

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 007 257**

51 Int. Cl.:

G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.04.2021 PCT/EP2021/059316**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.10.2021 WO21209339**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.04.2021 E 21717087 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.12.2024 EP 4143574**

54 Título: **Método in vitro para el diagnóstico de sujetos infectados por especies de micobacterias**

30 Prioridad:

13.04.2020 EP 20382291

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

19.03.2025

73 Titular/es:

**NEIKER - INSTITUTO VASCO DE INVESTIGACIÓN
Y DESARROLLO AGRARIO, S.A. (50.00%)**

**Berreaga kalea nº1
48160 Derio, Bizkaia, ES y
SERIDA, SERVICIO REGIONAL DE
INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO
AGROALIMENTARIO (50.00%)**

72 Inventor/es:

**ALONSO FERNÁNDEZ-PACHECO, MARTA;
CASAIS GOYOS, ROSA;
JUSTE JORDÁN, RAMÓN;
BLANCO VÁZQUEZ, CRISTINA;
CANIVE RUIZ, MARÍA y
IGLESIAS BESTEIRO, NATALIA**

74 Agente/Representante:

IGARTUA IRIZAR, Ismael

ES 3 007 257 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 IN VITRO PARA EL DIAGNÓSTICO DE SUJETOS INFECTADOS POR ESPECIES DE MICOBACTERIAS

5 SECTOR DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere al campo médico o veterinario. En particular, la presente invención se dirige a un método in vitro para el diagnóstico de sujetos infectados con especies de *Mycobacterium*, particularmente sujetos infectados con *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (MAP) que es el agente causante de la paratuberculosis (PTB).

EXPOSICIÓN DE LA INVENCIÓN

MAP es una bacteria patógena perteneciente al género *Mycobacterium*. MAP causa la enfermedad de Johne o PTB, que afecta principalmente a rumiantes como el ganado vacuno, y se ha asociado con algunas enfermedades humanas como la de Crohn, la colitis ulcerosa o el cáncer colorrectal [Pierce ES et al., 2018. Could *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis cause Crohn's disease, ulcerative colitis... and colorectal cancer? Infect Agent Cancer. 2018 Jan 4;13:1.doi: 10.1186/s13027-017-0172-3. eCollection 2018] [Garvey M et al., 2018. *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis: A possible causative agent in human morbidity and risk to public health safety. Open Vet J. 2018;8(2):172-181. doi: 10.4314/ovj.v8i2.10. Epub 2018 May 19]. Además, MAP se ha asociado a una lista cada vez más larga de enfermedades inflamatorias/autoinmunes: sarcoidosis, síndrome de Blau, tiroiditis de Hashimoto, diabetes autoinmune (T1D), esclerosis múltiple (EM), artritis reumatoide, lupus y enfermedad de Parkinson [[Dow CT et al., 2020. Proposing BCG Vaccination for *Mycobacterium avium* ss. *paratuberculosis* (MAP) Associated Autoimmune Diseases. Microorganisms. 2020 Feb 5; 8(2). PMID: 32033287 PMCID: PMC7074941].

La transmisión de MAP se produce principalmente por vía fecal-oral a través de la ingestión de heces, calostro o leche contaminados con MAP. La infección suele producirse en los primeros meses de vida del animal, pero permanece subclínica durante una media de 2-5 años. Tras ser ingerida, MAP atraviesa la mucosa intestinal donde es fagocitada por macrófagos subepiteliales que establecen una infección crónica. MAP es capaz de sobrevivir y proliferar dentro de los fagosomas inhibiendo la apoptosis y la acidificación de los fagosomas e impidiendo la presentación de antígenos al sistema inmunitario. A medida que la infección progresa, las lesiones en el intestino y los ganglios linfáticos mesentéricos se agravan. En lugar de focalizarse, el infiltrado granulomatoso se vuelve difuso, alterando la estructura y la función de la mucosa y afectando al yeyuno y al ileon. Según su localización y extensión, las lesiones histológicas presentes en los tejidos intestinales de los animales infectados son clasificadas en focales, multifocales y difusas [González J et al., 2005. Histopathological classification of lesions associated with natural paratuberculosis infection in cattle. J Comp Pathol. 2005 Ago-Oct; 133(2-3):184-96. PMID: 16045917 DOI: 10.1016/j.jcpa.2005.04.007]. Las lesiones focales consisten en pequeños granulomas, localizados principalmente en los ganglios linfáticos yeyunales e ileales. Las lesiones multifocales consisten en granulomas bien delimitados en el tejido linfático intestinal y también en la lámina propia intestinal. Las lesiones difusas se caracterizaban por enteritis granulomatosa grave y linfadenitis. Según el tipo de célula inflamatoria presente en el infiltrado y la cantidad de bacilos ácido-alcohol resistentes (AFB), las lesiones difusas se subdividieron en difusas linfoplasmocitarias o paucibacilares, intermedias y difusas histiocíticas o lesiones multibacilares [Balseiro et al., 2018. Chronic regional intestinal inflammatory disease: A trans-species slow infection? Comp. Immunol., Microbiol., Infect. Dis. 2018. 62:88-100. DOI: <https://doi.org/j.cimid.2018.12.001>]. En el tipo de lesión linfoplasmocitaria difusa el infiltrado celular está compuesto principalmente por linfocitos que se extiende por amplias áreas, contiene raras AFB y es claramente visible a simple vista. El tipo de lesión histiocítica difusa consiste en un gran número de células epitelioides, linfocitos, macrófagos y numerosas células gigantes de Langhans con enormes cantidades de AFBs, que afectan a amplias zonas del intestino y aparece como un engrosamiento de la pared intestinal fácilmente visible al abrir el intestino. El tipo intermedio difuso también puede observarse a simple vista afectando a amplias zonas del intestino como un engrosamiento de la mucosa compuesto microscópicamente por linfocitos, macrófagos y escasas células gigantes de Langhans con un pequeño número de AFB.

La PTB es responsable de importantes pérdidas económicas en los rebaños lecheros de todo el mundo debido a la disminución de la producción de leche, el aumento de los costes de gestión y el sacrificio prematuro por enfermedad clínica. Varios estudios han demostrado que más del 50 % de los rebaños de vacas lecheras son positivos a los anticuerpos MAP en EE.UU. y en Europa y, por lo tanto, la PTB bovina puede considerarse endémica en estas zonas. Las vacunas comerciales inactivadas contra la PTB bovina son muy eficaces en la reducción de la presencia de MAP en heces y tejidos y en el aumento tanto de la producción de leche como de la vida productiva del ganado en explotaciones infectadas en comparación con explotaciones no vacunadas. Sin embargo, la vacunación contra la PTB con vacunas inactivadas muertas por calor no está permitida en la mayoría de los países europeos debido a su interferencia con las pruebas de detección de *Mycobacterium bovis*. Por lo tanto, el control de la PTB se basa actualmente en la realización de pruebas y sacrificios, así como en la prevención de la transmisión de MAP a animales susceptibles mediante estrategias higiénico-sanitarias adecuadas. Sin embargo, la eficacia de los programas de control basados en la política de "prueba y sacrificio" está fuertemente condicionada por la sensibilidad de las pruebas utilizadas para identificar las infecciones tempranas. En la actualidad, el cultivo fecal se considera "la prueba de referencia" para el diagnóstico ante mortem de la infección por MAP. Sin embargo, el cultivo fecal individual es caro y requiere mucho tiempo y sólo detecta infecciones avanzadas debido al inicio relativamente tardío de la excreción fecal

durante el curso natural de la infección por MAP. De hecho, la sensibilidad del cultivo fecal es del 70 % en animales con clínica asociada a PTB, pero sólo del 23 al 29% en animales con infección subclínica, que pueden excretar MAP de forma intermitente y en menor número en las heces y la leche, contaminando el medio ambiente e infectando a otros animales.

Los diagnósticos en fase inicial, como el ensayo de liberación de *IFN-γ* (IGRA), detectan si se ha provocado una respuesta inmune mediada por células T en respuesta a antígenos micobacterianos. El método IGRA utiliza un ELISA tipo sándwich para detectar la respuesta celular a MAP midiendo la diferencia en las señales de *IFN-γ* para muestras de sangre total activadas por antígeno específico (extracto de MAP) y antígeno no específico (extracto de *M. phlei*) (ID Vet). El IGRA sólo refleja la exposición a MAP, por lo que no puede discriminar entre individuos con infección controlada y aquellos con enfermedad subclínica.

El IDEXX ELISA, que detecta anticuerpos específicos producidos contra MAP, se utiliza hoy en día ampliamente para diagnóstico de la PTB. Sin embargo, el IDEXX ELISA se asocia con una alta tasa de resultados falsos negativos (baja sensibilidad) [Vázquez et al., 2014. Las infecciones latentes son la forma más frecuente de paratuberculosis en ganado friso sacrificado. Revista española de investigación agraria 2014 12(4): 1049-1060. <http://dx.doi.org/10.5424/sjar/2014124-5978>]. Esto significa que un alto porcentaje de sujetos, los infectados latentes, siguen dando negativo. Los resultados falsos negativos son preocupantes porque dificultan la aplicación de medidas de control o erradicación.

Así pues, la detección de las infecciones por MAP, principalmente las infecciones subclínicas antes de que la bacteria se desprenda y se transmita a los compañeros de rebaño y posiblemente a los humanos, sigue siendo una necesidad no cubierta. En otras palabras, se necesitan herramientas novedosas con alta sensibilidad y especificidad para detectar las infecciones por MAP, principalmente en las primeras fases de la infección y durante la larga fase córica que precede a la fase clínica de la enfermedad.

La presente invención se centra en la resolución de los problemas citados y en ella se proporciona una nueva estrategia para diagnóstico de sujetos infectados con MAP, que ofrece una alta sensibilidad y especificidad, también en etapas tempranas o durante la larga fase crónica de la infección por MAP.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Breve descripción de la invención

Tal como se ha explicado anteriormente, la presente invención está dirigida a un método *in vitro* para el diagnóstico de sujetos infectados con especies de *Mycobacterium*, particularmente sujetos infectados con MAP que es el agente causante de PTB.

Cinco de los muchos biomarcadores identificados por RNA-Seq fueron seleccionados para el desarrollo de nuevos ELISAs para fines de diagnóstico, según sus altos niveles de expresión en animales con lesiones histológicas focales o difusas con respecto a los animales de control sin lesiones.

La **Tabla 1** muestra la expresión diferencial de genes biomarcadores del huésped seleccionados tras el análisis RNA-Seq de sangre periférica de ganado Holstein con lesiones histológicas focales y difusas frente a animales de control sin lesiones detectadas. El cambio de pliegue Log2 medio es una medida de la expresión génica diferencial entre dos grupos comparados.

Tabla 1

Biomarcador ID	Gen ID	Focal vs. Control		Difusa vs. Control	
		Cambio de pliegue Log2 medio	p-valor	Cambio de pliegue Log2 medio	p-valor
MMP8	XLOC_010350	1.89	0.00035		
ABCA13	XLOC_033714	3.74	0.00005		
FAM84A	XLOC_005071			2.15	0.00005
SPARC	XLOC_040915			2.21	0.00065
DES	XLOC_019473			3.75	0.00030
MMP8, metalopeptidasa de matriz 8 bovina; ABCA13, subfamilia A de casetes de unión a ATP Miembro 13 bovino; FAM84A, familia con similitud de secuencia 84-miembro A bovina; SPARC, proteína secretada ácida y rica en cisteína bovina; DES. desmina bovina.					

Los genes que codifican para las proteínas bovinas MMP8 (Matriz metalopeptidasa 8) y ABCA13 (subfamilia A de casetes de unión a ATP Miembro 13 bovino) mostraron una expresión significativamente mayor en animales con lesiones focales, mientras que los genes que codifican para las proteínas bovinas FAM84A (familia con similitud de secuencia 84-miembro A bovina), SPARC (proteína secretada ácida y rica en cisteína) y DES (desmina) estaban regulados al alza en los animales que mostraban lesiones difusas. La selección del biomarcador se basó en los altos niveles de expresión, la localización celular (las proteínas extracelulares, presentes en los sueros, fueron la opción preferida para la detección mediante ELISA) y la disponibilidad comercial de kits ELISA para su detección específica.

El potencial diagnóstico de cinco ELISAs diseñados para detectar MMP8, ABCA13, FAM84A, SPARC y DES fue estudiado utilizando muestras de suero de vacas infectadas con distintas lesiones histológicas en los tejidos intestinales que representaban diversos estadios de la enfermedad. El método o técnica de referencia utilizada para clasificar a los animales incluidos en este estudio fue el tipo de lesiones histológicas presentes en sus tejidos intestinales. Significativamente, tal y como se desprende de los resultados que se ofrecen a continuación, no fue posible validar los cinco ELISA basados en biomarcadores para el diagnóstico de la PTB. De hecho, sólo tres de los cinco ELISAs basados en biomarcadores fueron capaces de discriminar animales con lesiones focales, dos de los cinco ELISAs basados en biomarcadores discriminaron animales con lesiones multifocales, dos de los cinco ELISAs basados en biomarcadores discriminaron animales con lesiones difusas y tres de los cinco ELISAs basados en biomarcadores fueron capaces de discriminar todos los animales infectados del grupo control. De hecho, los ELISA para detección de FAM84A y DES no discriminaron ningún grupo de animales infectados (su AUC fue siempre inferior a 0,7).

Cabe destacar que los ELISAs para la detección de las proteínas ABCA13 y/o SPARC y/o MMP8 mostraron un alto rendimiento, específicamente para discriminar el grupo de animales con lesiones focales y el grupo de todas las lesiones (que comprende todos los animales con lesiones histológicas focales, multifocales y difusas). Como se muestra en los resultados proporcionados a continuación, el ELISA para la detección de ABCA13 mostró el rendimiento diagnóstico más preciso tanto para la detección de animales con lesiones focales (valor AUC de 0,866, $p < 0,001$) como para la detección global de animales con cualquier tipo de lesión histológica (valor AUC de 0,825, $p < 0,001$). Así pues, el ELISA para la detección de ABCA13 es un método preciso para la detección de animales con lesiones focales y para la detección global de animales con cualquier tipo de lesión histológica.

En consecuencia, ABCA13 se presenta aquí como una alternativa fiable para los métodos utilizados actualmente para el diagnóstico de la PTB. De hecho, IDEXX ELISA es hoy en día ampliamente utilizado para el diagnóstico de PTB aunque este método está asociado con una alta tasa de resultados falsos negativos (baja sensibilidad). Esto significa que un alto porcentaje de infectados sujetos siguen dando negativo para la enfermedad debido a la baja sensibilidad del IDEXX ELISA. Este problema se resuelve con la presente invención porque, tal y como se explica en el presente documento, el ABCA13 mostró una alta sensibilidad y especificidad.

Así pues, la primera realización de la presente invención se refiere a un método *in vitro* para diagnosticar sujetos infectados con especies de *Mycobacterium* que comprende: a) medir la concentración de la proteína ABCA13 en una muestra biológica consistente en suero o plasma obtenido del sujeto, y b) en el que si se identifica un aumento de la concentración de la proteína ABCA13 en la etapa a) con respecto a la concentración de la proteína ABCA13 medida en sujetos control no infectados, es una indicación de que el sujeto está infectado con especies de *Mycobacterium*.

En una realización preferente, la presente invención se refiere a un método *in vitro* para diagnosticar sujetos infectados con MAP que comprende: a) medir la concentración de la proteína ABCA13 en una muestra biológica que consiste en suero o plasma obtenido del sujeto, y b) en el que si se identifica un aumento de la concentración de la proteína ABCA13 en la etapa a) con respecto a la concentración de la proteína ABCA13 medida en sujetos control no infectados, es una indicación de que el sujeto está infectado con MAP.

En una realización preferente, la presente invención se refiere a un método *in vitro* para el diagnóstico de PTB en un sujeto que comprende: a) medir la concentración de la proteína ABCA13 en una muestra biológica que consiste en suero o plasma obtenida del sujeto, y b) en el que si se identifica un aumento de la concentración de la proteína ABCA13 en la etapa a) con respecto a la concentración de la proteína ABCA13 medida en sujetos control no infectados, es una indicación de que el sujeto padece PTB.

En una realización preferente, los métodos *in vitro* descritos anteriormente comprenden: a) medir la concentración de las proteínas [ABCA13 y SPARC] en una muestra biológica que consiste en suero o plasma obtenido del sujeto, y b) en el que si se identifica un aumento de la concentración de las proteínas [ABCA13 y SPARC] en la etapa a) con respecto a la concentración de las proteínas [ABCA13 y SPARC] medida en sujetos control no infectados, es una indicación de que el sujeto padece PTB.

En una realización preferente, los métodos *in vitro* descritos anteriormente comprenden: a) medir la concentración de las proteínas [ABCA13 y SPARC y MMP8] en una muestra biológica consistente en suero o plasma obtenido del sujeto, y b) en la que si se identifica un aumento de la concentración de las proteínas [ABCA13 y SPARC y MMP8] en la etapa a) con respecto a la concentración de las proteínas [ABCA13 y SPARC y MMP8] medidas en sujetos control

no infectados, es un indicio de que el sujeto padece PTB.

En una realización preferente, los métodos *in vitro* anteriormente descritos comprenden: a) medir la concentración de las proteínas, en una muestra biológica consistente en suero o plasma obtenido del sujeto, en donde si la concentración obtenida para cualquiera de las proteínas anteriormente citadas está por encima ($\geq$) del valor de corte establecido, esto es indicativo de que el sujeto sufre de PTB.

En una realización preferente, los métodos *in vitro* descritos anteriormente comprenden el diagnóstico de PTB latente o patente, preferiblemente PTB latente.

En una realización preferente, el sujeto es un mamífero seleccionado del grupo que consiste en: ganado vacuno, cabra, oveja, caballo, cerdo, ciervo, conejo, jabalí, bisonte, llama, alpaca, zarigüeya, tejón, elefante o ser humano; preferentemente un animal de granja seleccionado del grupo consistente en: vaca, cabra, oveja, caballo, cerdo, ciervo, llama o alpaca.

En una realización preferente, el método antes citado es un inmunoensayo, preferiblemente un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

La segunda realización de la presente invención se refiere al uso *in vitro* de la proteína ABCA13, de las proteínas [ABCA13 y SPARC], o de las proteínas [ABCA13 y SPARC y MMP8], en una muestra biológica consistente en suero o plasma, para el diagnóstico de sujetos infectados por especies de *Mycobacterium*.

En una realización preferente, las proteínas se utilizan para diagnosticar sujetos infectados con MAP.

En una realización preferente, las proteínas se utilizan para el diagnóstico de PTB.

En una realización preferente, las proteínas se utilizan para el diagnóstico de PTB latente o patente, preferentemente PTB latente

La tercera realización de la presente invención se refiere al uso de un kit que comprende herramientas o reactivos para determinar la concentración de la proteína ABCA13 en una muestra biológica que consiste en suero o plasma, para diagnosticar sujetos infectados con especies de *Mycobacterium*

En una realización preferente, la presente invención se refiere al uso de un kit que comprende herramientas o reactivos para determinar la concentración de las proteínas [ABCA13 y SPARC] o de las proteínas [ABCA13 y SPARC y MMP8] en una muestra biológica consistente en suero o plasma, para diagnosticar sujetos infectados con especies de *Mycobacterium*.

La divulgación se refiere además a un método para tratar sujetos infectados con *especies de Mycobacterium*, en particular con MAP, mediante la aplicación de una dosis o cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que produce una respuesta terapéutica positiva en un sujeto infectado con la bacteria. Significativamente, este método comprende un primer paso en el que el sujeto es diagnosticado mediante cualquiera de los métodos descritos anteriormente.

La divulgación se refiere además a un método para garantizar que un lote de leche procede de hembras libres de infección por MAP y, por tanto, que el producto es apto para el consumo humano sin riesgo significativo de causar ninguna de las enfermedades humanas mencionadas.

A los efectos de la presente invención se definen los siguientes términos:

- La frase "concentración de las proteínas medida en sujetos de control no infectados", se refiere a un "valor de referencia" de la concentración de las proteínas. Si se determina un "aumento" de la concentración de las proteínas con respecto a dicho "valor de referencia" (es decir, la concentración es significativamente superior al valor de referencia), esto es un indicio de que el sujeto está infectado por la bacteria.
- Un "valor de referencia" puede ser un valor umbral o un valor de corte. Típicamente, un "valor umbral" o "valor de corte" puede determinarse experimental, empírica o teóricamente. Un "valor de corte" también puede seleccionarse arbitrariamente basándose en las condiciones experimentales y/o clínicas existentes, como un experto común en la materia. El "valor de corte" debe determinarse para obtener la sensibilidad y especificidad óptimas de acuerdo con la función de la prueba y el balance beneficio/riesgo (consecuencias clínicas de los falsos positivos y falsos negativos). Normalmente, la sensibilidad y especificidad óptimas (y, por tanto, el valor umbral) pueden determinarse mediante una curva Característica Operativa del Receptor (ROC) basada en datos experimentales. Por ejemplo, tras determinar los niveles de los biomarcadores en un grupo de referencia, se puede utilizar un análisis algorítmico para el tratamiento estadístico de las concentraciones medidas de los biomarcadores en las muestras biológicas que se van a analizar, y obtener así un estándar de clasificación que tenga significación para la clasificación de las muestras. La curva ROC se utiliza principalmente para las pruebas de diagnóstico bioquímico clínico. ROC es un indicador global que

refleja las variables continuas de la tasa de verdaderos positivos (sensibilidad) y la tasa de falsos positivos (1-especificidad). Revela la relación entre la sensibilidad y la especificidad con el método de composición de la imagen. Se establece una serie de valores de corte diferentes (umbrales o valores críticos, valores límite entre los resultados positivos y negativos de la prueba diagnóstica) como variables continuas para calcular una serie de valores de sensibilidad y especificidad. A continuación, se utiliza la sensibilidad como coordenada vertical y la especificidad como coordenada horizontal para dibujar una curva. Cuanto mayor sea el área bajo la curva (AUC), mayor será la precisión del diagnóstico/pronóstico. En la curva ROC, el punto más cercano al extremo superior izquierdo del diagrama de coordenadas es un punto crítico que presenta valores de sensibilidad y especificidad elevados. El valor AUC de la curva ROC se sitúa entre 1,0 y 0,5. Cuando $AUC > 0,5$, el resultado diagnóstico es cada vez mejor a medida que AUC se aproxima a 1. Cuando el AUC está entre 0,5 y 0,7, la precisión es baja. Cuando el AUC está entre 0,7 y 0,9, la precisión es buena. Cuando el AUC es superior a 0,9, la precisión es bastante alta. Este método algorítmico se realiza preferentemente con un ordenador. Para el trazado de la curva ROC puede utilizarse cualquier software o sistema existente en la técnica.

- Por "que comprende" se entiende que incluye, pero no se limita a, lo que sigue a la palabra "que comprende". Así pues, el uso del término "que comprende" indica que los elementos enumerados son necesarios u obligatorios, pero que otros elementos son opcionales y pueden o no estar presentes.
- Por "consiste en" se entiende "incluido, y limitado a", lo que sigue a la frase "consiste en". Por lo tanto, la frase "consiste en" indica que los elementos enumerados son necesarios u obligatorios, y que no pueden estar presentes otros elementos.
- Por "dosis o cantidad terapéuticamente eficaz" de una composición para tratar la PTB se entiende una cantidad que, cuando se administra, produce una respuesta terapéutica positiva en un sujeto que padece PTB. La cantidad exacta requerida variará de un sujeto a otro, dependiendo de la especie, la edad y el estado general del sujeto, la gravedad de la afección tratada, el modo de administración, etc. Un experto en la materia puede determinar la cantidad "eficaz" adecuada en cada caso particular mediante experimentación rutinaria, basándose en la información proporcionada en el presente documento.
- "Latente" y "patente" se refieren a los dos tipos posibles de infecciones causadas por MAP. "Latente" se refiere a la presencia de lesiones focales con baja o moderada frecuencia de evidencia microbiológica o inmunológica de infección. Una infección "latente" daría lugar a una manifestación crónica o subclínica de la enfermedad en la que los signos clínicos aún no son perceptibles. Por el contrario, PTB "patente" se refiere a la presencia de lesiones inflamatorias multifocales o difusas con una alta frecuencia de indicios microbiológicos o inmunológicos de infección. Una infección "patente" generalmente daría lugar a una manifestación clínica de la enfermedad, en la que los signos clínicos son perceptibles.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1. Niveles de concentración de biomarcadores en suero de bovinos de raza Holstein Friesian que presentan diferentes tipos de lesiones histológicas en los tejidos intestinales focales ($n=55$), multifocales ($n=17$) y difusas ($n=15$). Los animales de control ($n=61$) procedían de una explotación libre de PTB. El número de animales con lesiones focales, multifocales, difusas o con cualquier tipo de lesiones analizados para ABCA13 fue de 53, 16, 14 y 83, respectivamente. Los biomarcadores se detectaron y cuantificaron en suero bovino mediante ELISA específicos suministrados por MyBioSource, San Diego, CA, EE.UU. a) FAM84A, familia bovina con similitud de secuencia 84-miembro A; b) DES, desmina bovina; c) ABCA13, cassette de unión a ATP subfamilia A miembro 13 bovino; d) MMP8, metalopéptidasa de matriz 8 bovina; e) SPARC, proteína secretada bovina ácida y rica en cisteína; f) IDEXX ELISA. Los datos se representan como gráficos de dispersión en los que cada punto representa un único animal. La media de cada grupo histológico se representa mediante un punto negro grueso y la desviación estándar mediante una línea vertical. Los asteriscos indican si las diferencias entre cada grupo histológico y el control son o no significativas (*, $p < 0,05$; **, $p > 0,01$; ***, $p < 0,001$).

Figura 2. Curvas Característica Operativa del Receptor (ROC) de biomarcadores seleccionados en vacas Holstein Friesian con lesiones histológicas focales ($n=55$), multifocales ($n=17$) o difusas ($n=15$) en sus tejidos intestinales frente a animales control de una explotación libre de PTB ($n=61$). El número de animales con lesiones focales, multifocales, difusas o con cualquier tipo de lesiones analizadas para ABCA13 fue de 53, 16, 14 y 83, respectivamente, a) FAM84A, familia bovina con similitud de secuencia 84-miembro A; b) DES, desmina bovina; c) ABCA13, miembro 13 de la subfamilia A de casetes de unión a ATP bovino; d) MMP8, metalopéptidasa de matriz 8 bovina; e) SPARC, proteína secretada ácida y rica en cisteína bovina; f) IDEXX ELISA de suero.

EXPOSICIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los siguientes ejemplos revelan una forma preferida de llevar a cabo la invención, sin la intención de limitar su ámbito de protección.

Ejemplo 1. Metodología.

Ejemplo 1.1 Animales y consideraciones éticas

En este estudio de campo se incluyeron dos grupos de animales: **Grupo sacrificado**) Noventa y tres vacas Holstein Friesian (con entre 0,81 y 12,66 años) procedentes de 26 explotaciones ubicadas en el Principado de Asturias (Noroeste de España). En Asturias el 25% de los rebaños y el 1,9% de los animales fueron positivos por ELISA en suero en 2017 (datos extraídos de los registros de la Consejería). En concreto, cincuenta y cinco animales procedían de una explotación lechera con un tamaño medio del rebaño de 105 vacas (2016-2019) y una prevalencia media de PTB del 6,30% en el periodo de muestreo, según la prueba ELISA en suero (laboratorios IDEXX, Hoofddorp, Países Bajos). Otros treinta y cuatro animales fueron elegidos aleatoriamente de vacas sacrificadas en el matadero local (procedentes de 24 granjas diferentes) y las cuatro vacas restantes procedían de la granja de vacas frisonas del SERIDA (3% de prevalencia media de PTB en el periodo 2018-2019). El estado de infección por PTB de estos 93 animales en el momento del sacrificio se determinó mediante histopatología, prueba ELISA en suero y cultivo bacteriológico y PCR específica en tiempo real de tejidos y heces. La información relativa a la presencia de signos clínicos asociados a la PTB, como la aparición gradual de pérdida de peso, diarrea y disminución de la producción de leche se obtuvo de los ganaderos cuando fue posible; **y grupo libre de PTB**) Sesenta y un animales (con entre 0,50 y 10,08 años) de una granja libre de PTB en Asturias se utilizaron como grupo control para el estudio. El estatus de libre de PTB de esta granja control se verificó anualmente mediante IDEXX ELISA en suero, la ausencia de casos clínicos en el periodo 2016-2020 así como por la ausencia de resultados positivos de cultivo bacteriológico fecal y PCR en 2019.

Los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité de Ética Animal del SERIDA y autorizados por la Consejería de Agroganadería y Recursos Autóctonos del Principado de Asturias, España (códigos de autorización PROAE 29/2015 y PROAE 66/2019). Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con la Directiva 2012/63/UE del Parlamento Europeo.

Ejemplo 1.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real en tejidos y materia fecal

El aislamiento del ADN genómico a partir de tejidos y heces se realizó utilizando el kit MagMax Total Nucleic Acid Isolation siguiendo las instrucciones del fabricante (ThermoFisher Scientific, Lissieu, Francia). Para la detección de ADN MAP, se utilizó la PCR en tiempo real LSI VetMax Triplex siguiendo las instrucciones del fabricante (ThermoFisher Scientific, Lissieu, Francia). El kit permite la detección por PCR en tiempo real de los genes *Map* IS900 y F57 en ADN extraído de heces, cultivos líquidos y tejidos o colonias. Las amplificaciones de PCR en tiempo real se realizaron utilizando el sistema de detección de PCR en tiempo real MX3000P (Stratagene, San Diego, EE.UU.) con las siguientes condiciones: 1 ciclo a 50 °C durante 2 min, 1 ciclo de 95 °C durante 10 min, 45 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 15 s y recocido/extensión a 60 °C durante 60 s.

Ejemplo 1.3. Cultivo bacteriológico de tejidos y heces

Para el cultivo bacteriológico, un pool (2 gr) de ganglios linfáticos ileocecales, ganglio linfático yeyunal distal, válvula ileocecal (ICV) y yeyuno distal fueron descontaminados con 38 mL de cloruro de hexa-decilpiridinio a una concentración final de 0,75% (Sigma, St. Louis, MO) y se homogeneizó en una batidora de estómago. Tras 30 minutos de incubación a temperatura ambiente, se transfirieron 15 ml de la suspensión a un tubo nuevo y se incubaron durante la noche para su descontaminación y sedimentación. Se tomaron aproximadamente 200 ml de la suspensión de la capa cercana al sedimento y se inocularon en dos slants de medio de yema de huevo Herrolds (HEYM; Becton Dickinson, Sparks, MD) y en dos slants de medio Lowenstein-Jensen (LJ; Difco, Detroit, MI), ambos suplementados con 2mg/L de Mycobactin J (ID.vet Innovative Diagnostics, Grabels, Francia). En el momento del sacrificio, se tomaron heces del recto de cada animal, se mantuvieron a 4°C y se procesaron en las 48 h siguientes a su llegada al laboratorio. Las muestras fecales (2 g cada una) se descontaminaron, se mezclaron en un stomacher y se cultivaron en HEYM y LJ, como se describió anteriormente para el cultivo de tejidos.

Ejemplo 1.4. Clasificación histológica de los animales

Como se ha mencionado anteriormente, los animales incluidos en este estudio se clasificaron según el tipo de lesiones histológicas presentes en sus tejidos intestinales. Se recogieron secciones de tejido de yeyuno distal, ICV y yeyuno y ganglios linfáticos ICV de las 93 vacas sacrificadas, se fijaron en formalina tamponada neutra al 10%, se cortaron en rodajas y se incrustaron en parafina siguiendo procedimientos estándar. Posteriormente, se evaluaron secciones de 4 mm mediante tinción de hematoxilina-eosina (HE) y Ziehl-Neelsen (ZN) para detectar detección específica de bacterias acidorresistentes. Los cortes se observaron con un microscopio óptico Olympus BH-2 y se fotografiaron con una cámara digital Olympus DP-12. Las secciones teñidas se examinaron mediante microscopía óptica para detectar y clasificar las lesiones patológicas y detectar la presencia de bacterias acidorresistentes (AFB).

Ejemplo 1.5 Ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA) para la detección de los biomarcadores seleccionados

Se recogió sangre periférica de la vena caudal de todas las vacas incluidas en el estudio utilizando tubos de plástico BD Vacutainer Z activadores de la coagulación del suero (Vacuette, Kremsmunster, Austria). Tras la coagulación, el suero se separó por centrifugación durante 20 min a 2.500 g a temperatura ambiente y se almacenó a -20 °C hasta su uso. Las concentraciones de los biomarcadores seleccionados en el suero de cada animal se midieron utilizando

ELISAs disponibles comercialmente según instrucciones del fabricante. Kits ELISA sándwich cuantitativo Bovine Matrix Metalloproteinase 8 (MMP8) (Rango de detección 3,12-100 ng/mL); kit ELISA Bovine Protein FAM84A (Rango de detección 62,5-2000 pg/mL), kit ELISA Bovine SPARC (Rango de detección 0.78-50 ng/mL), y kit ELISA competitivo Bovine ATP-binding cassette subfamily A member 13 (ABCA13) ELISA kit (Rango de detección 0-5000 pg/mL) y Bovine Desmin (DES) ELISA kit (Rango de detección 0-25 ng/mL) fueron utilizados para la detección específica de MMP8, FAM84A, ABCA13, SPARC y DES, respectivamente (MyBioSource, San Diego, CA. USA).

El procedimiento de ensayo para la detección específica del biomarcador ABCA13 se describe con más detalle a continuación:

1. Añadir 100 mL de muestras de suero y los estándares al pocillo apropiado. Añadir 100 mL de PBS (pH 7.0-7.2) al pocillo de control en blanco.
2. Añadir 50 mL de conjugado a cada pocillo (NO al pocillo de control en blanco). Mezclar bien. Cubrir la placa e incubar durante 1 hora a 37°C.
3. Lavar la placa cinco veces con solución de lavado 1X diluida (350-400 mL /pocillo/lavado) utilizando un lavador automático. Se recomienda ajustar el lavador para un tiempo de remojo de 10 segundos y un tiempo de agitación de 5 segundos entre cada lavado.
4. Añadir 50 mL de sustrato A y 50 mL de sustrato B a cada pocillo, incluido el pocillo de control en blanco. A continuación, tapar e incubar durante 15 minutos a 37°C (evitar la luz solar, si después de 15 min el color no es oscuro prolongar el tiempo de incubación, pero el tiempo máximo es de 30min).
5. Añadir 50 ml de solución de parada a cada pocillo, incluido el pocillo de control en blanco. Mezclar bien.
6. Determinar inmediatamente la densidad óptica (DO) a 450 nm utilizando un lector de microplacas.

Se utilizó una curva estándar para determinar la concentración de biomarcadores en las muestras de suero (se trazó la DO media de cada estándar el eje vertical frente a la concentración en el eje horizontal y se dibujó el mejor ajuste para generar una curva de regresión). Los estándares y las muestras se analizaron por duplicado. El valor medio del control en blanco se restó de los valores medios de DO brutos antes de la interpretación de los resultados. Para la optimización se utilizaron varias diluciones del suero (por ejemplo: sin diluir, 1:2, 1:4 y 1:8) y se consideró óptima la dilución que mostró un mayor número de muestras con valores de medición incluidos dentro del intervalo de la curva estándar. En la mayoría de los casos, la dilución óptima fue 1:2; sin embargo, las muestras con concentraciones elevadas de un biomarcador específico tuvieron que ensayarse con diluciones superiores.

Ejemplo 1.6 Análisis estadístico.

El AUC (área bajo la curva) y el valor de corte óptimo para cada ELISA se determinaron mediante el análisis de la curva ROC. Los valores de corte óptimos para la sensibilidad y la especificidad se basaron en el índice máximo de Youden ($J=Se+Sp-1$).

El poder discriminatorio de cada ELISA basado en biomarcadores para diferenciar entre los diferentes histológicos y el grupo de control se determinó según [Muller, M.P., Tomlinson, G., Marrie, T.J., Tang, P., McGeer, A., Low, D.E., Detsky, A.S., Gold, W.L. (2005). Can routine laboratory tests discriminate between severe acute respiratory syndrome and other causes of community-acquired pneumonia? *Clin Infect Dis.* 40(8):1079-86. <https://doi.org/10.1086/428577>] [ParkHE., Park, H T., Jung YH., Yoo, HS. (2017). Establishment a real-time reverse transcription PCR based on host biomarkers for the detection of the sub-clinical cases of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis*. *PLoS One.* 25;12(5):e0178336. doi: 10.1371/journal.pone.0178336] como sigue: Se consideró que las puntuaciones $AUC \geq 0,9$ tenían un poder discriminatorio excelente; $0,8 \leq AUC < 0,9$ buen poder discriminatorio; $0,7 \leq AUC < 0,8$ poder discriminatorio justo; y $AUC < 0,7$, poder discriminatorio pobre (Muller et al., 2005). Se consideró que las puntuaciones AUC más altas mostraban un mejor poder discriminatorio.

Se utilizaron modelos de regresión logística binaria multivariante (paquete Caret de R) para evaluar la capacidad diagnóstica del uso simultáneo de varios biomarcadores, proporcionando el AUC, y valores como la sensibilidad y la especificidad para las diferentes combinaciones de biomarcadores. La comparación de las curvas ROC para comprobar la significación estadística de la diferencia entre las áreas bajo las curvas ROC (derivadas de los mismos casos) se realizó con el método de DeLong et al. (1988) [DeLong ER, DeLong DM, Clarke-Pearson DL (1988): Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach. *Biometrics* 44:837-845] para los biomarcadores con regularidad, buena y excelentes valores de AUC ($AUC \geq 0,7$). La significación estadística de las diferencias en las variables cuantitativas (por ejemplo: edad) entre dos grupos histológicos se estudió mediante la prueba t de Student (normalidad) o la prueba de Wilcoxon (no normalidad).

Todos los datos se analizaron utilizando los programas pROC, OptimalCutpoints y Caret [Max Kuhn (2020). caret: Classification and Regression Training. R package version 6.0-85. <https://CRAN.R-project.org/package=caret>] paquetes del entorno estadístico R Statistical environment version 3.6.0 [R Core Team (2018). R: Un lenguaje y entorno para la computación estadística. R Fundación para la Informática Estadística. Viena. Austria. URL <https://www.R-project.org/>], con intervalos de confianza del 95%.

Ejemplo 2. Resultados

Ejemplo 2.1 Evaluación histológica, inmunológica y microbiológica del estado de la infección por MAP

- 5 Las características histológicas, inmunológicas y microbiológicas de todos los animales incluidos en este estudio (animales sacrificados n=93 y animales control de una granja libre de PTB n=61) se resumen en la **Tabla 2**.

10 Así, la **Tabla 2** muestra la evaluación del estado de infección por MAP en 154 vacas Holstein Friesian incluidas en el estudio. El examen patológico de las secciones de tejido intestinal permitió clasificar a los animales en cuatro grupos: focales (n=55, 59,14%), multifocales (n=17, 18,28%), difusas (n=15, 16,12%) y sin lesiones (n=6, 6,45%).

Tabla 2

MÉTODO DE DIAGNÓSTICO	FOCAL (n=55)	MULTIFOCAL (n=17)	DIFUSA (n=15)	NL (n=6)	CONTROL (n=61)
ZN	49,09%	94.11%	100%	0%	ONU
IDEXX ELISA	5.45%	23.52%	73.33%	0%	0%
FECAL PCR	9.09%	29.41%	73.33%	0%	0%
CULTIVO FECAL	5.45%	17.64%	20.00%	0%	0%
TEJIDO PCR	27.27%	41.17%	73.33%	0%	ONU
CULTIVO DE TEJIDOS	27.27%	41.17%	66.66%	0%	ONU
SIGNOS CLÍNICOS	0.00%	15.38%	64.28%	0%	0.00%
EDAD (años)	5.72±2.16	5.50±1.85	4.98±1.58	2.41±1.11	3.62±2.41
NL, sin lesiones; CONTROL; se refiere a los 61 animales control de una explotación libre de PTB; UN, indeterminado (tejidos no disponibles ya que los animales están vivos); La edad se expresa como el valor medio del grupo ± desviación estándar. El cálculo del % de animales con signos clínicos se basa en animales con estado clínico conocido (focal n=28, multifocal n=13, difusa n=14 y control n=61).					

15 En el grupo de animales con lesiones focales, el 76,36% fueron positivos por uno o más métodos de diagnóstico (Ziehl-Neelsen, PCR en tiempo real fecal y tisular, cultivo bacteriológico fecal y tisular y ELISA en suero) y el restante 23,64% fueron negativos en todas las pruebas analizadas (n=13). Concretamente, el 49,09% fueron positivos por Ziehl-Neelsen, el 9,09% por PCR fecal en tiempo real, 27,27% por PCR tisular en tiempo real y por cultivo bacteriológico tisular, y 5,45% por cultivo bacteriológico fecal y ELISA sérico. Ninguno de los animales del grupo focal presentaba signos clínicos asociados a la PTB, por lo que estos animales con lesiones focales se consideraron subclínicamente infectados.

20 En el grupo de animales con lesiones multifocales, el 100% de las muestras fueron positivas para al menos uno de los siguientes 6 factores técnicos: Ziehl-Neelsen, PCR en tiempo real fecal y tisular, cultivo bacteriológico fecal y tisular y ELISA sérico. En concreto, el 94,11% de los animales fueron positivos por Ziehl-Neelsen, el 23,52% por ELISA en suero, el 29,41% por PCR fecal en tiempo real, el 41,17% por PCR tisular en tiempo real, el 17,64% por cultivo fecal y el 41,17% por cultivo tisular. En este grupo, un mayor porcentaje de animales (15,38%) presentó signos clínicos, incluido el animal más joven con signos clínicos (2,72 años de edad). En el grupo difuso, 100% de los animales fueron positivos por Ziehl-Neelsen, 73,33% fueron positivos por ELISA en suero y por PCR en tiempo real fecal y tisular, el 20% por cultivo fecal y el 66,66% por cultivo tisular. En este grupo, el 64,28% de los animales presentaban signos clínicos asociados a la PTB.

30 Sólo 6 de los 94 animales analizados por histopatología no mostraron lesiones histológicas en su tejido intestinal. Estos animales resultaron negativos por PCR específica de MAP fecal y tisular y cultivo bacteriológico, así como por ELISA en suero. Dada la dificultad de encontrar animales sin lesiones se decidió utilizar como grupo de control 61 animales procedentes de una explotación libre de PTB en Asturias con el fin de aumentar el tamaño de la muestra y la significación estadística de los resultados. El estatus libre de PTB de esta granja de control se había verificado anualmente cuatro veces mediante IDEXX ELISA en suero y ausencia de casos clínicos en el periodo 2016-2019, así como mediante cultivo bacteriológico y PCR específica en tiempo real de heces en 2019. Sin embargo, ninguno de ellos había sido examinado histológicamente ya que se trata de una prueba post-mortem y estos animales siguen vivos.

Se encontraron diferencias significativas entre la edad del foco ($5,72 \pm 2,16$ años) y el control libre de PTB ($3,62 \pm 2,41$ años) ($p < 0,001$); y entre la edad del grupo multifocal ($5,50 \pm 1,85$ años) y control sin PTB ($3,62 \pm 2,41$ años) ($p = 0,009$). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre la edad de los grupos difusa ($4,98 \pm 1,58$ años) y control ($3,62 \pm 2,41$) ($p = 0,141$), grupos focal y difusa ($p = 0,65$), grupos multifocal y difusa ($p = 0,905$), y grupos multifocal y focal ($0,982$).

Ejemplo 2.2 Análisis ROC de los ELISA basados en biomarcadores seleccionados

Las precisiones diagnósticas de cada ELISA basado en biomarcador para discriminar entre los diferentes grupos histológicos y el grupo de control se calcularon mediante análisis ROC (Figuras 1 y 2). El análisis ROC de los datos obtenidos de 4 ELISA basados en biomarcadores para la detección de FAM84A, DES, MMP8 y SPARC se realizó utilizando 87 muestras de suero de 55 animales con lesiones focales, 17 con lesiones multifocales y 15 con lesiones difusas. El análisis ROC de la ELISA basada en ABCA13 se realizó utilizando 83 muestras de suero de 53 animales con lesiones focales, 16 con lesiones multifocales y 14 con lesiones difusas. Como ya se ha mencionado, el grupo de control utilizado para este análisis consistió en 61 animales procedentes de una explotación asturiana libre de PTB. El rendimiento de diagnóstico de los ELISA basados en biomarcadores también se comparó con el de los métodos convencionales de diagnóstico de PTB, como el ELISA de anticuerpos específicos anti-MAP (IDEXX ELISA). La **Figura 1** muestra la concentración de cada biomarcador en el suero de cada bovino Holstein Friesian clasificado dentro de un grupo histológico específico y la **Figura 2** muestra las curvas ROC de los datos obtenidos con cada uno de los ELISA basados en biomarcadores para cada grupo histológico.

Ejemplo 2.2.1. Detección de animales con lesiones histológicas focales (Tabla 3)

Tres ELISA para la detección de los biomarcadores ABCA13, MMP8 y SPARC tuvieron un buen poder discriminatorio entre los grupos focal y control ($0,8 \leq \text{AUC} < 0,9$). Sin embargo, el ELISA basado en ABCA13 demostró el rendimiento diagnóstico más preciso (valor AUC de 0,866, $p < 0,001$), con una sensibilidad del 79,25% y una elevada especificidad del 93,44%.

La combinación de los ELISA basados en ABCA13 y SPARC dio un valor AUC ligeramente superior a 0,951, con una sensibilidad del 93,44% y una especificidad (80,77%). El rendimiento diagnóstico del ELISA basado en ABCA13 para la detección de animales con lesiones focales fue mejor que el del IDEXX ELISA (valor AUC de 0,536), que tuvo una sensibilidad del 14,50% y una especificidad del 100,00%. No se observaron diferencias significativas entre las curvas ROC de las pruebas ELISA ABCA13, MMP8 y SPARC (ABCA13 frente a MMP8, $p = 0,386$; ABCA13 frente a SPARC, $p = 0,372$ y MMP8 frente a SPARC, $p = 0,781$). La **Tabla 3** muestra el rendimiento diagnóstico de los ELISA basados en biomarcadores seleccionados para el diagnóstico de bovinos con lesiones histológicas focales en los tejidos intestinales. El ELISA con el mejor rendimiento diagnóstico se muestra en negrita.

Tabla 3

FOCAL (N=55) VS. CONTROL (N=61)						
BIOMARCADOR	AUC	p-valor	CORTE	SE (%)	SP (%)	DV
FAM84A	0.522	0.682	1.04	38.2	73.8	0.560
DES	0.622	0.024	23.1	61.8	68.8	0.653
ABCA13	0.866	<0.001	1.74	79.2	93.4	0.863
MMP8	0.802	<0.001	33.31	87.3	68.8	0.780
SPARC	0.816	<0.001	273.15	59.2	88.5	0.738
IDEXX ELISAA	0.536	0.511	28.39	14.5	100	0.572
IDEXX ELISAb			55%	5.45	100	0.527

AUC, área bajo la curva; SE, sensibilidad; SP, especificidad; DV, valor diagnóstico (semisuma de la sensibilidad y la especificidad); valor p, es el valor p del área AUC, indica si la discriminación entre animales con lesiones focales y controles significativa; DES, desmina bovina; FAM84A, familia con similitud de secuencia 84-miembro A bovina; ABCA13, subfamilia A de casetes de unión a ATP Miembro 13 bovino; MMP8, metalopéptidasa de matriz 8 bovina; SPARC, proteína secretada ácida y rica en cisteína bovina; a, la exactitud diagnóstica del IDEXX ELISA se calculó mediante el análisis de la curva ROC; b, el valor de corte utilizado para calcular la sensibilidad y especificidad del ensayo se calculó utilizando el valor de corte establecido por el proveedor.

Ejemplo 2.2.2. Detección de animales con lesiones histológicas multifocales (Tabla 4)

En el grupo multifocal, el ELISA basado en SPARC mostró el rendimiento diagnóstico más preciso. El ELISA basado

en SPARC tuvo un buen poder discriminatorio (valor AUC de 0,865, $p < 0,001$) entre los grupos multifocal y de control, con una sensibilidad del 66,70% y una especificidad del 95,10%. La combinación de los resultados con los ELISA basados en ABCA13 y SPARC dio un AUC de 0,900 con una sensibilidad del 98,36% y una especificidad del 64,71%. El rendimiento diagnóstico del ELISA basado en la detección de SPARC también se comparó con el del IDEXX ELISA. El rendimiento diagnóstico del ELISA basado en la detección de SPARC para la detección de animales con lesiones multifocales fue mejor que el del IDEXX ELISA (valor AUC de 0,594), que tiene una sensibilidad del 27,80% y una especificidad del 100,00%. No se observaron diferencias entre sus curvas ROC de ELISA basados en MMP8 y SPARC (MMP8 vs. SPARC, $p = 0,771$).

- 10 La **Tabla 4** muestra el rendimiento diagnóstico de los ELISA basados en biomarcadores seleccionados para el diagnóstico de bovinos con lesiones histológicas multifocales en sus tejidos intestinales. El ELISA con el mejor rendimiento diagnóstico se muestra en negrita.

Tabla 4

MULTIFOCAL (N=17) VS. CONTROL (N=61)						
BIOMARCADOR	AUC	p-valor	CORTE	SE (%)	SP (%)	DV
FAM84A	0.524	0.766	0.87	50.00	67.20	0.586
DES	0.597	0.213	23.93	61.10	68.80	0.649
ABCA13	0.676	0.028	0.97	70.60	70.50	0.705
MMP8	0.779	<0.001	26.92	94.40	62.30	0.783
SPARC	0.865	<0.001	354.94	66.70	95.10	0.809
IDEXX ELISAA	0.594	0.229	67.58	27.80	100.00	0.639
IDEXX ELISAb			55%	27.77	100.00	0.617

AUC, área bajo la curva; SE, sensibilidad; SP, especificidad; VD, valor diagnóstico (semisuma de la sensibilidad y la especificidad); valor p, es el valor p del área AUC, indica si la discriminación entre animales con lesiones multifocales y controles es significativa; DES, desmina bovina; FAM84A, familia con similitud de secuencia 84-miembro A bovina; ABCA13, subfamilia A de casetes de unión a ATP Miembro 13 bovina; MMP8, metalopéptidasa de matriz 8 bovina; SPARC, proteína secretada ácida y rica en cisteína bovina; a, la precisión diagnóstica del IDEXX ELISA se calculó mediante el análisis de la curva ROC; b, el valor de corte utilizado para calcular la sensibilidad y especificidad del ensayo se calculó utilizando el valor de corte establecido por el proveedor.

Ejemplo 2.2.3. Detección de animales con lesiones histológicas difusas (Tabla 5)

Dos ELISAs para la detección de ABCA13 y MMP8 tuvieron un buen poder discriminatorio entre la difusa y los grupos de control ($0,8 \leq \text{AUC} < 0,9$). Sin embargo, el ELISA basado en MMP8 mostró el rendimiento diagnóstico más preciso (valor AUC de 0,866, $< 0,001$) con una sensibilidad del 100,00% y una especificidad del 77,10%. En este caso, la combinación de ELISA basados en biomarcadores no mejora los resultados obtenidos individualmente por el ELISA basado en MMP8. El rendimiento diagnóstico del ELISA basado en la detección de MMP8 también se comparó con el del ELISA de IDEXX. El poder discriminatorio del IDEXX ELISA entre los grupos difusa y de control fue excelente, con un valor AUC de 0,917 ($p < 0,001$). El rendimiento diagnóstico del IDEXX ELISA para detección de animales con lesiones difusas fue mejor que el de los ELISA basados en biomarcadores, con una sensibilidad del 86,70% y una especificidad del 96,70%. La comparación de las curvas ROC de ABCA13, MMP8 e IDEXX ELISA mostró que no había diferencias significativas entre las tres curvas ROC (ABCA13 frente a MMP8, $p = 0,843$; ABCA13 frente a IDEXX ELISA, $p = 0,482$ y MMP8 frente a IDEXX ELISA, $p = 0,444$).

Tabla 5

DIFUSA (N=15) VS. CONTROL (N=61)						
BIOMARCADOR	AUC	p-valor	CORTE	SE (%)	SP (%)	DV
FAM84A	0.635	0.108	1.06	66.70	75.40	0.710
DES	0.619	0.159	36.59	46.70	88.50	0.676
ABCA13	0.851	<0.001	1.20	86.70	83.30	0.850
MMP8	0.866	<0.001	40.23	100.00	77.10	0.885
SPARC	0.61	0.192	7.73	100.00	36.10	0.680

IDEXX ELISAa	0.917	<0.001	19.6	86.70	96.70	0.917
IDEXX ELISAb			55%	73.33	100	0.866

AUC, área bajo la curva; SE, sensibilidad; SP, especificidad; VD, valor diagnóstico (semisuma de la sensibilidad y la especificidad); valor p, es el valor p del área AUC, indica si la discriminación entre animales con lesiones difusas y controles es significativa; DES, desmina bovina; FAM84A, miembro A de la familia bovina con similitud de secuencia 84; ABCA13, subfamilia A de casetes de unión a ATP Miembro 13 bovino; MMP8, metalopeptidasa de matriz 8 bovina; SPARC, proteína secretada ácida y rica en cisteína bovina; a, la precisión diagnóstica del IDEXX ELISA se calculó mediante el análisis de la curva ROC; b, el valor de corte utilizado para calcular la sensibilidad y la especificidad del ensayo se calculó utilizando el valor de corte establecido por el proveedor del kit.

Ejemplo. 2.2.4. Detección global de animales con cualquier tipo lesión histológica (Tabla 6)

- 5 Se comparó la capacidad de los ELISA basados en biomarcadores para discriminar las vacas infectadas con cualquier tipo de lesión histológica (focal, multifocal o difusa) del grupo de control. Debe tenerse en cuenta que los tres diferentes grupos histológicos no están representados por igual (focal n=55, multifocal n=17 y difusa n=15), sin embargo, esto es un reflejo de la situación real en las granjas. Los ELISA basados en ABCA13 y MMP8 tuvieron un buen poder discriminatorio ($0,8 \leq AUC < 0,9$) entre los animales con lesiones y el grupo control. Sin embargo, el ELISA basado en
- 10 ABCA13 mostró el rendimiento diagnóstico más preciso (valor AUC de 0,825, $p < 0,001$) con una sensibilidad del 70,60% y una especificidad del 91,80%. La combinación de los resultados obtenidos con los ELISA en ABCA13 y SPARC arrojó un valor AUC ligeramente superior a (0,933) con una sensibilidad del 88,52% y una especificidad del 79,76%. El rendimiento diagnóstico del ELISA basado en la detección de ABCA13 también se comparó con el del ELISA IDEXX. El rendimiento diagnóstico del ELISA basado en ABCA13 para la detección de animales infectados fue
- 15 mejor que el del IDEXX ELISA (valor AUC de 0,613), que tuvo una sensibilidad del 28,40% y una especificidad del 100,00%.

La Tabla 6 muestra el rendimiento diagnóstico de ELISAs basados en biomarcadores seleccionados para el diagnóstico de ganado con lesiones histológicas en sus tejidos intestinales. El ELISA con el mejor rendimiento diagnóstico se muestra en negrita.

Tabla 6

TODAS LAS LESIONES (N=93) VS. CONTROL (N=61)						
BIOMARCADOR	AUC	p-valor	CORTE	SE (%)	SP (%)	VD
FAM84A	0.542	0.388	1.06	42.00	75.40	0.587
DES	0.617	0.016	23.1	61.40	68.80	0.651
ABCA13	0.825	<0.001	1.29	70.60	91.80	0.812
MMP8	0.808	<0.001	33.17	87.50	68.80	0.782
SPARC	0.79	<0.001	354.94	47.10	95.10	0.711
IDEXX ELISAa	0.613	0.020	28.39	28.40	100.00	0.642
IDEXX ELISAb			55%	32.20	100.00	0.661

AUC, área bajo la curva; SE, sensibilidad; SP, especificidad; VD, valor diagnóstico (semisuma de la sensibilidad y la especificidad); valor p, es el valor p del área AUC, indica si la discriminación entre animales con lesiones y controles es ; DES, desmina bovina; FAM84A, miembro A de la familia bovina con similitud de secuencia 84; ABCA13, subfamilia A de casetes de unión a ATP Miembro 13 bovino; MMP8, metalopeptidasa de matriz 8 de bovina; SPARC, proteína secretada ácida y rica en cisteína de bovino; a, la precisión diagnóstica del IDEXX ELISA se calculó mediante el análisis de la curva ROC; b, el valor de corte utilizado para calcular la sensibilidad y especificidad del ensayo se calculó utilizando el valor de corte establecido por el proveedor.

- A continuación se presenta un resumen de las ELISA con el mejor rendimiento diagnóstico para cada grupo histológico.
- 25 El ELISA basado en ABCA13 mostró el rendimiento diagnóstico más preciso (valor AUC de 0,866, $p < 0,001$) para la detección de animales con lesiones focales. El ELISA basado en SPARC mostró el rendimiento diagnóstico más preciso (valor AUC de 0,865, $p < 0,001$) para la detección de animales con lesiones multifocales. La prueba ELISA basada en MMP8 mostró la mayor precisión diagnóstica (valor AUC de 0,866, $p < 0,001$) para la detección de animales con lesiones difusas, sin embargo, el rendimiento diagnóstico del IDEXX ELISA (valor AUC de 0,917, $p < 0,001$) fue
- 30 mejor que el de la prueba basada en biomarcadores con una sensibilidad del 86,70% y una especificidad del 96,70%.

Por último, para la detección global de animales con cualquier tipo de lesión histológica, el ELISA basado en ABCA13 mostró el rendimiento diagnóstico más preciso (valor AUC de 0,825, $p < 0,001$) con una sensibilidad del 70,60% y una especificidad del 91,80%. Además, la combinación de biomarcadores para la detección de animales con lesiones focales, multifocales o de cualquier tipo podría mejorar la sensibilidad del diagnóstico. En conjunto, nuestros resultados muestran que el ELISA basado en ABCA13 es un método muy preciso para la discriminación de animales con lesiones focales y para la detección global de animales con cualquier tipo de lesión histológica.

La **Tabla 7** muestra el rendimiento diagnóstico de los mejores ELISA basados en biomarcadores y IDEXX ELISA para la detección de los diferentes grupos histológicos de animales. El análisis ROC de los ELISA basados en MMP8 y SPARC y el IDEXX ELISA se realizó utilizando 87 muestras de suero de 55 animales con lesiones focales, 17 con lesiones multifocales y 15 con lesiones difusas. Se realizó un análisis ROC del ELISA basado en ABCA13 utilizando 83 muestras de suero de 53 animales con lesiones focales, 16 con lesiones multifocales y 14 con lesiones difusas:

Tabla 7

GRUPO	ELISA	AUC	p-valor	CORTE	SE (%)	SP (%)	DV
FOCAL	ABCA13	0.866	<0.001	1.74	79.20	93.40	0.863
MULTIFOCAL	SPARC	0.676	0.028	0.97	70.60	70.50	0.705
DIFUSO	MMP8	0.851	<0.001	1.20	86.70	83.30	0.850
DIFUSO	IDEXXa	0.917	<0.001	19.6	86.70	96.70	0.917
TODAS LESIONES	LASABCA13	0.825	<0.001	1.29	70.60	91.80	0.812

GRUPO, se refiere a los diferentes grupos de análisis establecidos en función de la clasificación histopatológica; AUC, área bajo la curva; p-valor, indica si la discriminación entre animales con lesiones y controles es significativa; SE, sensibilidad; SP, especificidad; DV, valor diagnóstico (semisuma de la sensibilidad y la especificidad); ABCA13, subfamilia A de casetes de unión a ATP Miembro 13 bovino; MMP8, metalopeptidasa de matriz 8 bovina; SPARC, proteína secretada bovina ácida y rica en cisteína; a, la precisión diagnóstica del IDEXX ELISA se calculó mediante el análisis de la curva ROC.

Ejemplo 2.2.5. Comparación del rendimiento diagnóstico del ELISA basado en ABCA13 con otros métodos convencionales para el diagnóstico de animales con lesiones focales

El rendimiento diagnóstico del ELISA basado en la detección de ABCA13 también se comparó con métodos de diagnóstico de PTB convencionales, como el ELISA de anticuerpos anti-MAP específicos (IDEXX ELISA), y la PCR en tiempo real fecal y tisular específica y el cultivo bacteriológico.

La **Tabla 8** muestra el rendimiento diagnóstico de los ensayos de diagnóstico basados en biomarcadores convencionales y novedosos para la detección de animales con lesiones focales en sus tejidos intestinales. El ELISA basado en ABCA13 mostró un mejor valor diagnóstico que los demás métodos de diagnóstico ensayados para la detección y discriminación de animales con lesiones focales. Fue capaz de detectar como positivos 44 de los 55 animales con lesiones focales (sensibilidad del 80%) y como negativos 57 de los 61 controles (especificidad del 93%). El valor diagnóstico o las sensibilidades de las demás metodologías convencionales fueron inferiores. En concreto, el IDEXX ELISA fue 100% específico pero sólo detectó como positivos 3 de 55 animales (5,45% de sensibilidad) cuando el punto de corte utilizado (55%) fue el establecido por el proveedor u 8 de 55 (14,54%) cuando utilizamos el punto de corte (28,39%) calculado mediante el análisis ROC.

Tabla 8

MÉTODO	AUC	p-valor	CORTE	SE (%)	SP (%)d	DV
ELISA ABCA13a	0.866	<0.001	1.74	79.20	93.40	0.863
IDEXX ELISAb	0.536	0.511	28.39%	14.50	100	0.572
IDEXX ELISAc			55%	5.45	100	0.527
Cultivo fecal				5.45	100	0.527
PCR fecal				9.09	100	0.545
Cultivo de tejidos				27.27	UN	
PCR de tejidos				27.27	IN	

AUC, área bajo la curva; SE, sensibilidad; SP, especificidad; VD, valor diagnóstico; UN, indeterminado; p-valor, indica si la discriminación entre animales con lesiones focales y controles es significativa. ABCA13, , subfamilia A de casetes de unión a ATP Miembro 13 bovino; a, indican que el número de animales con lesiones focales, multifocales, difusas o con cualquier de lesión analizados con el ELISA basado en ABCA13 fue de 53, 16, 14 y 83, respectivamente; b, el valor de corte utilizado para estimar la sensibilidad y la especificidad del ensayo se calculó mediante análisis ROC; c, el valor de corte utilizado para estimar la sensibilidad y la especificidad del ensayo fue el establecido por el proveedor; d, el grupo de control utilizado para calcular la especificidad consistió en 61 animales de una explotación libre de PTB.

Ejemplo 2.2.6. Se probó una combinación de ELISA basados en biomarcadores para determinar el valor diagnóstico del ELISA basado en ABCA13 mediante análisis de regresión logística.

Los modelos de diagnóstico basados en la combinación de algunos de los cinco biomarcadores seleccionados mejoran ligeramente el valor diagnóstico de los ELISA basados en un único biomarcador (véase la **Tabla 9**).

La **Tabla 9** muestra el rendimiento diagnóstico de los modelos basados en el uso combinado de varios biomarcadores en comparación con el rendimiento obtenido para los ELISA basados en un solo biomarcador para el diagnóstico de bovinos con diferentes lesiones histológicas en los tejidos intestinales. Este análisis se llevó a cabo utilizando 55 animales con lesiones focales, 18 con lesiones multifocales, 15 con lesiones difusas y 67 animales de control.

Tabla 9

GRUPO	BIOMARCADOR	AUC	Valor P	SE (%)	SP (%)	DV
FOCAL	ABCA13	0.837	<0.001	79.25	88.06	0.84
MULTIFOCAL	SPARC	0.852	<0.001	66.67	92.54	0.80
DIFUSA	MMP8	0.831	<0.001	100	71.64	0.86
PATENTE	MMP9	0.781	<0.001	96.97	58.21	0.78
CUALQUIER LESIÓN	ABCA13	0.793	<0.001	69.41	86.57	0.78
GRUPO	MODELOS DE BIOMARCADORES	AUC	IC 95%	SE (%)	SP (%)	DV
FOCAL	DES, ABCA13 Y SPARC	0.911	0.437-0.646	84.62	86.57	0.86
MULTIFOCAL	DES, FAM84A Y SPARC	0.851	0.737-0.964	70.54	89.55	0.80
DIFUSA	-					
PATENTE	DES, ABCA13, MMP8 Y SPARC	0.82	0.727-0.910	75	85.07	0.80
CUALQUIER LESIÓN	DES, ABCA13, MMP8 Y SPARC	0.878	0.824-0.932	80.95	85.07	0.83

Grupo, grupo histológico; AUC, área bajo la curva; SE, sensibilidad; SP, especificidad; VD, valor diagnóstico (semisuma de la sensibilidad y la especificidad); valor p, es el valor p del área AUC, indica si la discriminación entre animales con lesiones focales y Controles es significativa; DES, desmina bovina; FAM84A, familia bovina con similitud de secuencia 84 miembro A; ABCA13, , subfamilia A de casetes de unión a ATP Miembro 13 bovino; MMP8, metalopéptidasa de matriz 8 bovina; SPARC, proteína secretada ácida y rica en cisteína bovina.

Ejemplo 2.2.7. Validación a gran escala de un ELISA basado en ABCA13

Habíamos demostrado que el ELISA para la detección de ABCA13 es un método preciso para la detección de animales con lesiones focales y para la detección global de animales con cualquier tipo de lesión histológica.

Para confirmar aún más estos resultados se realizó una validación a gran escala del ELISA basado en ABC13 (n=661) utilizando 556 muestras de suero de 445 animales infectados con lesiones focales, 55 con lesiones multifocales y 58 con lesiones difusas. El grupo de control no infectado estaba formado por 105 animales de dos explotaciones asturianas libres de PTB.

La **Tabla 10** muestra el rendimiento diagnóstico del ELISA basado en ABCA13 para el diagnóstico de bovinos con diferentes tipos de lesiones histológicas en sus tejidos intestinales. La precisión diagnóstica del ELISA basado en

ABCA13 se calculó mediante el análisis de la curva ROC.

Tabla 10

	AUC	Valor P	CORTE	SE	SP	DV
Control (n=105) vs. Todas las lesiones (n=556)	0.843	<0.0001	>3.66	77.24	84.76	0.81
Control (n=105) vs. focal (n=445)	0.883	<0.0001	>3.66	82.02	84.76	0.83
Control (n=105) vs. multifocal (n=55)	0.667	0.0032	>3.66	61.82	84.76	0.73
Control (n=105) frente a difuso (n=58)	0.705	<0.0001	>3.1	63,79	77.10	0.70
Control (n=105) vs. Patente (n=113)	0.687	<0.0001	>3.66	58.41	84.76	0.72

AUC, área bajo la curva; SE, sensibilidad; SP, especificidad; VD, valor diagnóstico (semisuma de la sensibilidad y la especificidad); p-valor, es el valor p del área AUC, indica si la discriminación entre animales con lesiones focales y Controles es ; ABCA13, subfamilia A de casetes de unión a ATP Miembro 13 bovino. El grupo patente estaba formado por los animales con lesiones multifocales y difusas; El poder discriminatorio de cada biomarcador para discernir entre los distintos grupos histopatológicos y el grupo Control se consideró el siguiente: basado en biomarcadores Se consideró que los ELISA con valores de $AUC \geq 0,9$ tenían un poder discriminatorio excelente; $0,8 \leq AUC < 0,9$ buen poder discriminatorio; $0,7 \leq AUC < 0,8$ poder discriminatorio justo; y $AUC < 0,7$, poder discriminatorio deficiente.

- 5 El ELISA para la detección de ABCA13 tiene un buen poder discriminatorio entre el grupo focal y el grupo de control (valor AUC de 0,843, $p < 0,0001$) y entre el grupo con todas las lesiones y el control (valor AUC de 0,883, $p < 0,0001$). Estos resultados confirman además que el ELISA para la detección de ABCA13 es un método de diagnóstico preciso para la detección de animales con lesiones focales y para la detección global de animales con cualquier tipo de lesión histológica.

10 Ejemplo 2.2.8. Comparación entre los resultados obtenidos con el ELISA basado en ABCA13 y el (N=661)

Como hemos mencionado, el IDEXX ELISase utiliza hoy en día ampliamente para el diagnóstico de la PTB, aunque este método se asocia a una elevada tasa de resultados falsos negativos (baja sensibilidad). Por esta razón, hemos comparado los resultados obtenidos con el ELISA basado en ABCA13 y el IDEXX ELISA para las 661 muestras utilizadas en el estudio de validación a gran escala.

La **Tabla 11** muestra la sensibilidad, especificidad y valor diagnóstico del nuevo ELISA basado en ABCA13 y la IDEXX ELISA convencional para la detección de los distintos grupos histológicos. El valor de corte utilizado para estimar la sensibilidad y la especificidad del ELISA basado en ABCA13 y del IDEXX ELISA fue de 3,66 ng/mL y 55% (% relativo ODmuestra/ODcontrol positivo), respectivamente. La estimación de la sensibilidad se basó en el análisis de 445 animales con lesiones focales, 55 con multifocales y 58 con difusas. El grupo de control utilizado para calcular la especificidad consistió en 105 animales de dos explotaciones libres de PTB.

Tabla 11

	Sensibilidad (%)	
TIPO DE LESIÓN	ELISA basado en ABCA13	IDEX ELISA
FOCAL	82,02	3,37
MULTIFOCAL	61,82	32,72
DIFUSA	63,8	86,2
MULTIFOCAL+DIFUSA	58,41	60,17
TODOS LOS TIPOS DE LESIONES	77,24	15,09
	Especificidad (%)	
	ELISA basado en ABCA13	IDEX ELISA
FOCAL	84,76	100

MULTIFOCAL	84,76	100
DIFUSA	77,1	100
MULTIFOCAL+DIFUSA	84,76	100
TODOS LOS TIPOS DE LESIONES	84,76	100
Valor diagnóstico		
	ELISA basado en ABCA13	INDEX ELISA
FOCAL	0,83	0,52
MULTIFOCAL	0,73	0,66
DIFUSA	0,70	0,93
MULTIFOCAL+DIFUSA	0,72	0,80
TODOS LOS TIPOS DE LESIONES	0,81	0,58
<i>ABCA13, subfamilia A de casetes de unión a ATP Miembro 13 bovino</i>		

Estos hallazgos apoyan nuestros resultados anteriores que indican que el ELISA basado en ABCA13 es un método muy preciso para la discriminación de animales con lesiones focales y para la detección global de animales con cualquier tipo de lesión histológica. En concreto, el ELISA basado en ABC13 tiene una mayor sensibilidad para la detección de animales con lesiones focales que representan infecciones subclínicas difíciles de detectar mediante métodos de diagnóstico convencionales.

5

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método *in vitro* para el diagnóstico de sujetos infectados por especies de *Mycobacterium* que comprende:
 - a) medir la concentración de la proteína ABCA13 en una muestra biológica que consiste en suero o plasma obtenida del sujeto, y
 - b) en donde si se identifica un aumento de la concentración de la proteína ABCA13 en la etapa a) con respecto a la concentración de la proteína ABCA13 medida en sujetos control no infectados, es una indicación de que el sujeto está infectado con especies de *Mycobacterium*.
- 10 2. Método *in vitro*, según reivindicación 1, para diagnosticar sujetos infectados con *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* que comprende:
 - a) medir la concentración de la proteína ABCA13 en una muestra biológica que consiste en suero o plasma obtenida del sujeto, y
 - 15 b) en donde si se identifica un aumento de la concentración de la proteína ABCA13 en la etapa a) con respecto a la concentración de la proteína ABCA13 medida en sujetos control no infectados, es una indicación de que el sujeto está infectado con *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*.
- 20 3. Método *in vitro*, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para el diagnóstico de la paratuberculosis en un sujeto que comprende:
 - a) medir la concentración de la proteína ABCA13 en una muestra biológica que consiste en suero o plasma obtenida del sujeto, y
 - b) en donde si se identifica un aumento de la concentración de la proteína ABCA13 en la etapa a) con respecto a la concentración de la proteína ABCA13 medida en sujetos control no infectados, es una
 - 25 indicación de que el sujeto padece paratuberculosis.
- 30 4. Método *in vitro*, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende:
 - a) medir la concentración de las proteínas [ABCA13 y SPARC] en una muestra biológica que consiste en suero o plasma obtenida del sujeto, y
 - b) en donde si se identifica un aumento de la concentración las proteínas [ABCA13 y SPARC] en la etapa a) con respecto a la concentración de las proteínas [ABCA13 y SPARC] medidas en sujetos control no infectados, es una indicación de que el sujeto padece paratuberculosis.
- 35 5. Método *in vitro*, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende:
 - a) medir la concentración de las proteínas [ABCA13 y SPARC y MMP8] en una muestra biológica que consiste en suero o plasma obtenido del sujeto, y
 - b) en donde si se identifica un aumento de concentración de las proteínas [ABCA13 y SPARC y MMP8] en la etapa a) con respecto a la concentración de las proteínas [ABCA13 y SPARC y MMP8] medidas en sujetos control no infectados, es una indicación de que el sujeto padece
 - 40 paratuberculosis.
- 45 6. Método *in vitro*, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende:
 - a) medir la concentración de las proteínas de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en una muestra biológica que consiste en suero o plasma obtenido del sujeto,
 - b) en donde si la concentración obtenida para alguna de las proteínas anteriormente citadas es superior al valor de corte establecido, es indicativo de que el sujeto padece paratuberculosis.
- 50 7. Método *in vitro*, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para el diagnóstico de paratuberculosis latente o patente, preferentemente paratuberculosis latente.
- 55 8. Método *in vitro*, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el sujeto es un mamífero seleccionado del grupo que consiste en: ganado vacuno, cabra, oveja, caballo, cerdo, ciervo, conejo, jabalí, bisonte, llama, alpaca, zarigüeya, tejón, elefante o ser humano; preferentemente un animal de granja seleccionado del grupo consistente en: vaca, cabra, oveja, caballo, cerdo, ciervo, llama o alpaca.
- 60 9. Uso *in vitro* de la proteína ABCA13, de las proteínas [ABCA13 y SPARC], o de las proteínas [ABCA13 y SPARC y MMP8], en una muestra biológica que consiste en suero o plasma, para el diagnóstico de sujetos infectados por especies de *Mycobacterium*.
- 65 10. Uso *in vitro*, según la reivindicación 9, para el diagnóstico de sujetos infectados con *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*.
11. Uso *in vitro*, según cualquiera de las reivindicaciones 9 o 10, para el diagnóstico de la paratuberculosis.
12. Uso *in vitro*, según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, para el diagnóstico de la paratuberculosis latente o patente, preferentemente paratuberculosis latente.

5

13. Uso de un kit que comprende herramientas o reactivos para determinar la concentración de la proteína ABCA13 en una muestra biológica consistente en suero o plasma para el diagnóstico de sujetos infectados con especies de *Mycobacterium*.
14. Uso de un kit, según la reivindicación 13, que comprende herramientas o reactivos para determinar la concentración de las proteínas [ABCA13 y SPARC] o las proteínas [ABCA13 y SPARC y MMP8] para diagnosticar sujetos infectados con especies de *Mycobacterium*.

Figura 1

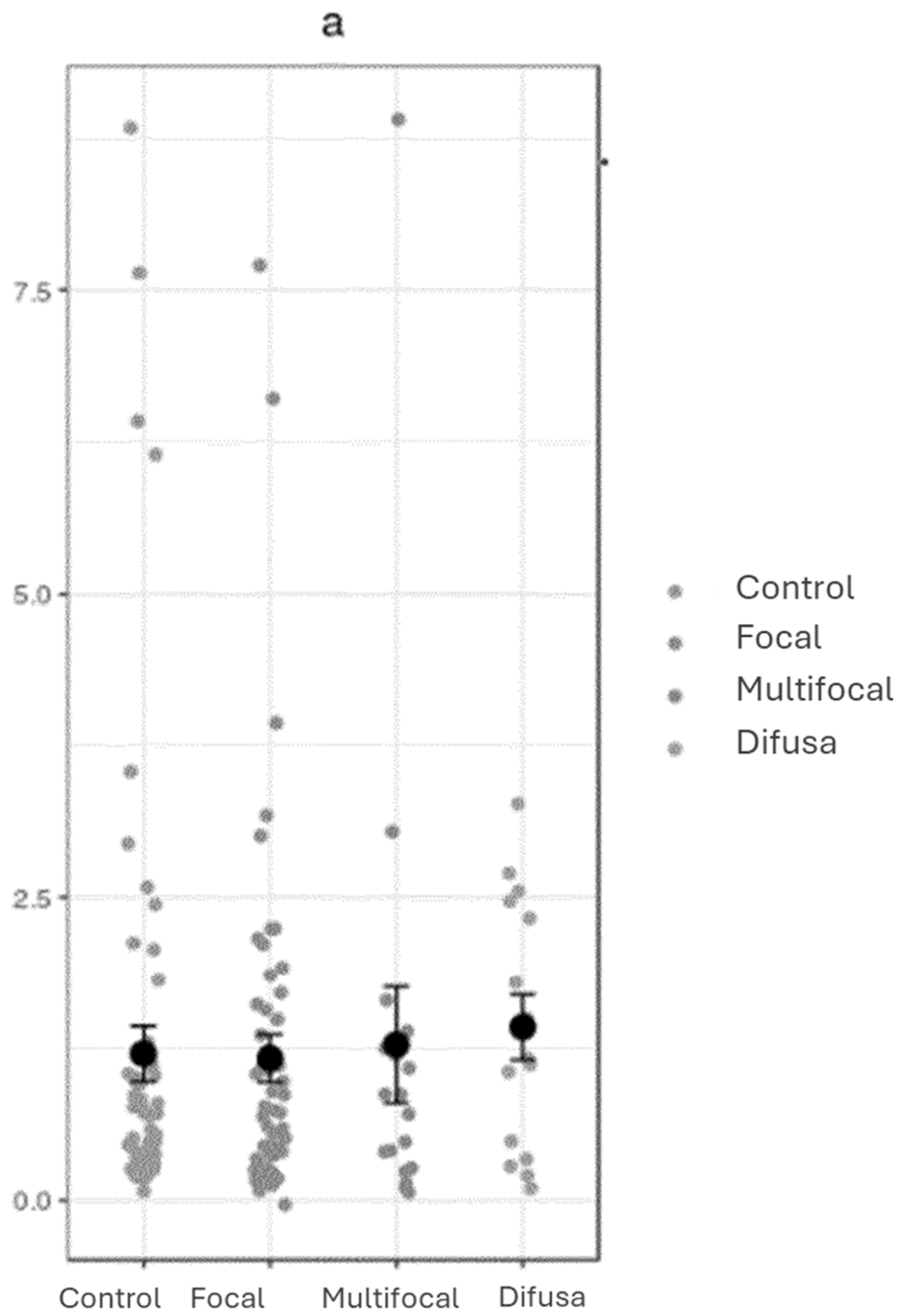


Figura 1 (Cont.)

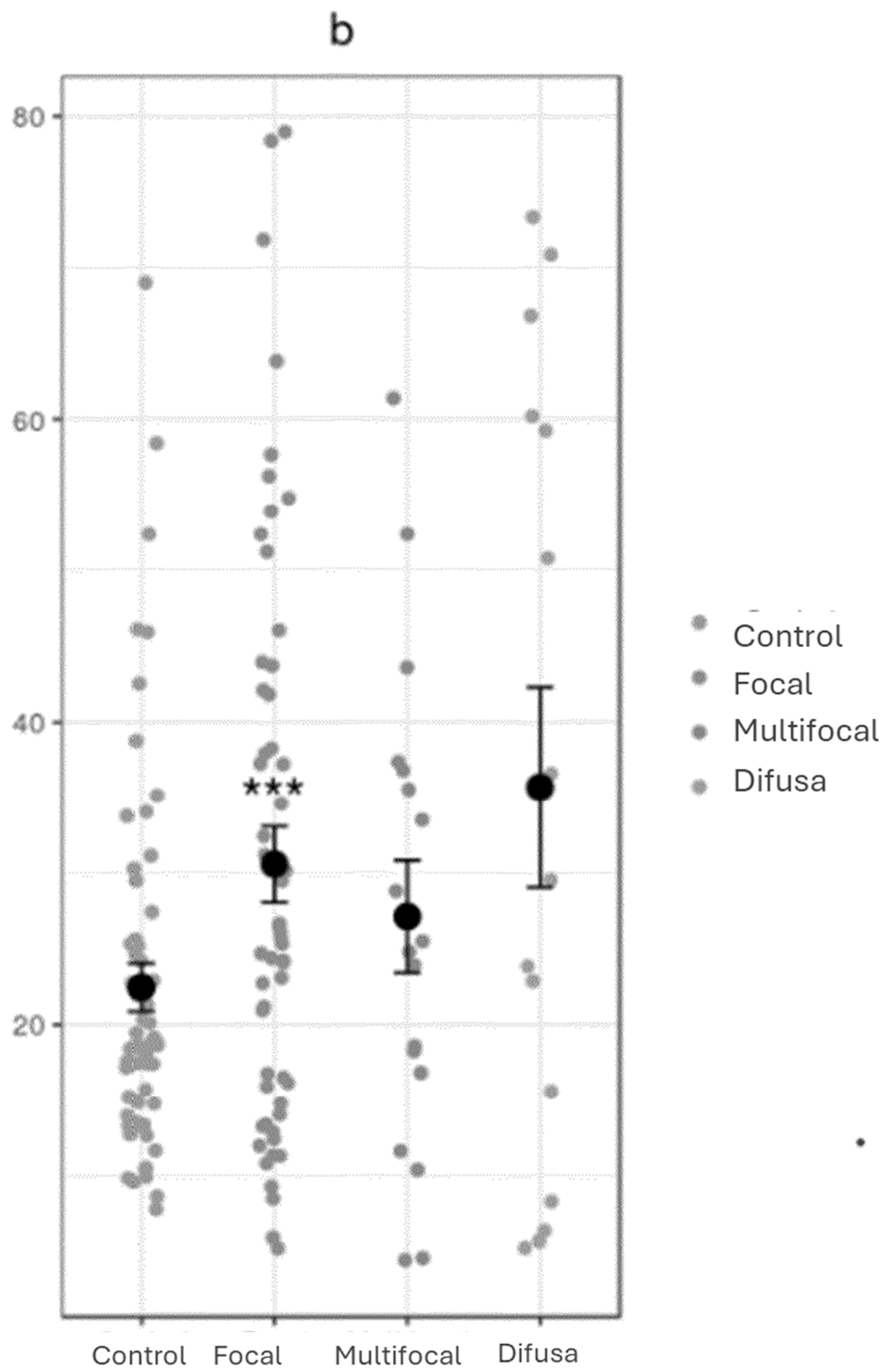


Figura 1 (Cont.)

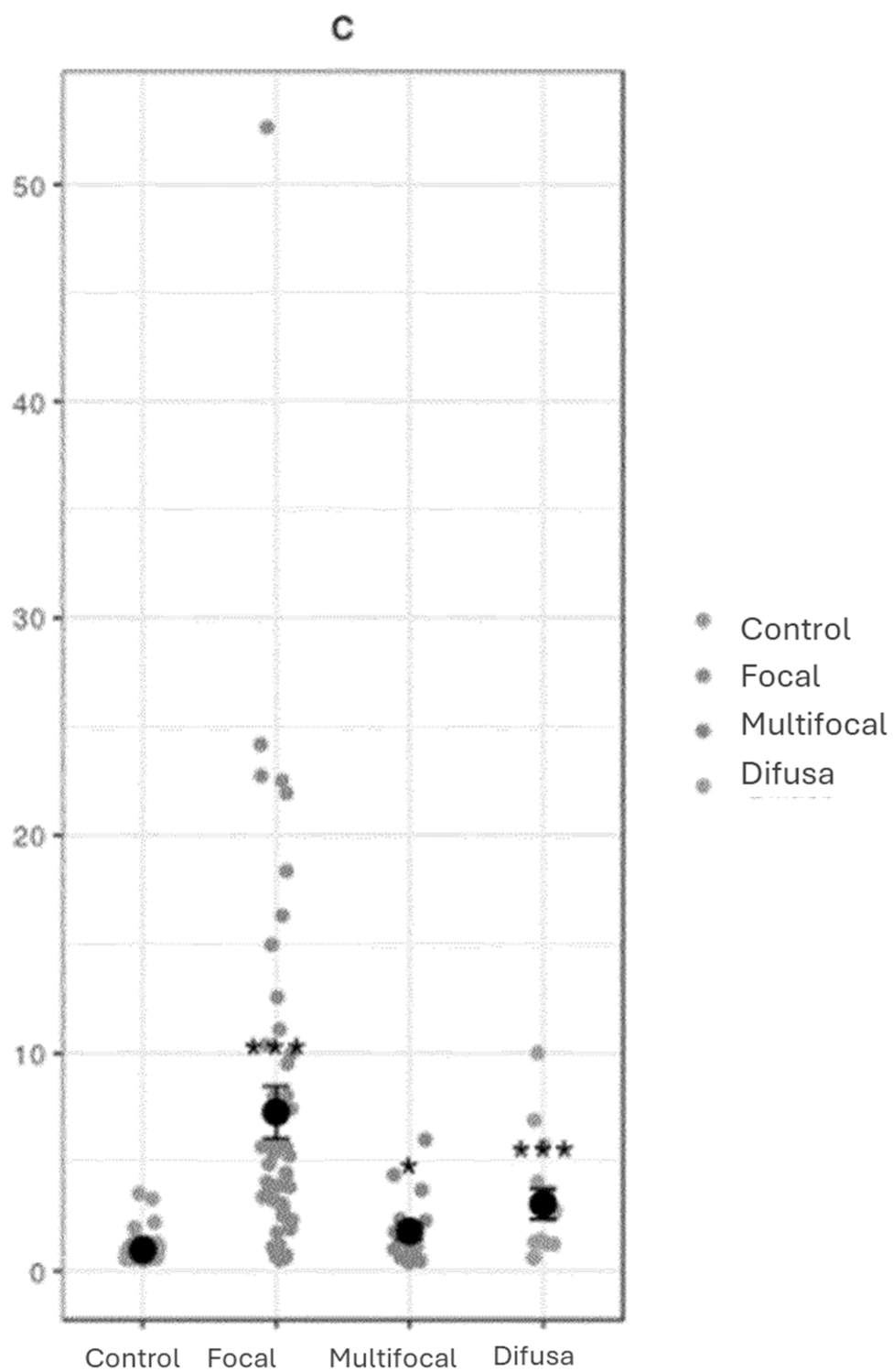


Figura 1 (Cont.)

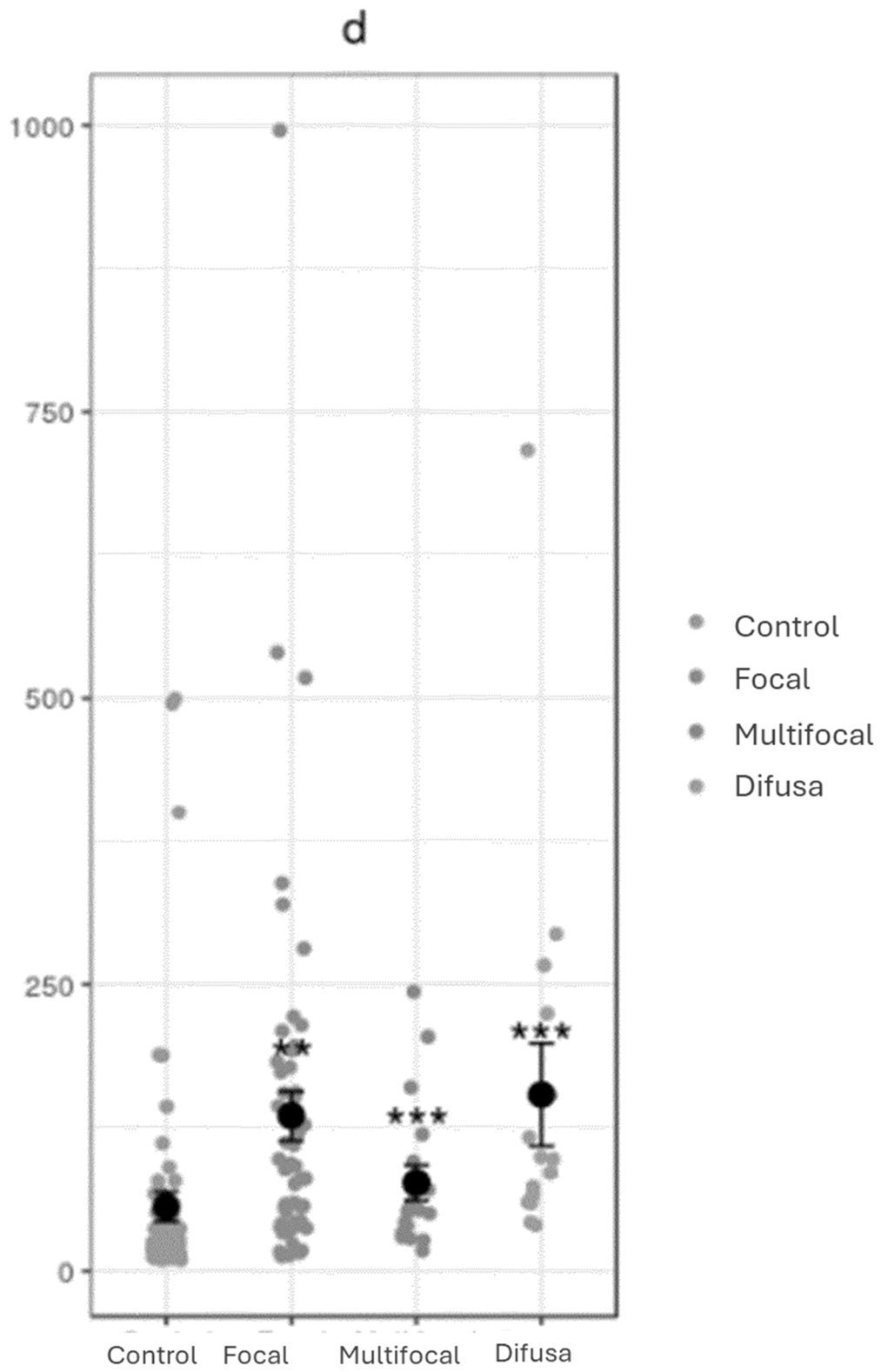


Figura 1 (Cont.)

e

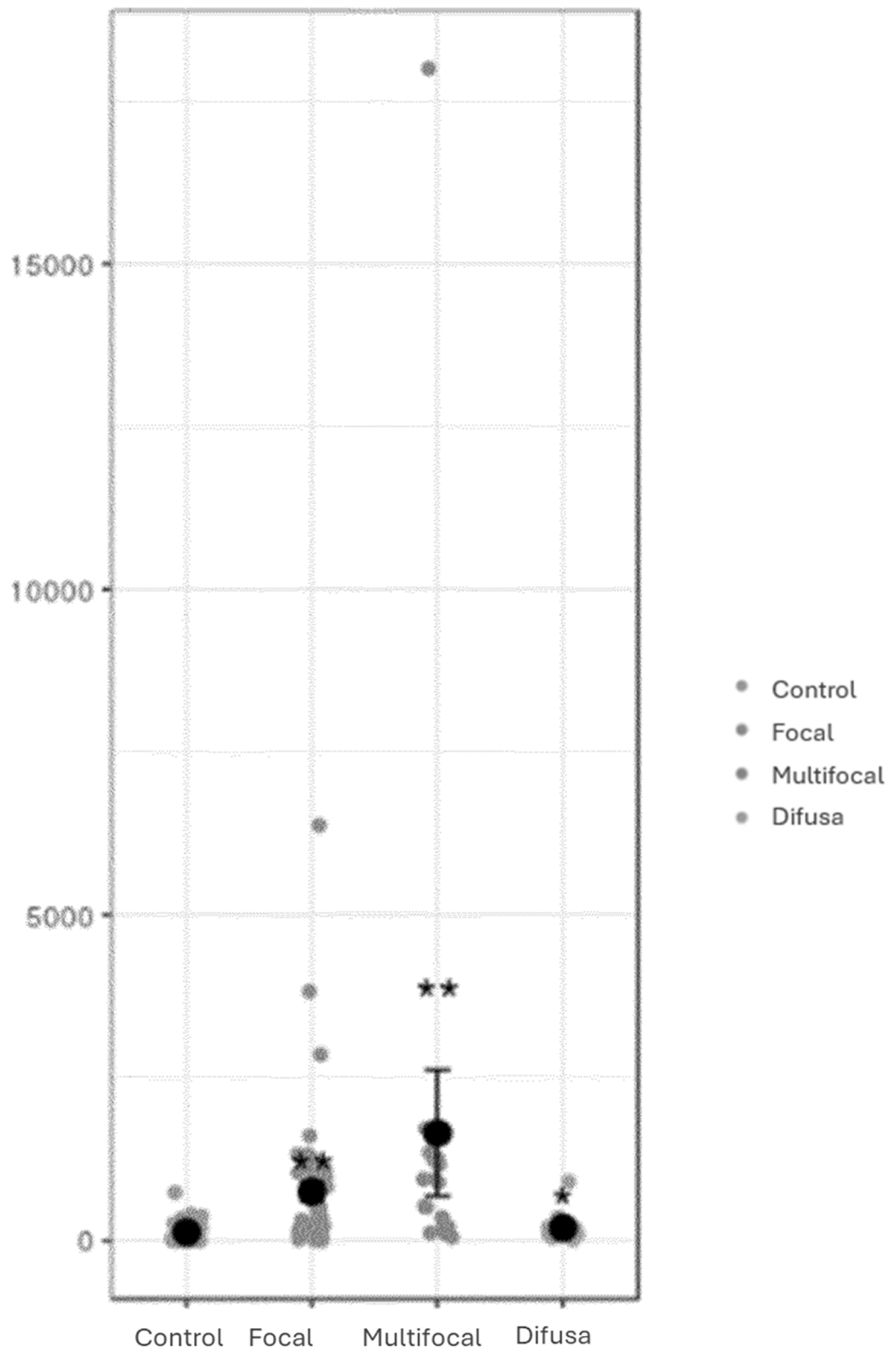


Figura 1 (Cont.)

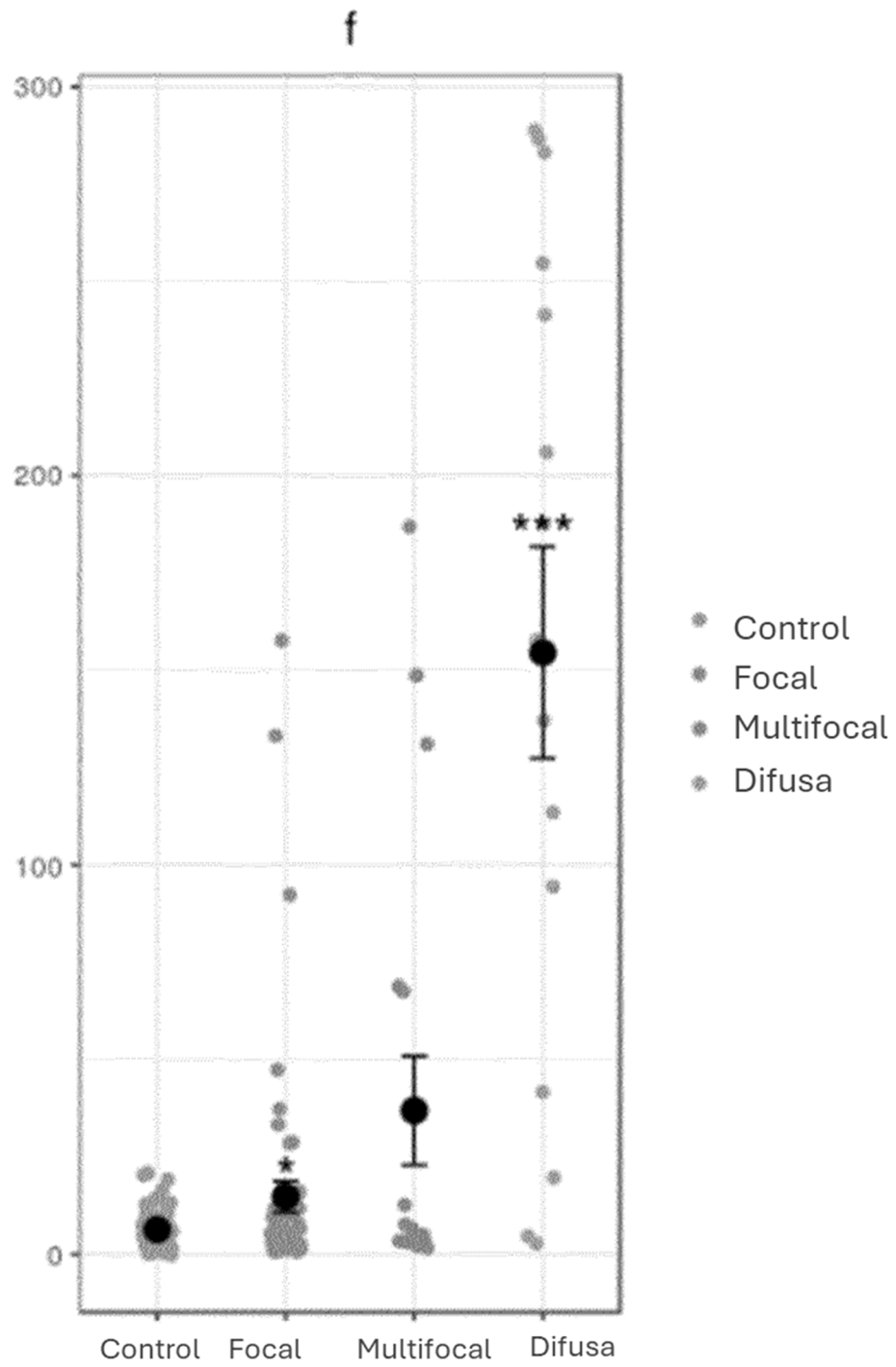


Figura 2

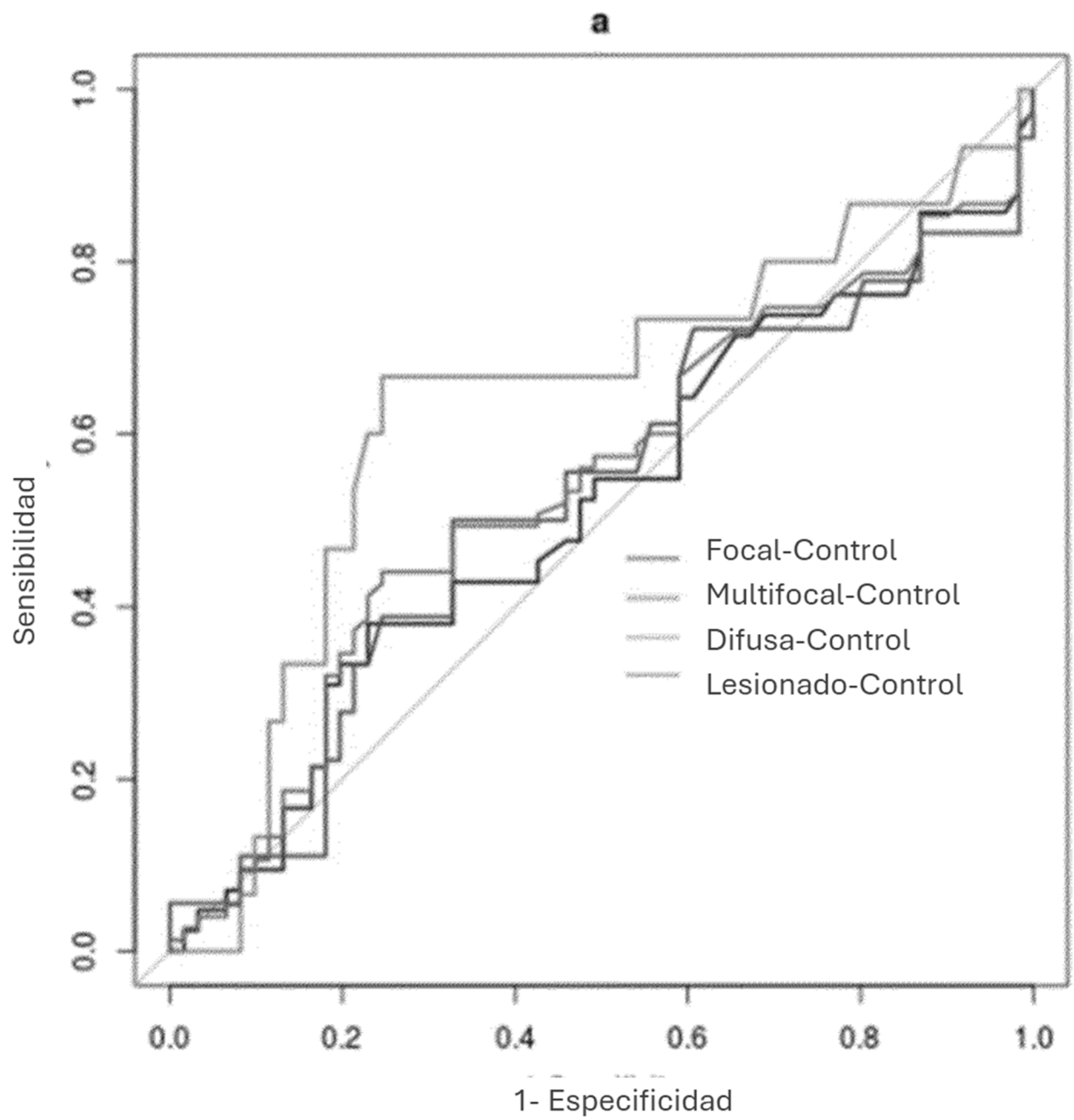


Figura 2 (Cont.)

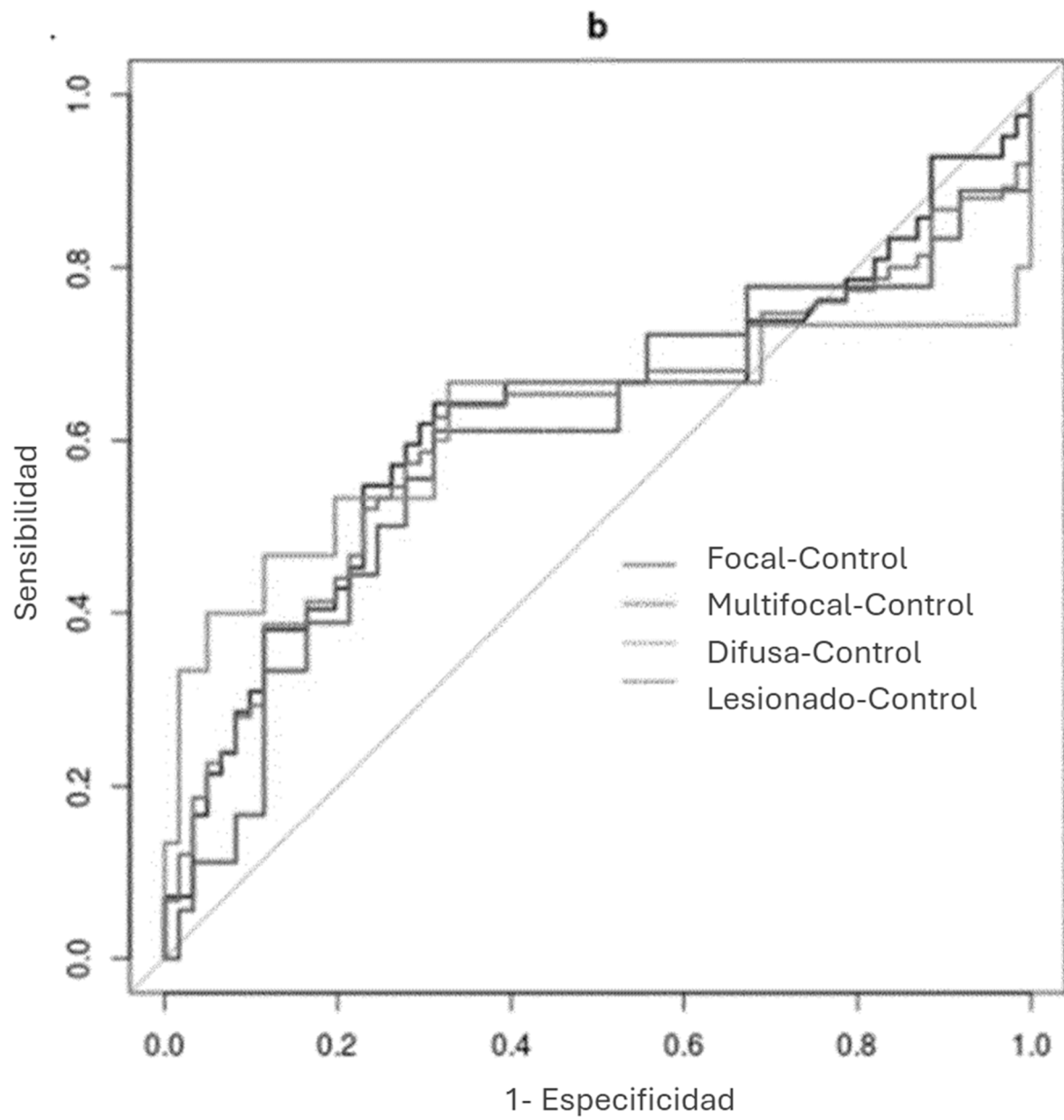


Figura 2 (Cont.)

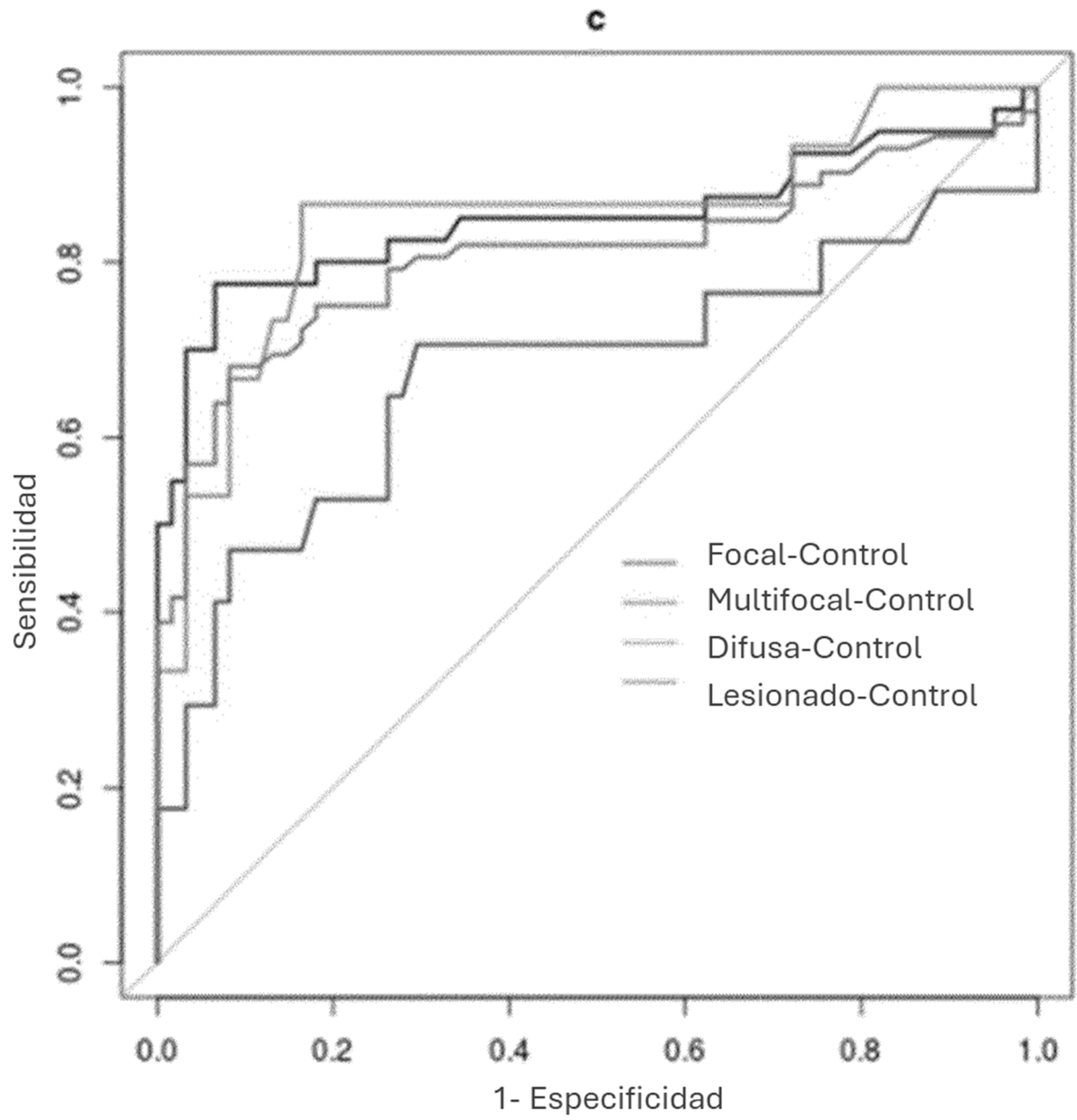


Figura 2 (Cont.)

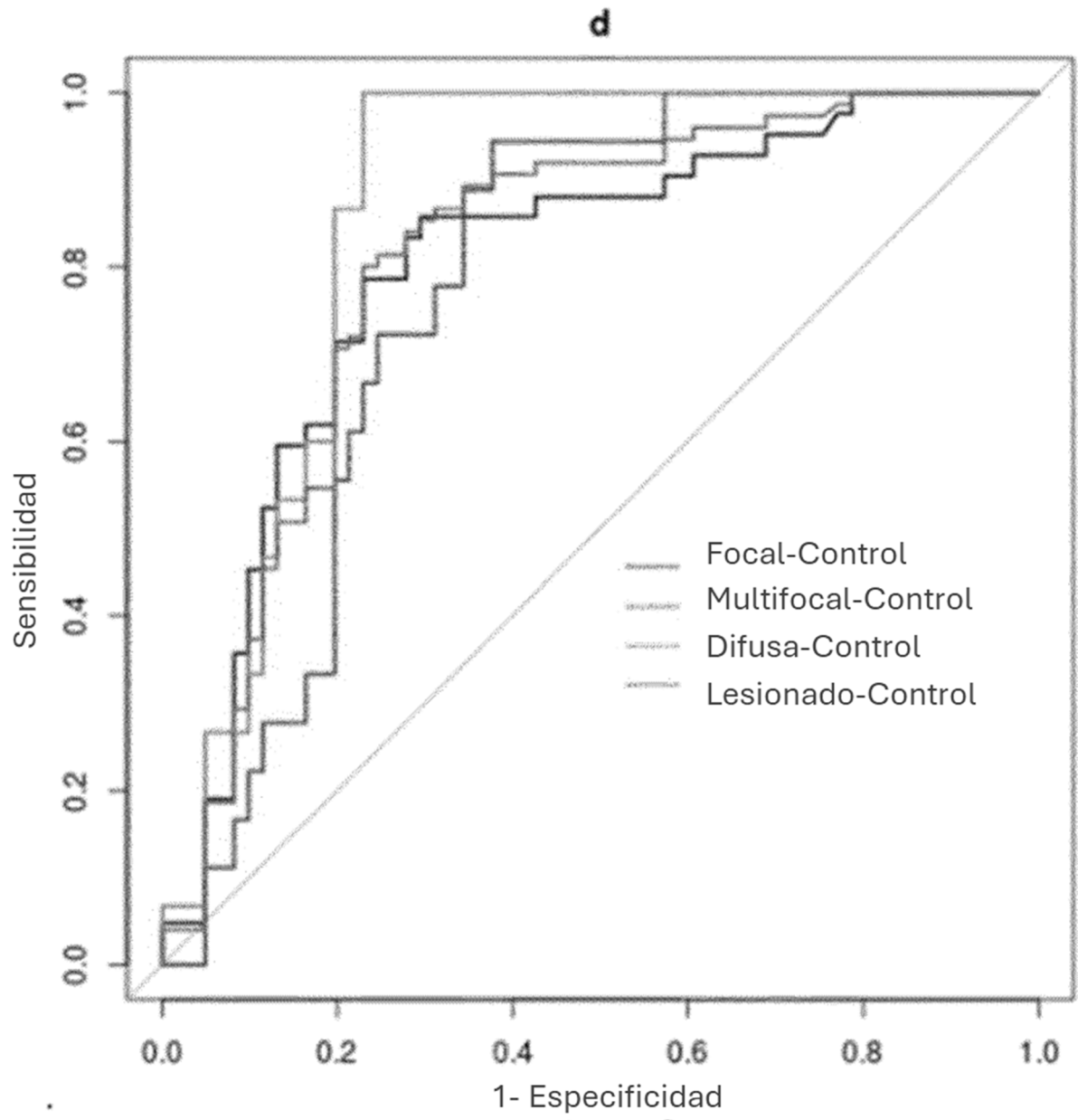


Figura 2 (Cont.)

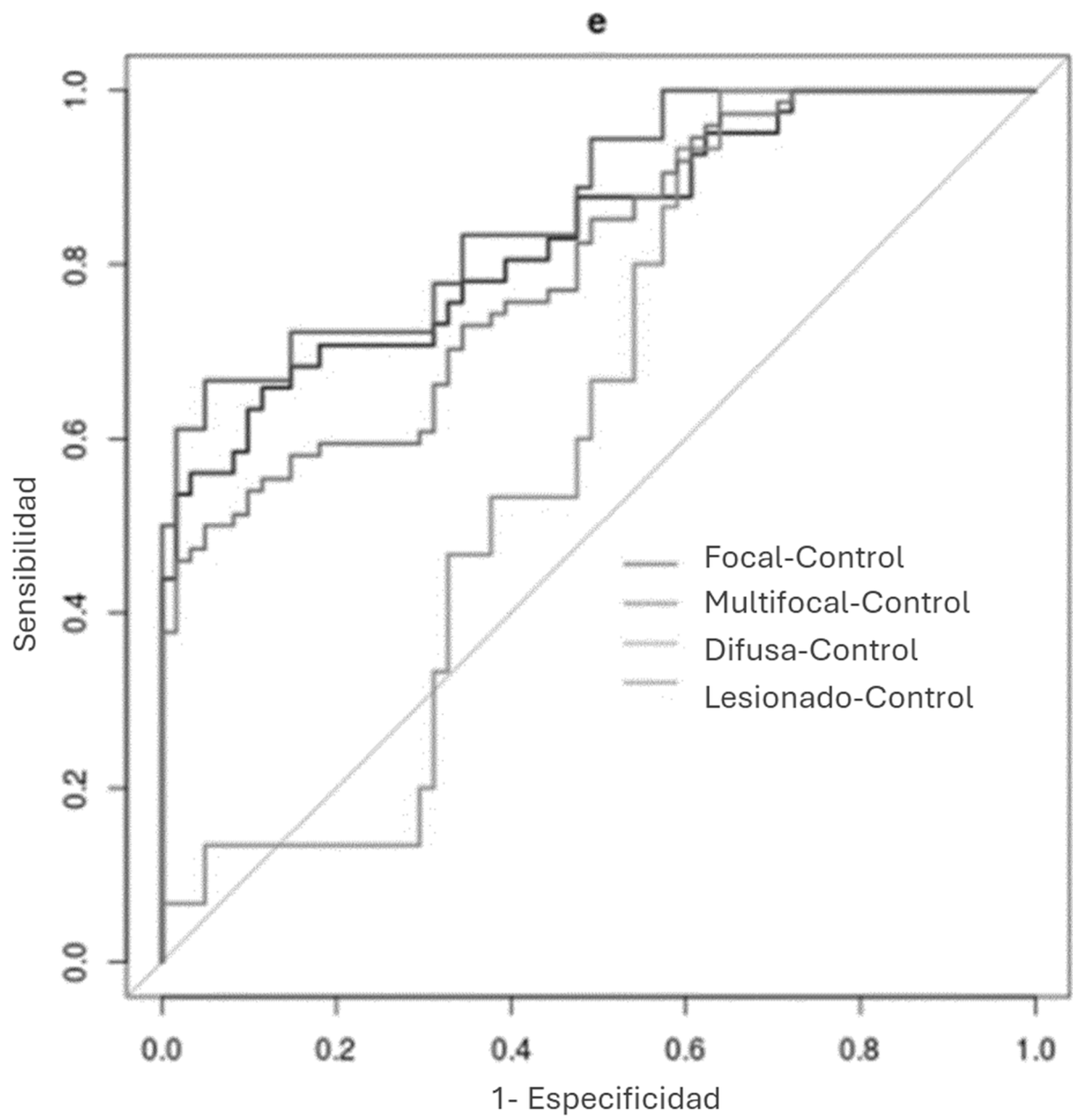
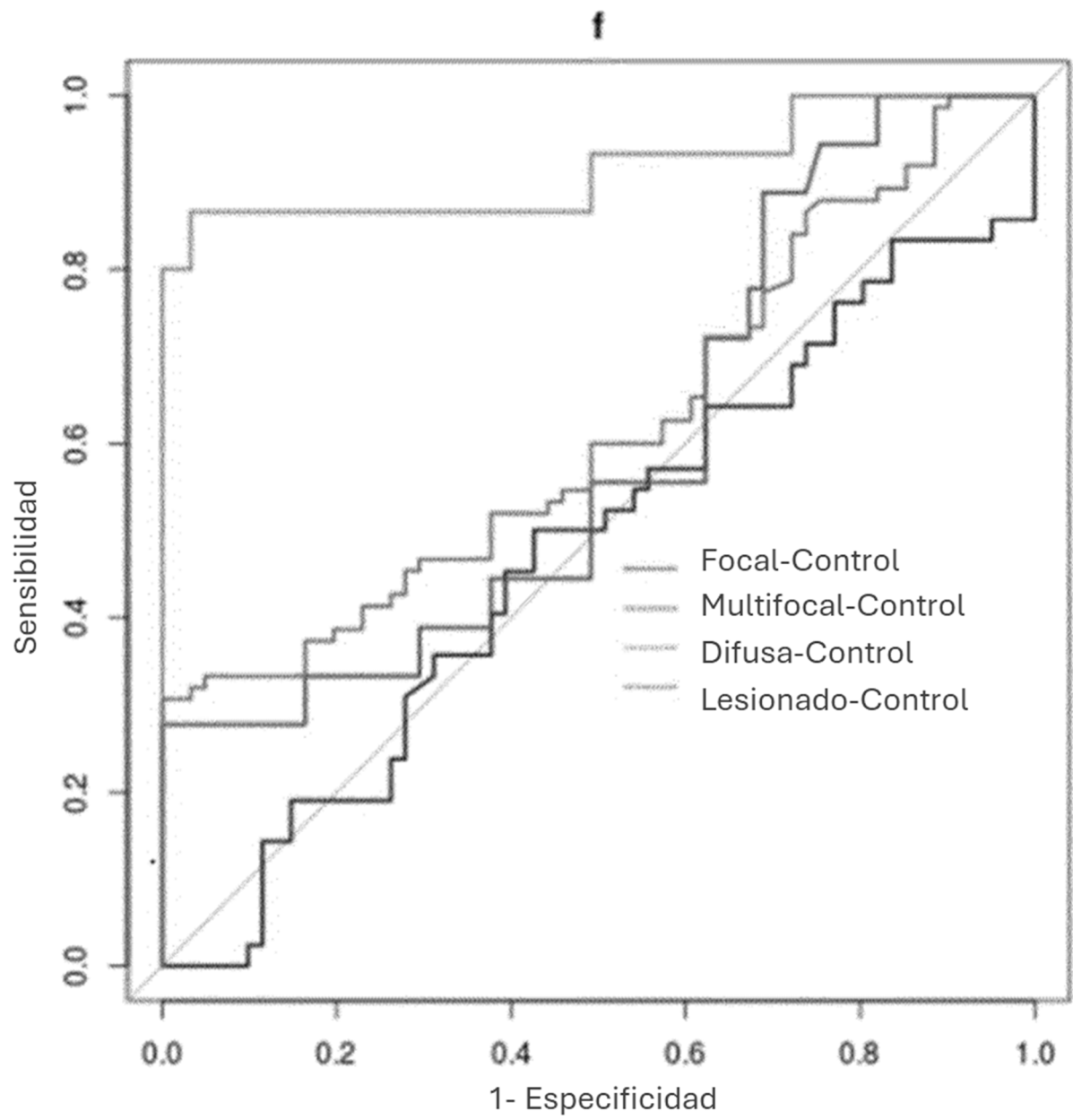


Figura 2 (Cont.)



REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es sólo para comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. Aunque se ha puesto gran cuidado en la compilación de las referencias, no puede excluirse la posibilidad de errores u omisiones y la OEP declina toda responsabilidad a este respecto.

Literatura no patente citada en la descripción:

PIERCE ES et al. Could Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis cause Crohn's disease, ulcerative colitis... and colorectal cancer?. Infect Agent Cancer., 04 January 2018, vol. 13, 1 [0002]

GARVEY M et al. Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis: A possible causative agent in human morbidity and risk to public health safety. Open Vet J., 19 May 2018, vol. 8 (2), 172-181 [0002]

DOW CT et al. Proposing BCG Vaccination for Mycobacterium avium ss. paratuberculosis (MAP) Associated Autoimmune Diseases. Microorganisms, 05 February 2020, vol. 8 (2) [0002]

GONZÁLEZ J et al. Histopathological classification of lesions associated with natural paratuberculosis infection in cattle. J Comp Pathol., August 2005, vol. 133 (2-3), 184-96 [0003]

BALSEIRO et al. Chronic regional intestinal inflammatory disease: A trans-species slow infection?. Comp. Immunol., Microbiol., Infect. Dis., 2018, vol. 62, 88-100 [0003]

VAZQUEZ et al. Latent infections are the most frequent form of paratuberculosis in slaughtered Friesian cattle. Spanish Journal of Agricultural Research, 2014, vol. 12 (4), 1049-1060, [http:// dx.doi.org/10.5424/sjar/2014124-5978](http://dx.doi.org/10.5424/sjar/2014124-5978) [0006]

MULLER, M.P. ; TOMLINSON, G. ; MARRIE, T.J. ; TANG, P.. ; MCGEER, A. ; LOW, D.E. ; DETSKY, A.S. ; GOLD, W.L. Can routine laboratory tests discriminate between severe acute respiratory syndrome and other causes of community-acquired pneumonia?. Clin Infect Dis., 2005, vol. 40 (8), 1079-86, <https://doi.org/10.1086/428577> [0045]

PARKHE. ; PARK, H T. ; JUNG YH. ; YOO, HS. Establishment a real-time reverse transcription PCR based on host biomarkers for the detection of the sub-clinical cases of Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis. PLoS One., 2017, vol. 25 (5), e0178336 [0045]

DELONG ER ; DELONG DM ; CLARKE-PEARSON DL. Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach. Biometrics, 1988, vol. 44, 837-845 [0046]

MAX KUHN. Classification and Regression Training, 2020, <https://CRAN.R-project.org/package=caret> [0047]

R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna. Austria, 2018, <https://www.R-project.org> [0047]