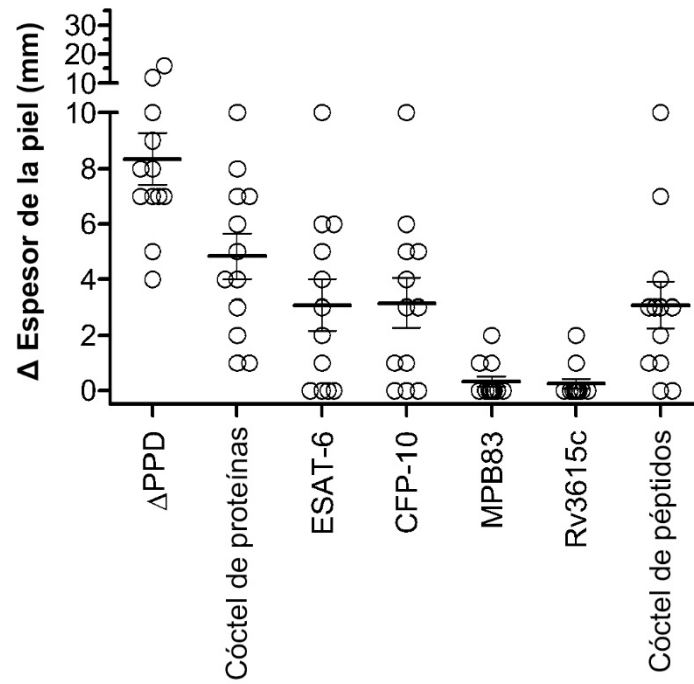


Figura 7

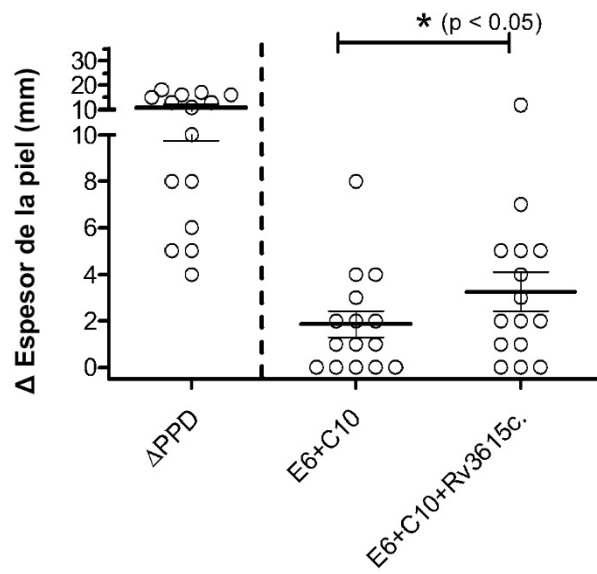


Figura 8

