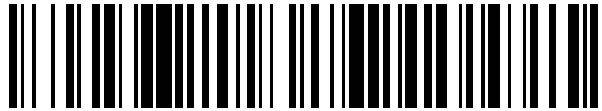


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 666 073**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.07.2013 PCT/EP2013/065002**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.01.2014 WO14012928**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.07.2013 E 13737831 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.12.2017 EP 2872896**

54 Título: **Estado de infección de tuberculosis en un individuo**

30 Prioridad:

16.07.2012 EP 12176506

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

30.04.2018

73 Titular/es:

**LIONEX GMBH (100.0%)
Salzdahlumer Strasse 196
38126 Braunschweig, DE**

72 Inventor/es:

**SINGH, MAHAVIR;
DELIOS, MARIO M. y
DELLA BELLA, CHIARA**

74 Agente/Representante:

LOZANO GANDIA, José

ES 2 666 073 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

ESTADO DE INFECCIÓN DE TUBERCULOSIS EN UN INDIVIDUO**DESCRIPCIÓN**

5 En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método para diagnosticar o determinar el estado de infección de tuberculosis en un individuo afectado por o que se sospecha que está afectado por infección de tuberculosis. En un aspecto adicional, se proporciona un método para la estratificación del régimen terapéutico de un individuo con infección de tuberculosis así como un método para predecir un desenlace clínico o determinar un ciclo de tratamiento en un individuo afectado por infección de tuberculosis. Además, la presente invención proporciona un método para monitorizar el cambio de estado latente a activo de infección de tuberculosis o viceversa en un individuo. Además, la presente invención se refiere a un kit para su uso en el diagnóstico o la detección del estado de infección de tuberculosis así como a alanina deshidrogenasa de *Mycobacterium tuberculosis* para su uso en diferenciar específicamente estado latente de estado de enfermedad activo de tuberculosis en un individuo.

15 Técnica anterior

A lo largo de la última década se han logrado avances sustanciales en el diagnóstico inmunológico *in vitro* de infección por *Mycobacterium tuberculosis* (TB) (Machingaidze S. *et al.*, *Pediatr Infect Dis J.* 2011; 30:694-700). Hay tres ensayos de liberación de interferón γ (IGRA) específicos para *Mycobacterium tuberculosis* comercialmente disponibles. Detectan la liberación de interferón γ (INF- γ) por células mononucleares en el ELISpot (T-SPOT.TB - Oxford Immunotec, Abingdon, R.U.) o en sangre completa en el ELISA (QuantiFERON-TB GOLD y QuantiFERON-TB GOLD en tubo; QFT-G-IT; Cellestis, Carnegie, Australia) tras el contacto *ex vivo* con antígenos de *Mycobacterium tuberculosis* específicos. Con respecto a la prueba cutánea de tuberculina (TST), los IGRA tienen varias ventajas: se ven mínimamente influidos por vacunación con bacilo de Calmette-Guérin (BCG) o infección por micobacterias distintas de tuberculosis previas, no provocan un efecto de refuerzo, no necesitan un acceso doble a instalaciones de atención sanitaria, y la interpretación de los resultados no depende del operario (Chiappini E. *et al.*, *Clin Ther.* 16 de abril de 2012). En adultos, se ha notificado que los IGRA son más específicos y al menos tan sensibles como TST y actualmente se incluyen en algoritmos de diagnóstico en las directrices para adultos (Mazurett GH. *et al.*, *Estados Unidos, 2010, MMWR Recomm Rep.* 2010; 59:1-25). Sin embargo, la sensibilidad y especificidad de IGRA notificados varían en gran medida entre estudios en poblaciones pediátricas y se recomienda precaución con respecto a su uso en niños debido a datos de mala calidad y contrastantes (Machingaidze S. *et al.*, *Pediatr Infect Dis J.* 2011; 30:694-700; Sun L. *et al.*, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2011; 63:165-73; Mandalakas AM, *et al.*, *Int J Tuberc Lung Dis* 2011; 15:1018-32). Además, no permiten distinguir la infección de tuberculosis activa de la latente (LTBI) (Amanatidou V. *et al.*, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 4 de enero de 2012). Esta cuestión es fundamental para pediatras ya que un diagnóstico de TB definitiva, confirmado por cultivos, es raro en niños. La enfermedad de TB pediátrica es normalmente paucibacilar y la mayoría de los diagnósticos de TB en niños son enfermedades "probables", basándose en resultados de TST e IGRA, síntomas y signos clínicos, hallazgos radiológicos, historia personal, respuesta a terapia para TB y experiencia de los médicos en este campo.

40 Un IGRA positivo en un niño con signos que sugieren TB activa no permite el diagnóstico definitivo especialmente si el niño procede de una zona con alta prevalencia de TB. El resultado de IGRA positivo puede deberse a enfermedad de TB así como a LTBI, que puede ser secundaria a la enfermedad que provoca los síntomas o signos en investigación. En esta situación, una prueba que distinga con precisión la tuberculosis activa de la infección de TB latente sería valiosa. En la actualidad, no ha habido éxito en estudios que usan ensayos de ELISpot basados en citocinas distintas de INF- γ (es decir: IL-10 o IL-2) (Amanatidou V, *et al.*, *Eur J. Clin Microbiol Infect Dis.* 4 de enero de 2012) o que exploran la respuesta inmunitaria a otros antígenos micobacterianos además de ESAT-6, CFP-10 y TB7.7 que se incluyen actualmente en los IGRA comercialmente disponibles.

50 Los métodos alternativos para determinar el estado de tuberculosis incluyen la determinación de perfiles de anticuerpos característicos del estado de tuberculosis. Por ejemplo, en el documento US 2007/0026473 A1 así como en Davidow A., *et al.*, 2005, *Infection and Immunity*, 73(10), 6846-6851, se describen tales perfiles de anticuerpos. En los mismos, se usaron antígenos (ESAT-6, Ag de 38 kDa, Ag de 16 kDa, Rv 2626c, ferredoxina y alanina deshidrogenasa) para determinar perfiles de anticuerpos. Se describe que los anticuerpos frente a Ag de 38 kDa, alanina deshidrogenasa y Rv2626c están asociados con TB activa, mientras que los anticuerpos frente a AG de 16 kDa, ferredoxina A y ESAT-6 están asociados con TB inactiva. En cambio, el grupo identificó posteriormente en Gennaro M.L., *et al.*, 2007, en *J. Tuberc. Lung Dis.*, 11 (6), 624-631, que las respuestas de anticuerpos frente a antígenos ESAT-6, Ag de 38 kDa, Ag de 16 kDa, malato sintasa y MTSA-10/CFP-10 están aumentadas en los grupos con TB en comparación con el grupo de control, mientras que otros antígenos, Rv 2626c, ferredoxina A, alanina deshidrogenasa, Ag85 y GluS no muestran ninguna diferencia a nivel de anticuerpo. Por tanto, los datos son controvertidos con respecto a algunos antígenos y el documento de Gennaro *et al.* publicado con posterioridad identifica que, entre otros, la alanina deshidrogenasa y también Rv 2626c no son adecuados para determinar el estado de TB.

65 Sin embargo, los ensayos basados en anticuerpos tienen inconvenientes referentes a la sensibilidad y especificidad. Todavía a día de hoy no se ha desarrollado ninguna prueba serológica que pueda diagnosticar TB activa con alta sensibilidad y especificidad (Sarman Singh y V.M. Katoch, *Indian J Med Res* 2011, 134(5): 583-587: doi:

10.4103/0971-5916-90980).

Por tanto, existe una necesidad de métodos adicionales que permitan diferenciar entre estado latente y activo de infección de tuberculosis. Por consiguiente, existe una necesidad en la técnica de enfoques que sean para la detección y determinación del régimen terapéutico, o predecir el desenlace clínico o determinar el ciclo de tratamiento así como determinar el estado de infección de tuberculosis en un individuo que padece de la misma.

La presente invención tiene como objetivo proporcionar nuevos métodos y ensayos particularmente útiles en las cuestiones descritas anteriormente.

Sumario de la presente invención

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método según la reivindicación 1 para diagnosticar o determinar el estado de infección de tuberculosis en un individuo afectado por o que se sospecha que está afectado por infección de tuberculosis, que comprende:

a) determinar el nivel o la cantidad de citocinas liberadas o producidas por células mononucleares tras la estimulación, mediante lo cual dichas células mononucleares se obtienen a partir de dicho individuo; y

b) determinar o diagnosticar el estado de dicho individuo basándose en el nivel o la cantidad de citocinas liberadas o producidas a partir de las células mononucleares,

caracterizado porque las células mononucleares se estimulan con alanina deshidrogenasa (AlaDH) micobacteriana y en el que las citocinas que van a determinarse son IL-2.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un método para la estratificación del régimen terapéutico de un individuo con infección de tuberculosis que comprende:

a) determinar el nivel o la cantidad de citocinas liberadas o producidas a partir de células mononucleares tras la estimulación, mediante lo cual dichas células mononucleares se obtienen a partir de dicho individuo; y

b) determinar el estado de infección de tuberculosis basándose en el nivel o la cantidad de citocinas liberadas o producidas a partir de dichas células mononucleares tras la estimulación permitiendo la diferenciación de un estado latente y activo de infección de tuberculosis en dicho individuo, caracterizado porque las células mononucleares se estimulan en presencia de alanina deshidrogenasa (AlaDH) micobacteriana, en particular, de *Mycobacterium tuberculosis* y en el que las citocinas que van a determinarse son IL-2.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para predecir un desenlace clínico o determinar el ciclo de tratamiento en un individuo afectado por infección de tuberculosis que comprende:

a) determinar el nivel o la cantidad de citocinas liberadas o producidas a partir de células mononucleares tras la estimulación, mediante lo cual dichas células mononucleares se obtienen a partir de dicho individuo; y

b) predecir el desenlace clínico o determinar el ciclo de tratamiento basándose en el nivel o la cantidad de citocinas liberadas o producidas a partir de dichas células mononucleares tras la estimulación, caracterizado porque la estimulación incluye el cultivo de dichas células mononucleares con alanina deshidrogenasa (AlaDH) micobacteriana, en particular, de *Mycobacterium tuberculosis*, y en el que las citocinas que van a determinarse son IL-2.

Otra realización de la presente invención se refiere a un método para monitorizar el cambio de estado latente a activo de infección de tuberculosis o viceversa en un individuo que comprende:

a) determinar el nivel o la cantidad de citocina liberada o producida a partir de células mononucleares a partir de dicho individuo tras la estimulación en un primer punto de tiempo;

b) determinar el nivel o la cantidad de citocinas liberadas o producidas a partir de células mononucleares tras la estimulación, mediante lo cual dichas células mononucleares se obtienen a partir de dicho individuo en un segundo punto de tiempo; y

c) comparar el nivel o la cantidad de citocinas determinado en la etapa a) con el nivel o la cantidad determinado en la etapa b) o con un valor de referencia mediante lo cual un aumento del nivel o la cantidad con respecto a un valor de referencia o con respecto al nivel o la cantidad determinado en la etapa a) es indicativo de una transición de estado latente a activo y una disminución del nivel o la cantidad con respecto a un valor de referencia o con respecto al nivel o la cantidad determinado en la etapa a) es indicativa de una transición de estado activo a latente,

caracterizado porque las células mononucleares se estimulan con alanina deshidrogenasa (AlaDH) micobacteriana,

en particular, de *Mycobacterium tuberculosis*, y en el que las citocinas que van a determinarse son IL-2.

Es decir, los presentes inventores reconocieron que alanina deshidrogenasa (AlaDH) micobacteriana, en particular, de *Mycobacterium tuberculosis*, representa un estimulante adecuado para células mononucleares obtenidas a partir de los individuos afectados por o que se sospecha que están afectados por infección de tuberculosis y, posteriormente, determinar la cantidad o el nivel de citocinas liberadas o producidas por dichas células mononucleares tras la estimulación, permitiendo por tanto diferenciar entre estado latente y activo de infección de tuberculosis en dicho individuo en consecuencia. En particular, a diferencia de otros componentes micobacterianos conocidos, por ejemplo tal como se describe en Amanatidou V. *et al.*, Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 4 de enero de 2012, se ha mostrado sorprendentemente que AlaDH da como resultado la liberación o producción de citocina únicamente en estado de TB activo mientras que durante el estado de TB latente la liberación o producción de citocinas es significativamente inferior. Esto es particularmente cierto para la citocina IL-2.

Los métodos descritos en el presente documento son normalmente métodos *in vitro*. Las células mononucleares proceden del individuo que va a someterse a prueba. Dichas células se obtienen previamente a partir de dicho individuo mediante lo cual la etapa de tomar una muestra que incluye las células del individuo, por ejemplo tomar una muestra de sangre, no forma normalmente parte del método según la presente invención. Los métodos tal como se describen en el presente documento incluyen realizaciones en las que se usan muestras de sangre completa para la estimulación o en las que se aíslan previamente las células mononucleares a partir de la muestra de sangre completa. A menos que se indique lo contrario en el presente documento, el término "células mononucleares" incluye la realización de muestras de sangre completa. En una realización preferida, las células mononucleares son células mononucleares aisladas, aisladas por ejemplo a partir de sangre completa.

Además, la presente invención se refiere al uso de un kit para diagnosticar o determinar el estado de infección de tuberculosis, o para predecir un desenlace clínico o determinar el ciclo de tratamiento en un individuo afectado por o que se sospecha que está afectado por infección de tuberculosis, o para la estratificación del régimen terapéutico de un individuo con infección de tuberculosis o para monitorizar la evolución de infección de tuberculosis, o para determinar la transición de estado latente a activo de infección de tuberculosis en un individuo, comprendiendo dicho kit medios para determinar el nivel o la cantidad de citocinas liberadas o producidas a partir de células mononucleares tras la estimulación, mediante lo cual dichas células mononucleares se obtienen a partir de dicho individuo, un agente estimulante que es AlaDH micobacteriana, por ejemplo de *Mycobacterium tuberculosis*, e instrucciones sobre cómo usar dicho kit de prueba para un método según la presente invención y en el que las citocinas que van a determinarse son IL-2.

Además, la presente invención se refiere al uso de alanina deshidrogenasa micobacteriana, en particular, de *Mycobacterium tuberculosis*, como estimulante que permite diferenciar entre estado latente y activo de infección de tuberculosis en un individuo afectado por o que se sospecha que está afectado por infección de tuberculosis.

Finalmente, se proporciona una composición que comprende AlaDH micobacteriana, en particular, de *Mycobacterium tuberculosis*, en combinación ESAT-6 y CFP-10 para su uso en la determinación de infección de tuberculosis en un individuo, en particular para su uso como estimulantes, por ejemplo en ensayos basados en sangre completa o en células.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: la figura 2 muestra una ROC que ilustra la sensibilidad y especificidad de resultados de ELISpot de IFN-gamma e IL-2 con AlaDH en la distinción de niños con tuberculosis latente (n = 21) y activa (n = 25).

Descripción detallada de la presente invención

La presente invención se refiere en un primer aspecto a un método según la reivindicación 1 para diagnosticar o determinar el estado de infección de tuberculosis en un individuo afectado por o que se sospecha que está afectado por infección de tuberculosis, que comprende:

a) determinar el nivel o la cantidad de citocinas liberadas o producidas por células mononucleares tras la estimulación, mediante lo cual dichas células mononucleares se obtienen a partir de dicho individuo; y

b) determinar o diagnosticar el estado de dicho individuo basándose en el nivel o la cantidad de citocinas liberadas o producidas a partir de las células mononucleares,

caracterizado porque las células mononucleares se estimulan con alanina deshidrogenasa (AlaDH) micobacteriana, en particular, de *Mycobacterium tuberculosis*, y en el que las citocinas que van a determinarse son IL-2. Es decir, los presentes inventores reconocieron que, dependiendo del nivel o la cantidad de citocinas liberadas o producidas por células mononucleares tras la estimulación mediante lo cual dichas células mononucleares se obtienen a partir del individuo afectado por o que se sospecha que está afectado por infección de tuberculosis, es posible diagnosticar o determinar el estado de infección de tuberculosis en dicho individuo cuando se estimulan células nucleares con

alanina deshidrogenasa micobacteriana, en particular, de *Mycobacterium tuberculosis*, para la liberación o producción de citocinas.

5 A diferencia de ensayos comercialmente disponibles, los ensayos y métodos descritos en el presente documento permiten diferenciar entre el estado latente y activo de infección de tuberculosis. La diferenciación entre los dos tipos diferentes de estado es importante para determinar el ciclo de tratamiento y el riesgo del curso de infección de tuberculosis así como para predecir el desenlace clínico. Además, es importante monitorizar el desarrollo de la infección de tuberculosis en dicho individuo. Se ha mostrado que cuando se usa AlaDH como estimulante, el patrón de citocinas liberadas o producidas a partir de las células mononucleares estimuladas con la molécula de AlaDH es diferente entre individuos que tienen infección de TB latente e individuos que tienen infección de TB activa. En cambio, las moléculas de IGRA comercialmente disponibles sólo permiten diferenciar entre individuos sin infección y con infección, sin diferenciar entre los dos estados.

15 Tal como se usa en el presente documento, el término "individuo" en el contexto de la presente invención es normalmente un mamífero, en particular, el mamífero es un ser humano, un primate no humano u otros mamíferos propensos a infección micobacteriana. El individuo puede ser macho o hembra. El individuo puede ser uno al que previamente se le ha diagnosticado, o se ha identificado que padece, infección de tuberculosis y, opcionalmente, pero no necesariamente, ya se ha sometido a tratamiento para infección de tuberculosis. Un individuo también puede ser uno al que se le ha diagnosticado, o se ha identificado que padece, infección de tuberculosis pero que ha mostrado mejora en la enfermedad como resultado de recibir uno o más tratamientos para la infección en consecuencia. Además, el individuo también puede ser uno al que no se le ha diagnosticado, o que no se ha identificado que tenga, infección de tuberculosis.

25 Los términos "determinar" o "detectar" tal como se usan en el presente documento, se refieren a evaluar la presencia, ausencia, cantidad, nivel o cuantía de o bien una sustancia dada dentro de una muestra clínica o derivada de sujeto, incluyendo la calidad y/o niveles de concentración cuantitativa de sustancias que evalúan de otro modo valores o clasificación de un parámetro clínico de un sujeto.

30 Los términos "comprende" o "que comprende" o "contiene" o "que contiene" incluyen las realizaciones de "consistir" o "que consiste".

35 Tal como se usa en el presente documento, el término "AlaDH" comprende fragmentos antigénicos o el polipéptido completo de AlaDH. En particular, la AlaDH es un oligopéptido o polipéptido antigénico derivado del péptido de SEQ ID NO. 1. Es decir, la AlaDH micobacteriana es preferiblemente la AlaDH de TB con el n.º de referencia de NCBI NP_217296.1 o el número de base de datos TubercuList AlaDHRv2780. El experto conoce fragmentos adecuados, por ejemplo tal como se describe en el documento EP 0966544 que se incorpora en el presente documento como referencia. Además, el término comprende homólogos del mismo de SEQ. ID. NO. 1 que tienen la misma actividad estimulante sobre células mononucleares que AlaDH de SEQ. ID. NO. 1.

40 Tal como se usa en el presente documento, el término "latente" incluye el estado latente de infección de TB (LTBI) así como el estado curado tras el tratamiento satisfactorio a menos que se indique lo contrario.

45 Tal como se usa en el presente documento, el término "células mononucleares obtenidas a partir de... un individuo" se refiere a células obtenidas previamente a partir de dicho individuo. Las células proceden del individuo pero el método según la presente invención normalmente no incluye la etapa de toma de muestras. En vez de eso, se proporcionan las células como muestra. La muestra puede ser sangre completa o una muestra que contiene las células tras etapas de aislamiento a partir de la muestra a partir de dicho individuo.

50 Además, la presente invención se refiere un método para la estratificación del régimen terapéutico de un individuo con infección de tuberculosis que comprende:

a) determinar el nivel o la cantidad de citocinas liberadas o producidas a partir de células mononucleares tras la estimulación, mediante lo cual dichas células mononucleares se obtienen a partir de dicho individuo; y

55 b) determinar el estado de infección de tuberculosis basándose en el nivel o la cantidad de citocinas liberadas o producidas a partir de dichas células mononucleares tras la estimulación permitiendo la diferenciación de un estado latente y activo de infección de tuberculosis en dicho individuo, caracterizado porque las células mononucleares se estimulan en presencia de alanina deshidrogenasa (AlaDH) micobacteriana, en particular, de *Mycobacterium tuberculosis*, y en el que las citocinas que van a determinarse son IL-2.

60 Es decir, es posible estratificar el régimen terapéutico de un individuo que padece infección de tuberculosis basándose en la determinación del estado de infección, concretamente para diferenciar entre estado latente y activo de infección de tuberculosis.

65 Además, los presentes inventores reconocieron que AlaDH representa una herramienta valiosa, concretamente, un estimulante valioso para muestras de sangre completa, en particular, células mononucleares obtenidas a partir de un

individuo afectado por o que se sospecha que está afectado por infección de tuberculosis para diagnosticar o determinar el estado de dicha infección de tuberculosis en dicho individuo.

5 Por tanto, se proporciona un método para monitorizar el cambio de estado latente a activo de infección de tuberculosis o viceversa en un individuo que comprende:

a) determinar el nivel o la cantidad de citocinas liberadas o producidas a partir de células mononucleares a partir de dicho individuo tras la estimulación en un primer punto de tiempo;

10 b) determinar el nivel o la cantidad de citocinas liberadas o producidas a partir de células mononucleares tras la estimulación, mediante lo cual dichas células mononucleares se obtienen a partir de dicho individuo en un segundo punto de tiempo; y

15 c) comparar el nivel o la cantidad de citocinas determinado en la etapa a) con el nivel o la cantidad determinado en la etapa b) o con un valor de referencia mediante lo cual un aumento del nivel o la cantidad con respecto a un valor de referencia o con respecto al nivel o la cantidad determinado en la etapa a) es indicativo de una transición de estado latente a activo y una disminución en el nivel o la cantidad con respecto a un valor de referencia o con respecto al nivel o la cantidad determinado en la etapa a) es indicativa de una transición de estado activo a latente

20 caracterizado porque las células mononucleares se estimulan con alanina deshidrogenasa (AlaDH) micobacteriana, en particular, de *Mycobacterium tuberculosis*, y en el que las citocinas que van a determinarse son IL-2.

25 En el contexto de la presente invención, el término "valor de referencia" se refiere a un valor de índice, un valor derivado de uno o más índices informáticos, un valor derivado de un sujeto con infección de tuberculosis activa o latente conocida, en particular, con una cohorte de la misma. En particular, los valores de referencia obtenidos a partir de individuos afectados por infección de tuberculosis de estado latente y activo y, además, el valor de referencia representa un intervalo o índice obtenido a partir de al menos dos muestras extraídas de un individuo con dicho estado de enfermedad.

30 En una realización preferida, las células mononucleares se obtienen a partir de una muestra de dicho individuo. Dicha muestra puede ser sangre, una muestra derivada de sangre u otras muestras que contienen células mononucleares adecuadas para permitir ensayos de liberación de citocinas o ensayos que determinan la cantidad de citocinas tanto a nivel de proteína como de ácido nucleico. En particular, la muestra es una muestra de sangre o se deriva de otros líquidos corporales incluyendo lavado broncoalveolar y orina y tejidos.

35 Es decir, las células mononucleares pueden obtenerse a partir de sangre u otros líquidos corporales y, opcionalmente, se aíslan mediante técnicas comunes.

40 Un experto en la técnica apreciará que varios métodos diferentes son útiles para obtener dichas células mononucleares a partir del individuo.

Es decir, los presentes inventores reconocieron que AlaDH representa un estimulante adecuado en un ensayo de sangre completa y en un ensayo basado en células para un método según la presente invención.

45 Se prefiere que el nivel o la cantidad de citocinas se determine mediante ensayos basados en el sistema inmunitario. Un experto en la técnica apreciará que varios métodos son útiles para determinar la cantidad o el nivel de la citocina en una muestra, incluyendo inmunoensayos tales como inmunotransferencia de tipo Western, ELISA y ELISpot. Se desea particularmente que las citocinas se determinen a nivel de proteína con técnica ELISpot o ELISA. Sin embargo, los niveles de citocinas también pueden medirse determinando los niveles de ARNm correspondientes a dichas citocinas en consecuencia. El experto conoce métodos adecuados para determinar los mismos a nivel de ácido nucleico incluyendo técnicas de PCR.

50 La citocina determinada es IL-2. La cantidad o el nivel de IL-2 se determina al liberarse o producirse por dichas células mononucleares tras la estimulación con alanina deshidrogenasa (AlaDH) micobacteriana, en particular, de *Mycobacterium tuberculosis*.

Tal como se demuestra en el presente documento, los ensayos ELISpot basados en ELISpot de IL-2 permiten diferenciar entre estado latente y activo de infecciones de tuberculosis o bien en niños o bien en adultos.

60 Según una realización preferida, el valor de referencia para el estado latente de infección de tuberculosis es inferior a 25, preferiblemente inferior a 10, mientras que el valor de referencia para el estado activo de infección de tuberculosis es superior a 50, preferiblemente superior a 100, para ELISpot de IL-2.

65 Cuando se monitoriza el cambio de estado latente a activo de infección de tuberculosis o viceversa en un individuo, la primera muestra del individuo se obtiene preferiblemente en un primer punto de tiempo mientras que la segunda muestra se obtiene después de un punto de tiempo, preferiblemente predeterminado, por ejemplo tras someterse a

tratamiento de infección de tuberculosis o someterse a tratamiento para enfermedades autoinmunitarias. Por ejemplo, en el caso del tratamiento de enfermedades autoinmunitarias u otras enfermedades mediante las cuales se modula el sistema inmunitario, resulta útil determinar el estado de infección de TB para evitar cualquier aparición de la infección de TB. Se conoce que cuando se trata a pacientes con RA, la infección de TB en estado latente puede avanzar a estado activo. Es decir, la presente invención permite determinar el ciclo de tratamiento en dicho individuo o predecir el desenlace clínico identificando el estado real de infección de tuberculosis en dicho individuo.

En particular, el método según la presente invención permite identificar o monitorizar o supervisar a individuos afectados por infección de tuberculosis para determinar un cambio de estado latente a activo de tuberculosis o viceversa. Cuando el nivel o la cantidad relativo o absoluto de citocinas aumenta, es indicativo de una transición del estado latente al activo, mientras que una disminución del nivel o la cantidad relativo o absoluto es indicativa de una transición de estado activo a latente.

En claro contraste con alanina deshidrogenasa (AlaDH) micobacteriana, en particular, de *Mycobacterium tuberculosis*, otros estimulantes usados por ejemplo en ensayos ELIspot o ELISA como estimulantes sólo permiten diferenciar infección de TB y ausencia de infección de TB, por ejemplo las conocidas moléculas micobacterianas ESAT-6, CFP-10 u otras moléculas.

Sin embargo, en el presente documento se ha determinado que una composición que comprende alanina deshidrogenasa (AlaDH) micobacteriana, en particular, de *Mycobacterium tuberculosis*, y ESAT-6 así como CFP-10 permite aumentar la sensibilidad y especificidad de pruebas que permiten diferenciar entre individuos sin infección y con infección, en particular, pruebas en las que estos componentes se usan como estimulantes. Es decir, los componentes de dicha composición pueden usarse en ensayos independientes o pueden usarse en combinación.

Surgen importantes implicaciones clínicas de los hallazgos descritos en el presente documento. Debido a la posibilidad de diferenciar entre estado latente y activo es posible estratificar el régimen terapéutico o determinar el ciclo de tratamiento en el individuo en consecuencia.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere al uso de un kit para diagnosticar o determinar el estado de infección de tuberculosis, o para predecir un desenlace clínico o determinar el ciclo de tratamiento en un individuo afectado por o que se sospecha que está afectado por infección de tuberculosis, o para la estratificación del régimen terapéutico de un individuo con infección de tuberculosis o para monitorizar la evolución de infección de tuberculosis, o para determinar la transición de estado latente a activo de infección de tuberculosis en un individuo, comprendiendo dicho kit medios para determinar el nivel o la cantidad de citocinas liberadas o producidas a partir de células mononucleares tras la estimulación, mediante lo cual dichas células mononucleares se obtienen a partir de dicho individuo, un agente estimulante que es alanina deshidrogenasa (AlaDH) micobacteriana, en particular, de *Mycobacterium tuberculosis*, e instrucciones sobre cómo usar dicho kit de prueba para un método según la presente invención, y en el que las citocinas que van a determinarse son IL-2.

En particular, en una realización preferida dicho kit es un ELIspot o ELISA que permite determinar el nivel o la cantidad de la citocina. Se prefiere particularmente que el ELIspot o ELISA sea un ensayo que permita la determinación de la cantidad o el nivel de IL-2. Alternativamente, el kit es un kit de PCR con medios adecuados para analizar la expresión de citocinas a nivel de ácido nucleico.

Además, la presente invención se refiere al uso de alanina deshidrogenasa (AlaDH) micobacteriana, en particular, de *Mycobacterium tuberculosis*, en la diferenciación del estado latente y estado activo de infección de tuberculosis en un individuo afectado por o que se sospecha que está afectado por infección de tuberculosis. La alanina deshidrogenasa micobacteriana es particularmente útil para diferenciar lo mismo en seres humanos, en particular, niños.

Finalmente, se proporcionan ensayos útiles para realizar o llevar a cabo el método según la presente invención. Dicho ensayo comprende medios para cultivar células mononucleares y AlaDH como estimulante en una forma adecuada para estimular dichas células mononucleares cuando se añade a un cultivo de las mismas. Además, el ensayo puede contener medios para determinar la cantidad o el nivel de la citocina que va a detectarse. Normalmente, dicho ensayo se basa en un inmunoensayo, en particular, dicho ensayo es un ELIspot o ELISA. La detección se realiza mediante anticuerpos que detectan específicamente la citocina deseada. Alternativamente, el ensayo es un ensayo basado en PCR.

La divulgación anterior describe de manera general la presente invención. Puede obtenerse una comprensión más completa mediante referencia a los siguientes ejemplos específicos de terceras realizaciones de la invención sin limitarse a las mismas.

Ejemplos

65 Materiales y métodos

Sujetos del estudio

5 Niños consecutivos que corrían el riesgo de infección de TB remitidos al la unidad de enfermedades infecciosas, departamento de ciencias la salud de mujeres y niños, universidad de Florencia, Italia, se incluyeron de manera prospectiva entre 2009 y 2010. Los niños del estudio fueron aquellos con sospecha clínica de enfermedad de TB y/o en estrecho contacto con casos recientemente diagnosticados de enfermedad de TB contagiosa y/o niños procedentes de adopción internacional o que inmigraron recientemente de países con una alta prevalencia de TB. Se consideró un máximo de dos años como periodo de inmigración reciente. Los niños con trastornos de inmunodeficiencia congénita o adquirida (basándose en su historia clínica, exploración clínica y/o pruebas de analíticas) se excluyeron del estudio.

Prueba cutánea de tuberculina

15 Se administró TST según el método de Mantoux inyectando por vía intradérmica 5 unidades de tuberculina (en 0,1 ml) de derivado de proteína purificado (Biocine Test-PPD, Chiron, Siena, Italia) en la superficie anterior del antebrazo. Se registró la induración de piel transversal (en mm) tras 48-72 horas. Siguiendo las directrices de la Academia americana de pediatría (American Academy of Pediatrics. [Tuberculosis]. en: Pickering LK, Baker CJ, Kimberlin DW, Long SS, eds. Red Book: 2009 Report of the Committee on Infectious Diseases. 28ª ed. Elk Grove Village, IL: American Academy of Pediatrics; 2009: [680-701]. Amanatidou V. *et al*, véase anteriormente) se definió una TST positiva como un tamaño de induración ≥ 5 mm para niños en estrecho contacto con caso de enfermedad de TB contagioso conocido o sospechado o para niños que se sospechaba que tenían enfermedad de TB (basándose en evidencias clínicas y/o radiografía del tórax) y ≥ 10 mm para niños nacidos en países con una alta prevalencia de TB y que inmigraron recientemente.

QFT-G-IT

25 Se realizó la prueba OFT-IT según las instrucciones del fabricante tal como se describió anteriormente (Millington KA, *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA. 2011; 108:5730-5. Vilaplana C, *et al.*, Scand J Immunol 2008; 67:610-7). Tras restar el valor del control negativo, el resultado era positivo si la respuesta dependiente de antígeno era $\geq 0,35$ UI, negativo si la respuesta inducida por mitógeno era $\geq 0,5$ UI/ml y la respuesta dependiente de antígeno era $< 0,35$ UI/ml, e indeterminado si las respuestas tanto inducida por mitógeno como dependiente de antígeno estaban por debajo del punto de corte o la respuesta inducida por mitógeno era > 8 UI/ml.

Ensayo ELISpot

35 Se realizaron ELISpot interno para IFN-gamma e IL-2 usando antígenos de *M. tuberculosis* de Lionex. En resumen, se estimularon blastos de células T (105 células) de cada línea de pacientes con antígeno de *M. tuberculosis* en presencia de APC autólogos irradiados (5 X 10⁴ células) y se sembraron por triplicado en placas de 96 pocillos recubiertas con anticuerpos anti-IFN- γ o anti-IL-2. Células estimuladas con medio solo sirvieron como controles negativos. Células estimuladas con PHA sirvieron como controles positivos. Después se incubaron microplacas de ELISPOT de IFN- γ e IL-2 a 37°C en CO₂ al 5% durante 24 horas. Al final del periodo de cultivo, se lavaron las placas y se incubaron durante 3 horas con el AcM anti-IFN- γ o anti-IL-2 biotinilado apropiado. Después se añadió complejo de estreptavidina-HRP durante 2 horas, seguido por la disolución de sustrato. Se contaron las SFC usando un lector de ELISPOT automatizado (Autoimmune Diagnostika GmbH).

Diseño del estudio

50 Se obtuvo información referente a datos sociodemográficos, exposición previa a TB e historia clínica anterior de los padres o tutores de cada niño o de la documentación médica y se registró en la base de datos del estudio. Se consideró que los niños estaban vacunados con BCG si había documentación clara disponible y/o si estaba presente una cicatriz. Todos los niños se sometieron a evaluación clínica, TST y venopunción para IGRA (QFT-G-IT y ensayo ELISpot interno). Se extrajo sangre durante la primera exploración tras haberse obtenido el consentimiento informado del padre o tutor y antes de comenzar cualquier tratamiento anti-tuberculoso. Se realizó una radiografía de tórax en todos los niños sintomáticos, en aquellos con una TST positiva y en todos los contactos de menos de 5 años de edad. A los niños con sospecha de TB pulmonar se les tomaron tres muestras de aspirados gástricos temprano por la mañana o de esputo recopiladas para la detección de *Mycobacterium tuberculosis* (por medio de microscopía, reacción en cadena de la polimerasa y cultivo). Se realizó una tomografía computerizada (TC) del tórax en casos seleccionados a criterio del pediatra. En la unidad de enfermedades infecciosas no se presentó ningún caso de TB extrapulmonar sospechado o determinado durante el periodo del estudio. El estudio recibió la aprobación del comité ético local y se obtuvo el consentimiento informado para el estudio de los padres o tutores.

Definición de grupos del estudio

65 Se clasificaron los niños del estudio como sin infección, casos de LTBI o casos de enfermedad de TB pulmonar activa, siguiendo la definición de las directrices de la Academia americana (American Academy of Pediatrics. [Tuberculosis]. en: Pickering LK, Baker CJ, Kimberlin DW, Long SS. eds. Red Book: 2009 Report of the Committee

on Infectious Diseases. 28ª ed. Elk Grove Village, IL: American Academy of Pediatrics: 2009: [680-701]). En caso de resultados de TST/QFT-G-IT discordes, se asignaron los niños al grupo correspondiente basándose en el resultado de TST, según las directrices estadounidenses y europeas más recientes (American Academy of Pediatrics. [Tuberculosis]. en: Pickering LK, Baker CJ, Kimberlin DW, Long SS, eds. Red Book: 2009 Report of the Committee on Infectious Diseases. 28ª ed. Elk Grove Village, IL: American Academy of Pediatrics: 2009: [680-701]. Amanatidou V. *et al.*, véase anteriormente). En particular, los niños asintomáticos con TST negativa se definieron como sin infección. Se asignó diagnóstico de LTBI a cualquier niño con una TST positiva y sin evidencias clínicas o radiológicas de TB activa. Los casos de TB activa se definieron según dos categorías: TB definitiva, niños con *Mycobacterium tuberculosis* cultivada o detectada mediante microscopía o métodos moleculares a partir de esputo o cultivo de aspirado gástrico, y TB probable: ausencia de confirmación microbiológica pero presencia de todos de los siguientes criterios: (A) síntomas y signos clínicos de TB activa, (B) radiografía anómala y/o exploración de TC consistente con TB pulmonar, (C) respuesta a terapia para TB más, (D) o bien historia de contacto con TB o bien viaje a un país endémico para TB en el plazo de los 24 meses anteriores (Amanatidou V. *et al.*, véase anteriormente).

15 Análisis estadístico

Se compararon datos categóricos usando la prueba de la Chi cuadrado (o prueba exacta de Fisher, cuando los tamaños de célula previstos eran menores de cinco). Se usó la prueba de Wilcoxon-Mann-Whitney para mediciones continuas para someter a prueba relaciones en análisis para datos independientes, cuando se suponía que la variable dependiente no era una variable de intervalo con distribución normal. Se evaluó la concordancia de la prueba mediante estadística de la k de Cohen con considerándose el acuerdo "ligero" para $k \leq 0,2$, "aceptable" para $0,2 < k \leq 0,4$, "moderado" para $0,4 < k \leq 0,6$, "sustancial" para $0,6 < k \leq 0,8$ y "óptimo" para $0,8 < k \leq 1,0$. Se llevó a cabo un análisis de curva de rendimiento diagnóstico (ROC) para determinar los mejores umbrales de resultados de ELISpot de IL-2 e IFN- γ en la distinción entre niños con TB activa o latente, con respecto a antígenos de *M. tuberculosis* específicos y se notificaron la sensibilidad y especificidad correspondientes. También se calcularon el área bajo la curva de ROC (AUC) y el intervalo de confianza (IC) del 95%. Se realizó un análisis estadístico usando el software estadístico SPSS para Windows, versión 14.0. Se consideró que $P < 0,05$ era estadísticamente significativo.

30 Resultados

Se incluyeron en el estudio setenta y cinco niños (varones); mediana de la edad: 75 meses; intervalo intercuartil [IQR] 39-116. Se documentó la vacunación con BCG previa en 21 (28,0%) niños.

Se realizó el diagnóstico de enfermedad de TB definitiva en 5 niños. Todos estos niños presentaban síntomas compatibles con TB (por ejemplo, tos persistente, fiebre, sudores nocturnos o pérdida de peso) y/o enfermedad pulmonar documentada mediante radiografía de tórax y confirmada mediante resultados de exploración de TC y se detectó *Mycobacterium tuberculosis* a partir de los cultivos y/o microscopía y/o reacción en cadena de la polimerasa. Se diagnosticó TB probable en 20 niños. Todos estos niños se sometieron a al menos tres exploraciones de aspirado gástrico o esputo para la detección de *Mycobacterium tuberculosis* que produjeron resultados negativos. La tabla 1 muestra el estado de vacunación con BCG, el tamaño de TST y el resultado de QFT-G-IT según el diagnóstico final.

Tabla 1: Estado de vacunación con BCG, tamaño de TST y resultado de QFT-G-IT según el diagnóstico final de los niños del estudio

	sin infección n = 29 n (%)	TB latente n = 21 n (%)	Enfermedad de TB probable n = 20 n (%)	Enfermedad de TB definitiva n=5 n (%)
Edad, meses (mediana e IQR)	77 (28-101)	116 (61-151)	52 (27-82)	47 (8-97)
Vacunado con BCG, TST, diámetro de induración (mm)	5	12	1	0
< 5	28	0	0	1
≥ 5 y < 10	1	1	2	0
≥ 10 y < 15	0	5	1	1
≥ 15	0	15	17	3
Resultado de QFT-G-IT				
negativo	29	5	3	5
positivo	0	15	17	0
indeterminado	0	1	0	0

BCG = Bacilo de Calmette-Guérin, TST = prueba cutánea de tuberculina, IGRA = ensayo de liberación de interferón γ

Se obtuvo un resultado de TST/QFT-G-IT discordes en cuatro niños (un niño con TB definitiva, QFT-G-IT positiva y TST negativa y tres niños con TB probable, QFT-G-IT negativa y TST positiva). El acuerdo global entre el IGRA y la

TST (sin tener en cuenta el resultado indeterminado) fue sustancial con un valor de k de 0,679.

Resultados de ELISpot de IFN- γ e IL-2

5 Los resultados de ELISpot se resumen en la tabla 2.

Tabla 2. Resultados de ELISpot

	sin infección n = 29	TB latente n = 21	Enfermedad de TB probable n = 20	Enfermedad de TB definitiva n = 5	P de niños sin infección frente a con infección	P de enfermedad latente frente a manifiesta
ELISpot de IFN- γ						
- ESAT-6	35 (1-102)	320 (157-520)	292 (170-631)	330 (190-1575)	<0,0001	0,724
- CFP-10	40 (1-120)	305 (130-625)	280 (76-986)	876 (200-3532)	<0,0001	0,691
- Híbrido H1	60 (12-192)	300 (127-437)	295 (120-825)	180 (115-1737)	<0,0001	0,651
- Ag85B	65 (12-152)	150 (47-322)	107 (46-192)	90 (27-1517)	0,063	0,724
- AlaDH	35 (12,5-110)	85 (17-180)	147 (71-303)	280 (115-1565)	<0,001	0,021
- PstS1	40 (1-122)	50 (1-197)	60 (11-241)	95 (18-982)	0,0512	0,504
ELISpot de IL-2						
- ESAT-6	10 (1-35)	220 (35-410)	110 (60-402)	420 (155-1365)	<0,0001	0,791
- CFP-10	10 (1-20)	210 (85-710)	160 (100-637)	510 (355-1735)	<0,0001	0,574
- Híbrido H1	20 (1-50)	180 (35-535)	195 (95-595)	430 (265-1635)	<0,0001	0,247
- Ag85B	20 (10-75)	4 (10-140)	45 (17-195)	200 (135-1485)	0,063	0,188
- AlaDH	1 (1-20)	1 (1-10)	75 (36-130)	340 (110-1365)	=0,001	<0,0001
- PstS1	10 (1-50)	20 (1-75)	20 (10-95)	10 (5-155)	<0,0001	0,755

10 Comparando niños sin infección frente a niños con infección de TB (LTBI más enfermedad de TB probable y definitiva) se demostraron medianas de valores significativamente superiores en niños con infección que en niños sin infección, teniendo en cuenta respuestas de ELISpot de IFN- γ frente a ESAT-6 ($p < 0,0001$), CFP-10 ($p < 0,0001$), híbrido de H1 ($p < 0,0001$) o AlaDH ($p = 0,001$), mientras que las diferencias no fueron significativas teniendo en cuenta Ag85B ($p = 0,063$) y Pst1S ($p = 0,512$). Teniendo en cuenta los resultados de ELISpot de IL-2, se demostraron resultados significativamente diferentes con ESAT-6, CFP-10, híbrido de H1 y AlaDH ($p = 0,001$); pero no con Ag85 ($p = 0,063$).

15 Comparando resultados entre niños con LTBI y aquellos con enfermedad de TB (enfermedad probable más definitiva) las diferencias fueron significativas para ELISpot de IFN- γ teniendo en cuenta sólo la respuesta frente a antígeno AlaDH ($p = 0,021$) (tabla 2). Con respecto a ELISpot de IL-2, se confirmaron diferencias significativas para antígeno AlaDH ($p < 0,0001$) mientras que no se demostró ninguna diferencia teniendo en cuenta otros antígenos. Comparando resultados entre niños sin infección y niños con LTBI se observaron diferencias significativas en las respuestas de ELISpot de IFN- γ frente a ESAT-6 ($p > 0,0001$), CFP-10 ($p > 0,0001$), híbrido de H1 ($p = 0,001$), mezcla ($p = 0,017$) y en respuestas de ELISpot de IL-2 frente a ESAT-6 ($p > 0,0001$), CFP-10 ($p > 0,0001$), híbrido de H1 ($p > 0,0001$) y mezcla ($p > 0,0001$).

20 Los análisis de ROC demostraron que, teniendo en cuenta la respuesta frente a AlaDH, para un valor de ELISpot de IL-2 de 12,5 SCF por millón de CMSP (tras restar los puntos de fondo), la sensibilidad en la distinción entre TB latente y activa era del 100% y la especificidad era del 81%. Para ELISpot de IFN- γ el rendimiento era mucho peor; para el mejor umbral de 42,0 SCF por millón de CMSP la sensibilidad era del 88% y la especificidad del 56% (figura 1).

25 Se obtuvieron resultados similares en pacientes adultos con LTBI, véase la tabla 3.

30

35 Tabla 3. Resultados de ELISpot en adultos

	sin infección n = 31	TB latente n = 39	Enfermedad de TB probable n = 12	Enfermedad de TB definitiva n = 18
ELISpot de IFN- γ				
- ESAT-6	29	343	301	342
- CFP-10	34	298	276	722
<hr/>				
- Híbrido de H1	52	312	221	173
- Ag85B	71	179	114	102
- AlaDH	24	99	266	328
- PstS1	51	43	72	86
<hr/>				
ELISpot de IL-2				
- ESAT-6	7	215	114	433
- CFP-10	5	227	148	471
- Híbrido de H1	14	198	201	445
- Ag85B	25	52	63	217
- AlaDH	2	8	193	429
- PstS1	9	29	37	13

5 Tal como se demuestra mediante ejemplos, los rendimientos de ensayos de ELISpot basados en interferón γ e IL-2 en niños y adultos cuando se usa AlaDH de *Mycobacterium tuberculosis* como estimulante (antígeno) permiten diferenciar entre estado latente y agudo de infección de tuberculosis. Además, tal como se esperaba, los antígenos actualmente incluidos en IGRA comerciales disponibles, tales como ESAT-6 y CFP-10, permiten diferenciar únicamente entre individuos sin infección y con infección.

10 Además, una mezcla o composición de ESAT-6 y AlaDH de *Mycobacterium tuberculosis* micobacteriana así como CFP-10 permite determinar la infección de tuberculosis en un individuo con una sensibilidad y especificidad superiores. Tal como se demuestra mediante análisis de ROC, la sensibilidad de la distinción de un estado latente y activo alcanzó el 100% mientras que la especificidad era del 96% usando el ensayo de ELISpot basado en IL-2. El rendimiento del ensayo de ELISpot de interferón γ usando antígeno AlaDH no fue tan bueno como el del ensayo de ELISpot basado en IL-2, pero todavía permite diferenciar entre los dos tipos diferentes de estado.

15 Además, tal como se demuestra, los métodos y sistemas de ensayo según la presente invención son particularmente útiles para la distinción de niños con TB activa de aquellos con TB latente cuando se usa antígeno AlaDH.

REIVINDICACIONES

1. Método para i) diagnosticar o determinar el estado de infección de tuberculosis o ii) predecir un desenlace clínico o determinar el ciclo de tratamiento en un individuo afectado por infección de tuberculosis, o iii) la estratificación del régimen terapéutico de un individuo con infección de tuberculosis en un individuo afectado por o que se sospecha que está afectado por infección de tuberculosis, que comprende:
 - a) determinar el nivel o la cantidad de citocinas liberadas o producidas por células mononucleares tras la estimulación, mediante lo cual dichas células mononucleares son de dicho individuo; y
 - b) i) determinar o diagnosticar el estado de dicho individuo basándose en el nivel o la cantidad de citocinas liberadas o producidas a partir de las células mononucleares, o ii) predecir el desenlace clínico o determinar el ciclo de tratamiento basándose en el nivel o la cantidad de citocinas liberadas o producidas a partir de dichas células mononucleares tras la estimulación, o iii) determinar el estado de infección de tuberculosis basándose en el nivel o la cantidad de citocinas liberadas o producidas a partir de dichas células mononucleares tras la estimulación permitiendo la diferenciación de un estado latente y activo de infección de tuberculosis en dicho individuo,

caracterizado porque las células mononucleares se estimulan con alanina deshidrogenasa (AlaDH) micobacteriana, y en el que las citocinas que van a determinarse son IL-2.
2. Método según la reivindicación 1 para monitorizar el cambio de estado latente a activo de infección de tuberculosis o viceversa en un individuo que comprende:
 - a) determinar el nivel o la cantidad de citocinas liberadas o producidas a partir de células mononucleares a partir de dicho individuo tras la estimulación en un primer punto de tiempo;
 - b) determinar el nivel o la cantidad de citocinas liberadas o producidas a partir de células mononucleares tras la estimulación, mediante lo cual dichas células mononucleares se obtienen a partir de dicho individuo en un segundo punto de tiempo; y
 - c) comparar el nivel o la cantidad de citocinas determinado en la etapa a) con el nivel o la cantidad determinado en la etapa b) o con un valor de referencia mediante lo cual un aumento del nivel o la cantidad con respecto a un valor de referencia o con respecto al nivel o la cantidad determinado en la etapa a) es indicativo de una transición de estado latente a activo y una disminución del nivel o la cantidad con respecto a un valor de referencia o con respecto al nivel o la cantidad determinado en la etapa a) es indicativa de una transición de estado activo a latente

caracterizado porque las células mononucleares se estimulan con alanina deshidrogenasa (AlaDH) micobacteriana.
3. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que la AlaDH es de *Mycobacterium tuberculosis*.
4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las células mononucleares proceden de una muestra del individuo incluyendo una muestra de sangre u otros líquidos corporales incluyendo lavado broncoalveolar y orina y tejidos.
5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el nivel o la cantidad de citocinas se determina a nivel de proteína o a nivel de ácido nucleico.
6. Método según la reivindicación 5, en el que el nivel o la cantidad de citocina se determina mediante un inmunoensayo o mediante técnicas de PCR.
7. Método según la reivindicación 6, en el que el inmunoensayo es un ELISpot o ELISA.
8. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el valor de referencia en Elispot de IL-2 es inferior a 25.
9. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que los individuos son niños.
10. Uso de un kit para diagnosticar o determinar el estado de infección de tuberculosis, o para predecir un desenlace clínico o determinar el ciclo de tratamiento en un individuo afectado por o que se sospecha que está afectado por infección de tuberculosis, o para la estratificación del régimen terapéutico de un individuo con infección de tuberculosis o para monitorizar la evolución de infección de tuberculosis, o para determinar la transición de estado latente a activo de infección de tuberculosis en un individuo, comprendiendo dicho kit medios para determinar el nivel o la cantidad de citocinas liberadas o producidas a partir de células

mononucleares tras la estimulación, mediante lo cual dichas células mononucleares se obtienen a partir de dicho individuo, un agente estimulante que es alanina deshidrogenasa (AlaDH) micobacteriana, e instrucciones sobre cómo usar dicho kit de prueba para un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que las citocinas que van a determinarse son IL-2.

- 5
11. Uso de un kit según la reivindicación 10, mediante el cual dicho kit es un ELISpot o ELISA o dicho kit es un kit de PCR.
- 10
12. Uso de alanina deshidrogenasa micobacteriana como estimulante para diferenciar estado latente y estado activo de infección de tuberculosis en un individuo afectado por o que se sospecha que está afectado por infección de tuberculosis.
- 15
13. Uso de alanina deshidrogenasa (AlaDH) micobacteriana en la diferenciación entre infección de tuberculosis latente y activa según la reivindicación 12, en el que los individuos are niños.
14. Uso de una composición que comprende alanina deshidrogenasa (AlaDH) micobacteriana en la determinación de infección de tuberculosis en un individuo, usando los componentes de la composición como estimulante.
- 20
15. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, en el que la AlaDH es AlaDH de *Mycobacterium tuberculosis*.

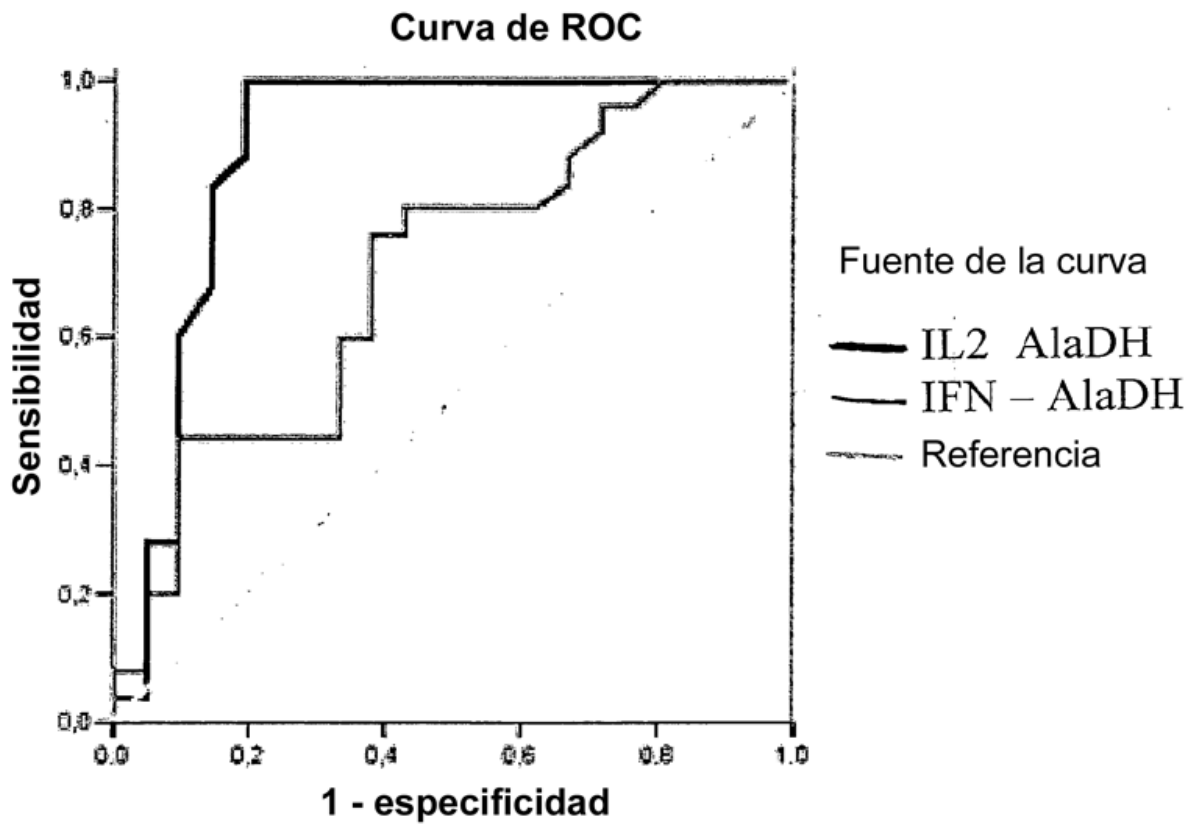


Figura 1