

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 428 378**

51 Int. Cl.:

G01N 33/569 (2006.01)

C07K 14/35 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.09.2007 E 07804286 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.07.2013 EP 2069792**

54 Título: **Método y kit para detectar si un individuo es susceptible a progresar hasta una enfermedad micobacteriana activa**

30 Prioridad:

14.09.2006 GB 0618127

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

07.11.2013

73 Titular/es:

**LALVANI, AJIT (100.0%)
39 Lonsdale Road
Oxford, OX2 7ES, GB**

72 Inventor/es:

**LALVANI, AJIT y
MILLINGTON, KERRY**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 428 378 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 y kit para detectar si un individuo es susceptible a progresar hasta una enfermedad micobacteriana activa

5 Campo de la invención

La invención se refiere a un método pronóstico.

10 Antecedentes de la invención

10 El ensayo cutáneo de tuberculina (TST) ha sido hasta ahora el único marcador pronóstico para tuberculosis activa (TB) en personas con reciente exposición a TB. Las reacciones de ensayo cutáneo más grandes a tuberculina se asocian con índices crecientes de posterior progreso a tuberculosis activa. Sin embargo, la fiabilidad pronóstica del TST en poblaciones vulnerables, tales como niños jóvenes, puede estar reducida. La aplicación del ensayo cutáneo también tiene limitaciones logísticas; por ejemplo, la necesidad de una nueva visita de 3 a 7 días después para leer el resultado y la subjetividad en el registro de la cantidad de endurecimiento cutáneo.

Sumario de la invención

20 Los presentes inventores han demostrado que respuestas de células T a antígenos micobacterianos particulares actúan como marcadores pronóstico que pueden usarse para identificar a individuos en riesgo de progresar hasta enfermedad micobacteriana activa. Este hallazgo se usa como base del método pronóstico de la invención.

25 Por consiguiente, la presente invención proporciona un método para detectar si un individuo progresará hasta tener enfermedad micobacteriana activa que comprende determinar si el individuo tiene una respuesta de células T contra uno o más de los siguientes antígenos micobacterianos:

- CFP-10,
- Rv3873, o
- 30 - Rv3878.

La invención también proporciona el uso del método pronóstico de la invención de una lista que comprende un medio para determinar si el individuo tiene una respuesta de células T contra uno o más de los siguientes antígenos micobacterianos:

- 35 - CFP-10,
- Rv3873 o
- Rv3878.

40 Breve descripción del dibujo

La Figura 1 muestra un diagrama de flujo para el estudio descrito en los Ejemplos.

Breve descripción de las secuencias

- 45 SEC ID N° 1 es la secuencia de aminoácidos del antígeno ESAT-6 de *Mycobacterium tuberculosis*.
- SEC ID N° 2 es la secuencia de aminoácidos del antígeno CPF10 de *Mycobacterium tuberculosis*.
- SEC ID N° 3 es la secuencia de aminoácidos del antígeno Rv1989c de *Mycobacterium tuberculosis*.
- 50 SEC ID N° 4 es la secuencia de aminoácidos del antígeno Rv3873 de *Mycobacterium tuberculosis*.
- SEC ID N° 5 es la secuencia de aminoácidos del antígeno Rv3878 de *Mycobacterium tuberculosis*.
- SEC ID N° 6 es la secuencia de aminoácidos del antígeno Rv3879c de *Mycobacterium tuberculosis*.
- ES1 a ES17 son las secuencias de aminoácidos de una combinación de 17 péptidos derivados de ESAT-6.
- cfp10/1 a cfp10/18 son las secuencias de aminoácidos de una combinación de 18 péptidos derivados de CFP-10.
- 55 NEW POOL 1 enumera las secuencias de aminoácidos de una combinación de 6 péptidos derivados de Rv3873.
- NEW POOL 3 enumera las secuencias de aminoácidos de una combinación de 6 péptidos derivados de Rv3873.
- NEW POOL 4 enumera las secuencias de aminoácidos de una combinación de 7 péptidos derivados de Rv3878.
- 60 NEW POOL 5 enumera las secuencias de aminoácidos de una combinación de 7 péptidos derivados de Rv3878.
- NEW POOL 6 enumera las secuencias de aminoácidos de una combinación de 6 péptidos derivados de Rv3879c.
- 65 NEW POOL 7 enumera las secuencias de aminoácidos de una combinación de 6 péptidos derivados de Rv3879c.

NEW POOL 8 enumera las secuencias de aminoácidos de una combinación de 5 péptidos derivados de Rv3879c.

NEW POOL 9 enumera las secuencias de aminoácidos de una combinación de 6 péptidos derivados de Rv1989c.

5 NEW POOL 10 enumera las secuencias de aminoácidos de una combinación de 6 péptidos derivados de Rv1989c.

NEW POOL 11 enumera las secuencias de aminoácidos de una combinación de 6 péptidos derivados de Rv1989c.

10 Descripción detallada de la invención

La invención proporciona un método para detectar si un individuo progresará hasta tener enfermedad micobacteriana activa. En una realización preferida dicha enfermedad micobacteriana está causada por *Mycobacterium tuberculosis*.

15 El individuo es típicamente un mamífero, preferiblemente un ser humano. El individuo es típicamente uno que no tiene ningún síntoma de una infección micobacteriana. El individuo puede dar positivo o negativo en un ensayo de Mantoux. El individuo puede estar en riesgo de infección micobacteriana, típicamente por razones socioeconómicas o puede tener una predisposición genética o adquirida a infección micobacteriana.

20 El individuo puede ser un "contacto" conocido o sospechoso que ha estado expuesto a o puede haber estado expuesto a *Mycobacterium tuberculosis*. Típicamente la exposición es a tuberculosis pulmonar, tal como tuberculosis pulmonar "abierta" que es positiva en frotis de esputo A.F.B. (bacilo acidorresistente). El contacto puede ser alguien cuya exposición es en casa, el lugar de trabajo (tal como un trabajador de asistencia sanitaria) o exposición en prisiones (tal como un prisionero). La exposición puede haber sido el resultado de residir en un país con elevada prevalencia de TB, y en una realización el método pronóstico se realiza después de emigración a un país con una baja prevalencia de TB. Por tanto el individuo puede ser un inmigrante.

30 El individuo (por ejemplo, que tiene una exposición reciente o remota conocida o sospechosa) puede estar sano, puede tener una co-infección o una afección crónica o estar con agentes terapéuticos que le ponen en un riesgo mayor de desarrollar TB activa y/o que puede hacer que la infección por TB sea más difícil de diagnosticar. Los ejemplos incluyen individuos infectados por VIH, individuos que toman inmunosupresores (por ejemplo, corticosteroides, azatioprina y agentes anti-TNF- α , tales como infliximab, y terapia contra el cáncer), pacientes de hemodiálisis, receptores de trasplantes de órganos, diabéticos y niños muy pequeños (con edades por debajo de 5 años, particularmente por debajo de 2 años).

40 El método de la invención se refiere a la determinación de si un individuo tiene una respuesta de células T contra antígenos particulares. Esto puede determinarse por cualquier método adecuado, por ejemplo cualquier método que pueda usarse para detectar la presencia de células T expuestas a antígeno. En una realización se determina midiendo el nivel de células T específicas contra el antígeno o antígenos. Puede determinarse determinando si las células T del individuo reconocen el antígeno o antígenos.

45 Las células T que reconocen el antígeno en el método son generalmente células T que se han pre-sensibilizado *in vivo* contra el antígeno de una micobacteria. Estas células T expuestas a antígeno están generalmente presentes en la sangre periférica de un individuo que se ha expuesto a una micobacteria a una frecuencia de 1 en 10^6 a 1 en 10^3 células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Las células T pueden ser células T CD4 y/o CD8.

50 En el método, las células T pueden ponerse en contacto con el antígeno *in vitro*, preferiblemente *in vitro* en una muestra del individuo.

55 Generalmente las células T que se ponen en contacto en el método se toman del individuo en una muestra sanguínea, aunque pueden usarse otros tipos de muestra que contengan células T. La muestra puede añadirse directamente al ensayo o puede procesarse primero. Típicamente el procesamiento puede comprender diluir la muestra, por ejemplo con agua, tampón o medio. Típicamente la muestra se diluye de 1,5 a 100 veces, por ejemplo de 2 a 50 o de 5 a 10 veces.

60 El procesamiento puede comprender la separación de los componentes de la muestra. Típicamente las células mononucleares (MC) se separan de las muestras. Las MC comprenderán las células T y las células presentadoras de antígeno (APC). Por tanto, en el método, las APC presentes en las MC separadas pueden presentar el péptido a las células T. En otra realización solamente las células T, tales como solamente las células T CD4, pueden purificarse de la muestra. Las PBMC, MC y células T pueden separarse de la muestra usando técnicas conocidas en la técnica, tales como las descritas en Lalvani et al. (1997) J. Exp. Med. 186, pág. 859-865.

65 Preferiblemente, las células T usadas en el ensayo están en forma de muestras no procesadas o diluidas, son células T recién aisladas (tales como en forma de MC o PBMC recién aisladas) que se usan directamente *ex vivo*, en decir, no se cultivan antes de usarse en el método o son células descongeladas (que se congelaron

previamente). Sin embargo, las células T pueden cultivarse antes de su uso, por ejemplo en presencia del antígeno, y generalmente también citoquinas exógenas promotoras del crecimiento. Durante el cultivo el antígeno está típicamente presente sobre la superficie de APC, tal como la APC usada en el método. El pre-cultivo de las células T puede conducir a un aumento en la sensibilidad del método. Por tanto, las células T pueden convertirse en líneas celulares, tales como líneas celulares a corto plazo (por ejemplo, como se describe en Ota et al. (1990) Nature 346, pág. 183-187).

La APC que está típicamente presente en el método puede provenir del mismo individuo que la célula T o de un individuo diferente. La APC puede ser una APC de origen natural o una APC artificial. La APC es una célula que es capaz de presentar el antígeno a una célula T. Es típicamente una célula B, célula dendrítica o macrófago. Típicamente se separa de la misma muestra que la célula T y típicamente se co-purifica con la célula T. Por tanto la APC puede estar presente en MC o PBMC. La APC es típicamente una célula *ex vivo* recién aislada o una célula cultivada. Puede estar en forma de una línea celular, tal como una línea celular a corto plazo o inmortalizada. La APC puede expresar moléculas MHC de clase II vacías sobre su superficie.

En una realización, el antígeno se añade directamente a un ensayo que comprende células T y APC. Como se ha analizado anteriormente, las células T y las APC en dicho ensayo podrían estar en forma de MC. Cuando es un antígeno que puede reconocerse por la célula T sin la necesidad de presentación por APC, entonces no se requieren APC. Análogos que imitan el antígeno original unido a una molécula MHC son un ejemplo de dicho antígeno.

En una realización, el antígeno se proporciona a la APC en ausencia de la célula T. La APC se proporciona después a la célula T, típicamente después de permitirse que presente el antígeno sobre su superficie. El antígeno puede haberse captado en el interior de la APC y haberse presentado, o simplemente haberse captado sobre la superficie sin entrar dentro de la APC.

Típicamente se añaden de 10^5 a 10^7 , preferiblemente de $2,5 \times 10^5$ a 10^6 PBMC a cada ensayo. En el caso en que el péptido se añade directamente al ensayo su concentración es de 10^{-1} a 10^3 $\mu\text{g/ml}$, preferiblemente de 0,5 a 50 $\mu\text{g/ml}$ o de 1 a 10 $\mu\text{g/ml}$.

Típicamente, la cantidad de tiempo para que se incuben las células T con el antígeno es de 4 a 24 horas (preferiblemente de 5 a 18 horas) para células T efectoras o durante más de 24 horas para células centrales de memoria. Cuando se usan PBMC *ex vivo* se ha descubierto que pueden incubarse $5,0 \times 10^6$ PBMC en 10 $\mu\text{g/ml}$ de péptido durante 5 horas a 37°C .

El antígeno puede estar en cualquier forma adecuada. El antígeno generalmente comprende uno o más epítopos de células T de CFP-10, Rv3873 o Rv3878. Por tanto, en una realización se usan péptidos que son fragmentos de CFP-10, Rv3873 o Rv3878, aunque preferiblemente se usa la forma completa (como se muestra en las SEC ID N° 2 a 5) de cualquiera de estas proteínas. Además pueden usarse péptidos que comprenden secuencias que se reconocen por las células T que reconocen epítopos en CFP-10, Rv3873 o Rv3878. Dichas secuencias pueden tener una homología de al menos el 70%, 80%, 90% con la secuencia del epítipo original.

Los péptidos usados en la invención típicamente tienen una longitud de 8 a 1000 aminoácidos, tal como de 10 a 500, 15 a 200 ó 20 a 100 aminoácidos.

En una realización, se investigan las respuestas de células T contra 2 o más de CFP-10, Rv3873 o Rv3878, por ejemplo usando combinaciones de los péptidos. En esta realización, también pueden investigarse las respuestas de células T contra ESAT-6 para aumentar la potencia del método pronóstico de la invención. De nuevo, los péptidos usados pueden comprender un fragmento de ESAT-6 o, preferiblemente, la forma completa (mostrada en la SECID N° 1), y/o secuencias homólogas reconocidas por las células T que reconocen epítopos en ESAT-6. En una realización particularmente preferida, se investigan las respuestas de células T contra la combinación de ESAT-6 y CFP-10.

El antígeno puede ser un fragmento (tal como un péptido) y/u homólogo de una proteína de origen natural que se reconoce por una célula T que reconoce la secuencia natural del epítipo de célula T.

Una citoquina (tal como IL-2 o IFN- γ) puede detectarse típicamente permitiendo que se una a un agente de captura específico que puede inmovilizarse en un soporte tal como una placa,

Una citoquina (tal como IL-2 o IFN- γ) puede detectarse típicamente permitiendo que se una a un agente de captura específico que puede inmovilizarse en un soporte tal como una placa, perla o la propia célula secretora de citoquina, y después midiendo la presencia del complejo específico agente de unión/citoquina típicamente con un segundo agente de detección de unión. Puede incorporarse una etapa de lavado para retirar el material que no está específicamente unido al agente de captura.

Típicamente, el segundo agente se une a la citoquina en un sitio que es diferente del sitio que se une al primer agente. El segundo agente puede conjugarse directamente a una enzima tal como fosfatasa alcalina, o marcador fluorescente o puede comprender un resto de biotina a detectar por un tercer agente que comprende estreptavidina, que está directamente conjugado a una enzima o marcador fluorescente. La enzima conjugada entonces cambia el color de un reactivo. El agente es preferiblemente un anticuerpo mono o policlonal. Los anticuerpos contra citoquinas están disponibles en el mercado, o pueden crearse usando técnicas convencionales.

El método preferido empleado para detectar citoquinas estará basado en inmunoensayos tipo sándwich que detectan la frecuencia de células secretoras de citoquina tal como ELISpot de color o fluorescente, ensayos de dilución limitante, tinción intracelular de citoquinas y ensayos de secreción de citoquinas con o sin enriquecimiento de células secretoras de citoquinas promovidos por Miltenyi Biotec. Como alternativa, la cantidad de citoquina secretada puede medirse por ejemplo por un sistema basado en ELISA tal como el sistema de sangre completa Quantiferon® con el anticuerpo de captura inmovilizado en una placa, y sus modificaciones (por ejemplo como está disponible en Cellestis) o la tecnología de serie en suspensión Luminex® usando kits Beadlyte® con el anticuerpo de captura inmovilizado en una perla. También puede medirse la expresión del ARNm de citoquina con ensayos tales como RT-PCR.

En una realización, el sistema de detección que se usa es el ensayo ELISpot *ex vivo* descrito en el documento WO 98/23960. En ese ensayo la IFN- γ secretada por la célula T se une por un primer anticuerpo específico para IFN- γ que está inmovilizado en un soporte sólido. La IFN- γ unida después se detecta usando un segundo anticuerpo específico para IFN- γ que está marcado con un marcador detectable. Dicho anticuerpo marcado puede obtenerse de MABTECH (Estocolmo, Suecia). A continuación se analizan otros marcadores detectables que pueden usarse.

Kits

La invención también proporciona el uso de un kit para realizar los métodos de la invención que comprende un medio para determinar si un individuo tiene una respuesta de células T contra cualquiera de CFP-10, Rv3873 o Rv3878. Preferiblemente el kit comprende adicionalmente péptidos de uno o más de CFP-10, Rv3873, y/o Rv3878, opcionalmente también péptidos de ESAT-6 y opcionalmente anticuerpos contra IFN- γ o IL-2 inmovilizados en un soporte sólido. Típicamente el medio para detectar el reconocimiento permite o ayuda a la detección basada en las técnicas analizadas anteriormente. Por tanto, el método puede permitir la detección de la citoquina (tal como IFN- γ y/o IL-2) secretada por las células T después del reconocimiento. El kit por tanto puede incluir adicionalmente un agente de unión específica para la citoquina, tal como un anticuerpo. El agente típicamente está inmovilizado en un soporte sólido. Esto significa que después de la unión del agente la citoquina permanecerá en las cercanías de la célula T que la secretó. Por tanto se forman "manchas" de complejo citoquina/agente en el soporte, representando cada mancha una célula T que está secretando la citoquina. La cuantificación de las manchas, y típicamente la comparación frente a un control, permite la determinación de las cantidades relativas de células que secretan la citoquina.

El kit también puede comprender un medio para detectar los complejos citoquina/agente. Puede suceder un cambio detectable en el propio agente después de la unión de citoquina, tal como un cambio de color. Como alternativa, puede permitirse que un segundo agente marcado directa o indirectamente para la detección se una al complejo citoquina/agente para permitir la determinación de las manchas. Como se ha analizado anteriormente, el segundo agente puede ser específico para la citoquina, pero se une en un sitio diferente de la citoquina que el primer agente.

El soporte inmovilizado puede ser una placa con pocillos, tal como una placa de microtitulación. Cada ensayo, por lo tanto, puede realizarse en un pocillo diferente en la placa.

El kit puede comprender adicionalmente un medio para las células T, agentes de detección o tampones de lavado a usar en las etapas de detección. El kit puede comprender adicionalmente reactivos adecuados para la separación de la muestra, tal como la separación de las PBMC o células T de la muestra. El kit puede estar diseñado para permitir la detección de las células T directamente en la muestra sin requerir ninguna separación de los componentes de la muestra.

El kit también puede comprender controles, tales como controles positivos o negativos. El control positivo puede permitir que se ensaye el sistema de detección. Por tanto, el control positivo típicamente imita el reconocimiento del péptido en cualquiera de los métodos anteriores. Típicamente en los kits diseñados para determinar el reconocimiento *in vitro*, el control positivo es una citoquina, tal como IFN- γ y/o IL-2.

El kit también puede comprender un medio para recoger una muestra que contiene células T del ser humano, tal como una muestra sanguínea. El kit puede comprender un medio para separar las células mononucleares o células T de una muestra del individuo.

Terapia

En el caso de que se halle un individuo, mediante el método de la presente invención, que está en riesgo de progresar a enfermedad micobacteriana, el individuo puede tratarse administrando un agente que es terapéutico para una infección micobacteriana o enfermedad micobacteriana.

5 Al individuo puede administrarse un agente que trate una infección micobacteriana y/o enfermedad micobacteriana. El agente puede ser un agente natural tal como una vitamina (por ejemplo, vitamina D), producto mineral o derivado de plantas. El agente puede ser una vacuna preventiva o terapéutica. El agente es típicamente isoniazid, rifampicina, etambutol, pirazinamida, estreptomina, ácido para-amino-salicílico, canamicina, capreomicina, etionamida, cicloserina, tiacetazona o fluoroquinolona (por ejemplo, ciprofloxacina).

10 Al individuo (que necesita tratamiento) típicamente se le administra una cantidad no tóxica eficaz del agente. El agente puede estar en forma de una composición farmacéutica que comprende el agente y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Los vehículos y diluyentes adecuados incluyen soluciones salinas isotónicas, por ejemplo solución salina tamponada con fosfato. Típicamente, el producto se administra por administración parenteral, intravenosa, intramuscular, subcutánea, transdérmica, intradérmica, oral, intranasal, por inhalación (a los pulmones), intravaginal o intrarrectal.

15 La dosis del producto puede determinarse de acuerdo con diversos parámetros, especialmente de acuerdo con el agente particular; la edad, peso y estado del paciente a tratar; la vía de administración; y el régimen requerido. Un médico será capaz de determinar la vía requerida de administración y la dosificación para cualquier paciente particular. Sin embargo, una dosis adecuada puede ser de 10 µg a 10 g, por ejemplo de 100 µg a 1 g del producto.

Homología

25 Como se ha mencionado anteriormente, puede usarse un homólogo de una secuencia micobacteriana en el método de la invención. Un péptido que es homólogo a otro péptido es típicamente al menos un 70% homólogo al péptido, preferiblemente al menos un 80 ó 90% y más preferiblemente al menos un 95%, 97% o 99% homólogo al mismo, por ejemplo sobre una región de al menos 8, preferiblemente al menos 15, por ejemplo al menos 40, 60 ó 100 o más aminoácidos contiguos, o sobre su longitud completa. El homólogo típicamente difiere de la proteína o péptido en 1,2, menos de 6, tal como menos de 12 mutaciones (cada una de las cuales es una sustitución (por ejemplo, una sustitución conservativa), deleción o inserción) por ejemplo sobre cualquiera de las longitudes mencionadas anteriormente de la región mencionada para la homología.

35 Los métodos para medir la homología de la proteína son bien conocidos en la técnica y los especialistas en la técnica entenderán que en el presente contexto, la homología se calcula en base a la identidad de aminoácidos (a veces mencionada como "homología firme"). Por ejemplo, el paquete UWGCG proporciona el programa BESTFIT que puede usarse para calcular la homología (por ejemplo, usado con sus valores por defecto) (Devereux et al. (1984) Nucleic Acids Research 12, pág. 387-395).

40 En el homólogo, los aminoácidos que son equivalentes a aminoácidos en la proteína o péptido original que contribuyen a la unión de la molécula MHC o son responsables del reconocimiento por el receptor de células T, pueden ser iguales o pueden estar sustituidos de forma conservativa. Las sustituciones conservativas se definen en la siguiente tabla. Los aminoácidos en el mismo bloque en la segunda columna y preferiblemente en la misma línea en la tercera columna poder sustituirse entre sí:

45

ALIFÁTICO	No-polar	G A P
		IL V
	Polar-no cargado	C S T M
		N Q
	Polar-cargado	D E
		K R
AROMÁTICO		H F W Y

Los siguientes ejemplos ilustran la invención.

Ejemplos

50

Participantes en el estudio

55 A todos los adultos diagnosticados con tuberculosis pulmonar positiva en frotis de esputo en cualquiera de las 7 clínicas de tuberculosis financiadas por el gobierno en el lado asiático de Estambul entre octubre de 2002 y mayo de 2004 se les pidió si tenían niños viviendo en sus hogares y se les invitó a participar en el estudio. Cuatrocientos cuarenta y tres pacientes tenían uno o más contactos de niños en el hogar y todos estuvieron de acuerdo en

participar y dieron su consentimiento informado por escrito en representación de sus niños. En caso en que el paciente índice no fueran los padres, el consentimiento lo dieron los parientes del niño o tutor legal. Los contactos se incluyeron si tenían 16 años de edad o más jóvenes, y se excluyeron los casos prevalentes de tuberculosis activa.

- 5 Las directrices del Ministerio Turco de Sanidad para la vacunación con BCG son las siguientes: todos los niños se vacunan de forma intradérmica con BCG Pasteur 1173-P2 (Serum Institute of India Ltd., Pune, India) entre 2 y 3 meses de edad y se administra una vacunación de refuerzo en el primer año de escuela primaria, a los 6 a 7 años de edad. Los datos de vigilancia para la cobertura por vacunación con BCG en Turquía indican una tasa de vacunación del 79% en niños en 2004.

10

Evaluación clínica y tratamiento

Los 1.024 contactos de niños de los 443 pacientes índice con tuberculosis pulmonar con frotis de esputo positivo se incluyeron en los mismos días semanales cada semana en el Paediatric Infectious Diseases Clinic, Marmara University School of Medicine entre octubre de 2002 y mayo de 2004. Se realizó un historial médico completo, exploración física y documentación de cicatrices de vacunación con BCG por los pediatras del estudio. La información demográfica y socioeconómica se registró por la enfermera del estudio. Todos los niños recibieron un TST y una radiografía torácica y a 1.020 se les tomó una muestra de sangre venosa de 10 ml para el ensayo ELISpot.

20

Se investigaron adicionalmente los niños con características clínicas o hallazgos radiográficos que sugieren tuberculosis activa como ordena la presentación clínica. Cuando se hizo un diagnóstico final de tuberculosis activa, los niños se trataron con quimioterapia de corto curso convencional de 6 meses y se les siguió durante un año.

- 25 Se administró un curso de 6 meses de terapia preventiva con isoniazid de acuerdo con las directrices del Ministerio Turco de Sanidad. Todos los contactos se siguieron cada 6 meses en la clínica pero se les pidió que volvieran inmediatamente para una evaluación clínica adicional si desarrollaban síntomas intercurrentes coherentes con tuberculosis.

Antígenos

CFP-10, Rv3873 y Rv3878 se codificaron todos por el segmento genómico de la región de diferencia 1 (RDI). Rv1989c se codificó en RD2. RD1 y RD2 están ausentes de la mayoría de las cepas de la vacuna de *M. bovis* BCG y de la mayoría de las micobacterias del entorno, pero está presente en todas las cepas de *M. tuberculosis*.

35

Ensayo cutáneo de tuberculina

Se administró TST a todos los niños por el método de Mantoux usando 0,1 ml (2 unidades de tuberculina) de derivado de proteína purificada (PPD) RT23 (Statens Serum Institut, Copenhague, Dinamarca). El ensayo se realizó y se leyó por el pediatra del estudio que desconocía los resultados del ELISpot. La aparición cutánea de piel de naranja se anotó en todos los participantes, confirmando inoculación intradérmica de PPD. El endurecimiento se midió después de 48-72 horas con una regla. La respuesta al TST se registró como positiva si el diámetro del endurecimiento era de ≥ 10 milímetros en contactos no vacunados con BCG y endurecimiento de ≥ 15 milímetros en contactos vacunados con BCG. Los contactos con un resultado negativo de TST se les repitieron el TST de 2 a 6 meses después. La conversión de TST se definió como un aumento de ≥ 6 mm y el segundo endurecimiento de TST en ≥ 10 mm si no estaban vacunados con BCG y ≥ 15 mm si estaban vacunados con BCG.

45

ELISpot de interferón- γ ex vivo

50 Se tomó una muestra de sangre venosa de 10 ml para el ensayo ELISpot. En resumen, se sembraron placas ELISpot de interferón- γ pre-recubiertas (Mabtech AB, Estocolmo, Suecia) con $2,5 \times 10^5$ células mononucleares de sangre periférica por pocillo: pocillos duplicados contenían ausencia de antígeno (control negativo), fitohemaglutinina (control positivo; ICN Biomedical, OH, EE.UU.) a $5 \mu\text{g/ml}$, estreptoquinasa-estreptodornasa (antígeno relacionado no MTB) a $20,8 \text{ UI/ml}$ y 19 pares adicionales de pocillos duplicados, conteniendo cada uno antígeno ESAT-6 recombinante (SEC ID N° 1) a $8,34 \mu\text{g/ml}$, antígenos CFP10 recombinante (SEC ID N° 2) a $8,34 \mu\text{g/ml}$, derivado de proteína purificada (PPD) a $16,7 \mu\text{g/ml}$ y 1 de 16 combinaciones de péptidos que incorporaban 5, 6 ó 7 péptidos de 15 unidades de los 96 péptidos que abarcan la longitud de ESAT-6 o CFP-10, o regiones seleccionadas de Rv3873, Rv3878, Rv3879c y Rv1989c de modo que la concentración final de cada péptido fuera $10 \mu\text{g/ml}$. Se excluyeron los péptidos no específicos descritos previamente de Rv3873. Después de incubación durante una noche a 37°C en CO_2 al 5%, las placas se revelaron con anticuerpo detector pre-conjugado (Mabtech AB) seguido por sustrato cromogénico (Moss Inc., Pasadena, MD, EE.UU.). Las placas ELISpot se valoraron en Oxford por un contador ELISpot automatizado (AID-GmbH, Strassberg, Alemania). Las configuraciones de intensidad y tamaño de las manchas estaban predefinidas y se usaron las mismas configuraciones todo el tiempo. Las lecturas media de los pocillos duplicados se transfirieron electrónicamente a una hoja de cálculo por un programa informático adaptado, ELISTAT (AID-GmbH, Strassberg, Alemania). Las respuestas se valoraron como positivas si los pocillos de ensayo

65

contenían una media de al menos 5 células formadoras de mancha más de la media de los pocillos de control negativo y, además, esta cantidad era al menos dos veces la media de los pocillos de control negativo. Las personas que realizaban y leían los ensayos desconocían todos los identificadores personales y los resultados de TST.

- 5 Los ensayos ELISpot de IFN- γ *ex vivo* se repitieron 6 meses después del reclutamiento, incluyendo los controles negativos y positivos descritos anteriormente. Sin embargo, los ensayos repetidos solamente incluyeron 6 pares adicionales de pocillos duplicados, conteniendo cada uno 1 de 6 combinaciones que incorporaban 5 ó 6 péptidos de 15 unidades de dichos 35 péptidos que abarcan la longitud de ESAT-6 o CFP-10.

10 **Definiciones de caso incidente**

Los contactos de niños se siguieron clínicamente cada 6 meses durante 2 años en la clínica pero se pidió que volvieran inmediatamente para evaluación clínica adicional si desarrollaban síntomas intercurrentes. El diagnóstico de tuberculosis activa se hizo por pediatras del estudio, teniendo en cuenta los síntomas, los signos físicos, y los hallazgos radiológicos y microbiológicos. Los niños diagnosticados con tuberculosis pulmonar activa se trataron con 6 meses de quimioterapia de corto curso convencional. Los niños diagnosticados con tuberculosis miliar se trataron con isoniazid, rifampicina, estreptomycin y pirazinamida durante 2 meses seguido por isoniazid y rifampicina durante 10 meses adicionales. Los niños diagnosticados con tuberculosis resistente a múltiples fármacos se trataron con agentes de segunda línea en base a perfiles de susceptibilidad a antibióticos.

20

Análisis estadístico

Las diferencias entre las proporciones de contactos que responden a cada antígeno particular se compararon usando el ensayo de McNemar para variables binarias relacionadas. La fuerza de las respuestas de células T contra antígenos particulares entre los respondedores se comparó usando el ensayo de Mann-Whitney para variables continuas. El riesgo relativo y los intervalos de confianza del 95% (95% CI), evaluándose su significancia por valores P calculados por el ensayo de ji cuadrado, se usaron para evaluar el valor pronóstico del resultado del ensayo para la conversión de TST, la conversión de ELISpot de ESAT-6/CFP10 y el progreso hasta enfermedad TB activa. Todos los análisis se emprendieron en Graphpad Prism 4 para Windows (Versión 4.03, Graphpad Software, Inc., CA, EE.UU.) y SPSS para Windows (Rel 13.0, SPSS Inc, Chicago, EE.UU.).

25

30

Conclusiones

Los marcadores pronósticos pueden ayudar a identificar pacientes en diferentes grados de riesgo para resultados específicos y facilitan la elección del tratamiento. Se evaluó el valor pronóstico de una respuesta positiva en ELISpot de IFN- γ *ex vivo* contra los antígenos rESAT-6 (SEC ID N° 1), rCFP-10 (SEC ID N° 2), y contra péptidos que abarcan la longitud de estos antígenos (péptidos ES1 a ES17 para ESAT-6 y péptidos cf10/1 a fcp10/18 para CFP-10), y contra péptidos derivados de Rv3873 (NEW POOL 1 y NEW POOL 3), Rv3878 (NEW POOL 4 y NEW POOL 5) y Rv1989c (NEW POOL 9, 10 y 11) en la predicción del progreso hasta tuberculosis activa en 789 contactos de niños en el hogar de adultos con tuberculosis pulmonar positiva a frotis de esputo. La respuesta de ELISpot positiva para ESAT-6, CFP-10, Rv3873 o Rv3878 fue pronóstica del progreso hasta tuberculosis activa durante dos años (tabla 1). La tasa incidente relativa fue similar en contactos de niños de ELISpot positivo para los péptidos ESAT-6, CFP-10, Rv3873 y Rv3878 (tabla 1). Niños con ELISpot positivo para rESAT-6 o rCFP-10 tuvieron una mayor tasa incidente (tabla 1).

35

40

45

Las respuestas de ELISpot a PPD, una mezcla de aproximadamente 200 antígenos de *M. tb*, o a SKSD, un antígeno no hallado en *M. tb*, no fueron pronósticas de posterior tuberculosis activa (tabla 1). El uso de más de un antígeno o péptidos de diferentes antígenos en combinaciones específicas en el ensayo ELISpot identificó más niños en riesgo de progreso a tuberculosis activa (tabla 2). Notablemente, no todas las respuestas contra antígenos de *M. tb* conferían riesgo aumentado de progreso hasta tuberculosis activa, como se evidencia por la ausencia de valor pronóstico de respuestas de células T contra Rv3879c (NEW POOL 6, 7 y 8, tabla 3) y PPD (tabla 1), como se ha mencionado previamente. La detección de las respuestas de células T contra antígenos o péptidos micobacterianos mejoraría la identificación de contactos más probables a progresar hasta tuberculosis activa y ayudaría a los médicos a estimar de forma precisa el riesgo de progreso hasta enfermedad para guiar la decisión del inicio de la terapia preventiva.

50

55

Tabla 1: Tasa de incidencia relativa (RIR) de progreso hasta enfermedad de tuberculosis activa en contactos con exposición reciente a Mycobacterium tuberculosis

5 **Quantificación del riesgo de progreso hasta tuberculosis activa en base a respuestas *individuales* al antígeno n=789**

	Rv3873		Rv3878		Rv1989c	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Casos incidentes	7	7	6	8	6	8
Nº sin TB activa	187	588	148	627	209	566
Total	194	595	154	635	215	574
Tasa incidente relativa (95% CI)	3,067 (1,089 a 8,636)		3,093 (1,089 a 8,785)		2,002 (0,7027 a 5,705)	
Valor P	0,0259		0,0262		0,1857	

	ESAT-6		CFP10		rESAT-6		rCFPIO	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Casos incidentes	8	6	8	6	9	5	8	6
Nº sin TB activa	246	529	268	507	223	552	212	563
Total	254	535	276	513	232	557	220	569
Tasa incidente relativa (95% CI)	2,808 (0,9846 a 8,011)		2,478 (0,8685 a 7,072)		4,322 (1,464 a 12,76)		3,448 (1,210 a 9,828)	
Valor P	0,0438		0,0794		0,0038		0,0138	

	PPD		SKSD	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Casos incidentes	11	3	10	4
Nº sin TB activa	571	204	506	269
Total	582	207	516	273
Tasa incidente relativa (95% CI)	1,066 (0,8085 a 1,407)		1,094 (0,7823 a 1,530)	
Valor P	0,6799		0,6323	

- 10 ESAT-6 = péptidos derivados de la diana-6 antigénica secretora temprana = la combinación de péptidos ESAT-6 de ES1 a ES17 inclusive
 CFP10 = péptidos derivados de la proteína 10 de filtrado de cultivo = la combinación de péptidos CFP-10 de cfp10/1 a cfp10/18 inclusive
- 15 rESAT-6 = antígeno ESAT-6 recombinante definido como SEC ID Nº 1
 rCFPIO = antígeno CFP10 recombinante definido como SEC ID Nº 2
 Rv3873 = péptidos derivados de Rv3873 = New Pool 1 y New Pool 3 de Rv3873
 Rv3878 = péptidos derivados de Rv3878 = New Pool 4 y New Pool 5 de Rv3878
 Rv1989c = péptidos derivados de Rv1989c = New Pool 9 y New Pool 10 y New Pool 11 de Rv1989c
- 20 PPD = derivado de proteína purificada
 SKSD = estreptoquinasa estreptodornasa

Tabla 2: Tasa de incidencia relativa (RIR) de progreso hasta enfermedad de tuberculosis activa en contactos con exposición reciente a Mycobacterium tuberculosis

25 **Quantificación del riesgo de progreso hasta tuberculosis activa en base a *combinaciones* de respuestas de antígeno n=789**

	ESAT-6/CFP10		rESAT-6/rCFP10		ESAT-6/CFP10/rESAT-6/rCFP10		ESAT-6/CFP10 Y rESAT-6/rCFP10	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Casos incidentes	10	4	11	3	11	3	10	4
Nº sin TB activa	328	447	284	491	359	416	253	522
Total	338	451	295	494	370	419	263	526
Tasa incidente relativa (95% CI)	3,336 (1,055 a 10,55)		6,140 (1,727 a 21,84)		4,152 (1,167 a 14,77)		5,000 (1,583 a 15,80)	
Valor P	0,0292		0,0013		0,0166		0,0023	

	ESAT-6 /CFP10/Rv3873/Rv3878/ Rv3879c/Rv1989c		ESAT- 6/CFP10/Rv3873		ESAT- 6/CFP10/Rv3878		ESAT- 6/CFP10/Rv1989c	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Casos incidentes	12	2	10	4	10	4	12	2
Nº sin TB activa	447	328	359	416	350	425	413	362
Total	459	330	369	420	360	429	425	364
Tasa incidente relativa (95% CI)	4,314 (0,9716 a 19,15)		2,846 (0,8998 a 8,999)		2,979 (0,9421 a 9,421)		5,139 (1,157 a 22,82)	
Valor P	0,0351		0,0621		0,0505		0,0159	

	Rv3873/Rv3878/Rv3879c/Rv1989c		Rv3873/Rv3878/Rv3879c	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Casos incidentes	10	4	7	7
Nº sin TB activa	328	447	247	528
Total	338	451	254	535
Tasa incidente relativa (95% CI)	3,336 (1,055 a 10,55)		2,106 (0,7466 a 5,943)	
Valor P	0,0292		0,1502	

- 5 ESAT-6 = péptidos derivados de la diana-6 antigénica secretora temprana = la combinación de péptidos ESAT-6 de ES1 a ES17 inclusive
- CFP10 = péptidos derivados de la proteína 10 de filtrado de cultivo = la combinación de péptidos CFP-10 de cfp10/1 a cfp10/18 inclusive
- rESAT-6 = antígeno ESAT-6 recombinante definido como SEC ID Nº 1
- 10 rCFPIO = antígeno CFP10 recombinante definido como SEC ID Nº 2
- Rv3873 = péptidos derivados de Rv3873 = New Pool 1 y New Pool 3 de Rv3873
- Rv3878 = péptidos derivados de Rv3878 = New Pool 4 y New Pool 5 de Rv3878
- Rv3879c = péptidos derivados de Rv3879c = New Pool 6 y New Pool 7 y New Pool 8 de Rv3879c
- Rv1989c = péptidos derivados de Rv1989c = New Pool 9 y New Pool 10 y New Pool 11 de Rv1989c

Rv3873/Rv3878/Rv3879c/Rv1989c/rESAT- 6/rCFP10		Rv3873/Rv3878/Rv3879c/rESAT- 6/rCFP10		Rv1989c/rESAT- 6/rCFP10	
Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
12	2	11	3	12	2
432	343	370	405	384	391
444	345	381	408	396	393
4,662 (1,050 a 20,70)		3,927 (1,104 a 13,97)		5,955 (1,341 a 26,44)	
0,0250		0,0221		0,0073	

- 15 La tabla anterior muestra el uso de combinaciones de péptidos. De nuevo las columnas muestran casos incidentes, cantidad sin TB activa, total, tasa incidente relativa (95% CI) y valor P

Tabla 3. Resultado negativo para Rv3879c

	Rv3879c	
	Positivo	Negativo
Casos incidentes	5	9
Nº sin TB activa	186	589
Total	191	598
Tasa incidente relativa (95% CI)	1,739 (0,5899 a 5,128)	
valor P	0,3105	
Rv3879c = péptidos derivados de Rv3879c = New Pool 6 y New Pool 7 y New Pool 8 de Rv3879c		

20

Rv 3873 (SEC ID N°: 4)

```

1   mlwnahmppel ncarlmagag papmiaaaag wqtisaaida qaveitarin sigewtggg
61  sdkaiaaatp mrvwlqtast qaktramqat aqaaaytqam actpslpeia anhitqavit
121 acnffginni pialtemdyf irmwnqaala mevyqaetav ntlfeklepm asildpgasq
181 stnpiifgmp spgsstpvvg lppaatqtlg qigemsgpmq qltqplqqvt sifsqvvggq
241 ggnpadeaaa qmgllgtspl snhplaggsg psagaglira eslpgaggsi trtplmsqli
301 ekpvapsvmp aaaagssatg gaapvgagam gqgaqsggst rpglvapapl aqereedde
361 dwdeeddw
    
```

5 NEW POOL1

1. ATAQA AAYTQ AMATT
2. AAYTQ AMATT PSLPE
3. AMATT PSLPE IAAH
4. PSLPE IAAH ITQAV
5. IAAH ITQAV LTATN
6. ITQAV LTATN FFGIN

NEW POOL3

10

7. LAMEV YQ AET AVNTL
8. YQ AET AVNTL FEKLE
9. AVNTL FEKLE PMASI
10. FEKLE PMASI LDPGA
11. PMASI LDPGA SQSTT
12. LDPGA SQSTT NPIFG

RV3878 (SEC ID N°: 5)

```

1   maeplavdpt glsaaaakla glvfpqppap iavsgtdsvv aainetmpsi eslvsdgipg
61  vkaalrtas nmnaadvya ktdqsigtsl sqyafgssge glagvasvgg qpsqatqlis
121 tpsvqvttql getaaelapr vvatvpqivq laphavqmsq nasplaqtis qraqqaaqsa
181 qggsgpmpaq lasaekpate qaepvhevtn ddqgdqgdvq paevvaaard egagaspggq
15  241 pgggvpaqam dtgagarpa splaapvqps tpaqstttl
    
```

15

NEW POOL4

1. MAEPL AVDPT GLSAA
2. AVDPT GLSAA AAKLA
3. GLSAA AAKLA GLVFP
4. AAKLA GLVFP QPPAP
5. GLVFP QPPAP IAVSG
6. QPPAP IAVSG TDSVV
7. IAVSG TDSVV AAINE

20

NEW POOL5

8. TDSVV AAINE TMP SI
9. AAINE TMP SI ESLVS
10. TMP SI ESLVS DGLPG
11. ESLVS DGLPG VKAAL
12. DGLPG VKAAL TRTAS
13. VKAAL TRTAS NMNAA
14. TRTAS NMNAA ADVYA

25

Rv1989c (SEC ID N°: 3)

1 msdaldeglv qridargtie wsetcyrytg ahrdaisgeg arrfggrwmp plifpaiyla
5i dsaqacmvav eraaqaastt aekmleaayr lhtidvtdla vldittpqar eavglenddi
12i ygddwsgcqa vghaawfilhm qgvlvpaagg vglvvtayeq rtrpgqiqir qsvditpaly
13i qeirat

5 NEW POOL 9

- 1. VSDAL DEGLV QRIDA
- 2. DEGLV QRIDA RGTIE
- 3. QRIDA RGTIE WSETC
- 4. RGTIE WSETC YRYTG
- 5. WSETC YRYTG AHRDA
- 6. YRYTG AHRDA LSGEG

NEW POOL10

10

- 7. AHRDA LSGEG ARRFQ
- 8. LSGEG ARRFQ GRWNP
- 9. ARRFQ GRWNP PLLFP
- 10. GRWNP PLLFP AIYLA
- 11. PLLFP AIYLA DSAQA
- 12. AIYLA DSAQA CMVEV

NEW POOL11

15

- 13. DSAQA CMVEV ERAAQ
- 14. CMVEV ERAAQ AASTT
- 15. ERAAQ AASTT AEKML
- 16. AASTT AEKML EAAYR
- 17. AEKML EAAYR LHTID
- 18. EAAYR LHTID VTDLA

CFP-10 (SEC ID N°: 2)

20

**MAEMK TDAAT LAQEA GNFER ISGDL KTQID QVEST AGSLQ GQWRG GQWRG AAGTA
AQAAV VRFQE AANKQ KQELD EISTN IRQAG VQYSR ADEEQ QQALS SQMGF**

cfp10/1 MAEMK TDAAT LAQEA
 cfp10/2 TDAAT LAQEA GNFER
 cfp10/3 LAQEA GNFER ISGDL
 cfp10/4 GNFER ISGDL KTQID
 cfp10/5 ISGDL KTQID QVEST
 cfp10/6 KTQID QVEST AGSLQ
 cfp10/7 QVEST AGSLQ GQWRG
 cfp10/8 AGSLQ GQWRG AAGTA
 cfp10/9 GQWRG AAGTA AQAAV
 cfp10/10 AAGTA AQAAV VRFQE
 cfp10/11 AQAAV VRFQE AANKQ
 cfp10/12 VRFQE AANKQ KQELD
 cfp10/13 AANKQ KQELD EISTN
 cfp10/14 KQELD EISTN IRQAG
 cfp10/15 EISTN IRQAG VQYSR
 cfp10/16 IRQAG VQYSR ADEEQ
 cfp10/17 VQYSR ADEEQ QQALS
 cfp10/18 ADEEQ QQALS SQMGF

ESAT-6 (SEC ID N°: 1)

**MTEQQ WNFAG IEAAA SAIQG NVTSI HSLLD EGKQS LTKLA AAWGG SGSEA YQGVQ
QKWDA TATEL NNALQ NLART ISEAG QAMAS TEGNV TGMFA**

- ES1: MTEQQ WNFAG IEAAA
 - ES2: WNFAG IEAAA SAIQG
 - ES3: IEAAA SAIQG NVTSI
 - ES4: SAIQG NVTSI HSLLD
 - ES5: NVTSI HSLLD EGKQS
 - ES6: HSLLD EGKQS LTKLA
 - ES7: EGKQS LTKLA AAWGG
 - ES8: LTKLA AAWGG SGSEA
 - ES9: AAWGG SGSEA YQGVQ
 - ES10: SGSEA YQGVQ QKWDA
 - ES11: YQGVQ QKWDA TATEL
 - ES12: QKWDA TATEL NNALQ
 - ES13: TATEL NNALQ NLART
 - ES14: NNALQ NLART ISEAG
 - ES15: NLART ISEAG QAMAS
 - ES16: ISEAG QAMAS TEGNV
 - ES17: QAMAS TEGNV TGMFA
- SEC ID N°: 6 - Rv3879c

```

1  msitrptgsy arqml dpggw veadedt fyd raqey sqvlq rvtdv ldtcr qqkgh vfegg
61  lws ggaanaa ngal ganing lmlq dylat vitwhrhiag lieqaksdig nnvdgaqrei
121 dilendpsld aderhtains lvrathganv silvaesaerv lesknwkppk naledllqck
131 s p p p p d v p t l v v p s p g t p g t p g t p i t p g t p i t p g a p v t p i t p t p g t p v t p v t
241 p g k p v t p v t p v k p g t p g e p t p i t p v t p p v a p a t p a t p a t p v t p a p a p h p q p a p a p a p s p g
301 p o p v t p a t p g p s g p a t p g t p g g e p a p h v k p a a l a e q p g v p g q h a g g g t q s g p a h a d e s a a
361 s v t p a a a s g v p g a r a a a a a p s g r a v g a g a r s s v g t a a a s g a g s h a a t g r a p v a t s d k a a a
421 p s t r a a s a r t a p p a r p p s t d h i d k p d r s e s a d d g t p v s m i p v s a a r a a r d a a t a a a s a r q
431 r g r g d a l r l a r r i a a a l n a s d n n a g d y g f f w i t a v t t d g s i v v a n s y g l a y i p d g m e l p n
541 k v y l a s a d h a i p v d e i a r c a t y p v i a v g a w a a f h d m l r a v i g t a e q l a s s d p g v a k i v i
601 e p d d i p e s g k m t g r s r l e v v d p s a a a q l a d t t d q r l l d l l p p a p v d v n p p g d e r h m l w f e
661 l m k p m t s t a t g r e a a h l r a f r a y a a h s q e i a l h q a h t a t d a a v q r v a v a d w l y w q y v t g i
721 l d r a l a a a c

```

5

NEW POOL6

- 1. MSITR PTGSY ARQML
- 2. PTGSY ARQML DPGGW
- 3. ARQML DPGGW VEADE
- 4. DPGGW VEADE DTFYD
- 5. VEADE DTFYD RAQEY
- 6. DTFYD RAQEY SQVLQ

10

NEW POOL7

- 7. RAQEY SQVLQ RVTDV
- 8. SQVLQ RVTDV LDTCR
- 9. RVTDV LDTCR QQKGH
- 10. LDTCR QQKGH VFEGG
- 11. QQKGH VFEGG LWSGG
- 12. VFEGG LWSGG AANAA

15

NEW POOL8

13. LWSGG AANAA NGALG
14. AANAA NGALG ANINQ
15. NGALG ANINQ LMTLQ
16. ANINQ LMTLQ DYLAT
17. LMTLQ DYLAT VITWH

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para detectar si un individuo progresará hasta tener enfermedad micobacteriana activa que comprende determinar si el individuo tiene una respuesta de células T contra uno o más de los siguientes antígenos micobacterianos:
- CFP-10,
 - Rv3873, o
 - Rv3878.
- 10 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 donde la determinación de si el individuo tiene una respuesta de células T contra el antígeno micobacteriano se realiza evaluando:
- si las células T del individuo reconocen dicho antígeno micobacteriano, y/o
 - el nivel de células T que son específicas para dicho antígeno micobacteriano en una muestra del individuo.
- 15 3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 que comprende determinar si el individuo tiene una respuesta de células T contra 2, 3, 4 o todos los siguientes: ESAT-6, CFP-10, Rv3873 o Rv3878.
- 20 4. Un método de acuerdo con la reivindicación 3 que comprende determinar si el individuo tiene una respuesta de células T contra ESAT-6 y CFP-10.
- 25 5. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde las células T del individuo se ponen en contacto con un péptido que comprende un epítipo de células T de ESAT-6, CFP-10, Rv3873 o Rv3878; y se evalúa la respuesta de las células T contra el péptido.
- 30 6. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes que comprende la determinación del reconocimiento por células T de un péptido que comprende la SEC ID N° 1, SEC ID N° 2, SEC ID N° 4, SEC ID N° 5, o SEC ID N° 6, o un homólogo de una de dichas secuencias que es al menos un 70% homólogo al mismo.
- 35 7. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 que comprende la determinación del reconocimiento por células T de un fragmento y/u homólogo de ESAT-6, CFP-10, Rv3873 o Rv3878, donde dicho fragmento y/u homólogo es capaz de reconocerse mediante una célula T que reconoce un epítipo de células T de ESAT-6, CFP-10, Rv3873 o Rv3878.
- 40 8. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde las células T están presentes en una muestra del individuo, y
- todos los péptidos que tienen que ensayarse se proporcionan simultáneamente en la muestra, y/o
 - menos de 20, y preferiblemente menos de 10, péptidos diferentes se proporcionan en la muestra, y/o
 - al menos 1 ó 2 péptidos de 2 o más de: ESAT-6, CFP-10, Rv3873 y Rv3878, se proporcionan en la muestra.
- 45 9. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde el reconocimiento por las células T se mide por detección de la producción de una citoquina en la célula T y/o la secreción de una citoquina de la célula T.
- 50 10. Un método de acuerdo con la reivindicación 9 donde la detección de la citoquina se realiza usando anticuerpos contra la citoquina, donde los anticuerpos están opcionalmente inmovilizados y/o la citoquina es opcionalmente IFN- γ o IL-2.
- 55 11. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde las células T que se ensayan son células T recién aisladas (no cultivadas) o células T después de congelarse.
- 60 12. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde las células T que se ensayan se han cultivado *in vitro*.
- 65 13. Uso en un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes de un kit que comprende un medio para determinar si el individuo tiene una respuesta de células T contra uno o más de los siguientes antígenos micobacterianos:
- CFP-10,
 - Rv3873, o
 - Rv3878.
14. Uso de acuerdo con la reivindicación 13, donde el kit comprende adicionalmente uno o más péptidos de CFP-10, Rv3873 y/o Rv3878.

15. Uso de acuerdo con la reivindicación 13 o reivindicación 14, donde el kit comprende adicionalmente anticuerpos contra IFN- γ o IL-2 inmovilizados en un soporte sólido, y/o péptidos de ESAT-6.

Figura 1. Diagrama de flujo del estudio

