(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 665 605**

(51) Int. CI.:

G01N 33/50 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.09.2014 PCT/GB2014/052667**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **12.03.2015 WO15033136**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.09.2014 E 14789334 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.01.2018 EP 3042199**

(54) Título: **Método y kits para determinar el estado de infección de tuberculosis**

(30) Prioridad:

04.09.2013 GB 201315748

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.04.2018

(73) Titular/es:

MJO INNOVATION LIMITED (100.0%)
Jag Shaw Baker Berners House, 47-48 Berners Street
London W1T 3NF, GB

(72) Inventor/es:

LALVANI, AJIT;
POLLOCK, KATRINA, MARY;
TAYLOR, GRAHAM y
WHITWORTH, HILARY, SIAN

(74) Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

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 kits para determinar el estado de infección de tuberculosis

La presente invención se refiere a métodos para determinar el estado de infección de tuberculosis y a composiciones y kits para su uso en tales métodos.

A escala mundial, cada año se producen casi 2 millones de muertes debidas a tuberculosis activa (TB) (Organización Mundial de la Salud (OMS) 2011) y en el mundo desarrollado, incluyendo el Reino Unido, las tasas de TB han aumentado (Agencia de Protección de la Salud (APS) 2011).

Los médicos clínicos que tratan TB se enfrentan a dos retos principales:

1) Distinción del diagnóstico de infección por TB activa y TB latente ("ATB" y "LTBI", respectivamente)
2) Priorizar el tratamiento de LTBI en aquellos casos con mayor probabilidad de progreso a TB activa.

A diferencia, por ejemplo, de la infección por VIH, donde la cantidad de virus en el cuerpo (plasma u otros componentes) es directamente cuantificable usando PCR, no existe ningún ensayo comparable para medir directamente la carga patógena micobacteriana (por ejemplo, *Mycobacterium tuberculosis*). Un ensayo de diagnóstico de TB ampliamente usado, el ensayo de piel de Mantoux o tuberculina (TST), usa un enfoque basado en inmunidad para demostrar la presencia de la infección con *Mycobacterium tuberculosis* (MTB). El TST tiene una mala especificidad especialmente en los que están vacunados con BCG (Diel, Goletti et ál. 2011) y una mala sensibilidad especialmente en los que están inmunocomprometidos, por ejemplo, con infección por VIH (Cobelens, Egwaga et ál. 2006).

Los ensayos de liberación de interferón gamma (IGRA) introducidos recientemente también usan un enfoque basado en inmunidad, que es más cuantificable que el ensayo de Mantoux y menos abierto a confusión por vacunación con BCG o exposición a micobacterias ambientales. Ni el ensayo de Mantoux ni los IGRA ni en realidad ningún otro ensayo disponible en el mercado pueden distinguir de forma fiable entre TB latente, activa o tratada o predecir los pacientes con LTBI que es probable que progresen a TB activa.

Aproximadamente la mitad de los casos de TB pulmonar son positivos en frotis para bacilos alcohol-ácido resistentes (APS 2011). Por lo tanto, este método para diagnosticar TB activa no es muy sensible y es altamente específico del sitio de la enfermedad. El ensayo diagnóstico de referencia para TB activa es el cultivo microbiológico. Este solo fue positivo en un 58 % de los casos comunicados en el Reino Unido en 2010 (APS 2011) y es especialmente difícil de interpretar en enfermedad paucibacilar, por ejemplo, TB en ganglios linfáticos, TB en sistema nervioso central (TB SNC) y en infección conjunta con VIH. Este método de diagnóstico también está limitado por el acceso al sitio de la enfermedad, que puede ser un desafío. Los nuevos enfoques basados en PCR, por ejemplo, GeneXpert, aunque más rápidos que el cultivo microbiológico no pueden distinguir TB activa de latente. Tanto TB SNC como TB con infección conjunta con VIH están asociadas a morbilidad y mortalidad elevadas. Por lo tanto, un diagnóstico temprano y preciso es de suma importancia.

La investigación de la infección de TB tanto activa como latente puede implicar múltiples ensayos invasivos, prolongados y caros tales como CT con contraste, broncoscopia, biopsia o barrido mediante PET. Por lo tanto, un ensayo de sangre que pudiera reducir la necesidad de tal investigación exhaustiva sería de gran beneficio tanto para los pacientes como para los proveedores de atención sanitaria.

El tratamiento de TB activa requiere un régimen de tratamiento más largo, complejo y tóxico que la quimioprofilaxis usada para LTBI aunque, sin embargo, ambas pueden estar asociadas a toxicidad potencialmente mortal. Numerosas sustancias terapéuticas usadas en la actualidad para tratar infecciones micobacterianas están asociadas a alta morbilidad, por ejemplo, neuropatía periférica, y mortalidad, por ejemplo, necrosis hepática. Por lo tanto, es vital el uso del régimen terapéutico apropiado más corto y eficaz.

Un diagnóstico erróneo de TB activa como LTBI puede conducir a replicación micobacteriana incontrolada y aumenta el riesgo de resistencia al fármaco, que es más difícil de tratar y tiene asociadas una morbilidad y mortalidad más elevadas. El diagnóstico erróneo de LTBI y el tratamiento posterior como TB activa exponen a los pacientes a terapias innecesarias y en ocasiones tóxicas durante un periodo prolongado. Además, dado que la mayoría de los pacientes con LTBI nunca progresaran a TB activa, existe por lo tanto la oportunidad de perfeccionar el cuidado al identificar los casos con mayor probabilidad de progreso y priorizarlos para recibir tratamiento. De ese modo, los que es poco probable que progresen podrían evitar completamente la quimioprofilaxis.

En la actualidad no existe ningún ensayo diagnóstico capaz de distinguir estos dos grupos. Sin embargo, dado que la probabilidad de progreso es mayor en los primeros 2-3 años después de infección por MTB, las correlaciones de tiempo desde la exposición pueden proporcionar medios para la estratificación del riesgo.

Algunos datos han mostrado que los cambios en la respuesta inmune celular específica de antígeno reflejan la carga y la eliminación de patógenos, por ejemplo, en infecciones por citomegalovirus y VIH (Harari, Petitpierre et ál. 2004). Un trabajo reciente en la respuesta inmune celular específica a MTB ha sugerido que este paradigma es válido en TB (Casey, Blumenkrantz et ál.; Millington, Innes et ál. 2007). Otros estudios se han centrado en el uso de la función celular o el fenotipo celular específico de MTB para tratar de distinguir entre infección activa y latente (Harari, Rozot et ál.; Goletti, Butera et ál. 2006; Wang, Cao et ál. 2010; Mueller, Detjen et ál. 2008; Caccamo, Guggino et ál. 2009).

El documento de Patente WO 2007/107714 describe el uso de IFN-γ de linfocitos T y secreción de IL-2 en la evaluación del resultado de infecciones tales como TB. El documento de Patente WO 2009/158521 describe el uso de expresión diferencial de un gran número de genes para distinguir entre TB activa y latente. Caccamo et ál. (2010) Eur. J. Immunol 40: 2211-2220 describen el uso un subconjunto de linfocitos T que expresa TNF-α, IFN-γ e IL-2 que correlaciona con TB activa. Los datos en la bibliografía más extensa de la correlación de frecuencia de linfocitos T específicos de MTB multifuncionales (y aquí específicamente trifuncionales) con la presencia de TB activa son tanto limitados como conflictivos. El documento de Patente WO 2011/044508 describe el uso de expresión diferencial de antígenos de linfocitos T en la evaluación del pronóstico de pacientes que padecen generalmente enfermedades pulmonares crónicas. El documento de Patente WO 2012/085652 describe el uso de linfocitos T CD4 positivos en un método que es un 66,67 % sensible y un 92,41 % específico en la diferenciación entre infección de TB activa y latente, basándose solo en el porcentaje de las células que producen TNF-α pero no IFN-γ ni IL-2. Pedersen et ál. (2011) Scandinavian Journal of Immunology 74(2): 210-218 describen la vacunación pandémica de gripe que provoca respuestas de células Th1 $CD4^+$ específicas de gripe en pacientes hipogammaglobulinémicos. Whitworth et ál. (2013) describen la investigación con respecto a biomarcadores de la tuberculosis. El documento de Patente WO 2013/113092 describe el uso de uno o más biomarcadores para determinar una respuesta inmune de un sujeto a una composición inmunoestimuladora. Day et ál. (2011) describen la asociación de capacidad funcional de respuestas de linfocitos T específicos de *Mycobacterium* en seres humanos con carga micobacteriana. Pollock et ál. (2013) describen el inmunofenotipado de linfocitos T que distingue tuberculosis activa de latente. El documento de Patente WO 2014/039044 describe métodos de producción de poblaciones de células madre de memoria T.

Hasta la fecha, no se ha reconocido que la pérdida de la expresión de CD127 se pueda usar para discriminar un subconjunto de células T efectoras diferenciadas o muestre claramente que los cambios medidos en TB activa frente a latente sean independientes de infección conjunta con VIH. Por lo tanto, nadie ha demostrado un enfoque que sea lo suficientemente sensible o específico para impulsarse como ensayo diagnóstico clínico o ser ampliamente aplicable a la población infectada conjuntamente con VIH. Además, estos ensayos no se evaluaron con vista en el riesgo de estratificación en LTBI. Además, los resultados del documento de Patente WO 2012/085652 no fueron completamente replicables a partir de nuestros propios datos o en otros estudios que comparan TB activa y latente, por ejemplo Caccamo et ál. (2010) Eur. J. Immunol 40: 2211-2220.

Los presentes inventores combinan la medición simultánea tanto del fenotipo como de la función celular para dar unos datos altamente detallados de la respuesta inmune celular específica de MTB. También han mostrado por primera vez que, cuando se combinan, el fenotipo y la función celulares específicos de MTB están estrechamente relacionados con el estadio de enfermedad de TB, por ejemplo, activa frente a latente, y que estos cambios son independientes de la infección conjunta con VIH.

El método que se describe en el presente documento puede distinguir entre TB activa y latente con una sensibilidad de un 100 %, una especificidad de un 93 % y en el análisis de características de operador receptor, el área bajo la curva fue de 0,994 (siendo el valor para un ensayo perfecto 1).

Además, estos datos sugieren que, en LTBI, esta medición combinada puede ser un enfoque clínicamente pertinente para la estratificación de riesgo mediante la distinción de individuos que se han infectado recientemente frente a los que se han infectado remotamente. Por lo tanto, este nuevo enfoque combinado proporciona el indicador más preciso de actividad de enfermedad de TB hasta la fecha.

Los inventores proporcionan el enfoque inmunológico más sensible y específico hasta la fecha para la distinción de infección activa y latente y la indicación de la actividad de enfermedad micobacteriana basándose en la medición del fenotipo (CD45RA-CCR7-CD127-) de un subconjunto específico de células sensibles a antígeno de MTB CD4+.

Las ventajas del método proporcionado por los inventores sobre los ensayos usados en la actualidad se pueden observar en la Tabla A.

Tabla A: Ventajas de los métodos de la invención sobre las técnicas actuales

Ensayo	*TST*	*IGRA*	*Frotis*	*Cultivo de MTB*	*PCR*	*Radiología (rayos X/CT)*	***Métodos de la invención***
Proporciona evidencia de infección actual con MTB	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	**Sí**

Confundido por infección anterior de MTB (tratada)	Sí	Sí/ desconocido	No	No	No	Sí	**Desconocido, probablemente no**
Útil para diagnosticar LTBI	Sí	Sí	No	No	No	Sí	**Sí**
Útil para diagnosticar TB activa	No	Posiblemente	Sí	Sí	Sí	Sí	**Sí**
El ensayo es dependiente del sitio de la enfermedad de TB	No	No	Sí	Sí	Sí	Sí	**No**
Confundido por vacunación con BCG anterior	Sí	No	No	No	No	No	**Dependiente de antígeno**
Utilidad disminuida por inmunocompromiso	Sí	Método de pendiente	Sí	Sí	Desconocido	Sí	**No**
Distingue enfermedad activa de latente	No	No	No	No	No	Útil en ocasiones	**Sí**
Estratifica aquellos con LTBI con el mayor riesgo de progreso de la enfermedad	No	No	No	No	No	No	**Sí**

En un primer aspecto de la invención se proporciona un método *in vitro* de determinación del estado de infección de tuberculosis (TB) en un individuo que comprende:

(i) proporcionar una muestra que comprende linfocitos T;
(ii) exponer la muestra de (i) a uno o más antígenos de TB;
(iii) identificar los linfocitos T de la muestra que son CD4 positivo y (a) segregan TNF-α sin segregar IFN-γ; o (b) segregan IFN-γ sin segregar TNF-α;
(iv) identificar las células de (iii) que también son CCR7 y CD127 negativos; y opcionalmente
(v) calcular las células identificadas en (iv) como un porcentaje de las identificadas en (iii);

en el que la identificación de las células en (iv) y/o el porcentaje de células calculado en (v) correlaciona con el estado de infección de TB del individuo, y en el que las etapas (iii) y (iv) se pueden llevar a cabo secuencial o simultáneamente.

Las etapas (i) y (ii) se pueden llevar a cabo como una metodología distinta, por ejemplo, como parte de un ensayo alternativo tal como un ensayo IGRA (ensayo de liberación de interferón gamma), ELISpot (ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas de puntos), o TBSpot y posteriormente se puede llevar a cabo en un momento diferente o usar un equipo diferente (por ejemplo, placa de pocillos) o incluso una ubicación física diferente para las etapas restantes.

En ciertas realizaciones, las células identificadas en la etapa (iv) de los métodos son además CD45RA negativo.

En ciertas realizaciones, las células identificadas en la etapa (iii) de los métodos además no segregan IL-2.

En ciertas realizaciones, las células identificadas en la etapa (iii) de los métodos son además CD3 positivo.

En ciertas realizaciones, las células identificadas en la etapa (iii) de los métodos son además CD8 negativo.

"TB" se usa de forma intercambiable en el presente documento con "MTB" y "tuberculosis". Se pretende incluir TB causada por cualquier organismo causante específico de MTB incluyendo *Mycobacterium Tuberculosis, Mycobacterium Bovis* y *Mycobacterium africanum*. Es particularmente preferente que la TB esté causada por *Mycobacterium Tuberculosis*.

Por "individuo" los presentes inventores se refieren a cualquier organismo capaz de infectarse con TB. Preferentemente, el individuo es un mamífero, seleccionado más preferentemente entre ganado, tejones y seres humanos. Lo más preferentemente, el individuo es un ser humano.

Por "antígenos de TB" los presentes inventores y se refieren a cualquier proteína de TB capaz de provocar una respuesta inmune. Algunos ejemplos de antígenos de TB son derivado de proteína purificada de tuberculosis (PPD), ESAT-6, CFP-10, EspC, TB7.7, Rv3879c, Rv3873, Rv3878, proteínas PE/PPE, Ag85A/B y TB10.4, hemaglutinina de unión a heparina, Rv0440, Rv3875/Rv3874, Rv0140, Rv0384c, Rv2662, Rv3223c, Rv3307, Rv3862c, Rv0079, Rv0081, Rv0574c, Rv1733c, Rv1734c, Rv1998, Rv2006, Rv2007c, Rv2028c, Rv2627c, Rv2629, Rv2630, Rv3132c, Rv0867c, Rv1009, Rv1884c, Rv2389c. También se podría usar cualquier otro antígeno de TB conocido en la técnica.

En ciertas realizaciones las células de la etapa (iii) se identifican además como linfocitos T vivos. Se pueden identificar como células vivas mediante cualquier método conocido en la técnica, tal como el uso de un marcador de células muertas o un marcador de células vivas. Tales marcadores se conocen bien en la técnica (por ejemplo, kits de tinción de células muertas fijables LIVE/DEAD®).

Los marcadores de células muertas etiquetan estructuras celulares internas a través de membranas alteradas de las células muertas. Otros colorantes que se podrían usar como marcadores de células muertas son colorantes de ácidos nucleicos impermeables, por ejemplo EMA, DAPI, azul/verde/rojo SYTOX®, homodímero-1 de etidio, yoduro de propidio, 7-AAD, colorantes de cianuro monoméricos, colorantes de annexina V. No todos estos colorantes son adecuados para su uso con fijación en formaldehído a diferencia de los kits de tinción de células muertas fijables LIVE/DEAD®.

Los subconjuntos particulares de linfocitos T que se especifican en las etapas (iii) y (iv) se pueden identificar mediante cualquier técnica adecuada conocida en la técnica. Sin embargo, una técnica preferente es la de citometría de flujo de múltiples parámetros. Esta técnica es bien conocida en la técnica como un método que se puede usar para determinar la cantidad de células de cierto tipo en una muestra mediante criterios tales como fenotipo celular y/o función celular y usando un cóctel de anticuerpos marcados visualmente específicos para múltiples marcadores de fenotipo o función celular. Se puede usar la siguiente estrategia de clasificación:

Ejemplo de estrategia de clasificación:

1. Clasificar en células vivas, es decir, las negativas para el discriminador de células muertas
2. Clasificar en singletes usando dispersión directa
3. Clasificar en singletes usando dispersión lateral
4. Clasificar en linfocitos usando las propiedades de dispersión de la luz.
5. Clasificar en células CD3+
6. Clasificar en células CD4+
7. Definir cuadrantes de IFN-γ, IL-2 y TNF-α usando fluorescencia menos uno controles
8. Usar clasificación booleana para crear 7 subconjuntos funcionales no solapados que incluyen células de secreción de IFN-γ solo y células de secreción de TNF-α solo
9. Definir cuadrantes de CCR7 frente a CD45RA y CCR7 frente a CD127 usando fluorescencia menos uno controles en subconjuntos funcionales.
10. Usar clasificación booleana para seleccionar células CD45RA-CCR7-CD127-.

En realizaciones preferentes de la invención, las etapas (iii) y/o (iv) de los métodos del primer aspecto de la invención se llevan a cabo mediante citometría de flujo de múltiples parámetros.

Un método preferente de citometría de flujo de múltiples parámetros implicará la reducción del número de detectores de fluoróforo requeridos. Se estima que el método se podría simplificar mediante ensayo de citometría de flujo de al menos 5 colores a 6 colores. Por lo tanto, el método se podría procesar como un ensayo de 5-11 colores, por ejemplo, un ensayo de citometría de flujo de 11, 10, 9, 8, 7, 6 o 5 colores. Este es un objetivo realista para un ensayo diagnóstico en un marco clínico dados los ensayos de citometría de flujo llevados a cabo en la actualidad en pacientes con discrasia sanguínea, por ejemplo linfoma.

En ciertas realizaciones de la invención, el estado de infección de TB que se determina mediante el método del primer aspecto de la invención corresponde a la presencia o ausencia de infección de TB. En otras palabras, el método se usa para determinar si la muestra es de un individuo que está, o no está, infectado con TB.

En ciertas realizaciones la identificación de una o más células de la etapa (iii) determina la presencia de infección de TB.

En ciertas realizaciones de la invención, el estado de infección de TB que se determina mediante el método del primer aspecto de la invención corresponde a la presencia de una infección de TB activa (ATB) o una infección de TB latente (LTBI). En otras palabras, el método de la invención es capaz de distinguir entre muestras de individuos con TB activa y aquellos con TB latente.

En ciertas realizaciones la identificación de una o más células en la etapa (iv) determina la presencia de una infección de TB activa.

En ciertas realizaciones la ausencia de una o más células en la etapa (iv) determina la presencia de una infección de TB latente.

En ciertas realizaciones los valores porcentuales que se calculan en la etapa (v) que determinan la presencia de una infección de TB activa son mayores que los valores porcentuales que se calculan en la etapa (v) que determinan la presencia de una infección de TB latente. En otras palabras, los valores porcentuales que se determinan en la etapa (v) para una muestra de un individuo con TB activa serán mayores que para una muestra de un individuo con TB

latente.

Preferentemente, el estado de infección de TB corresponde a una infección de TB activa cuando el porcentaje que se calcula en la etapa (v) es de al menos un 10 % a un 40 %.

Preferentemente, el estado de infección de TB corresponde a una infección de TB activa cuando el porcentaje que se calcula en la etapa (v) es de al menos un 10 % a un 17,4 %.

Por ejemplo, el estado de infección de TB corresponde a una infección de TB activa cuando el porcentaje que se calcula en la etapa (v) es al menos un 10, 11, 12, 13, 14, 15, 15, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o un 40 %.
Más preferentemente, el estado de infección de TB corresponde a una infección de TB activa cuando el porcentaje que se calcula en la etapa (v) es al menos un 10, 11, 12, 13, 14, 15, 15, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o un 30 %.

Incluso más preferentemente, el estado de infección de TB corresponde a una infección de TB activa cuando el porcentaje que se calcula en la etapa (v) es al menos un 17-18 %, por ejemplo un 17,0, 17,1, 17,2, 17,3, 17,4, 17,5, 17,6, 17,7, 17,8, 17,9 o un 18,0 %.

Lo más preferentemente, el estado de infección de TB corresponde a una infección de TB activa cuando el porcentaje que se calcula en la etapa (v) es al menos un 17,4 %.

Preferentemente, el estado de infección de TB corresponde a una infección de TB latente cuando el porcentaje que se calcula en la etapa (v) es menor o igual que un 10 % a un 40 %.

Preferentemente, el estado de infección de TB corresponde a una infección de TB latente cuando el porcentaje que se calcula en la etapa (v) es menor o igual que un 17,3 % a un 40 %.

Por ejemplo, el estado de infección de TB corresponde a una infección de TB latente cuando el porcentaje que se calcula en la etapa (v) es menor o igual que un 10, 11, 12, 13, 14, 15, 15, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o un 40 %.

Más preferentemente, el estado de infección de TB corresponde a una infección de TB activa cuando el porcentaje que se calcula en la etapa (v) es menor o igual que un 10, 11, 12, 13, 14, 15, 15, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o un 25 %.

Incluso más preferentemente, el estado de infección de TB corresponde a una infección de TB activa cuando el porcentaje que se calcula en la etapa (v) es menor o igual que un 17-18 %, por ejemplo un 17,0, 17,1, 17,2, 17,3, 17,4, 17,5, 17,6, 17,7, 17,8, 17,9 o un 18,0 %.

Lo más preferentemente, el estado de infección de TB corresponde a una infección de TB latente cuando el porcentaje que se calcula en la etapa (v) es menor o igual que un 17,3 %.

En ciertas realizaciones de la invención, el estado de infección de TB que se determina mediante el método del primer aspecto de la invención corresponde al riesgo de una infección de TB latente que progresa a una infección de TB activa. En otras palabras, el método de la invención es capaz de determinar el riesgo de un individuo con una infección de TB latente que progresa a tener TB activa.

En una realización el riesgo de una infección de TB latente que progresa a una infección de TB activa se determina mediante la identificación de una o más células de la etapa (iv). En otras palabras, si se identifican una o más células en la etapa (iv), el individuo se encuentra en riesgo de progresar de una infección de TB latente a TB activa.

En una realización el riesgo de una infección de TB latente que progresa a una infección de TB activa es proporcional (correlacionado positivamente) al valor porcentual que se calcula en la etapa (v) del método. Por ejemplo, un mayor valor porcentual calculado en la etapa (v) correlaciona con un riesgo aumentado de una infección de TB latente que progresa a una infección de TB activa.

En ciertas realizaciones de la invención el estado de infección de TB que se identifica mediante el método del primer aspecto de la invención corresponde a la cantidad de tiempo transcurrido desde que el individuo se infectó originariamente con TB. En otras palabras, el método de la invención es capaz de determinar el tiempo relativo desde que el individuo se infectó originariamente con TB.

En una realización el tiempo transcurrido desde que el individuo se infectó originariamente con TB es inversamente proporcional (correlacionado negativamente) al valor porcentual que se calcula en la etapa (v). Por ejemplo, un mayor valor porcentual calculado en la etapa (v) correlaciona con una menor cantidad de tiempo desde que el individuo se infectó originariamente con TB.

Una infección asintomática adquirida más recientemente es más probable que progrese a enfermedad de TB activa que una infección adquirida hace más tiempo. Por lo tanto, la proporción o la frecuencia de CD3+CD4+TNFalfa+IFNgamma-IL2-CCR7-CD127-CD45RA- también puede correlacionar con lo reciente de una exposición a TB y en algunos casos puede ser tan alta como la observada en TB activa.

Los métodos de la invención permiten la determinación del estado de TB de un individuo independientemente de si el individuo también está infectado con VIH. En otras palabras, los métodos de la invención funcionan independientemente del estado de VIH del individuo.

En ciertas realizaciones el individuo está infectado con VIH. En otras realizaciones el individuo no está infectado con VIH, o el estado de infección con VIH del individuo es desconocido.

Los métodos de la invención permiten la determinación del estado de TB de un individuo independientemente del sitio de infección de TB. En otras palabras, los métodos de la invención funcionan independientemente del sitio de la infección de TB.

Por ejemplo, el individuo puede estar o haber estado infectado con TB en el pulmón (pulmonar) o en cualquier otro sitio (extrapulmonar), o el sitio de infección puede ser desconocido.

Algunos ejemplos de sitios de infección extrapulmonares incluyen la pleura (por ejemplo, en pleuresía tuberculosa), el sistema nervioso central (por ejemplo, en meningitis tuberculosa), el sistema linfático (por ejemplo, en escrófula en el cuello), el sistema genitourinario (por ejemplo, en tuberculosis urogenital), los huesos y las articulaciones (por ejemplo, en enfermedad de Pott en la columna vertebral), la piel, y manifestaciones gastrointestinales, entre otras.

En ciertas realizaciones el individuo ha estado infectado con TB en cualquier sitio. En otras palabras, el sitio de infección puede ser pulmonar y/o extrapulmonar. En ciertas realizaciones, el sitio de infección es desconocido.

En ciertas realizaciones de la invención la muestra que se proporciona en la etapa (i) de los métodos del primer aspecto de la invención es una muestra de sangre, preferentemente una muestra de células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Alternativamente, se puede usar una muestra de lavado broncoalveolar (BAL) o líquido cefalorraquídeo (CSF).

En ciertas realizaciones de la invención, el método es un 70-100 % sensible y/o un 80-100 % específico. En una realización el método es un 100 % sensible y/o un 93 % específico. La sensibilidad y la especificidad se calculan usando análisis de curva de operador de receptor. Este calcula un intervalo de sensibilidad y las especificidades dependiendo del porcentaje de corte que se estipula, por ejemplo, para un corte de > 19,05 % de células que segregan solo TNF-α específicas de MTB que son CD45RA-CCR7-CD127- la sensibilidad es de un 83,3 % y la especificidad es de un 100 %.

En ciertas realizaciones de la invención se lleva a cabo en primer lugar una etapa adicional en el método del primer aspecto de la invención con el fin de determinar si la muestra de células está infectada con MTB o bien se obtiene a partir de un sujeto infectado con MTB.

Por ejemplo, esta primera etapa adicional se puede llevar a cabo usando una plataforma ELISpot (ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas de puntos). También se podrían usar IGRA (ensayos de liberación de interferón gamma), ensayos basados en inmunidad, ensayos de piel de tuberculina y/o Quantiferon.

En un segundo aspecto de la invención se proporciona una composición que comprende una pluralidad de anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen a cada uno CD4, CCR7, CD127, TNF-α e IFN-γ y en el que la pluralidad comprende anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que son individualmente específicos para cada uno de CD4, CCR7, CD127, TNF-α e IFN-γ.

En otras palabras, la composición en su conjunto es capaz de unirse a cada uno de CD4, CCR7, CD127, TNF-α e IFN-γ y comprende anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que son individualmente capaces de unirse a solo uno de CD4, CCR7, CD127, TNF-α e IFN-γ.

También se desvela en el presente documento pero no se reivindica una composición que comprende una pluralidad de anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se une a cada uno de CD4, TNF-α, e IFN-γ y en la que la pluralidad comprende anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que son individualmente específicos para cada uno de CD4, TNF-α, e IFN-γ.

También se desvela en el presente documento pero no se reivindica una composición que comprende una pluralidad de anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se une a cada uno de CCR7 y CD127 y en la que la pluralidad comprende anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que son individualmente específicos para cada uno de CCR7 y CD127.

En ciertas realizaciones, la pluralidad de anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de las composiciones del segundo aspecto además es capaz de unirse a uno o más de CD3, CD8, CD45RA, IL-2 y/o células muertas y la pluralidad comprende además anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que son individualmente específicos para los uno o más de CD3, CD8, CD45RA, IL-2 y/o células muertas.

En una realización preferente, la pluralidad de anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de las composiciones del segundo aspecto además es capaz de unirse a CD45RA y la pluralidad comprende además anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que son individualmente específicos para CD45RA.

En una realización preferente, la pluralidad de anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de las composiciones del segundo aspecto además es capaz de unirse a IL-2 y la pluralidad comprende además anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que son individualmente específicos para IL-2.

En una realización preferente, la pluralidad de anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de las composiciones del segundo aspecto además es capaz en su conjunto de unirse a CD3 y la pluralidad comprende además anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que son individualmente específicos para CD3.

El fragmento de unión a antígeno se puede seleccionar entre el grupo que consiste en fragmentos Fv (por ejemplo, Fv de cadena individual y Fv unidos mediante disulfuro), fragmentos de tipo Fab (por ejemplo, fragmentos Fab, fragmentos Fab' y fragmentos $F(ab)_2$), dominios variables individuales (por ejemplo, dominios V_H y V_L) y anticuerpos de dominio (dAbs, incluyendo formatos individuales y dobles [es decir, dAb-conector-dAb]).

También se incluyen dentro del alcance de la invención versiones modificadas de anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, por ejemplo modificados mediante la unión covalente de polietilenglicol u otro polímero adecuado.

Los métodos de generación de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden generar mediante uno cualquiera de diversos métodos que emplean inducción de la producción *in vivo* de moléculas de anticuerpo, análisis sistemático de librerías de inmunoglobulinas (Orlandi. et ál., 1989. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:3833-3837; Winter et ál., 1991, Nature 349:293-299) o generación de moléculas de anticuerpo monoclonal mediante líneas celulares en cultivo. Estos incluyen, pero no se limitan a, la técnica del hibridoma, la técnica del hibridoma de linfocitos B humanos, y la técnica del hibridoma del virus de Epstein Barr (EBV) (Kohler et ál., 1975. Nature 256:4950497; Kozbor et ál., 1985. J. Immunol. Methods 81:31-42; Cote et ál., 1983. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:2026-2030; Cole et ál., 1984. Mol. Cell. Biol. 62:109-120).

Se pueden preparar anticuerpos monoclonales adecuados frente a antígenos seleccionados mediante técnicas conocidas, por ejemplo las que se desvelan en "Monoclonal Antibodies: A manual of techniques", H Zola (CRC Press, 1988) y en "Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications", J G R Hurrell (CRC Press, 1982).

Se pueden obtener fragmentos de anticuerpo usando métodos bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Harlow & Lane, 1988, "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York). Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo de acuerdo con la presente invención se pueden preparar mediante hidrólisis proteolítica del anticuerpo o mediante expresión en *E. coli* o células de mamífero (por ejemplo, cultivo de células de ovario de hámster chino u otros sistemas de expresión de proteínas) del ADN que codifica el fragmento. Alternativamente, los fragmentos de anticuerpo se pueden obtener mediante digestión en pepsina o papaína de anticuerpos completos mediante métodos convencionales.

En ciertas realizaciones la pluralidad de anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno se fija en un soporte sólido.

En ciertas realizaciones los anticuerpos o los fragmentos de unión a antígeno de los mismos con una especificidad particular son detectables por separado de aquellos con una especificidad diferente.

En otras palabras un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que es específico para una diana particular se puede detectar como una entidad separada con respecto a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que es específico para una diana diferente. En este contexto, "diana" se refiere a cualquiera de CD3, CD4, CD8, CD45RA, CCR7, CD127, TNF-α, IFN-γ o IL-2.

En una realización preferente los anticuerpos o los fragmentos de unión a antígeno de los mismos son detectables visualmente.

Los anticuerpos o los fragmentos de unión a antígeno de los mismos pueden estar etiquetados con el fin de permitir su detección. Por ejemplo, pueden estar etiquetados con una etiqueta fluorescente (por ejemplo, un fluoróforo) o con una etiqueta radiactiva.

Se conocen bien en la técnica múltiples ejemplos de etiquetas adecuadas tales como fluoróforos.

Los fluoróforos de interés incluyen, pero no se limitan a, colorantes de fluoresceína (por ejemplo, fluoresceína dT, 5-carboxifluoresceína (5-FAM), 6-carboxifluoresceína (6-FAM), 2',4',1,4,-tetraclorofluoresceína (TET), 2',4',5',7',1,4-hexaclorofluoresceína (HEX), y 2',7'-dimetoxi-4',5'-dicloro-6-carboxifluoresceína (JOE)), colorantes de cianuro tales como Cy5, derivados de dansilo, colorantes de rodamina (por ejemplo, tetrametil-6-carboxirodamina (TAMRA), colorantes ATTO (tales como ATTO 647N) y tetrapropano-6-carboxirodamina (ROX)), DABSYL, DABCYL, cianina, tal como Cy3, antraquinona, nitrotiazol, y compuestos de nitroimidazol, u otros colorantes no intercalantes.

Los posibles fluoróforos preferentes incluyen, entre otros, colorantes de láser violeta BD Horizon™, por ejemplo, BD Horizon™V450, colorantes de Alexa Fluor®, por ejemplo, Alexa Fluor® 488, isotiocianato de fluoresceína (FITC), R-ficoeritrina (PE), PECy™5, PerCP, PerCPCy™5.5, PE-Cy™7, Aloficocianina (APC), APC-Cy™7, APC-H7, colorantes Qdot, por ejemplo, Qdot 605.

Los fluoróforos particularmente preferentes incluyen, pero no se limitan a PE-CF594, AF700, QDot605, Qdot655, PE-Cy7, PerCP-Cy5.5, APC-Cy7, BV570, V450, PE, FITC, APC, Biotina, PE-Cy5.

Algunos fluoróforos a modo de ejemplo se usan como en los siguientes anticuerpos que se usan en los métodos que se describen en el presente documento: kits de tinción de células muertas fijables LIVE/DEAD®, aqua, (Invitrogen), CD3-APC-Alexa Fluor®750, CD4-Qdot®605, CD45RA-Odot®655 (Invitrogen), CD8-APC, CCR7-PE-Cy™7, CD127-FITC (BD Biosciences), PD-1-PerCP/Cy5.5 (Biolegend), IFN-γ-V450, IL-2-PE y TNF-α-AlexaFluor 700 (BD Biosciences).

Como se usa en el presente documento, "fluoróforo" (también denominado fluorocromo) se refiere a una molécula que, cuando se excita con luz que tiene una longitud de onda seleccionada, emite luz de una longitud de onda diferente.

También se desvela en el presente documento, pero no se reivindica, la composición del segundo aspecto para su uso en el diagnóstico de una infección de TB activa o latente.

En un aspecto adicional de la invención la composición del segundo aspecto, o una composición que comprende una pluralidad de anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se une a cada uno de CD4, CCR7 y CD127 y en la que la pluralidad comprende anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que son individualmente específicos para cada uno de CD4, CCR7, y CD127, es para su uso en el tratamiento de infección de TB en la que el uso comprende identificar si un individuo tiene una infección de TB activa o latente y posteriormente administrar el tratamiento más apropiado para la infección. Por ejemplo, si se muestra que el individuo tiene TB activa, entonces se administrará el tratamiento apropiado para tratar TB activa.

También se desvela en el presente documento, pero no se reivindica, un método de tratamiento de un sujeto infectado con TB que comprende:

(a) llevar a cabo el método de cualquier reivindicación precedente y
(b) administrar el tratamiento más apropiado para el sujeto dependiendo del resultado de la etapa (a).

Por ejemplo, si se muestra mediante la etapa (a) que el individuo tiene una infección de TB activa, entonces se administrará el tratamiento apropiado para tratar la TB activa en la etapa (b). A modo de ejemplo alternativo, si se muestra mediante la etapa (a) que el individuo tiene un alto riesgo de progresar de una infección de TB latente a TB activa, entonces se administrará un tratamiento apropiado en la etapa (b) (por ejemplo, se administrará un tratamiento para tratar TB activa en la etapa (b)).

A modo de ejemplo adicional, se podría recomendar que un individuo infectado conjuntamente con VIH comience una terapia antirretroviral altamente activa (HAART) si se muestra que tiene LTBI.

En un aspecto adicional de la invención se proporciona un kit para determinar el estado de infección de tuberculosis (TB) en un individuo que comprende:

(i) una composición que comprende una pluralidad de anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se une a cada uno de CD4, CCR7 y CD127 y en la que la pluralidad comprende anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que son individualmente específicos para cada uno de CD4, CCR7 y CD127;
(ii) una composición que comprende una pluralidad de anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se une a cada uno de TNF-α e IFN-γ y en la que la pluralidad comprende anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que son individualmente específicos para cada uno de TNF-α, e IFN-γ; y
(iii) instrucciones para su uso.

En otras palabras, la composición (i) del kit es una composición que en su conjunto es capaz de unirse a cada uno de CD4, CCR7 y CD127 y comprende anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que son individualmente capaces de unirse a solo uno de CD4, CCR7 y CD127; y la composición (ii) del kit es una composición que en su conjunto es capaz de unirse a cada uno de TNF-α, e IFN-γ y comprende anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que son individualmente capaces de unirse a solo uno de TNF-α, e IFN-γ.

En un aspecto adicional de la invención se proporciona un kit para determinar el estado de infección de tuberculosis (TB) en un individuo que comprende:

(i) una composición que comprende una pluralidad de anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se une a cada uno de CD4, TNF-α y IL-2 y en la que la pluralidad comprende anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que son individualmente específicos para cada uno de CD4, TNF-α y IL-2;
(ii) una composición que comprende una pluralidad de anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se une a cada uno de CCR7 y CD127 y en la que la pluralidad comprende anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que son individualmente específicos para cada uno de CCR7 y CD127; y
(iii) instrucciones para su uso.

En otras palabras, la composición (i) del kit es una composición que en su conjunto es capaz de unirse a cada uno de CD4, TNF-α y IL-2 y comprende anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que son individualmente capaces de unirse a solo uno de CD4, TNF-α y IL-2; y la composición (ii) del kit es una composición que en su conjunto es capaz de unirse a cada uno de CCR7 y CD127 y comprende anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que son individualmente capaces de unirse a solo uno de CCR7 y CD127.

En un aspecto adicional de la invención se proporciona un kit para determinar el estado de infección de tuberculosis (TB) en un individuo que comprende:

(i) una composición que comprende una pluralidad de anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se une a cada uno de CD4, CCR7, CD127, TNF-α e IFN-γ y en la que la pluralidad comprende anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que son individualmente específicos para cada uno de CD4, CCR7, CD127, TNF-α e IFN-γ; y
(ii) instrucciones para su uso.

En otras palabras, la composición (i) del kit es una composición que en su conjunto es capaz de unirse a cada uno de CD4, CCR7, CD127, TNF-α, e IFN-γ y comprende anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que son individualmente capaces de unirse a solo uno de CD4, CCR7, CD127, TNF-α, e IFN-γ.

En ciertas realizaciones de los kits de la invención, la pluralidad de anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de la composición de (i) y/o (ii) además es capaz de unirse a uno o más de CD3, CD8, CD45RA, IL-2 y/o células muertas y comprende además anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que son individualmente específicos para los uno o más de CD3, CD8, CD45RA, IL-2 y/o células muertas.

En ciertas realizaciones de los kits de la invención, la pluralidad de anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de la composición de (i) y/o (ii) además es capaz de unirse a CD45RA y comprende además anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que son individualmente específicos para CD45RA.

En ciertas realizaciones de los kits de la invención, la pluralidad de anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de la composición de (i) y/o (ii) además es capaz de unirse a CD3 y comprende además anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que son individualmente específicos para CD3.

En ciertas realizaciones de los kits de la invención, la pluralidad de anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de la composición de (i) y/o (ii) además es capaz de unirse a IL-2 y comprende además anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que son individualmente específicos para IL-2.

En ciertas realizaciones los kits de la invención comprenden además uno o más antígenos de TB, un discriminador de células vivas y/o muertas, y/o un control positivo.

Algunos ejemplos de antígenos de TB se han descrito anteriormente. Algunos ejemplos de discriminadores de células muertas (por ejemplo, marcadores de células muertas) se han descrito anteriormente.

Algunos ejemplos de controles positivos incluyen PMA-Ionomicina para estimular la muestra, PMA más ionóforo de calcio, lipopolisacárido (LPS), enterotoxina B de estafilococo (SEB), Anti CD3 más Anti CD28, fitohemaglutinina (PHA). También se pueden usar conjuntos de células humanas activadas que se han analizado sistemáticamente para la producción de citoquinas.

Un kit particular a modo de ejemplo puede incluir uno o más de los siguientes componentes:

a) control positivo, antígeno de ensayo
b) discriminador de células muertas
c) cóctel de anticuerpos conjugados con fluoróforo de superficie celular
d) fijación y tampón de permeabilización
e) cóctel de anticuerpos conjugados con fluoróforo intracelulares
f) tampón o tampones de lavado
g) placa de ensayo
(opcional h) perlas de compensación

También se desvela en el presente documento, pero no se reivindica, el uso de un kit en un método del primer aspecto.

Definiciones y abreviaturas

Por "CD3", "CD4" y "CD8" los presentes inventores se refieren a los cúmulos de diferenciación 3, 4 y 8, respectivamente.

Por "CCR7" los presentes inventores se refieren al receptor 7 de quimioquina C-C.

Por "CD127" los presentes inventores se refieren al cúmulo de diferenciación 127, también conocido como receptor alfa de interleuquina-7.

Por "CD45RA" los presentes inventores se refieren a la isoforma del cúmulo de diferenciación 45 RA.

Por "IFN-γ" los presentes inventores se refieren a interferón gamma.

Por "IL-2" los presentes inventores se refieren a interleuquina-2.

Por "TNF-α" los presentes inventores se refieren a factor de necrosis tumoral alfa.

Por "+" los presentes inventores se refieren a positivo. En otras palabras en el marcador/molécula inmunológico particular el + está asociado con su presencia.

Por "-" los presentes inventores se refieren a negativo. En otras palabras en el marcador/molécula inmunológico particular el + está asociado con su ausencia.

Por "anticuerpo" los presentes inventores incluyen moléculas de anticuerpo básicamente intactas, así como anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos (en los que al menos un aminoácido está mutado con respecto a los anticuerpos humanos de origen natural), anticuerpos de cadena individual, anticuerpos diespecíficos, cadenas pesadas de anticuerpo, cadenas ligeras de anticuerpo, homodímeros y heterodímeros de cadenas pesadas y/o ligeras de anticuerpo, y fragmentos de unión a antígeno y derivados de los mismos.

Por "fragmento de unión a antígeno" los presentes inventores se refieren a un fragmento funcional de un anticuerpo que es capaz de unirse a un antígeno particular.

El término "individuo" incluye todos los organismos. Algunos ejemplos de esos organismos incluyen mamíferos tales como seres humanos, vacas, tejones, perros, gatos, cabras, ovejas, y cerdos. Preferentemente, el individuo es un ser humano.

A continuación se describirán ejemplos que realizan un aspecto de la invención por referencia a las siguientes figuras en las que:

La Figura 1 muestra que la frecuencia de subconjuntos de células CD4+ y CD8+ que segregan IFN-γ y TNF-α aumenta en ATB

(A) Se muestra un ejemplo de la estrategia de clasificación para el subconjunto CD4+ que segrega solo TNF-α usando gráficas representativas de un individuo con ATB cuyas células se estimularon durante una noche con PPD. Las células se clasificaron en singletes vivos (no se muestra) y células CD3+CD4+ (fila superior), y a continuación de acuerdo con la expresión de IFN-γ, IL-2 y TNF-α usando FMO (fila media). Se usó clasificación booleana para definir subconjuntos funcionales no superpuestos individuales, por ejemplo el subconjunto TNF-α solo que no expresa IFN-γ o IL-2 (fila inferior).

Los gráficos muestran la frecuencia y la mediana de las células CD4+ (B) y CD8+ (C) que segregan IFN-γ y TNF-α en respuesta a la estimulación durante una noche con péptidos PPD o RD1 en participantes con ATB frente a

LTBI. Se indican aquellos con infección conjunta con VIH (círculos con relleno) y sin infección conjunta con VIH (círculos sin relleno). Los resultados se analizaron mediante ensayo U de Mann Whitney; y se consideraron significativos los valores de $p < 0,05$.

La Figura 2 muestra que el fenotipo de superficie celular de subconjuntos funcionales de células CD4+ está influido por el estadio de enfermedad de TB

Se examinaron subconjuntos funcionales de células CD4+ para la expresión de CD45RA y CCR7 en activo frente a LTBI en aquellos con una respuesta positiva.

(A) Se demuestra un ejemplo de estrategia de clasificación para un subconjunto CD4+ que segrega solo IFN-γ específico de PPD usando gráficas representativas de un individuo con ATB. Cada subconjunto funcional CD3+CD4+ (fila superior), por ejemplo células que segregan solo IFN-γ (fila media) se analizó para la expresión de CD45RA y CCR7 (fila inferior).
(B) Los gráficos muestran el porcentaje (y el porcentaje mediana) de células CD4+ IFN-γ solo estimuladas con PPD (página 7/22), TNF-α solo (página 8/22) y IL-2 solo (página 9/22) que son CD45RA-CCR7+ (TCM) (gráfico superior) y CD45RA-CCR7- (TEM) (gráfico interior) en pacientes con ATB y LTBI. Las dos primeras páginas son representativas de los cambios observados en activo frente a LTBI en todos los subconjuntos funcionales CD4+ específicos de MTB (que responden a péptidos PPD y RD-1) excepto células que segregan solo IL-2. Se indican aquellos con infección conjunta con VIH (círculos con relleno) y sin infección conjunta con VIH (círculos sin relleno). Los resultados se analizaron mediante ensayo U de Mann Whitney; y se consideraron significativos los valores de $p < 0,05$.

La Figura 3 muestra que el porcentaje de subconjuntos de linfocitos T funcionales CD4+ específicos de MTB que expresan CD127 está influido por el estadio de infección de TB y el recuento de CD4

Se examinaron subconjuntos de células funcionales CD3+CD4+ para la expresión de CD127.

(A) Se muestra una estrategia de clasificación representativa. Se estimularon PBMC de un individuo con infección de LTBI durante una noche con PPD, y se clasificaron células CD3+CD4+ (fila superior) para la secreción de citoquinas, por ejemplo, el subconjunto que segrega solo IFN-γ (fila media) y se analizaron para la expresión de CD127 (fila inferior).
(B) Los gráficos muestran el porcentaje (y el porcentaje mediana) de las células que expresan CD127 a partir de pacientes con respuesta positiva en subconjuntos de células CD4+ que segregan IFN-γ solo (fila superior), TNF-α solo (fila media) e IFN-γ y TNF-α doble (fila inferior) después de estimulación con péptidos PPD (página 11/22) y RD1 (página 12/22) en ATB y LTBI. Se indican los pacientes con infección conjunta con VIH (círculos con relleno) y sin infección conjunta con VIH (círculos sin relleno). Los resultados se analizaron mediante ensayo U de Mann Whitney; y se consideraron significativos los valores de $p < 0,05$.
(C) Los gráficos muestran correlaciones de células CD4/ml con el porcentaje de células CD4+ específicas de PPD que segregan las tres citoquinas (parte superior izquierda), IFN-γ solo (parte superior derecha), TNF-α y IL-2 (parte inferior izquierda) y TNF-α solo (parte inferior derecha) que expresan CD127 en pacientes con infección conjunta con VIH. Se indican los pacientes con TB (círculos con relleno) y LTBI (círculos sin relleno). Se muestra el coeficiente de correlación de rango de Spearman, que corresponde a los valores p y las líneas de mejor ajuste.

La Figura 4 muestra que combinar el análisis de subconjuntos funcionales con el fenotipo de memoria revela un biomarcador potencialmente potente para distinguir activa y LTBI

Se usó clasificación booleana para analizar el porcentaje de células CD4+ que segregan solo TNF-α específicas de PPD que tenían el fenotipo TEFF (CD45RA-CCR7-CD127-) en activo y LTBI.
Se muestra una estrategia de clasificación representativa para individuos con ATB (A) y LTBI (B). (C) Los gráficos en la parte superior de cada página muestran el porcentaje (y el porcentaje mediana) de células CD4+ TNFa solo e IFNy solo específicas de péptido PPD o RD-1 de pacientes con respuesta que fueron TEFF. Se muestran los valores de corte para distinguir ATB de LTBI como líneas de puntos, y se muestran las curvas ROC correspondientes en el gráfico inferior en cada página. Un corte de un 17,3 % de células TNF-α solo de fenotipo TEFF distinguió ATB de LTBI con un 100 % de sensibilidad (95 % de CI 73,5-100,0) y un 92,9 % de especificidad (95 % de CI 66,1-99,8) (tabla 2). En el análisis ROC, el área bajo la curva fue 0,99 (95 % de CI 0,97-1,01; $p < 0,0001$) (Figura 4C). Un corte de un 34,5 % para células IFN-γ solo específicas de PPD dio una sensibilidad de un 100 % (95 % de CI 73,5 a 100,0) y una especificidad de un 84,2 % (95 % de CI 60,42-96,6); un corte de un 33,8 % para células TNF-α solo específicas de RD-1 dio una sensibilidad de un 100 % (95 % de CI 54,07 a 100,0) y una especificidad de un 75,0 % (95 % de CI 34,91 a 96,8); y un corte de un 49,3 % de células IFN-γ solo específicas de RD-1 dio una sensibilidad de un 100 % (95 % de CI 66,4-100,0) y una especificidad de un 75,0 % (95 % de CI 42,8-94,5). (D) Los gráficos muestran el porcentaje (y el porcentaje mediana) de células CD4+ TNFα solo e IFNy solo específicas de PPD que fueron TEFF en pacientes con TB extrapulmonar (EPTB) y TB pulmonar (PTB). Se indican los pacientes con infección conjunta con VIH (círculos con relleno) y sin infección conjunta con VIH (círculos sin relleno). Los resultados se analizaron mediante ensayo U de Mann Whitney; y se consideraron significativos los valores de $p < 0,05$.

La Figura 5 muestra que no hubo ninguna diferencia en la frecuencia de células trifuncionales entre aquellas con ATB o LTBI o infectadas con VIH frente a no infectadas que responden a péptidos PPD (fila superior) o RD-1 (fila inferior)

Se indican los pacientes con infección conjunta con VIH (círculos con relleno) y sin infección conjunta con VIH (círculos sin relleno). Los resultados se analizaron mediante ensayo U de Mann Whitney; y se consideraron significativos los valores de $p < 0,05$.

La Figura 6 muestra que no hubo ninguna diferencia en la proporción de cualquier subconjunto funcional CD4+ que era TCM excepto en las células específicas de péptidos RD-1 que segregan solo IFN-γ (fila superior) y TNF-α e IL-2 (fila inferior)

Se indican los pacientes con infección conjunta con VIH (círculos con relleno) y sin infección conjunta con VIH (círculos sin relleno). Los resultados se analizaron mediante ensayo U de Mann Whitney; y se consideraron significativos los valores de $p < 0,05$.

La Figura 7 muestra la correlación inversa de la proporción de linfocitos T TNF-α solo específicos de PPD o específicos de ECR que son CD45RA-CCR7-CD127- con el tiempo desde exposición a TB

Proporción de linfocitos T TNF-α solo (a) específicos de PPD y (b) específicos de ECR que son CD45RA-CCR7-CD127- frente al tiempo estimado desde exposición a TB. Los resultados se analizaron mediante el coeficiente de correlación de rango de Spearman.

Ejemplos

Métodos usados en los ejemplos

Los participantes se reclutaron posiblemente de tres centros clínicos de Londres, Reino Unido durante el periodo de enero 2008 - febrero 2011 con la aprobación del servicio de ética de investigación nacional (07/H0712/85). Los participantes fueron ≥ 18 años, proporcionaron consentimiento informado por escrito y fueron elegibles si se encontraban en investigación clínica para ATB (TB activa), experimentando análisis sistemático de LTBI (infección latente de tuberculosis) o habían reconocido factores de riesgo de TB, por ejemplo, contacto de TB conocido.

La supuesta ATB se confirmó microbiológicamente mediante el laboratorio de diagnóstico clínico. LTBI se definió como una respuesta positiva a antígenos RD-1 en T-SPOT.TB (llevado a cabo en el procesamiento clínico de rutina) o ELISpot de IFN-γ de MTB (llevado a cabo para el estudio actual) en ausencia de evidencia sintomática, microbiológica o radiológica de ATB.

La presencia de infección por VIH se confirmó mediante ensayos en suero de 3ª y 4ª generación llevados a cabo mediante el laboratorio de diagnóstico clínico y usando un EIA específico de tipo VIH-1, de acuerdo con los patrones nacionales. Se sometieron a ensayo la carga viral de VIH (VL) y el recuento de linfocitos T CD4 en los laboratorios de diagnóstico acreditados por la asociación de patología clínica en el momento del reclutamiento para el estudio. Estuvieron disponibles pruebas diagnósticas de VIH para todos los pacientes con ATB (en línea con la política de análisis sistemático nacional) y la mayoría de aquellos con LTBI; los restantes no tenían ningún factor de riesgo para VIH y proporciones normales de linfocitos CD4:CD8, y se clasificaron como no infectados con VIH.

Las características demográficas de la población de estudio se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1: Características demográficas y resultados del ensayo clínico de los participantes

	HIV y TB		***TB***		***HIV y LTBI***		***LTBI***		***Total***	
	7	*(%)*	*6*	*(%)*	*10*	*(%)*	*11*	*(%)*	*34*	*(%)*
Edad mediana (IQR)	*43*	*(40,5-52,4)*	*34,5*	*(28,0-56,0)*	*36*	*(24,0-39,0)*	*33*	*(31,0-35,5)*	*35,5*	*(31,3-40,8)*
Sexo										
Masculino	*4*	*(57,1)*	*3*	*(50,0)*	*6*	*(60,0)*	*4*	*(36,4)*	*17*	*(50,0)*
Femenino	*3*	*(42,9)*	*3*	*(50,0)*	*4*	*(40,0)*	*7*	*(63,6)*	*17*	*(50,0)*
Etnia										
Africano negro	*5*	*(71,4)*	*1*	*(16,7)*	*8*	*(80,0)*	*6*	*(54,5)*	*20*	*(58,8)*
Asiático	*1*	*(14,3)*	*3*	*(50,0)*	*0*	*(0,0)*	*3*	*(27,3)*	*7*	*(20,6)*
Cabo Casiano	*1*	*(14,3)*	*2*	*(33,3)*	*2*	*(20,0)*	*2*	*(18,2)*	*7*	*(20,6)*
Vacunación con BCG										
Sí	*5*	*(71,4)*	*3*	*(50,0)*	*9*	*(90,0)*	*8*	*(72,7)*	*25*	*(73,5)*
No	*1*	*(14,3)*	*2*	*(33,3)*	*0*	*(0,0)*	*2*	*(18,2)*	*5*	*(14,7)*
Desconocido	*1*	*(14,3)*	*1*	*(16,7)*	*1*	*(10,0)*	*1*	*(9,1)*	*4*	*(11,8)*

Confirmación microbiológica (frotis/cultivo)										
Positivo	*7[a]*	*(100,0)*	*6[b]*	*(100,0)*	*NA*	*NA*	*NA*	*NA*	*13*	*(100,0)*
negativo	*0*	*(0,0)*	*0*	*(0,0)*	*NA*	*NA*	*NA*	*NA*	*0*	*(0,0)*
Ensayo de VIH										
Positivo	*7*	*(100,0)*	*0*	*(0,0)*	*10*	*(100,0)*	*0*	*(0,0)*	*17*	*(50,0)*
negativo	*0*	*(0,0)*	*6*	*(100,0)*	*0*	*(0,0)*	*6*	*(54,5)*	*12*	*(35,3)*
No realizado	*0*	*(0,0)*	*0*	*(0,0)*	*0*	*(0,0)*	*5[b]*	*(45,5)*	*5*	*(14,7)*

Todos los sujetos sometidos a ensayo positivos en uno o más del ensayo de piel de tuberculina, TSPOT.TB, QuantiFERON®-TB Gold In-Tube o ELISpot de IFN-γ de MTB, llevado a cabo clínicamente o para el estudio actual. IQR = intervalo intercuartil

[a] Diez pacientes con TB no habían iniciado el tratamiento en el momento del reclutamiento, dos habían recibido < 14 días de tratamiento, y uno había recibido ≥ 14 días de tratamiento

[b] Todos los participantes sin necesidad clínica de someterse a ensayo de VIH tenían proporciones normales de CD4:CD8

ELISpot de IFN-γ de MTB

Se estimularon células mononucleares de sangre periférica (PBMC) reciente o congelada, 2,5 x 10^5 por pocillo, durante una noche (37 °C, 5 % de CO_2, 16-20 h) en una placa de ELISpot de IFN-γ (Mabtech) con fitohemaglutinina (PHA; control positivo; Sigma-Aldrich), derivado de proteína purificada de tuberculina (PPD; Statens Serum Institute) o mezclas de péptidos superpuestos de 15-mero específicos de MTB que cubren cada uno de ESAT-6, CFP-10, EspC, TB7,7, Rv3879c, Rv3873 y Rv3878. Las células sin estimular se usaron como control negativo. El ensayo de ELISpot de IFN-γ se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente (Dosanjh DP et ál. Ann Intern Med 2008; 148:325-36).

Tinción de citoquina intracelular y citometría de flujo policromática: se cultivaron PBMC descongeladas (3-5 x 10^6 por pocillo) durante 16 h (37 °C, 5 % de CO_2) en suero humano al 10 % (Sigma-Aldrich) en RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) a una concentración de 1 x 10^7 células/ml. Las células se estimularon con PMA-Ionomicina (control positivo); (Sigma-Aldrich; concentración final de 500 ng/ml), PPD (concentración final de 16,7 µg/ml) o un cóctel de péptidos que abarca la longitud de tres antígenos asociados a RD1 específicos de MTB inmunodominantes, ESAT-6, CFP-10 y EspC (concentración final de 10 µg/ml por péptido) (Millington KA et ál. Proc Natl Acad Sci USA 2011; 108:5730-5). Las células sin estimular se usaron como control negativo.

Después de dos horas, se añadió monensina (concentración final de 2 µM). Después de estimulación, las células se lavaron y se tiñeron con un marcador de células muertas (kits de tinción de células muertas fijables LIVE/DEAD®, aqua, Invitrogen) durante 30 minutos a 4 °C en solución salina tamponada con fosfato (PBS). A continuación, las células se lavaron en PBS y se pusieron en tampón de bloqueo FC (suero humano al 10 % en solución de FACS filtrada (albúmina de suero bovino al 0,5 % y EDTA 2 mM en PBS)) durante 20 minutos a 4 °C antes de tinción con un cóctel de anticuerpos valorado anteriormente y optimizado con anticuerpos conjugados con fluorocromo frente a CD3-APC-Alexa Fluo®750, CD4-Qdot®605, CD45RA-Qdot®655 (Invitrogen), CD8-APC, CCR7-PE-CyTM7, CD127-FITC (BD Biosciences) y PD-1-PerCP/Cy5.5 (Biolegend). Después del lavado, las células se fijaron y se permeabilizaron usando el kit de fijación/permeabilización Cytofix/Cytoperm™ de BD (BD Biosciences) durante 20 minutos a 4 °C. Las células se descongelan dos veces con solución de permeabilización/lavado (BD Biosciences) y a continuación se tiñeron con anticuerpos conjugados con fluorocromo valorados anteriormente en solución de permeabilización/lavado con IFN-γ-V450, IL-2-PE y TNF-α-AlexaFluor 700 (BD Biosciences) durante 30 minutos a 4 °C. Se adquirieron 1 x 10^6 sucesos (cuando fue posible) inmediatamente usando un citómetro de flujo LSR-II de BD. Se usaron perlas de compensación de Ig anti-rata y anti-ratón (BD Biosciences) para ajustar los parámetros de compensación. Se usaron controles de fluorescencia menos uno (FMO) en cada experimento para ajustar las clasificaciones.

Análisis de datos y umbrales

Los datos se analizaron en FlowJo versión 9.4.4 ©TreeStar, Inc. Los sucesos se clasificaron en células vivas, singletes y linfocitos usando propiedades de difusión directa y secundaria. Se definieron los subconjuntos CD3+CD4+ y CD3+CD8+. Los controles de clasificación se usaron para definir respuestas de IFN-γ, IL-2 y TNF-α y expresión de marcador superficial.

Para el análisis de fenotipo de células específicas de MTB, se incluyeron solo los participantes con una respuesta positiva. Los pacientes con respuesta positiva se definieron como aquellos con una respuesta que era ≥ 2 veces el fondo (en muestras sin estimular pero completamente teñidas) y > 0,001 % de células CD3+CD4+ o CD3+CD8+.

Este corte se usó debido a que no se usó estimulación conjunta para mejorar las respuestas, y los presentes inventores normalizaron a los datos de fondo (sin estimular) antes de la aplicación del corte (en lugar de clasificar el fondo como despreciable). Un corte estricto significó que solo se incluyeron células específicas de antígeno en el análisis de fenotipo.

Análisis estadístico

Se llevó a cabo el análisis estadístico usando IBM SPSS Statistics versión 20 y GraphPad Prism versión 5.00 para Mac OS X, GraphPad Software, California USA. El estadio de enfermedad de TB comparó todos los TB (n = 13) frente a todos los LTBI (n = 21) independientemente del estado de VIH, el impacto de VIH comparado con todos los infectados con VIH (n = 17) frente a los no infectados (n = 17) independientemente del estadio de enfermedad de TB y para los cuatro subgrupos. Se usó el ensayo U de Mann-Whitney de 2 colas para comparaciones de dos muestras no paramétricas. Se usaron los coeficientes de correlación de intervalo de Spearman para las correlaciones de ensayo. La curva de características de operación de receptor (ROC) definió la sensibilidad y la especificidad del enfoque diagnóstico.

Ejemplo 1 - La frecuencia de células CD4+ y CD8+ con una respuesta IFN-γ+ y TNF-α+ aumentó en ATB

Los presentes inventores examinaron la frecuencia de subconjuntos de células efectoras funcionales CD4+ y CD8+. Se usó clasificación booleana para crear subconjuntos no superpuestos individuales por combinación de datos en 3 dimensiones (Figura 1A). La frecuencia de células CD4+ que segregan solo IFN-γ, solo TNF-α y doble IFN-γ/TNF-α específicas de PPD fue mayor en ATB en comparación con LTBI (p = 0,003, 0,002 y 0,002, respectivamente) (Figura 1B). Se observa una relación similar para células CD4+ que segregan solo IFN-γ específicas de péptido RD1 (no significativo; no se muestran los datos), y células que segregan doble IFN-γ/TNF-α (p = 0,017) (Figura 1B).

La presencia de infección con VIH no se asoció a una frecuencia alterada de estos subconjuntos de células. Los presentes inventores no observaron ninguna diferencia en la frecuencia de células trifuncionales en pacientes con ATB en comparación con aquellos con LTBI (Figura 5).

La mayoría de los participantes con ATB, pero no LTBI, tuvieron una respuesta CD8+ IFN-γ (PPD: 12/13 para ATB frente a 6/21 para LTBI, péptidos RD1: 10/13 para ATB frente a 11/21 para LTBI). Las frecuencias de células CD8+ que producen solo IFN-γ específicas de péptido PPD y RD1 fueron significativamente mayores en ATB que en LTBI (p = 0,017 y 0,016, respectivamente), como fue la frecuencia de células CD8+ específicas de PPD que segregan tanto IFN-γ como TNF-α (p = 0,013) (Figura 1C).

La infección conjunta con VIH se asoció (no significativamente) a una frecuencia reducida de respuestas IFN-γ/TNF-α doble y TNF-α solo específicas de PPD en ATB en comparación con VIH negativo (p = 0,051 para ambos). En el grupo de TB no infectado con VIH los porcentajes de estas células CD8+ específicas de PPD fue significativamente mayor que en LTBI (p = 0,008 y 0,022 respectivamente).

La similitud de la frecuencia de las células que segregan solo IFN-γ fue significativamente mayor en ATB en comparación con LTBI en VIH sin infectar (p = 0,023). Estos subconjuntos funcionales efectores CD8+ estuvieron por lo tanto relacionados con la carga micobacteriana de forma análoga a los subconjuntos CD4+ equivalentes pero el impacto de la infección conjunta con VIH fue más profundo.

Ejemplo 2 - La diferenciación celular CD4+ específica de PPD y específica de péptido RD1 aumentó en ATB frente a LTBI

Los presentes inventores analizaron el fenotipo de memoria de los subconjuntos funcionales CD4+ como correlaciones putativas de la carga patogénica micobacteriana. Se excluyeron los pacientes que no tuvieron respuesta. Cada subconjunto funcional de linfocitos T se clasificó para la expresión de CD45RA y CCR7 (Figura 2A). Los fenotipos de memoria de subconjuntos funcionales se definieron como CD45RA+CCR7+ virgen, CD45RA-CCR7+ de memoria central (TCM), CD45RA-CCR7- de memoria efectora (TEM) y CD45RA+CCR7- efectores de CD45RA+ (TEMRA). Este último subconjunto fue principalmente evidente en células CD8+.

Los subconjuntos funcionales efectores de células CD4+ específicas de péptidos PPD- y RD1 fueron principalmente TCM en LTBI en comparación con TEM en ATB, por ejemplo menos células CD4 + que segregan solo IFN-γ específicas de PPD fueron TCM en ATB en comparación con LTBI (p = 0,005) (Figura 2B). Las comparaciones de pacientes infectados con VIH con pacientes sin infectar no fueron significativas excepto para los subconjuntos CD4+ que segregan solo IFN-γ y doble TNF-α/IL-2 específicas de péptido RD1, menos de las cuales fueron TCM en los sujetos infectados con VIH que en los sujetos sin infectar (p = 0,030 y 0,006) (Figura 6).

A diferencia de los subconjuntos funcionales efectores CD4+, las células CD4+ IL-2 solo específicas de PPD (Figura 2B) y péptido RD1 (no se muestran los datos) fueron principalmente TCM tanto en ATB como en LTBI y por lo tanto no se vieron afectadas por el estadio de enfermedad de TB. Las respuestas celulares CD8+ IFN-γ solo a péptidos PPD y RD1 fueron en su mayor parte TEM y TEMRA (no se muestran los datos).

La expresión de CD127 (IL7Ra) se reduce después de estimulación con antígeno en linfocitos T efectores (Schluns et ál. Nat Rev Immunol 2003; 3:269-79.) y define los subconjuntos CD4+ y CD8+ de linfocitos T efectores murinos diferenciados distintos de células de memoria efectoras (Kaech et ál. Nat Immunol 2003; 4:1191-8; Harrington et ál. Nature 2008; 452:356-60). Por lo tanto, los presentes inventores midieron la expresión de CD127 en subconjuntos de linfocitos T funcionales CD4+ específicos de antígeno (Figura 3A).

Un menor porcentaje de células CD4+ específicas de péptido PPD y RD1 expresaron CD127 en ATB en comparación con LTBI, por ejemplo un menor porcentaje de células CD4+ que segregan solo IFN-γ y solo TNF-α específicas de PPD expresaron CD127 en ATB en comparación con LTBI ($p < 0,001$ y $p = 0,003$ respectivamente) (Figura 3B). La expresión de CD127 en células específicas de antígeno no se vio afectada por el estado de VIH (Figura 3B).

Sin embargo, en pacientes con infección conjunta con VIH, las frecuencias de varios subconjuntos de linfocitos T específicos de PPD que expresan CD127 correlacionaron con el recuento de CD4 (Figura 3C). De forma similar, para células específicas de péptido RD-1, las células que producen IFN-γ/IL-2 doble que expresan CD127 correlacionaron con el recuento de CD4 ($Ro = 0,647$; $p = 0,047$) y VL de VIH correlacionaron inversamente con células que expresan CD127 que segregan IFN-γ solo ($Ro = -0,780$; $p = 0,013$) e IFN-γ/TNF-α doble ($Ro = -0,727$; $p = 0,005$) (no se muestran los datos).

Ejemplo 3 - Expansión de linfocitos T efectores funcionales CD4+ diferenciados en ATB frente a LTBI

Los presentes inventores investigaron a continuación el potencial de la medición fenotípica y funcional combinada como biomarcador clínico. Los presentes inventores determinaron el porcentaje de células CD4+ específicas de péptido PPD y RD1 que segregan IFN-γ solo o TNF-α solo que fueron células efectoras diferenciadas (TEFF; CD45RA-CCR7-CD127-) (Figura 4A (ATB) y B (LTBI)).

En ATB, en comparación con LTBI, un mayor porcentaje de células CD4+ que segregan IFN-γ solo o TNF-α solo en respuesta a péptidos PPD y RD1 fueron TEFF. Esto fue más significativo para células CD4+ específicas de PPD CD4+ que segregan TNF-α solo ($p < 0,0001$) e IFN-γ solo ($p < 0,0001$). Un corte > 17,3 % de células TNF-α solo de fenotipo TEFF distinguió ATB de LTBI con un 100 % de sensibilidad (95 % de CI 73,5-100,0) y un 92,9 % de especificidad (95 % de CI 66,1-99,8) (Tabla 2).

En el análisis ROC, el área bajo la curva fue 0,99 (95 % de CI 0,97-1,01; $p < 0,0001$) (Figura 4C). Se generaron curvas ROC similares aunque ligeramente menos discriminativas para células IFN-γ solo específicas de PPD y para células específicas de RD-1 (Figura 4C).

Para someter a ensayo si este enfoque era robusto para las diferencias en el sitio de la enfermedad los presentes inventores compararon individuos con enfermedad pulmonar (PTB) y extrapulmonar (EPTB) activa. Los presentes inventores no descubrieron ninguna diferencia significativa en la proporción de células específicas de PPD que segregan IFN-γ solo, o TNF-α solo que fueron TEFF (Figura 4D) cuando estratificaron mediante el sitio de la enfermedad o la infección conjunta con VIH. No hubo ninguna diferencia en la proporción de células específicas de péptido RD-1 que fueron TEFF cuando estratificaron mediante el sitio de la enfermedad (no se muestran los datos).

Los análisis de realización de operador (KMP) también se vieron implicados en el reclutamiento de participantes y por lo tanto no cegaron la categorización de pacientes. Para demostrar la integridad y la reproducibilidad de los resultados, los datos de todos los participantes del estudio se clasificaron de nuevo y se analizaron de nuevo mediante un segundo operador independiente (HSW) que se había cegado con respecto al diagnóstico del paciente.

Las correlaciones entre los resultados obtenidos por los operadores 1 y 2 para el porcentaje de células CD3+CD4+ que segregan TNF-α solo ($Ro = 0,97$, $p < 0,0001$), el porcentaje de células CD3+CD4+ que segregan TNF-α solo que son CD127+ ($Ro = 0,96$, $p < 0,0001$) y el porcentaje de células CD3+CD4+ que segregan TNF-α solo que son CD45RA-CCR7- ($Ro = 0,88$, $p < 0,0001$) fueron muy fuertes. Usando el corte de un 17,3 % para células que segregan TNF-α solo de fenotipo TEFF para distinguir TB de LTBI, el operador 2 clasificó de forma errónea 1 caso de TB como LTBI, y 1 caso más de LTBI como TB (no se muestran los datos).

Tabla 2. Características clínicas y radiológicas de casos clasificados mediante el porcentaje de células que segregan TNF-α solo que fueron T_{EFF} (CD45RA-CCR7-CD127-)

N.º	**% de T_{EFF}/ TNF-α solo**	**VIH**	**CD4**	**VL**	**Frotis de esputo**	**Cultivo de MTB**	**Sitio de cultivo**	**Radiología (CXR o CT)**	**Diagnóstico de TB final**
S135	78,9	+	190	281671	-	+	BAL y fluido pleural	Efusiones pleurales bilaterales, pulmón y nódulos esplénicos, espesamiento peritoneal	pulmonar
S126	75,0	+	69	601000	+	+	Esputo	Consolidación focal de lóbulo ácigos en la cavidad, efusiones pleurales, sin linfadenopatía	pulmonar
S221	72,4	-	na	na	nt	+	Ganglio linfático	Ganglios linfáticos de baja densidad agrandados en mediastino y axila izquierda	extra pulmonar
S059	46,9	+	140	< 100	+	+	Esputo y BAL	Efusión, pleura engrosada, pérdida de volumen del pulmón derecho, cambio de vidrio deslustrado	pulmonar
S184	40,5	-	na	na	nt	+	Ganglio linfático	Múltiples ganglios linfáticos mediastinales del eje celíaco con ganglios en el bazo y mama	extra pulmonar
S193	37,6	+	136	28958	nt	+	Ganglio linfático	Linfadenopatía axilar, paraaórtica y abdominal, ganglios subpleurales, lesiones hepáticas	extra pulmonar
S083	30,0	-	na	na	-	+	Ganglio linfático, BAL, peritoneal	Recogida pleural derecha y linfadenopatía paratraqueal derecha	pulmonar
S076	29,2	+	200	< 50	+	+	Lóbulo superior izquierdo, BAL, esputo	Consolidación y cavitación del lóbulo superior, opacidades intersticiales, atelectasia lineal	pulmonar
S115	28,6	-	na	na	nt	+	Ganglio linfático	Linfadenopatía mediastinal	extra pulmonar
S146	20,1	+	250	52205	nt	+	Ganglio linfático	Linfadenopatía supraclavicular, mediastinal y abdominal, infiltrados nodulares	extra pulmonar
S195	18,0	-	na	na	+	+	BAL y ganglio linfático	Ganglios linfáticos mediastinales, hiliares y supraclaviculares, consolidación desigual	pulmonar
S153	17,8	-	na	na	nt	nt	nt	nada que señalar	LTBI

S082	17,5	-	na	na	-	+	Ganglio linfático	nada que señalar	extra pulmonar
S074	17,1	-	na	na	-	M *fortuitum*	BAL	Opacificación del lóbulo superior derecho, bajo volumen axilar y ganglios linfáticos mediastinales	LTBI
S050	16,7	+	480	12479	nt	nt	nt	nada que señalar	LTBI
S052	13,3	+	520	45719	-	-	Esputo	nada que señalar	LTBI
S177	12,8	-	na	na	nt	nt	nt	nada que señalar	LTBI
S094	10,9	+	660	< 50	nt	nt	nt	Nódulo muy calcificado y lóbulo superior derecho con pequeños ganglios linfáticos	LTBI
S092	10,3	nt	na	na	nt	nt	nt	nada que señalar	LTBI
S145	9,4	-	na	na	nt	nt	nt	nt	LTBI
S098	8,6	-	na	na	nt	nt	nt	(Costillas T4-9 fracturadas posteriormente)	LTBI
S047	8,5	+	360	< 50	nt	nt	nt	nada que señalar	LTBI
S079	6,2	nt	na	na	nt	nt	nt	nada que señalar	LTBI
S001	5,9	+	430	775	nt	nt	nt	nada que señalar	LTBI
S099	5,8	nt	na	na	nt	nt	nt	nada que señalar	LTBI
S120	4,7	nt	na	na	nt	nt	nt	Fibrosis en ambos vértices, linfadenopatía hiliar, engrosamiento pleural	LTBI
S097	na	+	177	19906	+	-	Esputo	Ganglios linfáticos subcarinales y axilares	pulmonar
S029	na	+	530	< 50	nt	nt	nt	nada que señalar	LTBI
S025	na	+	330	< 50	nt	nt	nt	nada que señalar	LTBI
S197	na	+	210	< 50	nt	nt	nt	nada que señalar	LTBI
S201	na	-	na	na	nt	nt	nt	nada que señalar	LTBI
S171	na	+	365	< 50	nt	nt	nt	nada que señalar	LTBI
S191	na	+	530	13328	nt	nt	nt	nt	LTBI
S121	na	-	na	na	nt	nt	nt	nada que señalar	LTBI

TB = tuberculosis, LTBI = infección de TB latente, Pos = positivo, Neg = negativo, nt = no sometido a ensayo, na = no aplicable, BAL = lavado broncoalveolar, CXR = rayos X de zona pectoral, CT = tomografía computerizada. Se podría predecir que aquellos por encima de la línea de división superior en negrita tenían ATB y aquellos por debajo de ella LTBI. Aquellos por debajo de la segunda línea de división en negrita no tuvieron respuesta TNF-α solo positiva a PPD.

Ejemplo 4 - Diagnóstico de infección con MTB

Las plataformas ELISpot que usan antígenos específicos de MTB tales como T-SPOT®.*TB* son un método altamente sensible y altamente específico para demostrar la presencia de infección con MTB (Dinnes, Deeks et ál. 2007). Los antígenos utilizados están codificados por o asociados a la región de diferencia 1 (RD1) incluyendo ESAT-6, CFP-10, Rv3879c, Rv3873 y Rv3615c que son tanto específicos como inmunodominantes para infección de MTB (Dosanjh, Hinks et ál. 2008) (Dosanjh, Bakir et ál. 2011). Este enfoque se recomienda en la actualidad por las

organizaciones de protección de salud a nivel mundial para el diagnóstico de LTBI. La plataforma ELISpot tiene las siguientes ventajas

a) Estandarización del número de células en cada pocillo, esto es una ventaja teórica en inmunosupresión y los datos sugieren que este ensayo conserva la sensibilidad cuando se usa en individuos infectados conjuntamente con VIH, a diferencia de TST (Chapman, Munkanta et ál. 2002).
b) Método de detección altamente sensible. Esto permite el uso de varios antígenos específicos de MTB, que se pueden usar para distinguir infección por MTB sin confusión con vacunación previa con BCG. El uso de estos antígenos en el método de citometría de flujo del Ejemplo 5 también es posible, pero las respuestas pueden ser demasiado bajas para una caracterización completa. La plataforma más sensible que el ensayo de análisis sistemático inicial es por lo tanto preferente para obtener la tasa de diagnóstico más alta.

Método:

1. Tomar 5-10 ml de sangre periférica del paciente en un tubo de ensayo de TSpot. TB.
2. Separar las células mononucleares de sangre periférica.
3. Poner las células contadas en una placa de TSpot.*TB* de 96 pocillos con control negativo, control positivo y pocillos de ensayo por duplicado.
4. Estimular durante una noche con antígenos específicos de MTB.
5. Leer en un lector SIDA ELISpot.
6. Estratificar en positivo y negativo de acuerdo con el umbral predefinido por el fabricante.

Este método de diagnosticar infección por MTB puede ir seguido preferentemente a continuación por el método que se describe en el Ejemplo 5.

Ejemplo 5: Distinción de infección de TB activa y latente e indicación de actividad de enfermedad micobacteriana.

La citometría de flujo de múltiples parámetros es una potente herramienta para la interrogación de la inmunidad celular para la medición de las respuestas a PPD, RD1, MTB vivo o muerto y BCG. Se usan procedimientos de citometría de flujo sencillos para monitorizar la infección de VIH (recuentos de CD4). Se usan procedimientos de tinción complejos para los diagnósticos de cánceres inmunes tales como leucemia. En la actualidad no existe ningún ensayo de citometría de flujo de múltiples colores para uso diagnóstico en el campo de TB.

El ensayo (que se puede llevar a cabo preferentemente como una segunda etapa después del ensayo que se describe en el Ejemplo 4) mide una nueva combinación de dianas celulares, que no se ha investigado simultáneamente con anterioridad:

1. Marcador de células muertas (permite la retirada de las células muertas del análisis)
2. Anticuerpo conjugado con fluorocromo frente al cúmulo de diferenciación (CD) 3 (identifica linfocitos T)
3. Anticuerpo conjugado con fluorocromo frente a CD4 (identifica al subconjunto principal de linfocitos T colaboradores)
4. Anticuerpo conjugado con fluorocromo frente al receptor 7 de quimioquina C-C (CCR7)
5. Anticuerpo conjugado con fluorocromo frente a CD127 también conocido como receptor de interleuquina 7 alfa (este está particularmente poco investigado en TB)
6. Anticuerpo conjugado con fluorocromo frente a interferón gamma (IFN-γ)
7. Anticuerpo conjugado con fluorocromo frente a interleuquina 2 (IL-2)
8. Anticuerpo conjugado con fluorocromo frente a factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α)
9. Anticuerpo conjugado con fluorocromo frente a CD45RA (la pérdida de este marcador identifica el subconjunto de memoria de linfocitos T experimentados, esto puede ser prescindible en el ensayo final)
10. Anticuerpo conjugado con fluorocromo frente a CD8 (identifica el subconjunto principal de linfocitos T citotóxicos, este marcador puede ser prescindible en el ensayo final)

Este método cuantifica la proporción de células CD3+ CD4+ vivas que segregan TNF-α o IFN-γ que no expresan CD45RA, CCR7 o CD127 (fenotipo de efector). Esto es para distinguir infección activa de latente y estratificar aquellos con riesgo de progresión a TB activa. Cuanto mayor es el porcentaje de células que segregan TNF-α solo que tienen este fenotipo de efector, mayor es la probabilidad de que el paciente tenga TB activa (umbral superior) o riesgo de progreso a TB activa (umbral inferior). La medición combinada de estos marcadores de fenotipo y función específicos de MTB y el enfoque específico de ensayo para el análisis de datos de citometría de flujo no se había descrito anteriormente.

Método:

1. Tomar 30 ml de sangre completa del paciente con una respuesta positiva del ensayo que se describe en el Ejemplo 1. (Esto se podría realizar simultáneamente con la flebotomía de la etapa 1).
2. Separar las PBMC usando una solución de Ficoll-Paque.

3. Tomar 3-5 millones de células por pocillo y dejar sin estimular (control negativo) o estimular durante 16 horas con mitógeno (control positivo) y derivado de proteína purificada (PPD) por duplicado. Después de 2 horas, añadir un compuesto bloqueante del aparato de Golgi, por ejemplo Monensina.
4. Teñir las células con un marcador de células vivas y a continuación con un cóctel de anticuerpos conjugados con fluorocromo frente a marcadores de superficie celular.
5. Fijar y permeabilizar las células y teñirlas con un cóctel de anticuerpos conjugados con fluorocromo frente a citoquinas intracelulares.
6. Adquirir al menos 1 millón de sucesos por pocillo en un citómetro de flujo.
7. Analizar los datos usando una estrategia de clasificación específica para este ensayo con un paquete de software de citometría de flujo, por ejemplo FlowJo, TreestarInc.

Discusión de los resultados de los Ejemplos 1-3

La interrogación detallada de los presentes inventores del fenotipo y la función de linfocitos T específicos de antígeno ha definido la asociación del estadio de enfermedad de TB a la inmunidad celular específica de MTB. Se asoció a ATB con un aumento de frecuencia de linfocitos T específicos de MTB CD4+ y CD8+ mono o difuncionales que segregan IFN-γ y/o TNF-α haciendo de estos subconjuntos biomarcadores potenciales de la actividad de la enfermedad.

La evaluación simultánea del fenotipo de memoria de células de respuesta proporcionó un sustituto más sensible y específico que el perfil funcional CD4+ solo. La expresión de CD45RA, CCR7 y CD127 en linfocitos T específicos de MTB que segregan solo IFN-γ o TNF-α fue más baja en aquellos con ATB. El fenotipo de memoria no se asoció de forma exclusiva al perfil funcional (excepto para células IL-2 solo que fueron principalmente T_{CM}) sino que se asoció estrechamente al estadio de TB subyacente. Por lo tanto, estos marcadores podrían servir como indicadores de la activación de TB.

La medición combinada tanto del perfil funcional como del fenotipo de diferenciación proporcionó una lectura inmunológica altamente discriminativa para ATB y LTBI. En aquellos con ATB, > 17,3 % de células CD4+ que segregan TNF-α solo específicas de PPD fueron CD45RA-CCR7-CD127- y por lo tanto este fenotipo se asoció fuertemente a la infección activada. Dado que las respuestas a PPD son menos específicas para la infección por MTB que las respuestas a los antígenos RD-1, esta firma de linfocitos T específicos de PPD se puede usar para distinguir TB de LTBI en la segunda etapa de una estrategia de ensayo diagnóstico de dos etapas, donde la infección por MTB se ha incluido en la etapa uno mediante un resultado positivo en un ensayo de inmunodiagnóstico basado en RD-1 (por ejemplo IGRA).

Los datos de los presentes inventores muestran que la frecuencia de células CD8+ específicas de MTB, y por lo tanto la proporción de pacientes con respuesta, aumentó en ATB y este enfoque mantiene la promesa de la discriminación del estadio de enfermedad de TB especialmente en infección conjunta con VIH donde todos los participantes tenían una respuesta positiva a péptidos de MTB. Sin embargo, esta asociación excluye la comparación de la función y el fenotipo combinados de células CD8+ específicas de MTB, debido a que los pacientes sin respuesta estaban principalmente por defecto en el grupo de LTBI. Por lo tanto, la medición de los subconjuntos funcionales de CD8+ en ATB y LTBI no fue suficientemente discriminativa para activo y LTBI en el grupo del presente estudio.

En este estudio, los presentes inventores incluyeron individuos con infección conjunta con VIH para comparar y distinguir el impacto de ATB en la inmunidad celular específica de MTB con el impacto de la infección conjunta con VIH. Cuando el impacto de células efectoras CD4+ específicas de MTB se vieron influidas por el estadio de enfermedad de TB, el impacto de la infección conjunta con VIH por sí mismo apenas estuvo asociado de forma significativa a estos cambios. Esto se puede deber parcialmente a la inclusión de pacientes que fueron tratados para infección por VIH.

Sin embargo, en el caso de CD127, la estratificación mediante el recuento de CD4 mostró que el estadio de la enfermedad de VIH influyó en la expresión de este marcador en linfocitos T específicos de MTB. Se observa una expresión reducida de CD127 en linfocitos T CD8+ específicos de VIH (en revisado en Crawley et ál. Immunol Cell Biol 23 de agosto de 2011. doi: 10,1038/icb.2011,66) y linfocitos T CD4+ (Dunham RM, et ál. J Immunol 2008; 180:5582-92) con el progreso de la enfermedad de VIH, pero no se había observado anteriormente ninguna relación entre el progreso de la enfermedad de VIH y la expresión de CD127. El descubrimiento de los presentes inventores indica que en la infección conjunta con VIH, las células CD4+ específicas de antígeno de MTB pierden la expresión de CD127 con el avance de la enfermedad de VIH y por lo tanto están potencialmente más diferenciadas. Este efecto podría ser inducido directamente por virus o de forma secundaria para aumentar la carga micobacteriana subclínica con el avance de la infección por VIH.

El grupo del presente estudio incluyó individuos con infección tanto pulmonar como extrapulmonar. La infección por VIH se asocia más habitualmente a diseminación de TB según se evidencia mediante la implicación extendida en algunos de estos individuos. A pesar de cierta variación en el fenotipo clínico de aquellos con ATB, el biomarcador de los presentes inventores distinguió de forma fiable el estadio de TB, independientemente del sitio de la

enfermedad, lo que sugiere que puede permanecer robusto a través del espectro de enfermedad de TB clínico y por lo tanto tener una amplia aplicabilidad. Ningún individuo con LTBI desarrolló ATB durante 12 meses de seguimiento lo que sugiere que, en el grupo del presente estudio (reclutado en un área no endémica de TB), no estuvo presente TB subclínica en aquellos clasificados como LTBI. La falta de cebado exógeno continuo o reestimulación debidos a la exposición de TB distingue el grupo del presente estudio de otros reclutados en áreas endémicas de TB y retira esto como posible efecto de confusión en los cambios inmunológicos que observan los presentes inventores.

A través de la disección del impacto de la variación del estadio de TB como sustituto para la carga patogénica micobacteriana, con y sin infección conjunta con VIH, los presentes inventores han identificado cambios celulares que son altamente sensibles a la actividad de TB.

Ejemplo 6: Correlación inversa con el tiempo desde la exposición estimada a TB.

En un trabajo adicional llevado a cabo entre un grupo completamente distinto de individuos sin infectar con VIH con infección de TB latente (LTBI) (Tabla 3), los presentes inventores han demostrado que la firma inmunológica de la proporción de linfocitos T TNF-α solo específicos de PPD o específicos de ECR que son CD45RA-CCR7-CD127-, correlaciona inversamente con el tiempo desde la exposición estimada a TB (Figuras (a) y (b)).

"ECR" se refiere a la combinación de ESAT-6 y CFP-10 y Rv3615c (conocida de otro modo como EspC). Cada uno de estos es un antígeno que se reconoce fuerte y ampliamente por los linfocitos T en personas infectadas con MTB pero no en personas sin infectar con MTB vacunadas con BCG. Por lo tanto, a diferencia de PPD, ECR es un cóctel específico de MTB de antígenos de linfocitos T.

Este segundo grupo incluye contactos recientes (< 6 meses) de casos de TB pulmonar conocidos e individuos de países con alta incidencia de TB que han estado en el Reino Unido durante al menos 2 años sin ninguna exposición a TB conocida en ese tiempo (contactos "remotos"). Para los contactos remotos, el tiempo desde la entrada al Reino Unido se usó como medida indicadora para el tiempo desde la exposición a TB. Dado el riesgo mucho mayor de progreso a enfermedad de TB en los primeros pocos años después de la infección con MTB, y el descenso del riesgo a lo largo del tiempo después de eso, la nueva firma de linfocitos T del inventor puede estratificar individuos con LTBI mediante su probabilidad de desarrollar la enfermedad.

Tabla 3. Características demográficas del grupo de LTBI sin infectar con VIH.

ID de paciente	**Edad**	**Sexo**	**TST (+/-)**	**IGRA (+/-)**	**Etnia**	**Tiempo desde exposición a TB***
T1002	57	M	+	+	Negra caribeña	5 meses
T1070	50	M	+	+	Blanca (Británica)	2 meses
T1204	21	F	+	+	Bangladesh	1 mes
T1208	24	M	+	+	Blanca (Británica)	4 meses
T1215	22	M	+	+	Blanca (Británica)	4 meses
T1263	41	M	+	+	Blanca (Británica)	3 meses
T496	33	M	NT	+	Blanca (Europa del este)	6 meses
T508	31	F	+	+	Blanca (Europa del oeste)	2 meses
T566	30	M	+	+	Hispánica (América del Sur)	4 meses
T846	43	F	+	NT	Negra caribeña	En curso
T854	44	M	+	+	Blanca (Británica)	3 meses
T475	29	M	NT	+	India	3 meses
T505	40	F	+	+	Negra africana	2 meses
T752	41	F	+	+	Asiática (otras)	En curso
T845	33	M	-	-	Negra africana	3 meses
T1044	35	F	-	+	Negra africana	2 años
T1169	53	M	+	+	Medio este (otras)	28 años
T1224	25	M	NT	+	India	3 años
T1225	21	F	NT	+	China	7 años

T1234	24	F	NT	+	India	3 años
T1235	24	M	NT	+	India	2 años
T1250	26	F	NT	+	India	3 años
T1265	25	M	+	+	India	3 años
T489	36	F	+	+	Negra africana	14 años
T491	34	F	NT	+	Negra africana	13 años
T515	37	M	-	+	Asiática (otras)	2 años
T957	29	F	+	+	Pakistaní	2 años
T1206	26	M	-	+	Asiática (otras)	2 años

M: masculino; F: femenino; NT: no sometido a ensayo
* Estimado basándose en el tiempo desde la exposición a un caso de índice de TB conocido (para contactos recientes) o el tiempo desde la emigración de un país con alta incidencia de TB (para contactos remotos).

Referencias

Caccamo, N., G. Guggino, et ál. (2009). "Analysis of Mycobacterium tuberculosis-specific CD8 T-cells in patients with active tuberculosis and in individuals with latent infection." PLoS One 4(5): e5528.

Casey, R., D. Blumenkrantz, et ál. "Enumeration of functional T-cell subsets by fluorescence-immunospot defines signatures of pathogen burden in tuberculosis." PLoS One 5(12): e15619.

Chapman, A. L., M. Munkanta, et ál. (2002). "Rapid detection of active and latent tuberculosis infection in HIV-positive individuals by enumeration of Mycobacterium tuberculosis-specific T cells." AIDS 16(17): 2285-2293.

Cobelens, F. G., S. M. Egwaga, et ál. (2006). "Tuberculin skin testing in patients with HIV infection: Limited benefit of reduced cutoff values." Clinical Infectious Diseases 43(5): 634-639.

Diel, R., D. Goletti, et ál. (2011). "Interferon-gamma release assays for the diagnosis of latent Mycobacterium tuberculosis infection: a systematic review and meta-analysis." Eur Respir J 37(1): 88-99.

Dinnes, J., J. Deeks, et ál. (2007). "A systematic review of rapid diagnostic tests for the detection of tuberculosis infection." Health technology assessment 11 (3): 1-196.

Dosanjh, D. P., M. Bakir, et ál. (2011). "Novel M tuberculosis antigen-specific T-cells are early markers of infection and disease progression." PLoS One 6(12): e28754.

Dosanjh, D. P., T. S. Hinks, et ál. (2008). "Improved diagnostic evaluation of suspected tuberculosis." Ann Intern Med 148(5): 325-336.

Goletti, D., O. Butera, et ál. (2006). "Region of difference 1 antigen-specific CD4+ memory T cells correlate with a favorable outcome of tuberculosis." J Infect Dis 194(7): 984-992.

Harari, A., S. Petitpierre, et ál. (2004). "Skewed representation of functionally distinct populations of virus-specific CD4 T cells in HIV-1-infected subjects with progressive disease: changes after antiretroviral therapy." Blood 103(3): 966-972.

Harari, A., V. Rozot, et ál. "Dominant TNF-alpha+ Mycobacterium tuberculosis-specific CD4+ T cell responses discriminate between latent infection and active disease." Nat Med 17(3): 372-376.

HPA. (2011). "Tuberculosis in the UK." Tomado en diciembre de 2011, de http://www.hpa.org.uk/webc/HPAweb-File/HPAweb_C/1317131791612.

Millington, K. A., J. A. Innes, et ál. (2007). "Dynamic relationship between IFNgamma and IL-2 profile of Mycobacterium tuberculosis-specific T cells and antigen load." J Immunol 178(8): 5217-5226.

Mueller, H., A. K. Detjen, et ál. (2008). "Mycobacterium tuberculosis-specific CD4+, IFNgamma+, and TNFalpha+ multifunctional memory T cells coexpress GM-CSF." Cytokine 43(2): 143-148.

Wang, X., Z. Cao, et ál. (2010). "Association of mycobacterial antigen-specific CD4(+) memory T cell subsets with outcome of pulmonary tuberculosis." The Journal of infection 60(2): 133-139.

WHO. (2011). "TB/HIV facts" Tomado en diciembre de 2011, 2011, de http://www.who.int/tb/challenges/hiv/factsheet hivtb 2011.pdf.

Crawley, A. M. and Angel, J. B. "Expression of gamma-chain cytokine receptors on CD8(+) T cells in HIV infection with a focus on IL-7Ralpha (CD127)", Immunol Cell Biol, 23 de agosto de 2011. doi: 10.1038/icb.2011.66

REIVINDICACIONES

1. Método *in vitro* de determinación del estado de infección de tuberculosis (TB) en un individuo, que comprende:

(i) proporcionar una muestra que comprende linfocitos T;
(ii) exponer la muestra de (i) a uno o más antígenos de TB;
(iii) identificar los linfocitos T en la muestra que son CD4 positivo y (a) segregan TNF-α sin segregar IFN-γ; o (b) segregan IFN-γ sin segregar TNF-α;
(iv) identificar las células de (iii) que también son CCR7 y CD127 negativos; y opcionalmente
(v) calcular las células identificadas en (iv) como un porcentaje de las identificadas en (iii);

en el que la identificación de las células en (iv) y/o el porcentaje de células calculado en (v) se correlaciona con el estado de infección de TB del individuo, y en el que las etapas (iii) y (iv) se pueden llevar a cabo secuencial o simultáneamente.

2. El método de la reivindicación 1 en el que: (a) las células identificadas en la etapa (iv) son además CD45RA negativo; y/o (b) las células identificadas en la etapa (iii) además no segregan IL-2; y/o (c) las células identificadas en la etapa (iii) son además CD3 positivo; y/o (d) los linfocitos T identificados en la etapa (iii) se identifican como linfocitos T vivos, preferentemente mediante el uso de un marcador de células muertas; y/o (e) el estado de infección de TB determinado mediante el método corresponde a la presencia o la ausencia de infección de TB, en donde opcionalmente la identificación de una o más células en la etapa (iii) determina la presencia de infección de TB.

3. El método de cualquier reivindicación anterior en el que el estado de infección de TB determinado mediante el método corresponde a la presencia de una infección de TB activa o una infección de TB latente.

4. El método de la reivindicación 3 en el que la identificación de células en la etapa (iv) corresponde a la presencia de una infección de TB activa o una infección de TB latente, en el que opcionalmente la identificación de una o más células en la etapa (iv) determina la presencia de una infección de TB activa o la identificación de ninguna célula en la etapa (iv) determina la presencia de una infección de TB latente.

5. El método de la reivindicación 3 en el que los valores porcentuales calculados en la etapa (v) que determinan la presencia de una infección de TB activa son mayores que los valores porcentuales calculados en la etapa (v) que determinan la presencia de una infección de TB latente.

6. El método de las reivindicaciones 3 y 5 en el que el estado de infección de TB corresponde a una infección de TB activa cuando el porcentaje calculado en la etapa (v) es al menos de un 10 % a un 40 %, al menos de un 10 % a un 17,4 %, o al menos un 17,4 %.

7. El método de las reivindicaciones 3 y 5 en el que el estado de infección de TB corresponde a una infección de TB latente cuando el porcentaje calculado en la etapa (v) es menor o igual a de un 10 % a un 40 %, menor o igual a de un 17,3 % a un 40 % o menor o igual a un 17,3 %.

8. El método de cualquier reivindicación anterior en el que el estado de infección de TB determinado mediante el método corresponde al riesgo de que una infección de TB latente progrese a una infección de TB activa, en el que opcionalmente el riesgo de que una infección de TB latente progrese a una infección de TB activa es proporcional al valor porcentual calculado en la etapa (v) del método.

9. El método de cualquier reivindicación anterior en el que el estado de infección de TB determinado mediante el método corresponde a la cantidad de tiempo transcurrido desde que el individuo se infectó originariamente con TB, en donde opcionalmente el tiempo transcurrido desde que el individuo se infectó originariamente con TB es inversamente proporcional al valor porcentual calculado en la etapa (v).

10. El método de cualquier reivindicación anterior en el que:

(a) el individuo está infectado con VIH; y/o
(b) el individuo se ha infectado con TB en cualquier sitio; y/o
(c) la muestra es una muestra de sangre (preferentemente una muestra de PBMC), una muestra de lavado broncoalveolar (BAL) o una muestra de líquido cefalorraquídeo (CSF); y/o
(d) el método es un 70-100 % (preferentemente un 100 %) sensible; y/o
(e) el método es un 80-100 % (por ejemplo un 93 %) específico; y/o
(f) las etapas (iii) y/o (iv) se llevan a cabo mediante citometría de flujo de múltiples parámetros; y/o
(g) se lleva a cabo en primer lugar una etapa adicional con el fin de determinar que la muestra de células está infectada con TB o bien se obtiene de un sujeto infectado con TB, en donde opcionalmente la etapa adicional se lleva a cabo usando una plataforma ELISpot, un ensayo de liberación de interferón gamma (IGRA) y/o un ensayo de piel de tuberculina.

11. Composición que comprende una pluralidad de anticuerpos o de fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen a cada uno de CD4, CCR7, CD127, TNF-α e IFN-γ y en donde la pluralidad comprende anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que son individualmente específicos para cada uno de CD4, CCR7, CD127, TNF-α e IFN-γ.

12. La composición de la reivindicación 11 en la que:

(a) la pluralidad de anticuerpos o de fragmentos de unión a antígeno de los mismos se unen además a CD45RA y en donde la pluralidad comprende además anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que son individualmente específicos para CD45RA; y/o
(b) la pluralidad de anticuerpos o de fragmentos de unión a antígeno de los mismos se unen además a IL-2 y en donde la pluralidad comprende además anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que son individualmente específicos para IL-2; y/o
(c) la pluralidad de anticuerpos o de fragmentos de unión a antígeno de los mismos se unen además a CD3 y en donde la pluralidad comprende además anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que son individualmente específicos para CD3; y/o
(d) los anticuerpos o los fragmentos de unión a antígeno de los mismos se seleccionan entre el grupo que consiste en fragmentos Fv, fragmentos scFv, Fab, dominios variables individuales y anticuerpos de dominio; y/o
(e) los anticuerpos o los fragmentos de unión a antígeno de los mismos con una especificidad particular se pueden detectar por separado de aquellos con una especificidad diferente; y/o
(f) los anticuerpos o los fragmentos de unión a antígeno de los mismos se pueden detectar visualmente; y/o
(g) los anticuerpos o los fragmentos de unión a antígeno de los mismos están etiquetados (por ejemplo con una etiqueta fluorescente).

13. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 11 o 12, o una composición que comprende una pluralidad de anticuerpos o de fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen a cada uno de CD4, CCR7 y CD127 y en donde la pluralidad comprende anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que son individualmente específicos para cada uno de CD4, CCR7 y CD127, para su uso en el tratamiento de una infección de TB en donde el uso comprende identificar si el sujeto tiene una infección de TB activa o latente y posteriormente administrar el tratamiento más apropiado para esa infección.

14. Kit para determinar el estado de infección de tuberculosis (TB) en un individuo, que comprende:

(a)

(i) una composición que comprende una pluralidad de anticuerpos o de fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen a cada uno de CD4, CCR7 y CD127 y en donde la pluralidad comprende anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que son individualmente específicos para cada uno de CD4, CCR7 y CD127; y
(ii) una composición que comprende una pluralidad de anticuerpos o de fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen a cada uno de TNF-α e IFN-γ y en donde la pluralidad comprende anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que son individualmente específicos para cada uno de TNF-α e IFN-γ; o

(b)

(i) una composición que comprende una pluralidad de anticuerpos o de fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen a cada uno de CD4, TNF-α e IFN-γ y en donde la pluralidad comprende anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que son individualmente específicos para cada uno de CD4, TNF-α e IFN-γ; y
(ii) una composición que comprende una pluralidad de anticuerpos o de fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen a cada uno de CCR7 y CD127 y en donde la pluralidad comprende anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que son individualmente específicos para cada uno de CCR7 y CD127; o

(c)

(i) una composición que comprende una pluralidad de anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen a cada uno de CD4, CCR7, CD127, TNF-α e IFN-γ y en donde la pluralidad comprende anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que son individualmente específicos para cada uno de CD4, CCR7, CD127, TNF-α e IFN-γ; y

(d) instrucciones para su uso; en donde opcionalmente:

la pluralidad de anticuerpos o de fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la composición de (i) y/o (ii) se unen además a uno o más de CD3, CD45RA y/o IL-2 y comprende además anticuerpos o fragmentos

de unión a antígeno de los mismos que son individualmente específicos para cada uno de los uno o más de CD3, CD45RA y/o IL-2; y/o que comprende además uno o más antígenos de TB, un discriminador de células vivas y/o muertas y/o un control positivo.

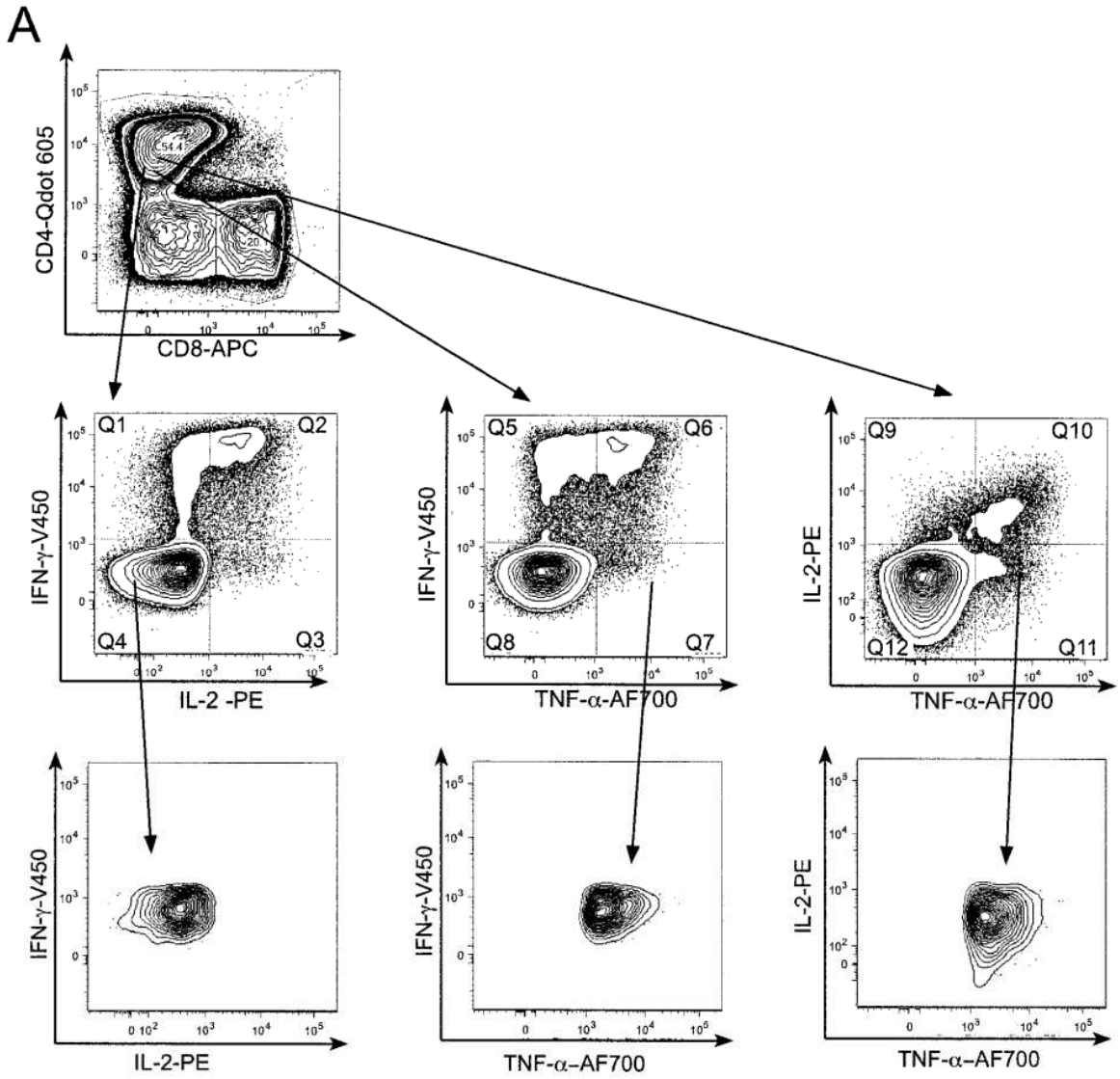

A
CD4-Qdot 605
CD8-APC
54.4
20
Q1
Q2
Q4
Q3
IFN-γ-V450
IL-2 -PE
Q5
Q6
Q8
Q7
IFN-γ-V450
TNF-α-AF700
Q9
Q10
Q12
Q11
IL-2-PE
TNF-α-AF700
IFN-γ-V450
IL-2-PE
IFN-γ-V450
TNF-α–AF700
IL-2-PE
TNF-α–AF700

Figura 1

B

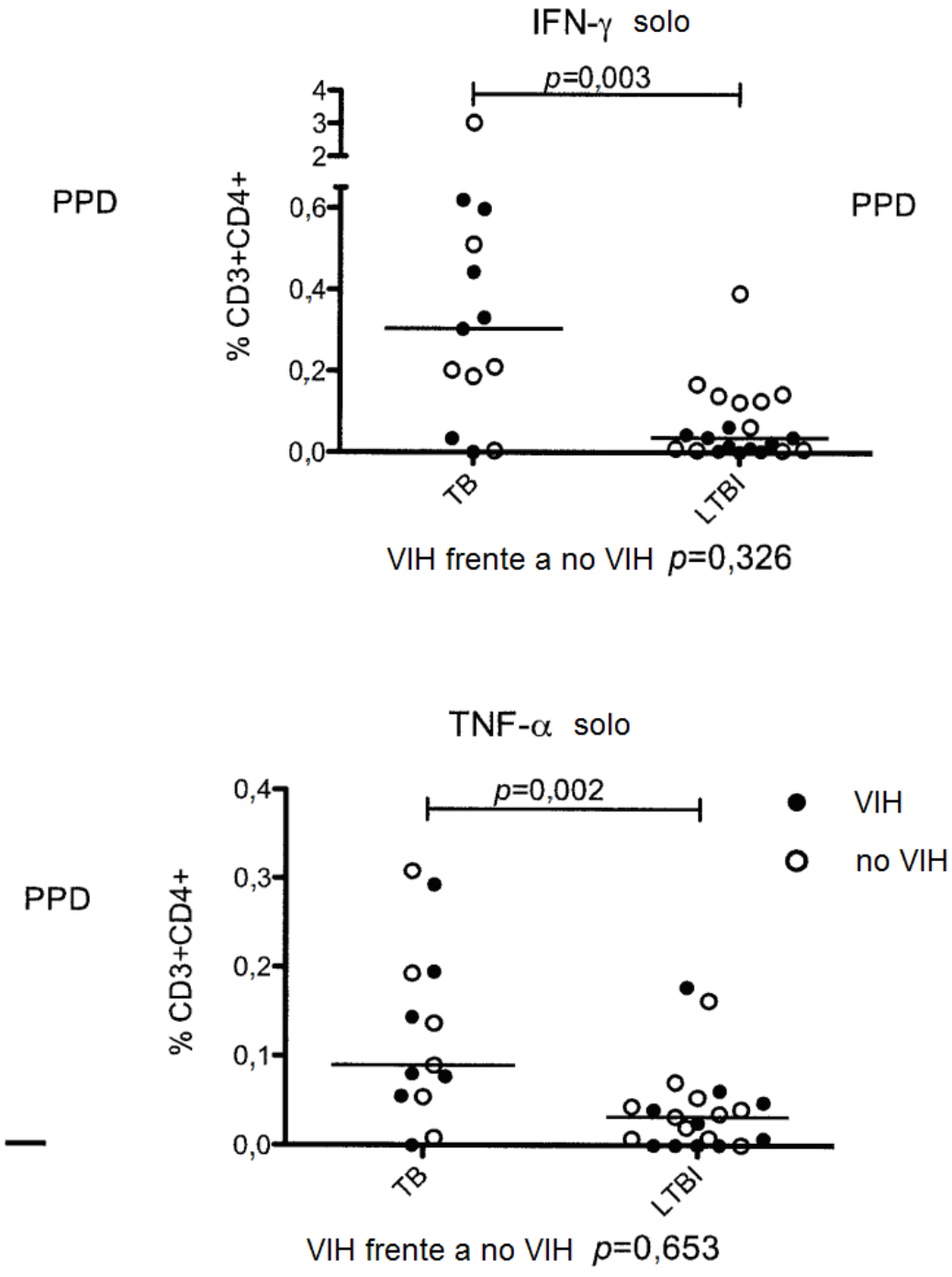
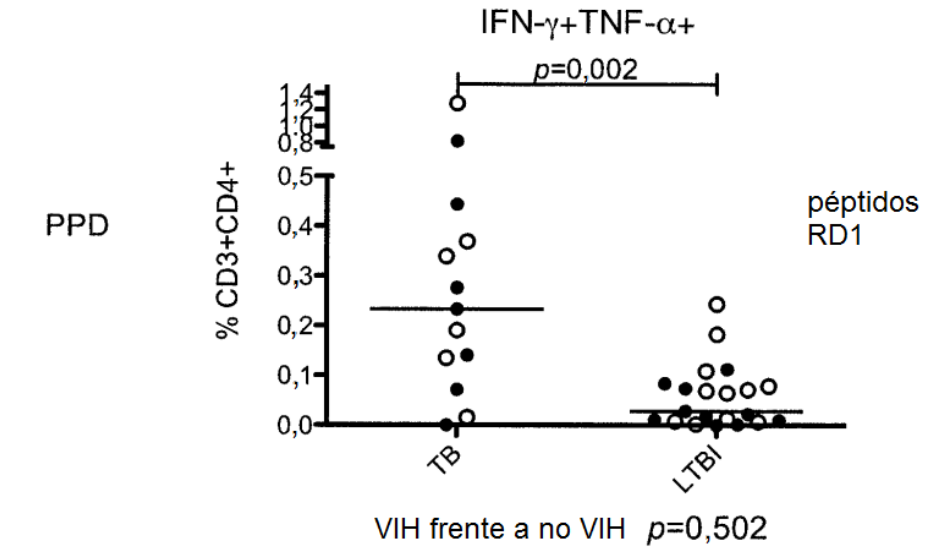


Figura 1 (cont.)

B*(cont.)*



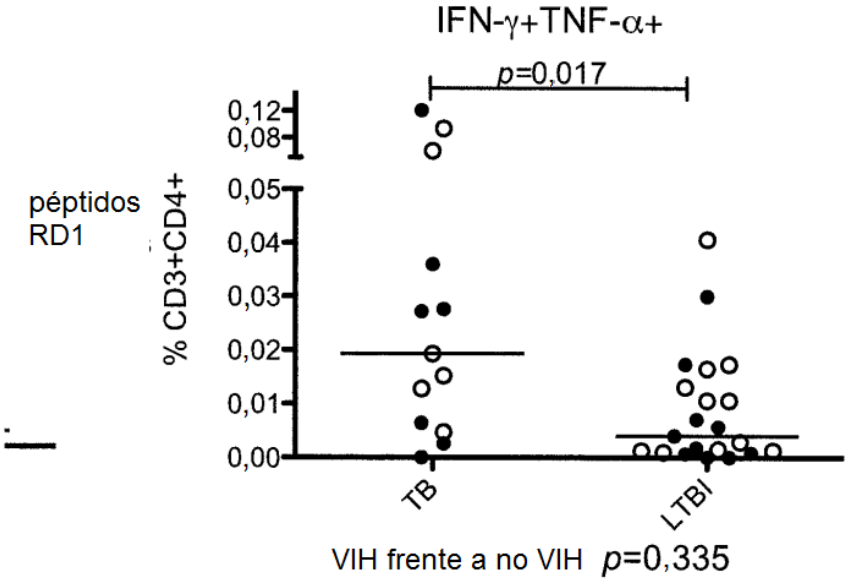


Figura 1 (cont.)

C

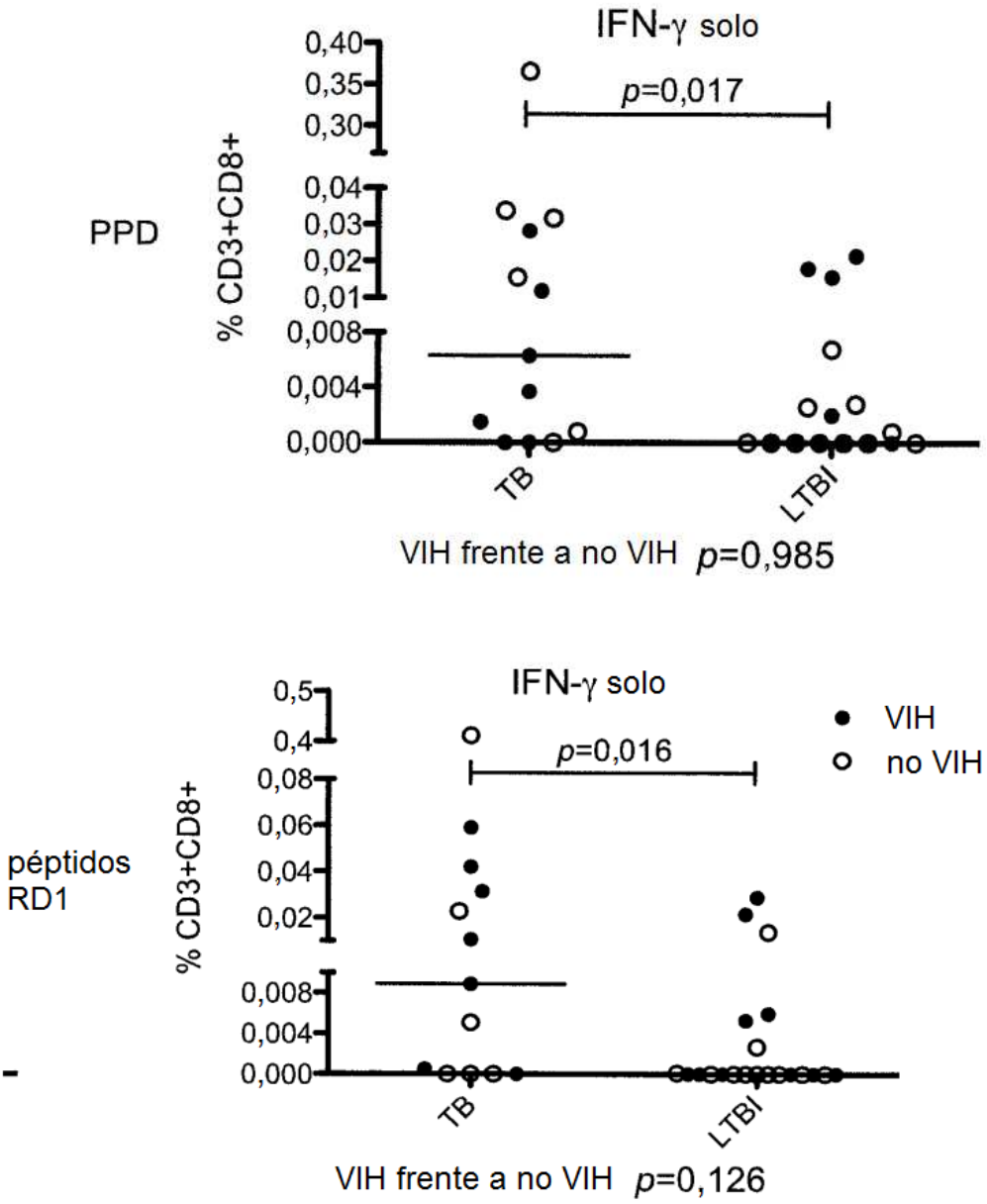


Figure 1 (con't)

C *(cont.)*

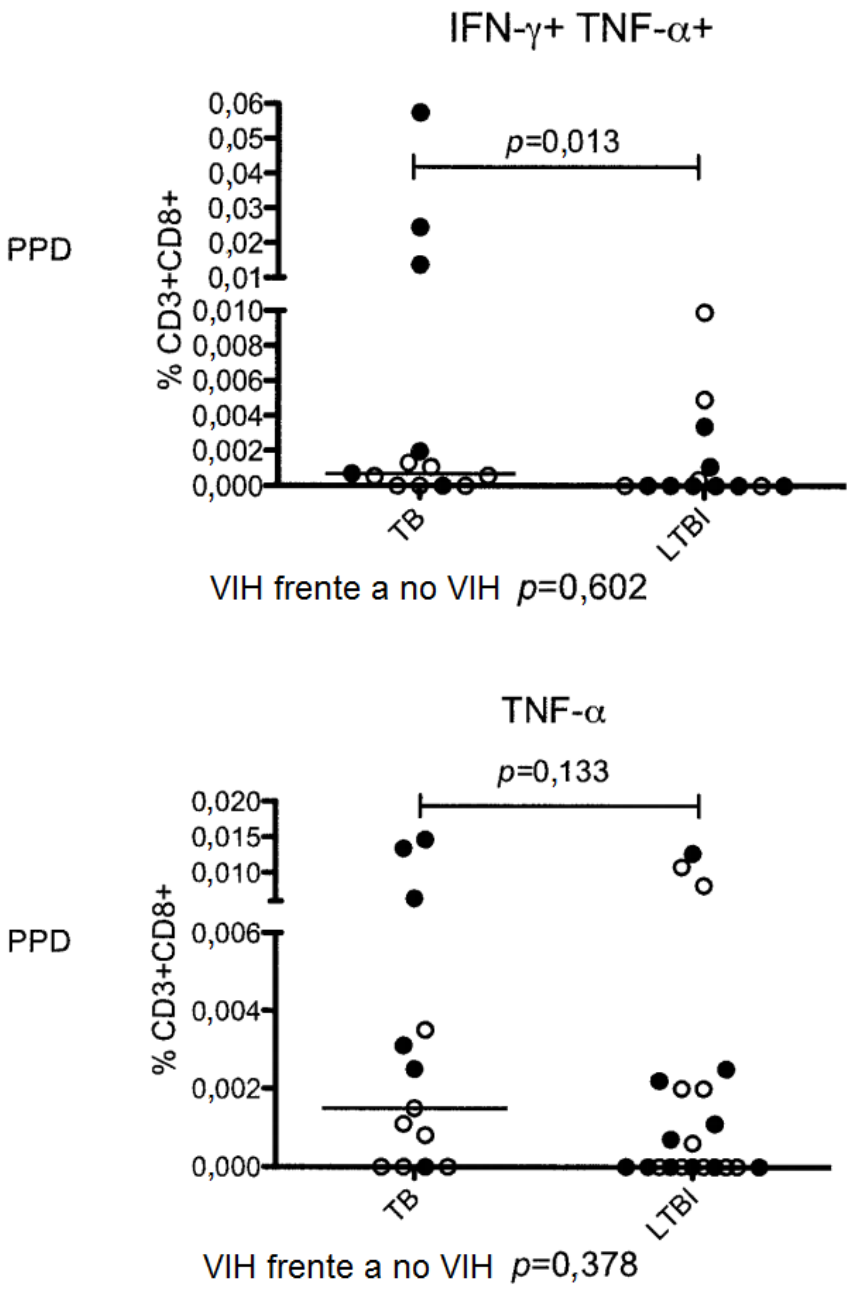


Figura 1 (cont.)

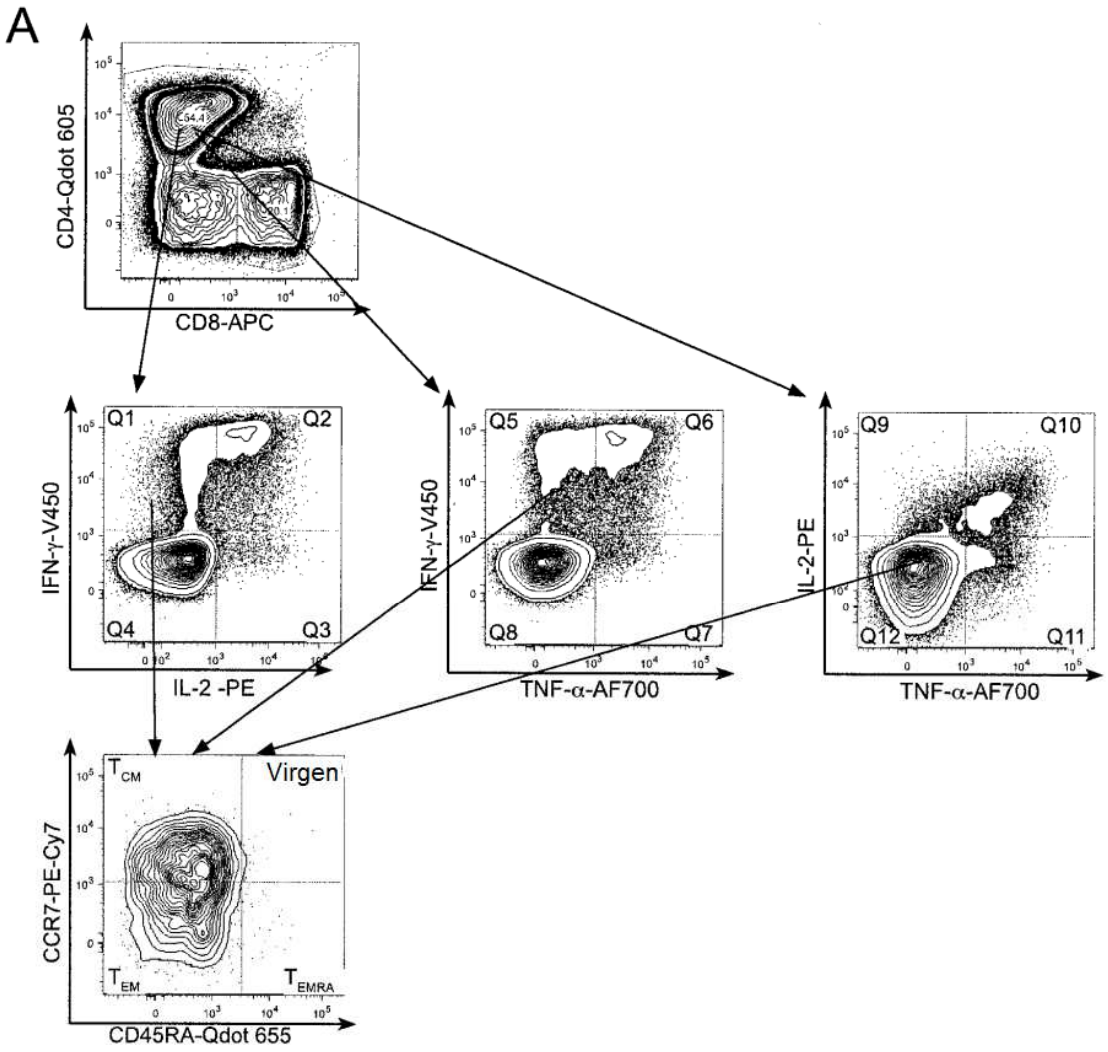
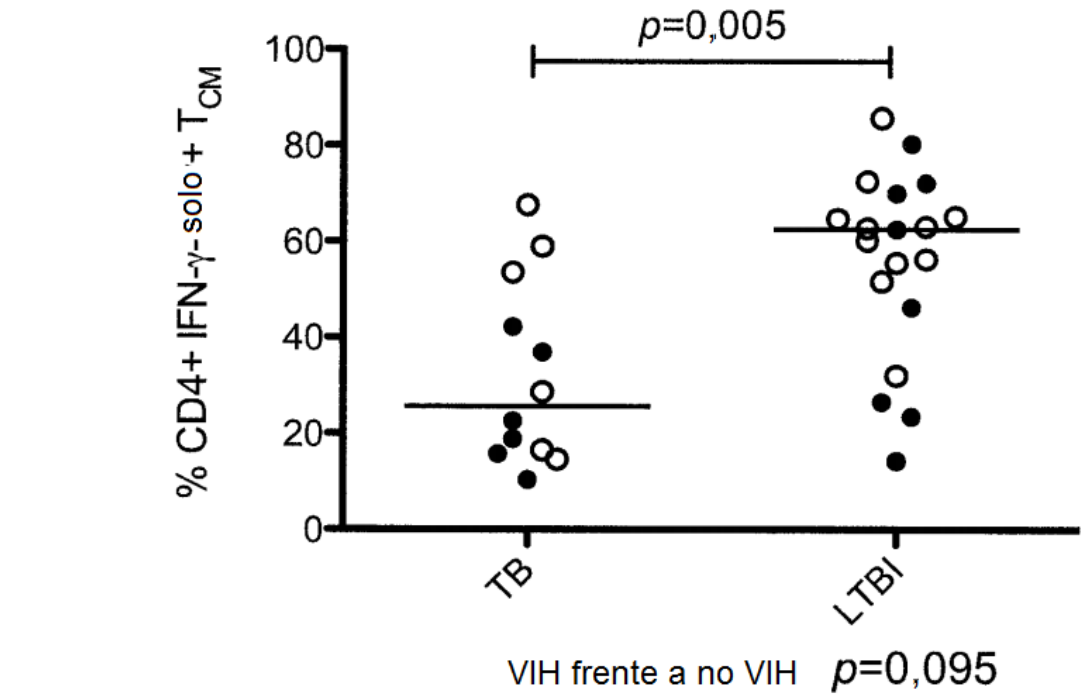

A
CD4-Qdot 605
CD8-APC
54.1
Q1
Q2
Q4
Q3
IFN-γ-V450
IL-2 -PE
Q5
Q6
Q8
Q7
IFN-γ-V450
TNF-α-AF700
Q9
Q10
Q12
Q11
IL-2-PE
TNF-α-AF700
T CM
Virgen
T EM
T EMRA
CCR7-PE-Cy7
CD45RA-Qdot 655

Figura 2

B



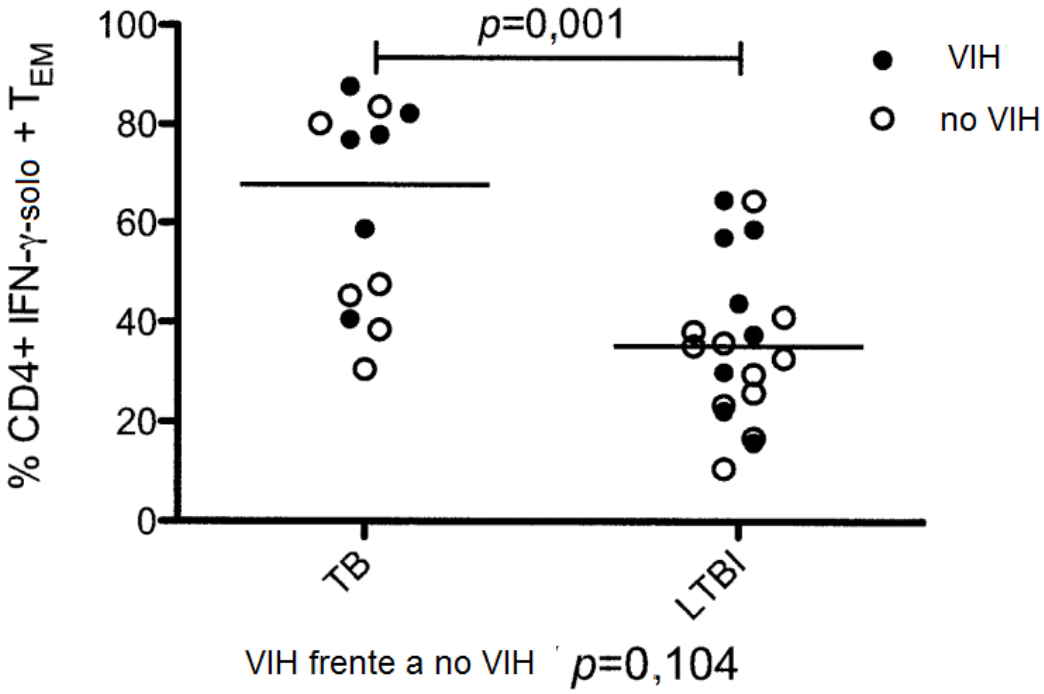
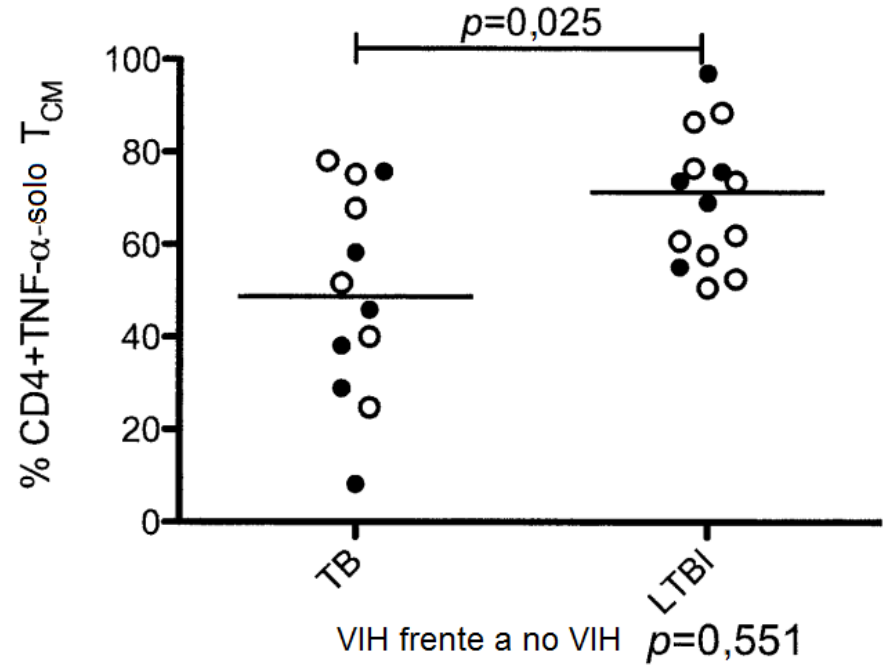


Figura 2 (cont.)

B ***(cont.)***



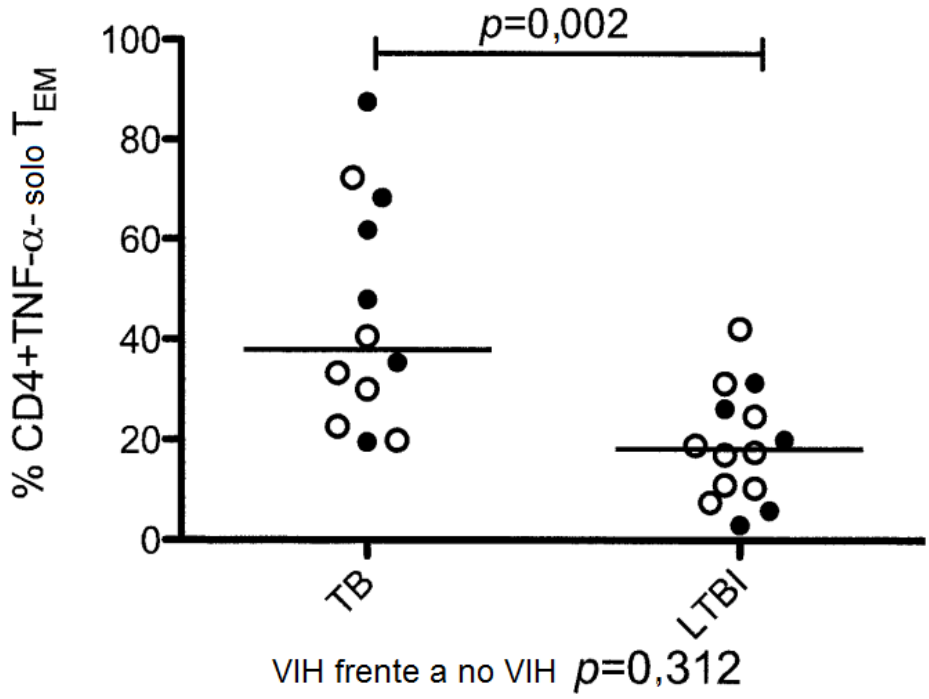
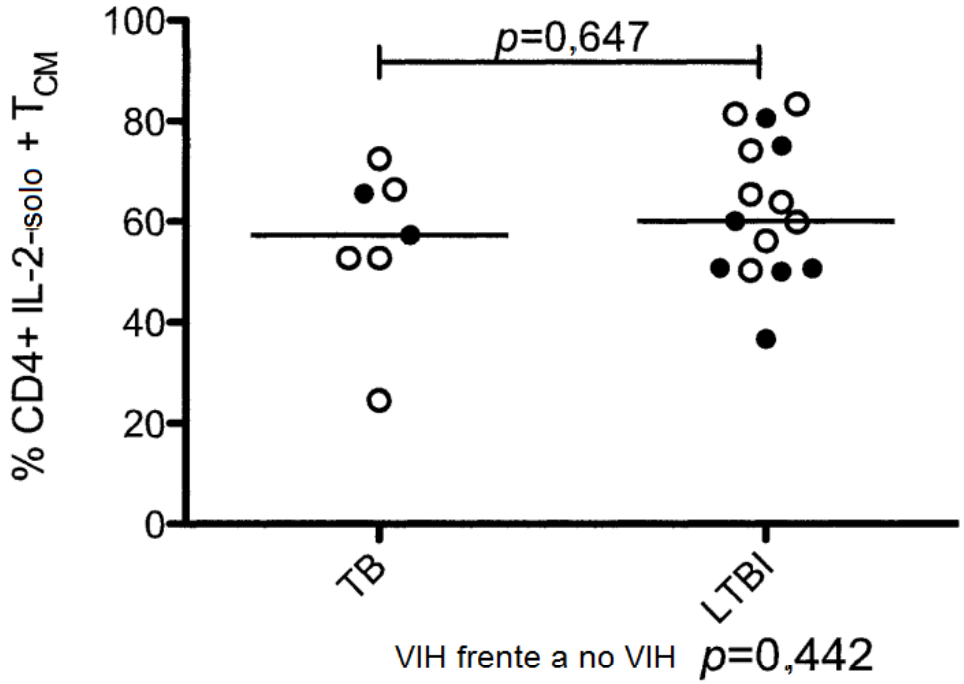


Figura 2 (cont.)

B ***(cont.)***



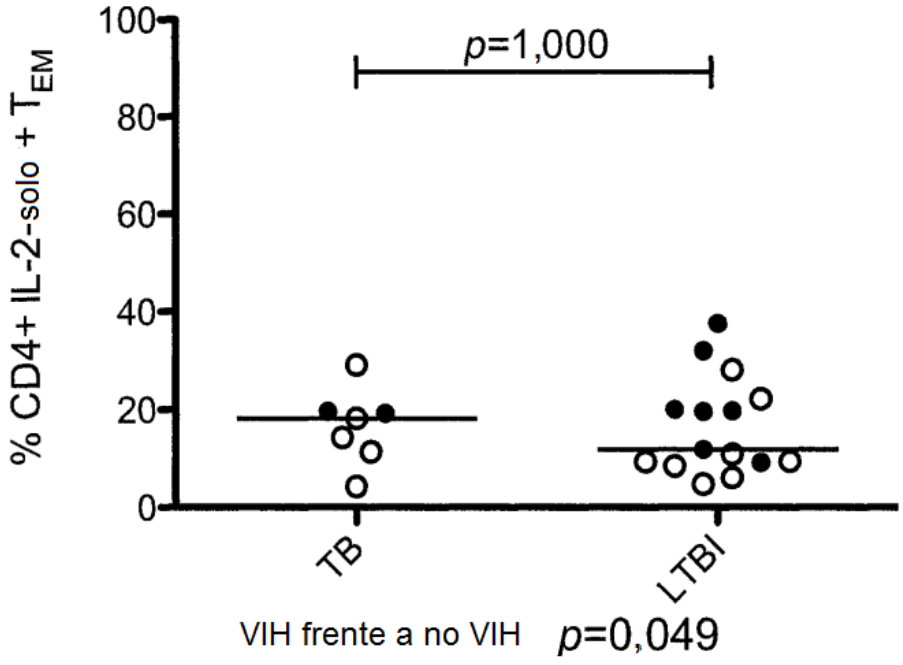


Figura 2 (cont.)

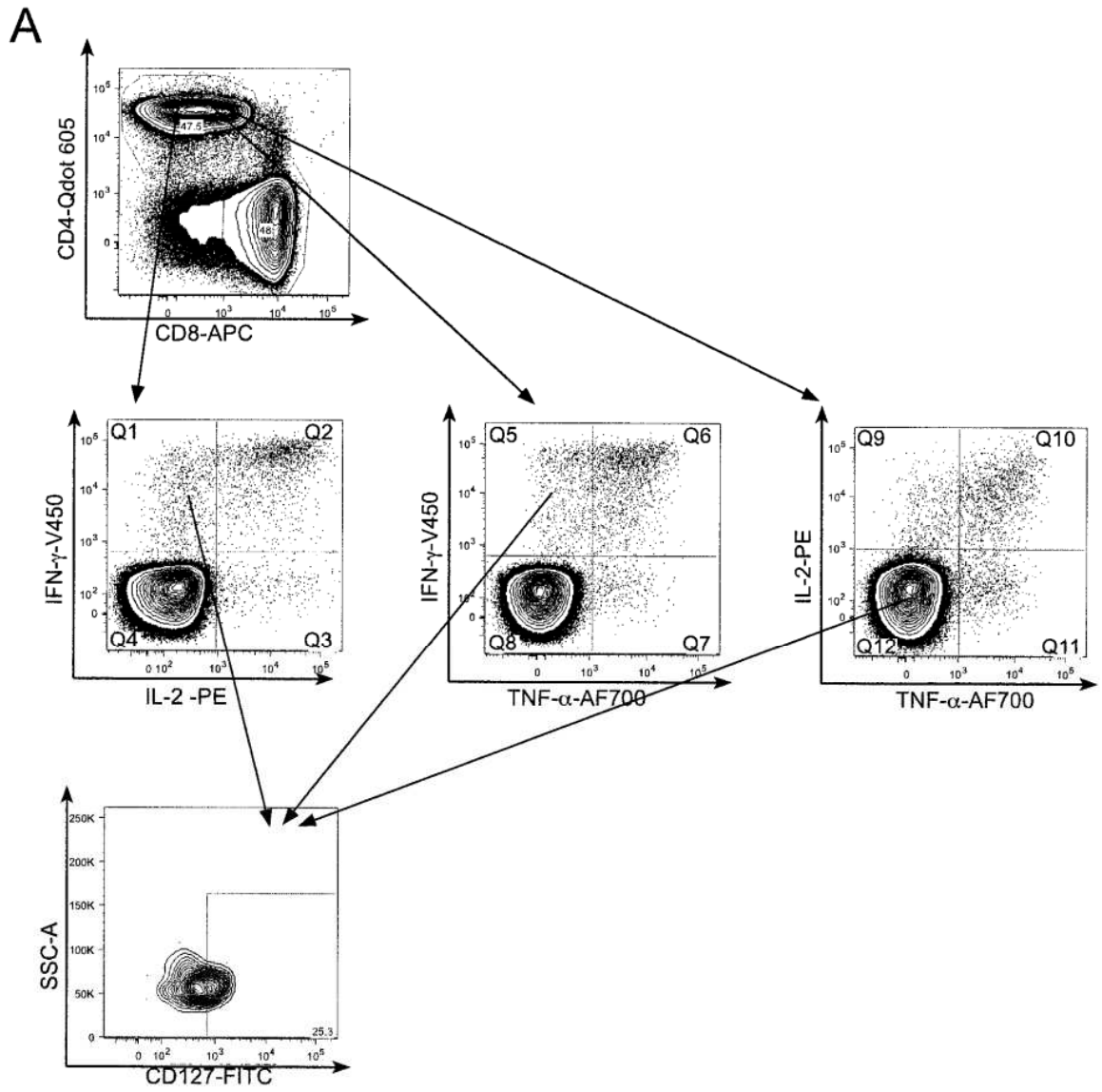


Figura 3 (cont.)

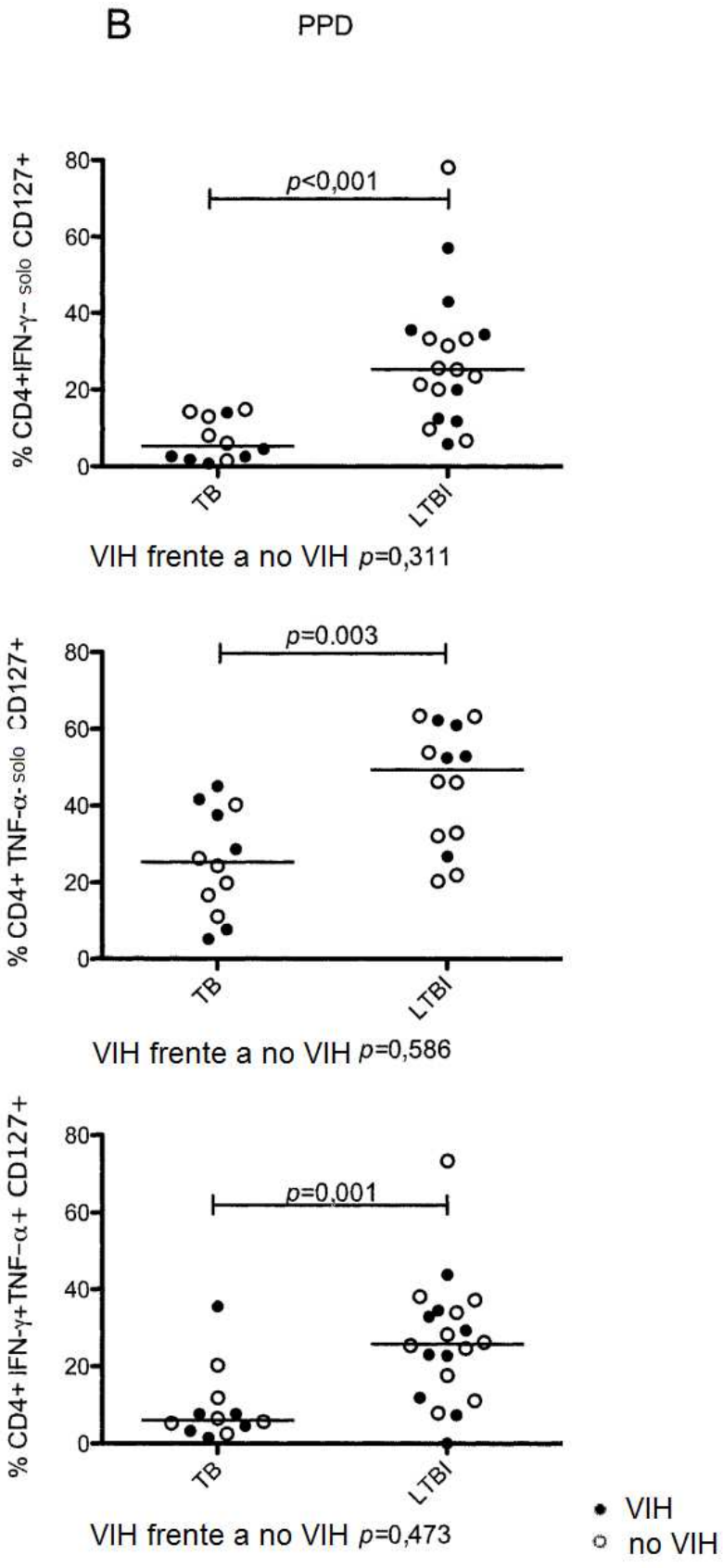
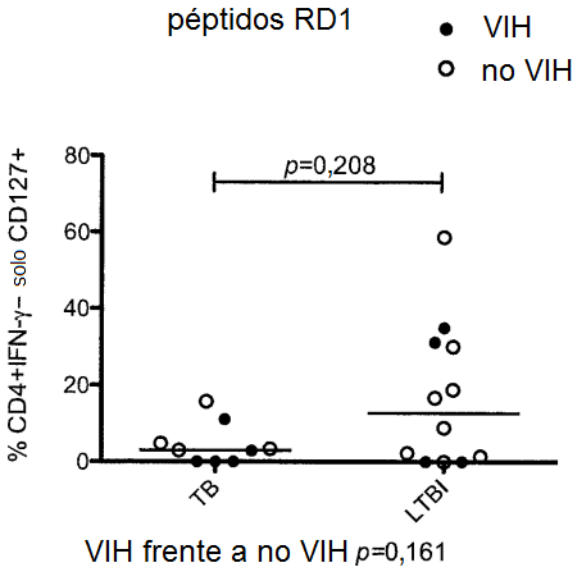
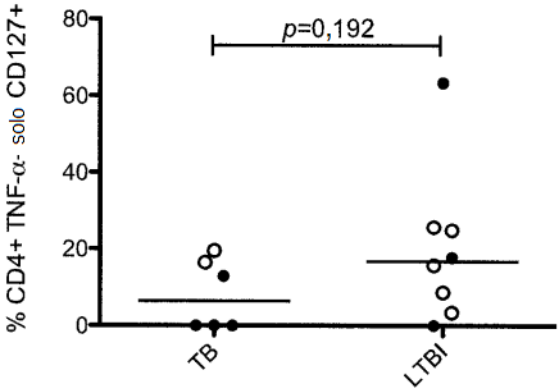


Figura 3 (cont.)

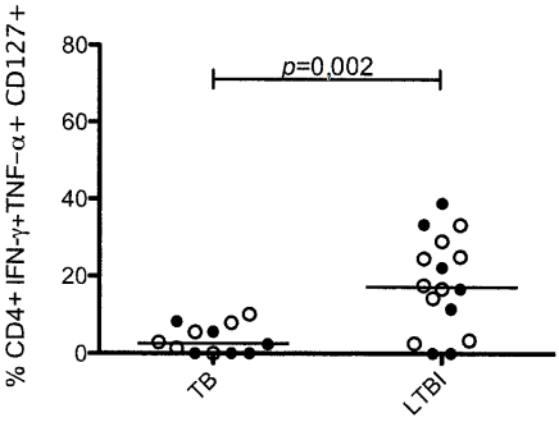
B *(cont.)*



VIH frente a no VIH p=0,161



VIH frente a no VIH p=0,137



VIH frente a no VIH p=0,297

Figura 3 (cont.)

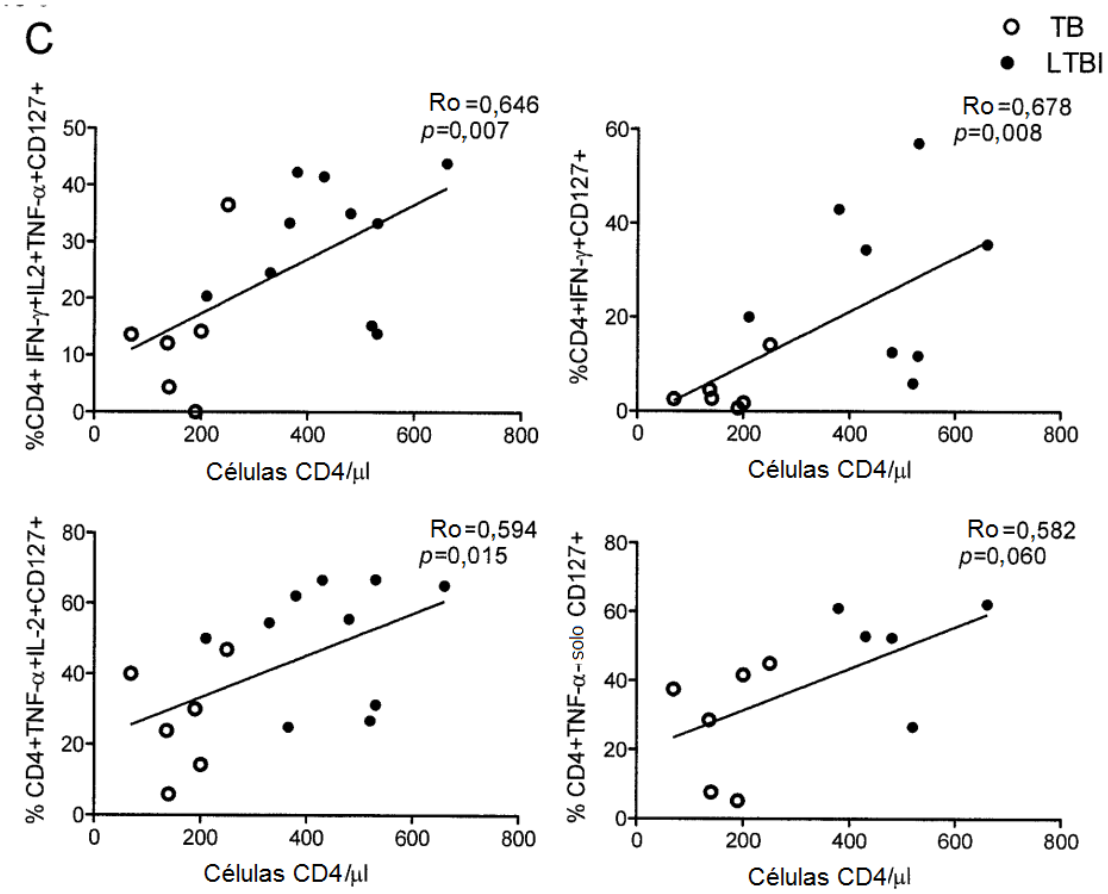


Figura 3 (cont.)

A

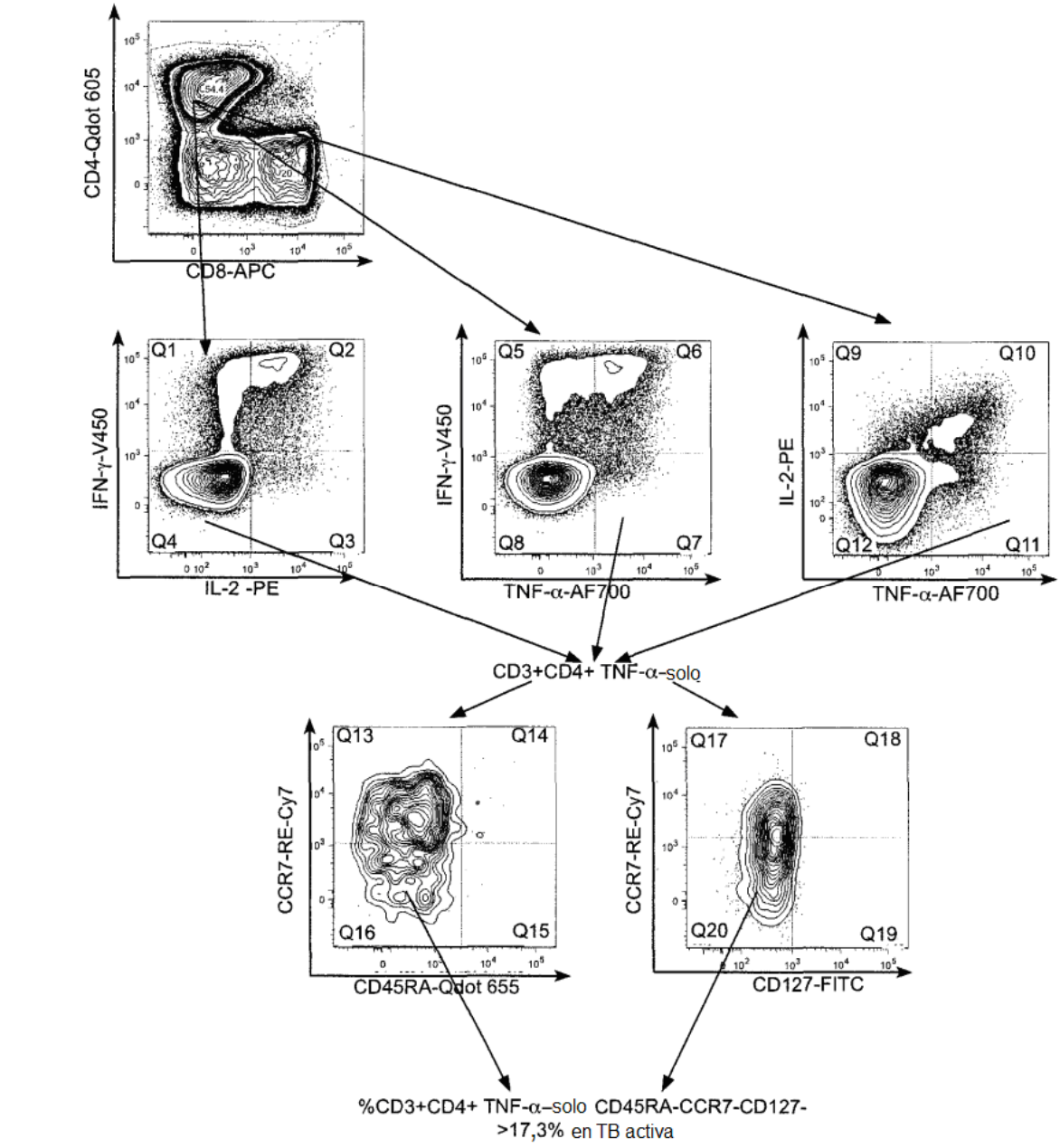

CD4-Qdot 605
CD8-APC
IFN-γ-V450
IL-2 -PE
Q1
Q2
Q4
Q3
IFN-γ-V450
TNF-α-AF700
Q5
Q6
Q8
Q7
IL-2-PE
TNF-α-AF700
Q9
Q10
Q12
Q11
CD3+CD4+ TNF-α-solo
CCR7-RE-Cy7
CD45RA-Qdot 655
Q13
Q14
Q16
Q15
CCR7-RE-Cy7
CD127-FITC
Q17
Q18
Q20
Q19
%CD3+CD4+ TNF-α–solo CD45RA-CCR7-CD127-
>17,3% en TB activa

Figura 4

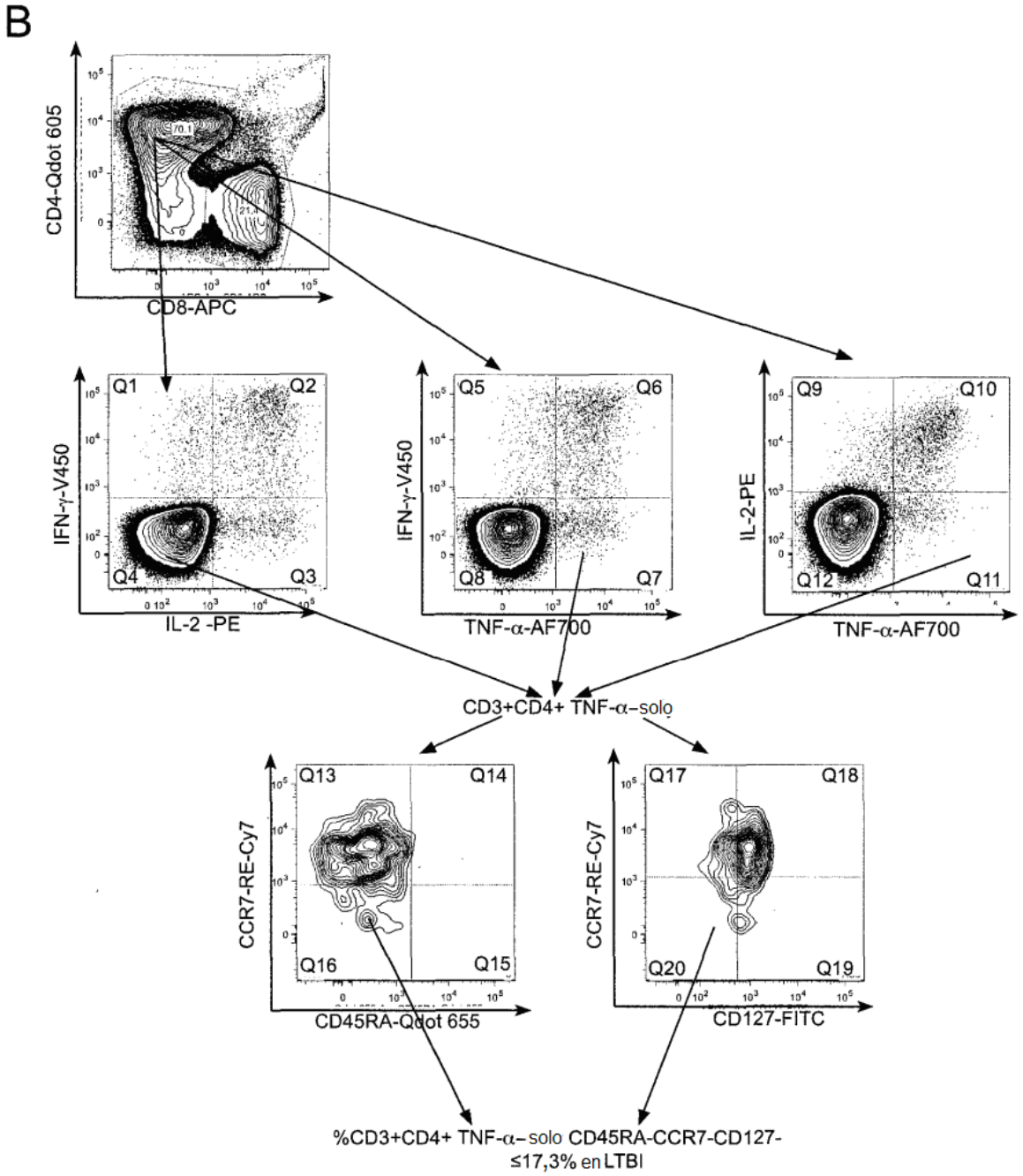
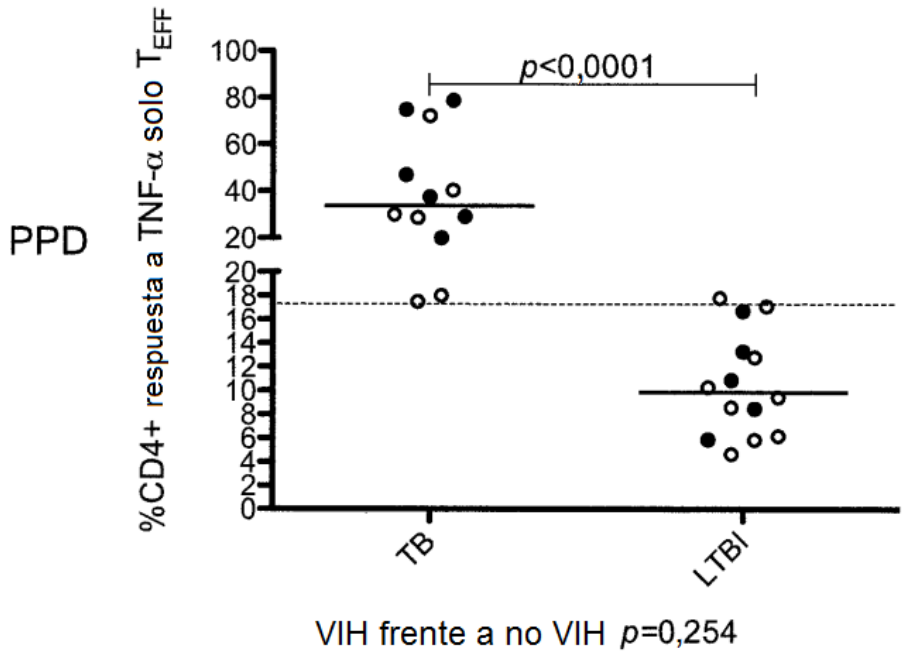


Figura 4 (cont.)

C



● VIH

○ no VIH

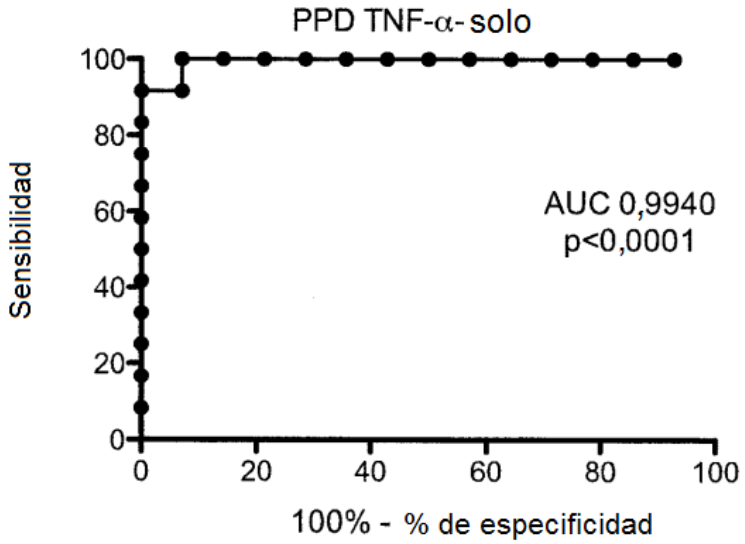
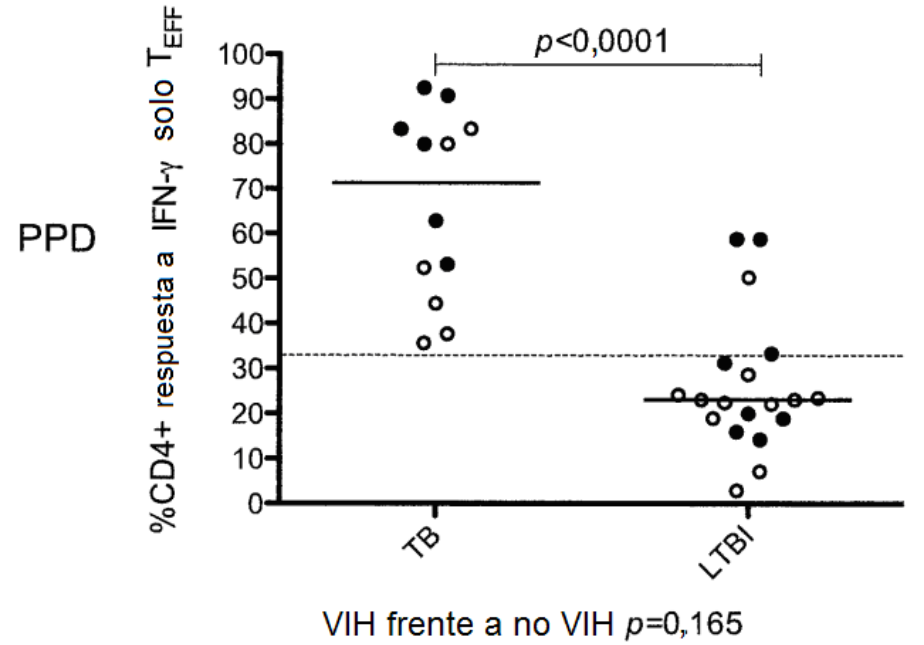


Figura 4 (cont.)

C *(cont.)*



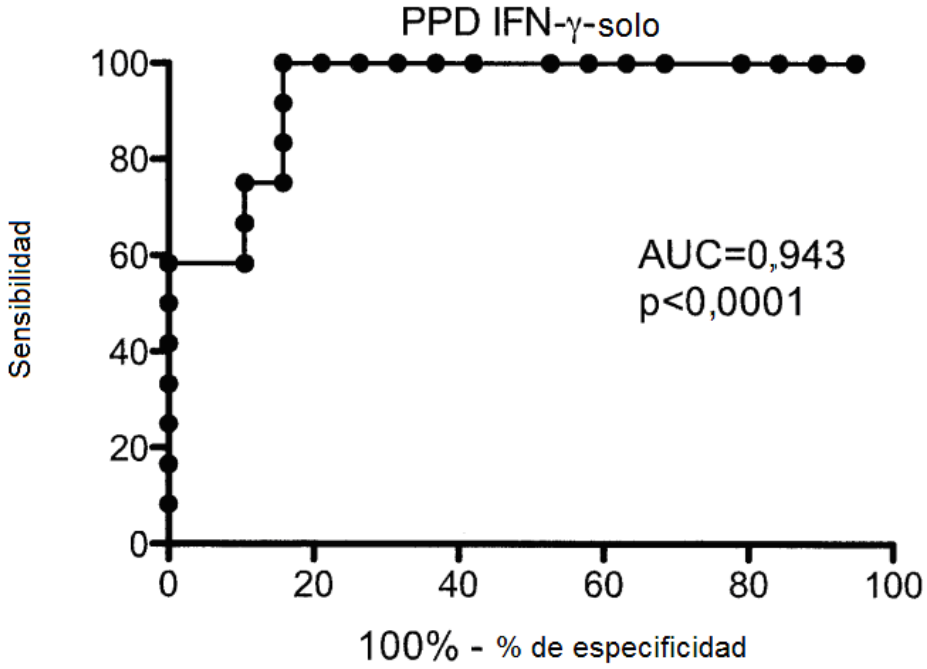
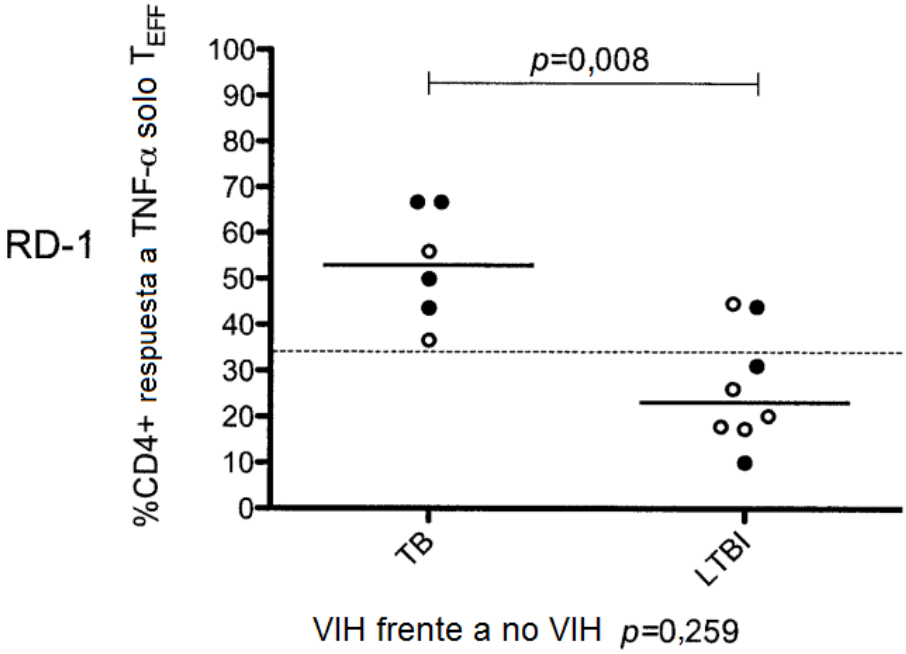


Figura 4 (cont.)

C ***(cont.)***



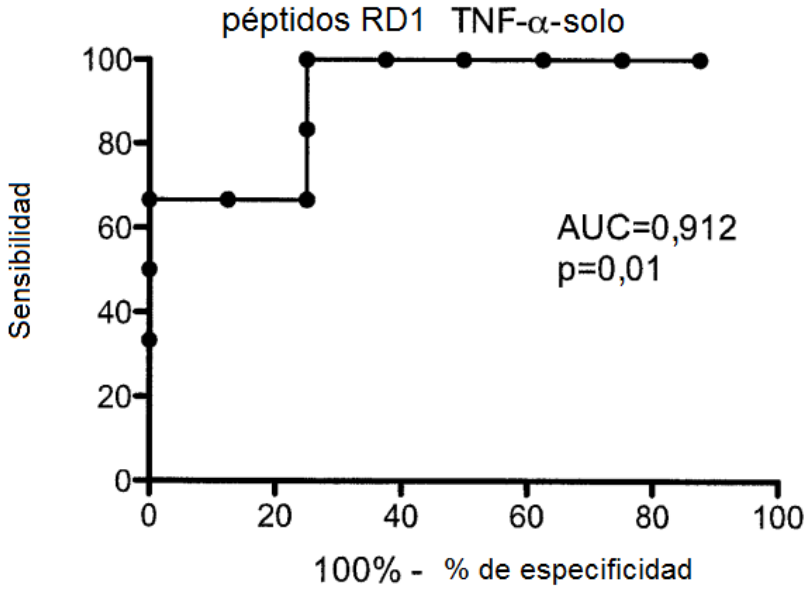
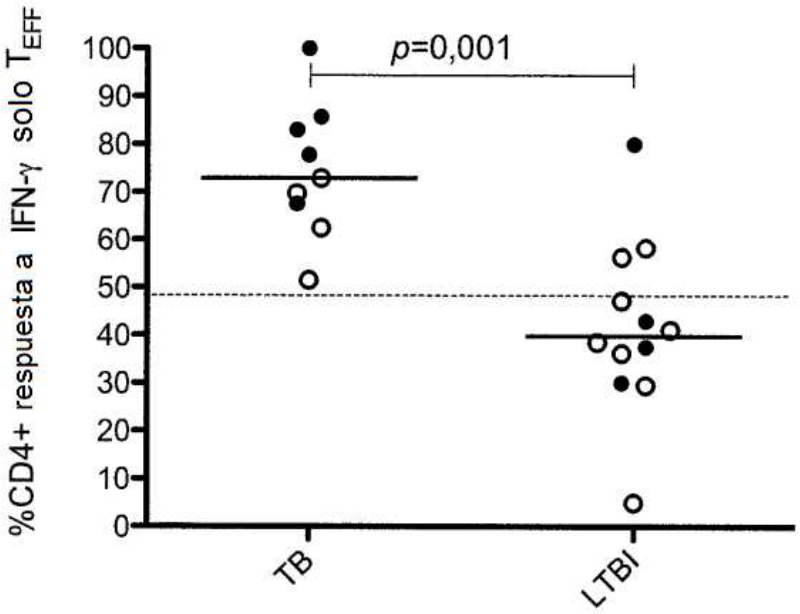


Figura 4 (cont.)

C *(cont.)*

RD-1



VIH frente a no VIH *p*=0,070

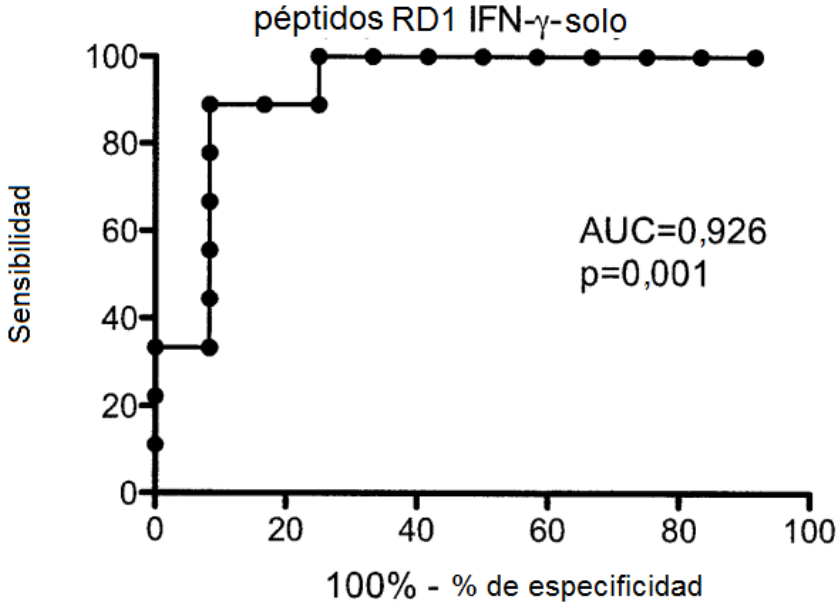


Figura 4 (cont.)

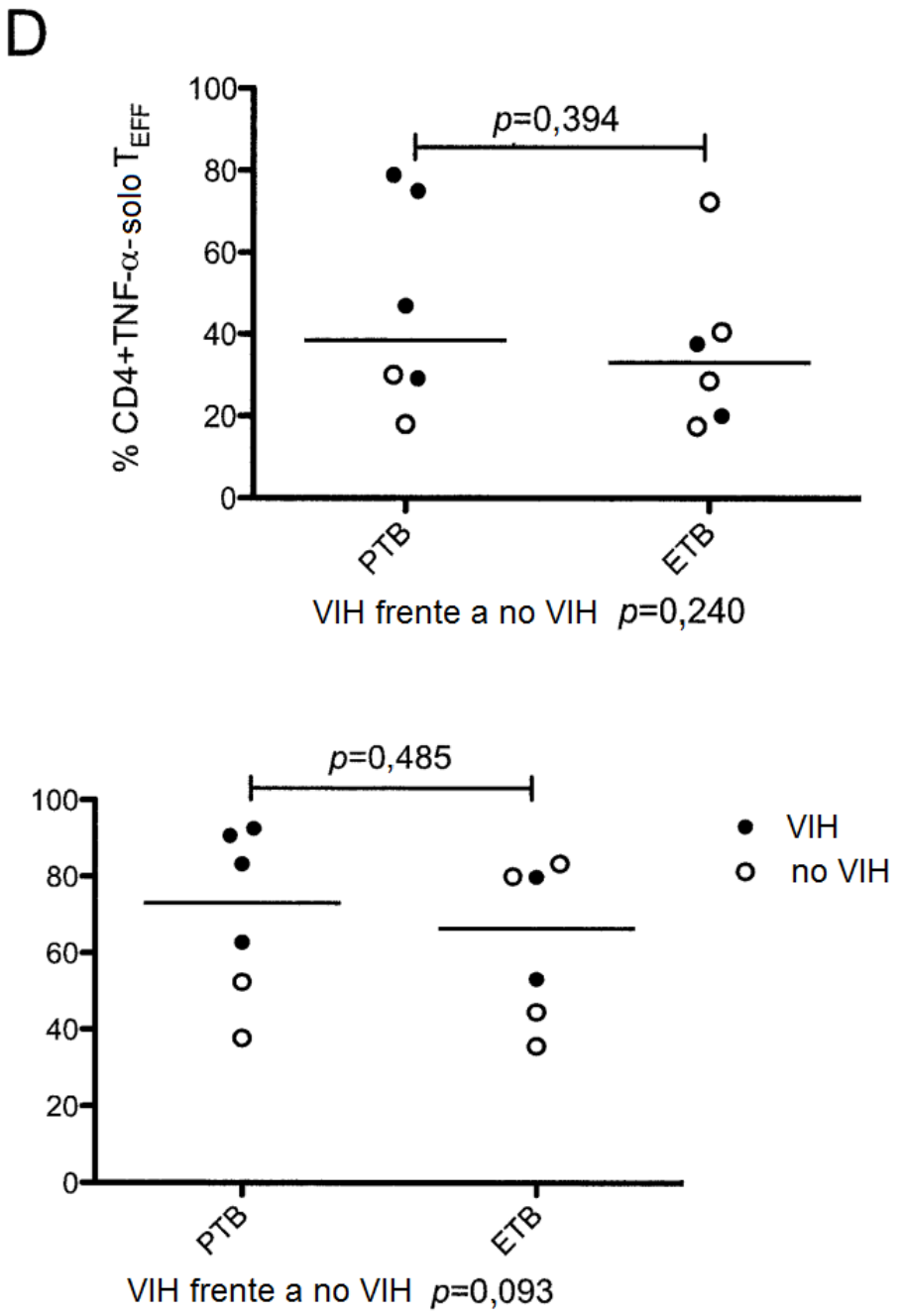


Figura 4 (cont.)

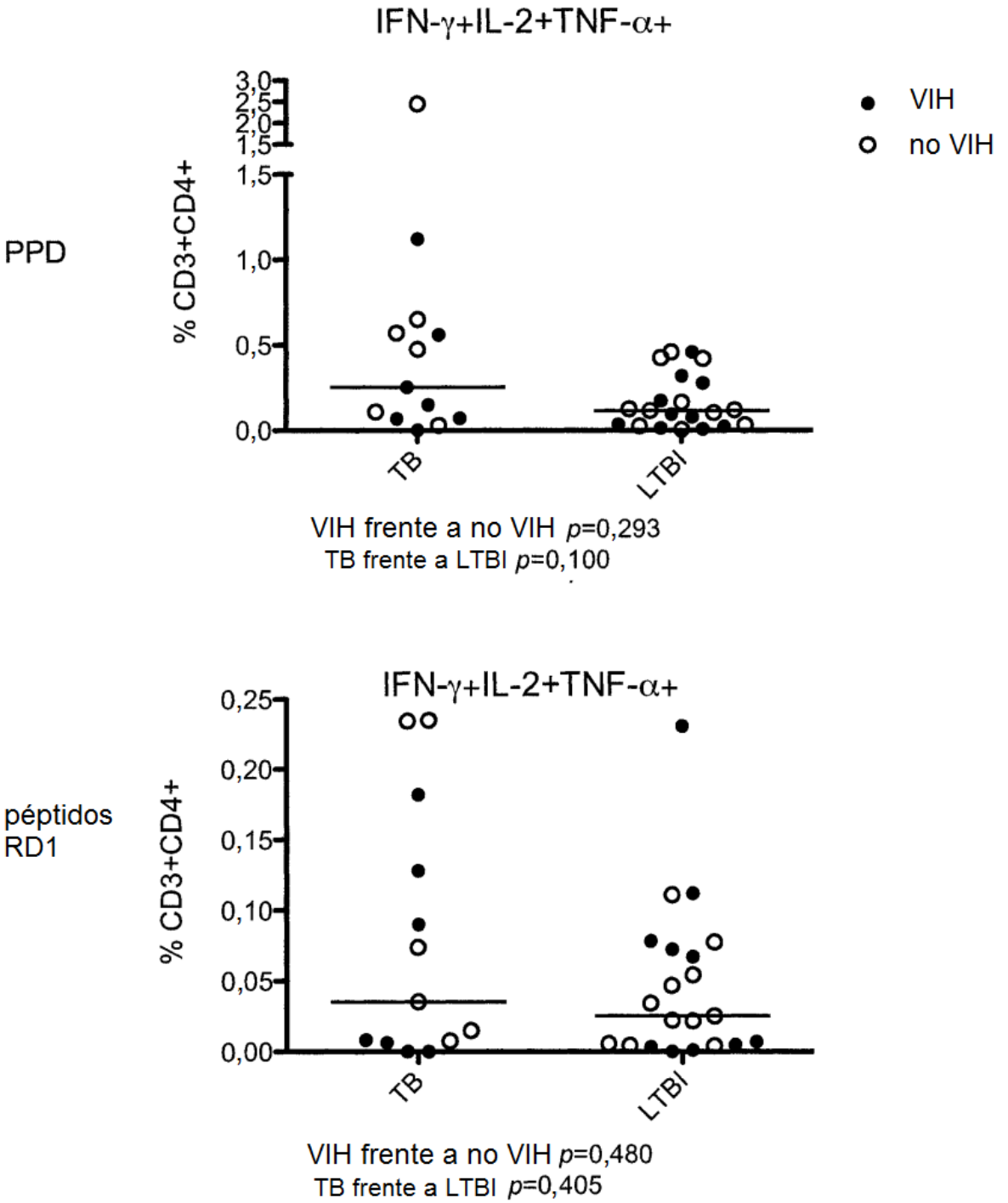

IFN-γ+IL-2+TNF-α+
PPD
% CD3+CD4+
3,0
2,5
2,0
1,5
1,5
1,0
0,5
0,0
TB
LTBI
VIH
no VIH
VIH frente a no VIH p=0,293
TB frente a LTBI p=0,100
IFN-γ+IL-2+TNF-α+
péptidos RD1
% CD3+CD4+
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
TB
LTBI
VIH frente a no VIH p=0,480
TB frente a LTBI p=0,405

Figura 5

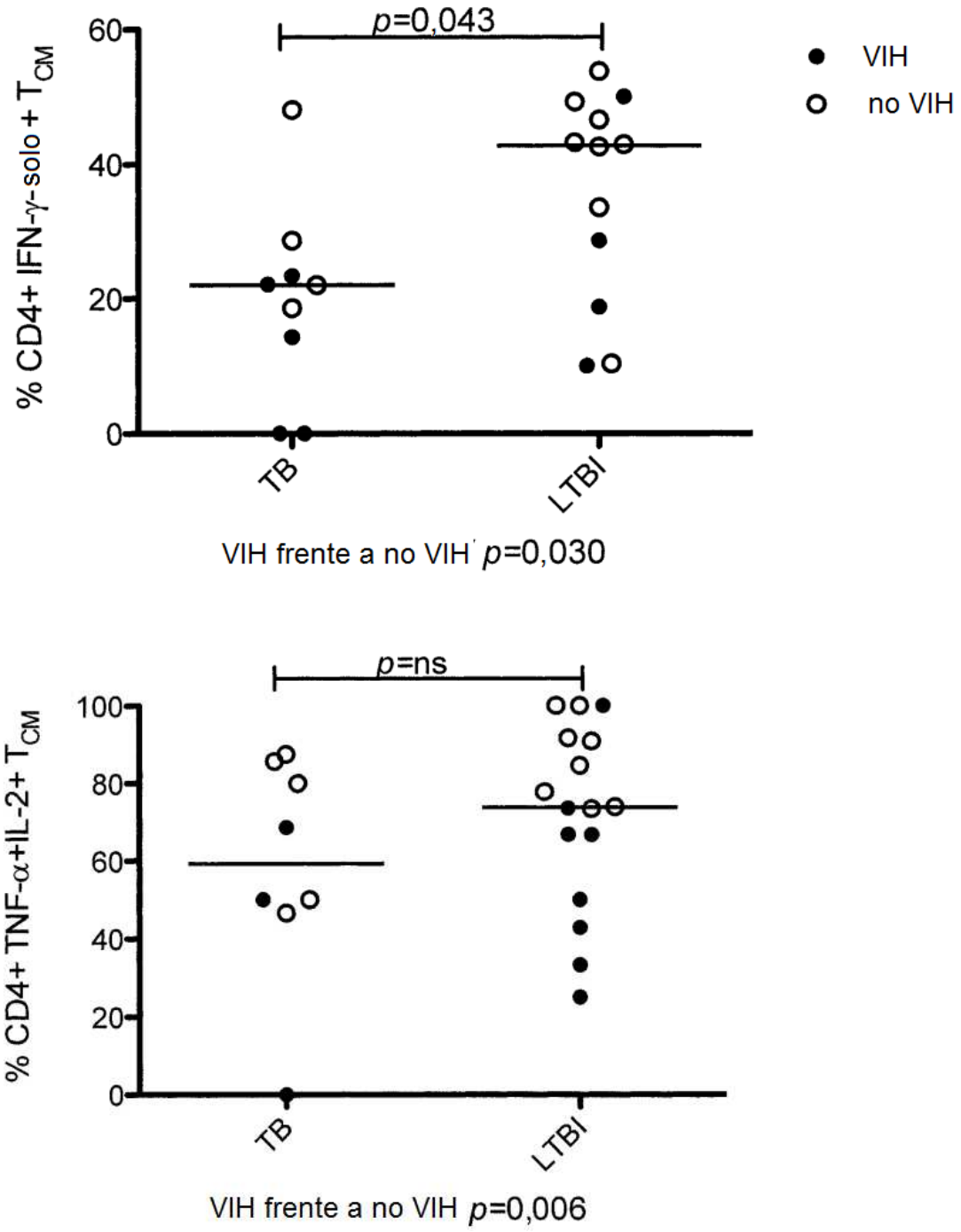
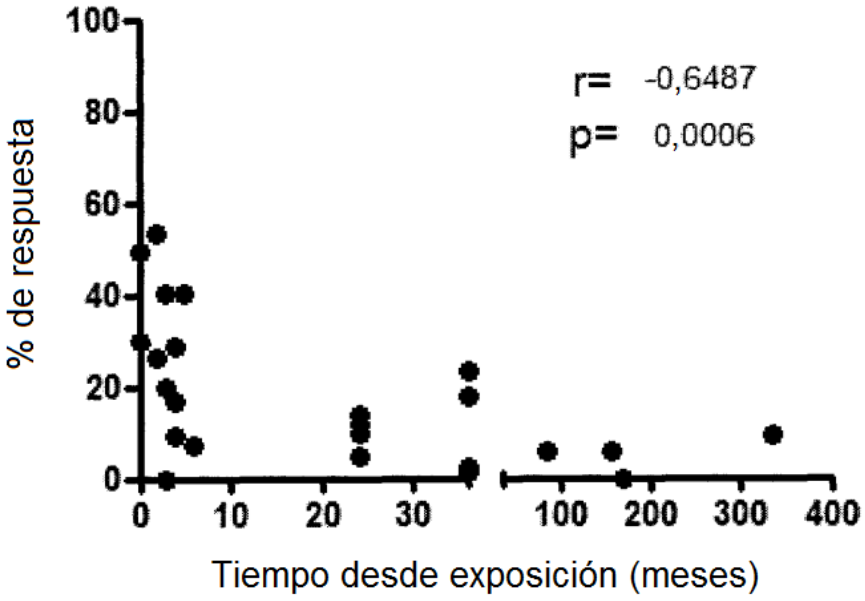

p=0,043
60
40
20
0
% CD4+ IFN-γ-solo + TCM
TB
LTBI
VIH
no VIH
VIH frente a no VIH p=0,030
p=ns
100
80
60
40
20
0
% CD4+ TNF-α+IL-2+ TCM
TB
LTBI
VIH frente a no VIH p=0,006

Figura 6

(a)


r= -0,6487
p= 0,0006
% de respuesta
Tiempo desde exposición (meses)
0
20
40
60
80
100
0
10
20
30
100
200
300
400

(b)

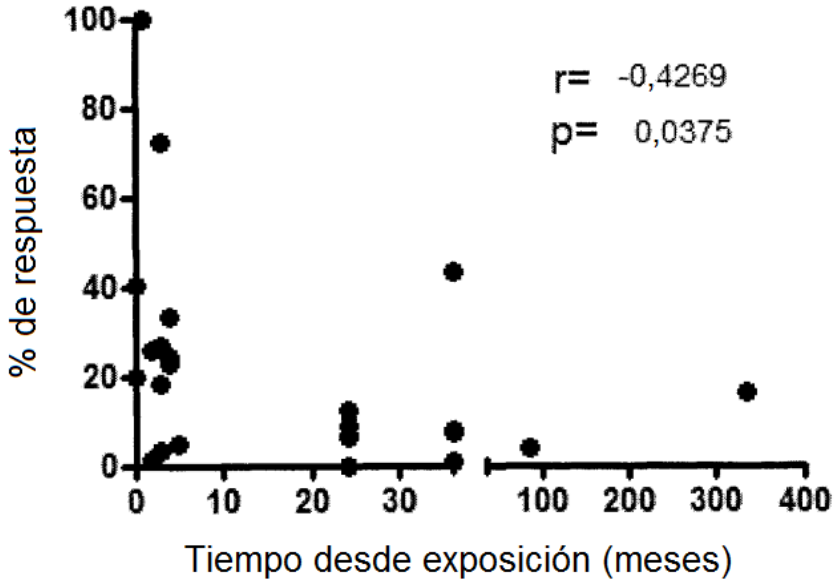

r= -0,4269
p= 0,0375
% de respuesta
Tiempo desde exposición (meses)
0
20
40
60
80
100
0
10
20
30
100
200
300
400

Figura 7