

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11)

**030721**

(13)

**B1**

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации  
и выдачи патента: **2018.09.28**

(51) Int. Cl. **G01N 33/569** (2006.01)

(21) Номер заявки: **201590220**

(22) Дата подачи: **2013.07.16**

### (54) СПОСОБЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОСТОЯНИЯ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ У ИНДИВИДУУМА

(31) **12176506.9**

(32) **2012.07.16**

(33) **EP**

(43) **2015.06.30**

(86) **PCT/EP2013/065002**

(87) **WO 2014/012928 2014.01.23**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**ЛИОНЕКС ГМБХ (DE)**

(72) Изобретатель:  
**Сингх Махавир, Делиос Марио М.,  
Делла Белла Чиара (DE)**

(74) Представитель:  
**Медведев В.Н. (RU)**

(56) US-A1-2007026473  
DAVIDOW AMY ET AL.: "Antibody profiles characteristic of Mycobacterium tuberculosis infection state", INFECTION AND IMMUNITY, AMERICAN SOCIETY FOR MACROBIOLOGY, USA, vol. 73, no. 10, 1 October 2005 (2005-10-01), pages 6846-6851, XP002567672, ISSN: 0019-9567, DOI: 10.1128/IAI.73.10.6846-6851.2005, the whole document

M.L. Gennaro ET AL.: "Antibody markers of incident tuberculosis among HIV-infected

adults in the USA: a historical prospective study", INT. J. TUBERC. LUNG. DIS., 1 June 2007 (2007-06-01), pages 624-631, XP055042331, Retrieved from the Internet: URL: [http://docstore.ingenta.com/cgi-bin/ds\\_deliver/1/u/d/ISIS/71136129.1/iatld/ijtld/2007/00000011/00000006/art00007/BA09D3F1C3E406CC13512370265D6560A518B9CCB6.pdf?link=http://www.ingentaconnect.com/error/delivery&format=pdf](http://docstore.ingenta.com/cgi-bin/ds_deliver/1/u/d/ISIS/71136129.1/iatld/ijtld/2007/00000011/00000006/art00007/BA09D3F1C3E406CC13512370265D6560A518B9CCB6.pdf?link=http://www.ingentaconnect.com/error/delivery&format=pdf), [retrieved on 2012-10-26], the whole document

AMANATIDOU V. ET AL.: "Latent tuberculosis infection in children: diagnostic approaches", EUROPEAN JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY & INFECTIOUS DISEASES, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 31, no. 7, 4 January 2012 (2012-01-04), pages 1285-1294, XP035064008, ISSN: 1435-4373, DOI: 10.1007/S10096-011-1524-3, the whole document

ELENA CHIAPPINI ET AL.: "Potential Role of M. tuberculosis Specific IFN-[gamma] and IL-2 ELISPOT Assays in Discriminating Children with Active or Latent Tuberculosis", PLOS ONE, vol. 7, no. 9, 1 January 2012 (2012-01-01), page e46041, XP055042205, ISSN: 1932-6203, DOI: 10.1371/journal.pone.0046041, the whole document

(57) Изобретение относится к способам определения состояния туберкулезной инфекции у индивидуума, а именно определения о переходе туберкулезной инфекции из латентного в активное состояние и из активного в латентное состояние. Изобретение также относится к применению этих способов для прогноза клинического исхода или определения курса лечения индивидуума, пораженного туберкулезной инфекцией. Кроме того, изобретение относится к применению микобактериальной аланиндегидрогеназы (AlaDH) в этих способах в качестве стимулятора для дифференциации латентного состояния и активного состояния туберкулезной инфекции у индивидуума, а также относится к применению набора в этих способах, где набор содержит средства для определения уровня IL-2, продуцируемого полученными от индивидуума мононуклеарными клетками, после стимуляции этих мононуклеарных клеток, стимулирующий агент, который представляет собой AlaDH, и инструкции о том, как использовать указанный тестовый набор.

**030721****B1****B1****030721**

В первом аспекте изобретение относится к способу определения состояния туберкулезной инфекции у индивидуума, пораженного туберкулезной инфекцией. В дополнительном аспекте предложен способ определения изменения туберкулезной инфекции у индивидуума с латентного на активное состояние или наоборот. Кроме того, настоящее изобретение относится к набору для применения в диагностике или детекции состояния туберкулезной инфекции, а также аланиндегидрогеназе *Mycobacterium tuberculosis* для применения в специфической дифференциации латентного состояния и активного состояния заболевания туберкулеза у индивидуума.

#### Известный уровень техники

В течение последнего десятилетия достигнуты значительные успехи в иммунологической диагностике инфекции *Mycobacterium tuberculosis* (TB) in vitro (Machingaidze S. et al., *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2011; 30:694-700). Коммерчески доступными являются три специфичных для *Mycobacterium tuberculosis* анализа с высвобождением интерферона- $\gamma$  (IGRA). Они детектируют высвобождение интерферона- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) мононуклеарными клетками в ELISpot (T-SPOT. TB - Oxford Immunotec, Abingdon, UK) или в цельной крови в ELISA (QuantiFERON-TB GOLD и QuantiFERON-TB GOLD в пробирке; QFT-G-IT; Cellestis, Carnegie, Australia) после контакта ex vivo со специфичными для *Mycobacterium tuberculosis* антигенами. В отношении туберкулиновой кожной пробы (TST), IGRA обладают рядом преимуществ: на них минимально влияет предыдущая вакцинация бациллой Кальметта-Герена (BCG) или инфекция нетуберкулезными микобактериями, они не вызывают эффекта ревакцинации, не требуют двойного посещения медицинского учреждения, и интерпретация результатов не зависит от исполнителя (Chiappini E. et al., *Clin. Ther.* 2012 Apr 16). Опубликовано, что у взрослых IGRA являются более специфичными и по меньшей мере такими же чувствительными, как TST, и в настоящее время они включены в диагностические алгоритмы в методические указания для взрослых (Mazurek G.H. et al., United States, 2010, MMWR Recomm. Rep. 2010; 59:1-25). Однако опубликованные чувствительность и специфичность IGRA в исследованиях детских групп сильно варьируют и в отношении их использования у детей рекомендуют соблюдать осторожность ввиду недостаточных и противоречивых данных (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 A.M. et al., *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.* 2011; 15:1018-32). Кроме того, они не позволяют отличить активную и латентную туберкулезную инфекцию (LTBI) (Amanatidou V. et al., *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2012 Jan 4). Эта задача является существенной для педиатров, так как определенный диагноз TB, подтвержденный культурами, у детей является редким. Как правило, заболевание детский TB является олигобациллярным и большинство диагнозов TB у детей являются "вероятными" заболеваниями на основе результатов TST и IGRA, клинических симптомов и признаков, рентгенологических исследований, анамнеза, реакции на лечение TB и опыта лечащего врача в этой области.

Положительный IGRA у ребенка с признаками, позволяющими предполагать наличие активного TB, не обеспечивает окончательного диагноза, особенно если ребенок живет в области с высоким распространением TB. Положительный результат IGRA может быть результатом заболевания TB, а также LTBI, которая может быть идентична заболеванию, вызывающему рассматриваемые симптомы или признаки. В этом случае полезным мог бы быть тест, который точно различает активный туберкулез от латентной TB инфекции. В настоящее время успеха в исследованиях с использованием анализов ELISpot на основе цитокинов, отличных от IFN- $\gamma$  (т.е. IL-10 или IL-2) (Amanatidou V. et al., *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2012 Jan 4), или исследуя иммунный ответ на другие микобактериальные антигены, отличные от ESAT-6, CFP-10 и TB7,7, которые в настоящее время включают в коммерчески доступные IGRA, достигнуто не было.

Альтернативные способы определения состояния туберкулеза включают определение профилей антител, характерных для состояния туберкулеза. Например, в US 2007/0026473 A1, а также в публикации Davidow A. et al., 2005, *Infection and Immunity*, 73(10), 6846-6851, описаны такие профили антител. В этих работах для определения профилей антител использовали антигены (ESAT-6, Ag 38 кДа, Ag 16 кДа, Rv 2626с, ферредоксин и аланиндегидрогеназу). Описано, что антитела к Ag 38 кДа, аланиндегидрогеназа и Rv 2626с ассоциированы с активным TB, тогда как антитела к Ag 16 кДа, ферредоксину A и ESAT-6 ассоциированы с неактивным TB. В отличие от этого, группа у Gennaro M.L. et al., 2007, *In J. Tuberc. Lung Dis.*, 11 (6), 624-631 позже определила, что ответ антителами на антигены ESAT-6, Ag 38 кДа, Ag 16 кДа, малатсинтеазу и MTSA-10/CFP-10 в группах с TB увеличен по сравнению с контрольной группой, тогда как другие антигены, Rv 2626с, ферредоксин A, аланиндегидрогеназа, Ag85 и GluS не демонстрируют отличий по уровню антител. Таким образом, данные относительно некоторых антигенов спорны и позже опубликованы Gennaro et al., причем в документе установлено, что между прочим аланиндегидрогеназа, а также и Rv2626с не подходят для определения статуса TB.

Однако анализы на основе антител имеют недостатки в отношении чувствительности и специфичности. До настоящего времени не разработано ни одного серологического теста, который мог бы с высокой чувствительностью и специфичностью диагностировать активный TB (Sarman Singh and V.M. Katoch, *Indian J. Med. Res.* 2011, 134(5): 583-587; doi: 10.4103/0971-5916.90980).

Следовательно, существует необходимость в дополнительных способах, позволяющих устанавли-

вать различия между латентным и активным состояниями туберкулезной инфекции. Соответственно, в данной области существует необходимость в подходах, которые предназначены для детекции и определения схемы лечения, или для прогноза клинического исхода или определения курса лечения, а также для определения состояния туберкулезной инфекции у страдающего от этого индивидуума.

В настоящем изобретении предложены новые способы и анализы, особенно пригодные для описанных выше задач.

### Сущность изобретения

В первом аспекте изобретение относится к способу определения состояния туберкулезной инфекции у индивидуума, включающему а) определение уровня цитокинов, продуцируемых мононуклеарными клетками после стимуляции мононуклеарных клеток, где указанные мононуклеарные клетки получены от указанного индивидуума; и с) сравнение уровня цитокинов, определенных на стадии а), с контрольным значением, где увеличение уровня относительно контрольного значения свидетельствует о переходе из латентного в активное состояние, а снижение уровня относительно контрольного значения свидетельствует о переходе из активного в латентное состояние, характеризующемуся тем, что мононуклеарные клетки стимулируют микобактериальной аланиндегидрогеназой (AlaDH), и определяемые цитокины представляют собой IL-2. Настоящее изобретение также относится к способу определения состояния туберкулезной инфекции у индивидуума, включающему а) определение уровня IL-2, продуцируемого мононуклеарными клетками после стимуляции мононуклеарных клеток, полученными от указанного индивидуума после стимуляции в первый момент времени; б) определение уровня IL-2, продуцируемого мононуклеарными клетками после стимуляции мононуклеарных клеток, где указанные мононуклеарные клетки получают от указанного индивидуума во второй момент времени; и с) сравнение уровня IL-2, определенных на стадии а), с уровнем, определенным на стадии б), где увеличение уровня относительно уровня, определенного на стадии а), свидетельствует о переходе из латентного в активное состояние, а снижение уровня относительно уровня, определенного на стадии а), свидетельствует о переходе из активного в латентное состояние. В способе мононуклеарные клетки стимулируют микобактериальной аланиндегидрогеназой (AlaDH).

Согласно одному из вариантов изобретения аланиндегидрогеназа (AlaDH) представляет собой аланиндегидрогеназу *Mycobacterium tuberculosis*.

Таким образом, авторы изобретения утверждают, что микобактериальная аланиндегидрогеназа, в частности аланиндегидрогеназа *Mycobacterium tuberculosis* (AlaDH), представляет собой подходящий стимулятор для мононуклеарных клеток, получаемых от индивидуумов, пораженных или с подозрением на поражение туберкулезной инфекцией, а затем определение количества или уровня цитокинов, высвобождаемых или продуцируемых указанными мононуклеарными клетками после стимуляции, таким образом, обеспечивает дифференциацию латентного и активного состояний туберкулезной инфекции у указанного индивидуума соответственно. В частности, в отличие от других известных микобактериальных компонентов, например, как описано в публикации Amanatidou V. et. al., Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 2012 Jan 4, неожиданно показано, что AlaDH приводит к высвобождению или продукции цитокинов только в состоянии активного ТВ, тогда как в состоянии латентного ТВ высвобождение или продукция цитокинов являются значимо более низкими. В частности, это верно для цитокина IL-2.

Способы, описываемые в настоящем документе, обычно представляют собой способы *in vitro*. Мононуклеарные клетки получают от тестируемого индивидуума. Указанные клетки получают от указанного индивидуума заранее, таким образом, стадия получения от индивидуума образца, содержащего клетки, например, получения образца крови, как правило, не является частью способа по настоящему изобретению. Как описано в настоящем документе, способы включают варианты осуществления, где для стимуляции используют образцы цельной крови или где из образца цельной клетки предварительно выделяют мононуклеарные клетки. Если в настоящем документе не указано иное, то термин "мононуклеарные клетки" включает вариант осуществления с образцами цельной крови. В предпочтительном варианте осуществления мононуклеарные клетки представляют собой выделенные мононуклеарные клетки, например выделенные из цельной крови.

Способ настоящего изобретения применяют для прогноза клинического исхода или определения курса лечения индивидуума, пораженного туберкулезной инфекцией.

Кроме того, настоящее изобретение относится к применению набора для определения состояния туберкулезной инфекции, или для прогноза клинического исхода, или определения курса лечения индивидуума, пораженного туберкулезной инфекцией, где указанный набор содержит средства для определения уровня цитокинов, продуцируемых мононуклеарными клетками после стимуляции мононуклеарных клеток, где указанные мононуклеарные клетки получают от указанного индивидуума, стимулирующий агент, который представляет собой микобактериальную AlaDH, например AlaDH *Mycobacterium tuberculosis*, и инструкции о том, как использовать указанный тестовый набор в способе по настоящему изобретению.

Кроме того, настоящее изобретение относится к применению микобактериальной аланиндегидрогеназы, в частности аланиндегидрогеназы *Mycobacterium tuberculosis*, в качестве стимулятора, обеспечивающего дифференциацию латентного и активного состояний туберкулезной инфекции у индивидуума,

пораженного или с подозрением на поражение туберкулезной инфекцией.

Последней предложено применение композиция, содержащей микобактериальную AlaDH, в частности AlaDH *Mycobacterium tuberculosis*, в комбинации с ESAT-6 и CFP-10 для определения туберкулезной инфекции у индивидуума, в частности для применения в качестве стимуляторов, например, в анализах цельной крови или в клеточных анализах.

#### **Краткое описание чертежа**

На фигуре представлена ROC, иллюстрирующая чувствительность и специфичность результатов ELISpot IFN-гамма и IL-2 под действием AlaDH в различении детей с латентным (n=21) и активным (n=25) туберкулезом.

#### **Подробное описание изобретения**

В первом аспекте изобретение относится к способу определения состояния туберкулезной инфекции у индивидуума, включающему а) определение уровня цитокинов, продуцируемых мононуклеарными клетками после стимуляции мононуклеарных клеток, где указанные мононуклеарные клетки получены от указанного индивидуума; и с) сравнение уровня цитокинов, определенных на стадии а), с контрольным значением, где увеличение уровня относительно контрольного значения свидетельствует о переходе из латентного в активное состояние, а снижение уровня относительно контрольного значения свидетельствует о переходе из активного в латентное состояние. В способе мононуклеарные клетки стимулируют микобактериальной аланиндегидрогеназой (AlaDH), и определяемые цитокины представляют собой IL-2.

В одном из вариантов AlaDH представляет собой аланиндегидрогеназу *Mycobacterium tuberculosis*. Таким образом, авторы настоящего изобретения утверждают, что в зависимости от уровня или количества цитокинов, высвобождаемых или продуцируемых мононуклеарными клетками после стимуляции, где указанные мононуклеарные клетки получают от индивидуума, пораженного или с подозрением на поражение туберкулезной инфекцией, у указанного индивидуума, когда у ядродержащих клеток микобактериальной аланиндегидрогеназой, в частности аланиндегидрогеназой *Mycobacterium tuberculosis*, стимулируют высвобождение или продукцию цитокинов, можно диагностировать или определять состояние туберкулезной инфекции.

В отличие от коммерчески доступных анализов, анализы и способы, описываемые в настоящем документе, обеспечивают дифференциацию латентного и активного состояний туберкулезной инфекции. Дифференциация двух различных типов состояния важна для определения курса лечения и риска течения туберкулезной инфекции, а также для прогноза клинического исхода. Кроме того, важно следить за развитием туберкулезной инфекции у указанного индивидуума. Показано, что когда в качестве стимулятора используют AlaDH, профиль цитокинов, высвобождаемых или продуцируемых мононуклеарными клетками, стимулированными молекулами AlaDH, у индивидуумов с латентной ТВ инфекцией и индивидуумов с активной ТВ инфекцией отличается. В отличие от этого, молекулы коммерчески доступных IGRA обеспечивают дифференциацию неинфицированных и инфицированных индивидуумов только без дифференциации двух этих состояний.

Как используют в настоящем документе, термин "индивидуум" в контексте настоящего изобретения, как правило, представляет собой млекопитающее, в частности млекопитающее представляет собой человека, не являющегося человеком примата или других млекопитающих, чувствительных к микобактериальной инфекции. Индивидуум может быть индивидуумом мужского или женского пола. Индивидуум может быть индивидуумом, который ранее был диагностирован или идентифицирован как страдающий туберкулезной инфекцией и, в некоторых случаях, но не обязательно, уже проходил лечение туберкулезной инфекции. Индивидуум также может быть индивидуумом, который ранее был диагностирован или идентифицирован как страдающий от туберкулезной инфекции, но у которого наблюдали улучшение в течение заболевания в результате получения одного или нескольких лекарственных средств от инфекции соответственно. Кроме того, индивидуум также может быть индивидуумом, у которого ранее не диагностировали или не идентифицировали наличие туберкулезной инфекции.

Как используют в настоящем документе, термин "определение" или "детекция" относится к оценке наличия, отсутствия, величины, уровня или количества любого данного вещества в клиническом или полученном от индивидуума образце, включая уровни качественных и/или количественных концентраций веществ, иным способом оценивающих значения или классификацию клинического параметра индивидуума.

Термин "включает" или "включающий" или "содержит" или "содержащий" включает варианты осуществления "состоит" или "состоящий".

Как используют в настоящем документе, термин "AlaDH" включает антигенные фрагменты или весь полипептид AlaDH. В частности, AlaDH представляет собой антигенный олигопептид или полипептид, полученный из пептида с Seq ID No. 1. Таким образом, микобактериальная AlaDH предпочтительно представляет собой ALaDH TB со ссылочным номером NCBI NP\_217296.1 или номером базы данных TubercuList AlaDH-Rv2780. Специалисту хорошо известны подходящие фрагменты, например как описано в EP 0966544, включенном в настоящий документ путем ссылки. Кроме того, термин включает гомологи Seq. ID. No. 1 с такой же стимулирующей активностью мононуклеарных клеток, как AlaDH Seq. ID. No. 1.

Как используют в настоящем документе, если не указано иное, термин "латентный" включает латентное состояние ТВ инфекции (LTBI), а также состояние излечения после успешного лечения.

Как используют в настоящем документе, термин "моноклеарные клетки, полученные от индивидуума" относится к клеткам, полученным ранее от указанного индивидуума. Клетки получают от индивидуума, но способ по настоящему изобретению, как правило, не включает стадию получения образца. Предпочтительно клетки предоставляют в виде образца. Образец может представлять собой цельную кровь или образец, содержащий клетки после стадий выделения из образца, полученного от указанного индивидуума.

Кроме того, настоящее изобретение относится к способу определения состояния туберкулезной инфекции у индивидуума, включающему:

а) определение уровня IL-2, продуцируемого моноклеарными клетками после стимуляции моноклеарных клеток, полученными от указанного индивидуума после стимуляции в первый момент времени;

б) определение уровня IL-2, продуцируемого моноклеарными клетками после стимуляции моноклеарных клеток, где указанные моноклеарные клетки получают от указанного индивидуума во второй момент времени; и

с) сравнение уровня IL-2, определенных на стадии а), с уровнем, определенным на стадии б), где увеличение уровня относительно уровня, определенного на стадии а), свидетельствует о переходе из латентного в активное состояние, а снижение уровня относительно уровня, определенного на стадии а), свидетельствует о переходе из активного в латентное состояние, характеризующемуся тем, что моноклеарные клетки стимулируют в присутствии микобактериальной аланиндегидрогеназы (AlaDH), в частности аланиндегидрогеназы *Mycobacterium tuberculosis*.

Таким образом, можно различать латентное и активное состояния туберкулезной инфекции.

Кроме того, авторы изобретения утверждают, что AlaDH представляет собой ценный инструмент, а именно, ценный стимулятор для образцов цельной крови, в частности моноклеарных клеток, полученных от индивидуума, пораженного или с подозрением на поражение туберкулезной инфекцией, для диагностики или определения состояния указанной туберкулезной инфекции у указанного индивидуума.

В контексте настоящего изобретения термин "контрольное значение" относится к индексной величине, величине, получаемой на основе одного или нескольких компьютерных индексов, величине, получаемой у индивидуума с известной активной или латентной туберкулезной инфекцией, в частности с их группой. В частности, контрольные значения получали у индивидуумов, пораженных туберкулезной инфекцией в латентном и активном состоянии, и, кроме того, контрольное значение представляет собой интервал или индекс, полученный на основе по меньшей мере двух образцов, полученных от индивидуума с указанным состоянием болезни.

В предпочтительном варианте осуществления моноклеарные клетки получают из полученного от указанного индивидуума образца. Указанный образец может представлять собой кровь, полученный из крови образец или другие образцы, содержащие моноклеарные клетки, подходящие для проведения анализов высвобождения цитокинов или анализов определения количества цитокинов на уровне белка и нуклеиновой кислоты. В частности, образец представляет собой образец крови или его получают из других жидкостей организма, включая бронхоальвеолярный лаваж, и мочу, и ткани.

Таким образом, моноклеарные клетки можно получать из крови или других жидкостей организма и, необязательно, их выделяют общеизвестными способами.

Специалисту в данной области известен ряд различных способов, пригодных для получения указанных моноклеарных клеток от индивидуума.

Таким образом, авторы изобретения утверждают, что AlaDH представляет собой подходящий стимулятор в анализе цельной крови и в клеточном анализе для способа по настоящему изобретению.

Предпочтительно, чтобы уровень или количество цитокинов определяли посредством иммунологических анализов. Специалисту в данной области понятно, что для определения количества или уровня цитокина в образце пригоден ряд способов, включая иммунологические анализы, такие как вестерн-блоттинг, ELISA и ELISpot. Особенно желательно, чтобы цитокины определяли на уровне белка способами ELISpot или ELISA. Однако уровни цитокинов также можно измерять путем определения уровней иРНК, соответствующих указанным цитокинам, соответственно.

Специалисту хорошо известны подходящие способы определения уровней цитокинов на уровне нуклеиновых кислот, включая способы ПЦР.

Предпочтительно, чтобы определяемый цитокин представлял собой, по меньшей мере, цитокин, выбранный из IL-2 или интерферона- $\gamma$ . Особенно желательно, чтобы определяли количество или уровень IL-2, высвобождаемого или продуцируемого указанными моноклеарными клетками после стимуляции микобактериальной аланиндегидрогеназой (AlaDH), в частности аланиндегидрогеназой *Mycobacterium tuberculosis*.

Как продемонстрировано в настоящем документе, анализы ELISpot на основе ELISpot IL-2 и/или ELISpot IFN- $\gamma$  обеспечивают дифференциацию латентного и активного состояний туберкулезной инфек-

ции у детей или взрослых.

По предпочтительному варианту осуществления контрольное значение для ELISpot IL-2 для латентного состояния туберкулезной инфекции составляет ниже 25, предпочтительно ниже 10, тогда как контрольное значение для активного состояния туберкулезной инфекции составляет выше 50, предпочтительно выше 100.

При наблюдении за изменением состояния туберкулезной инфекции у индивидуума с латентного на активное или наоборот, первый образец от индивидуума предпочтительно получают в первый момент времени, тогда как второй образец получают после, предпочтительно предопределенного, промежутка времени, например после прохождения лечения туберкулезной инфекции или прохождения лечения аутоиммунного заболевания. Например, в случае лечения аутоиммунного заболевания или другого заболевания, где изменено состояние иммунной системы, это помогает определить состояние ТВ инфекции, избегая любой атаки ТВ инфекции. Известно, что при лечении пациентов с РА латентное состояние ТВ инфекции может переходить в активное состояние. Таким образом, настоящее изобретение обеспечивает определение курса лечения или прогноз клинического исхода у указанного индивидуума посредством определения текущего состояния туберкулезной инфекции у указанного индивидуума.

В частности, способ по настоящему изобретению обеспечивает идентификацию или мониторинг или наблюдение за индивидуумами, пораженными туберкулезной инфекцией, с определением изменения состояния туберкулеза с латентного на активное или наоборот. Когда относительный или абсолютный уровень или количество цитокинов возрастают, это свидетельствует о переходе из латентного в активное состояние, тогда как снижение относительного или абсолютного уровня или количества свидетельствует о переходе из активного в латентное состояние.

В отчетливом противоречии с микобактериальной аланиндегидрогеназой (AlaDH), в частности аланиндегидрогеназой *Mycobacterium tuberculosis*, другие стимуляторы, например хорошо известные микобактериальные молекулы ESAT-6, CFP-10 или другие молекулы, например, используемые в качестве стимуляторов в анализах ELISpot или ELISA, обеспечивают только дифференциацию между ТВ инфекцией и не ТВ инфекцией.

Однако в настоящем документе определено, что композиция, содержащая микобактериальную аланиндегидрогеназу (AlaDH), в частности аланиндегидрогеназу *Mycobacterium tuberculosis*, и ESAT-6, а также CFP-10 обеспечивает повышенную чувствительность и специфичность тестов, предоставляя возможность дифференциации неинфицированных и инфицированных индивидуумов, в частности тестов, где эти компоненты используют в качестве стимуляторов. Таким образом, компоненты указанной композиции можно использовать в отдельных анализах или можно использовать в комбинации.

Из открытия, описываемого в настоящем документе, следуют важные клинические выводы. Вследствие возможности дифференциации латентного и активного состояний можно соответствующим образом стратифицировать схему лечения или определять курс лечения индивидуума.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к применению набора для определения состояния туберкулезной инфекции, или для прогноза клинического исхода, или определения курса лечения индивидуума, пораженного или с подозрением на поражение туберкулезной инфекцией, туберкулезной инфекцией, или для определения перехода туберкулезной инфекции у индивидуума из латентного в активное состояние, где указанный набор содержит средства для определения уровня или количества цитокинов, высвобождаемых или продуцируемых мононуклеарными клетками после стимуляции, где указанные мононуклеарные клетки получают от указанного индивидуума, стимулирующий агент, который представляет собой микобактериальную аланиндегидрогеназу (AlaDH), в частности аланиндегидрогеназу *Mycobacterium tuberculosis*, и инструкции о том, как использовать указанный тестовый набор в способе по настоящему изобретению.

В частности, в предпочтительном варианте осуществления указанный набор представляет собой ELISpot или ELISA, обеспечивающие определение уровня или количества цитокина. Особенно предпочтительно, чтобы ELISpot или ELISA представляли собой анализы, обеспечивающие определение количества или уровня IL-2 или интерферона- $\gamma$ , в частности IL-2. Альтернативно, набор представляет собой набор ПЦР со средствами, подходящими для анализа экспрессии цитокинов на уровне нуклеиновых кислот.

Кроме того, настоящее изобретение относится к применению микобактериальной аланиндегидрогеназы (AlaDH), в частности аланиндегидрогеназы *Mycobacterium tuberculosis*, в дифференциации латентного состояния и активного состояния туберкулезной инфекции у индивидуума, пораженного или с подозрением на поражение туберкулезной инфекцией.

Микобактериальная аланиндегидрогеназа особенно пригодна для дифференциации этого у человека, в частности у детей.

Приведенное выше описание в основном описывает настоящее изобретение. Более полное понимание можно получить при обращении к приведенным ниже конкретным примерам трех вариантов осуществления изобретения, не ограничиваясь ими.

### Примеры

Материалы и методы.

Исследуемые индивидуумы.

В исследование перспективно включали отбираемых подряд детей с риском ТВ инфекции, обращавшихся в инфекционное отделение отдела кафедры женского и детского здоровья университета Флоренции, Италия, в период с 2009 по 2010 год. Исследуемые дети представляли собой детей с клиническим подозрением на заболевание ТВ и/или находящиеся в тесном контакте с недавно диагностированными случаями заболевания контагиозным ТВ, и/или прошедшие международное усыновление, или недавно иммигрировавшие дети, поступившие из стран с высокой распространенностью ТВ. В качестве периода недавней иммиграции установили максимум два года. Из исследования исключали детей с врожденным или приобретенным иммунодефицитом (на основе их истории болезни (анамнеза), клинического исследования и/или лабораторного тестирования).

Туберкулиновая кожная проба.

TST проводили способом Манту посредством интрадермальной инъекции 5 туберкулиновых единиц (в 0,1 мл) очищенного белкового производного (Biocine Test-PPD, Chiron, Siena, Italy) в ладонную поверхность предплечья. Поперечное уплотнение кожи регистрировали (в мм) через 48-72 ч. В соответствии с American Academy of Pediatrics guidelines (American Academy of Pediatrics. [Tuberculosis]. In: Pickering L.K., Baker C.J., Kimberlin D.W., Long S.S., eds. Red Book: 2009 Report of the Committee on Infectious Diseases. 28th ed. Elk Grove Village, IL: American Academy of Pediatrics; 2009:[680-701], Amanatidou V. et al., см. выше) положительную TST определяли как размер уплотнения  $\geq 5$  мм для детей в тесном контакте с известным или предполагаемым случаем контакта с заболеванием ТВ, или для детей с предполагаемым заболеванием ТВ (на основе клинических признаков и/или рентгенограммы органов грудной клетки), и  $\geq 10$  мм для детей, рожденных в странах с высокой распространенностью ТВ и недавно иммигрировавших.

QFT-G-IT.

Тест QFT-IT проводили по инструкциям производителя, как описано ранее (Millington K.A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2011;108:5730-5. Vilaplana C. et al., Scand. J. Immunol. 2008;67:610-7). После вычитания величины отрицательного контроля результат был положительным, если антигензависимый ответ составлял  $\geq 35$  ME, отрицательным, если индуцированный митогеном ответ составлял  $\geq 5$  ME/мл и антигензависимый ответ составлял  $< 0,35$  ME/мл, и неопределенным, если как индуцированный митогеном и антигензависимый ответы находились ниже граница отсечения, или индуцированный митогеном ответ составлял  $> 8$  ME/мл.

Анализ ELISpot.

Собственный ELISpot для IFN-гамма и IL-2 проводили с использованием антигенов M. tuberculosis Lionex. В кратком изложении, бласты Т-клеток (105 клеток) линии каждого пациента стимулировали антигеном M. tuberculosis в присутствии облученных аутологических APC ( $5 \times 10^4$  клетки) и высевали в трех повторах в 96-луночные планшеты, покрытые антителом к IFN- $\gamma$  или антителом к IL-2. В качестве отрицательного контроля служили клетки, стимулированные только средой. В качестве положительного контроля служили клетки, стимулированные РНА. Затем микропланшеты ELISPOT IFN- $\gamma$  и IL-2 инкубировали при 37°C в 5% CO<sub>2</sub> в течение 24 ч. В конце периода культивирования планшеты отмывали и инкубировали в течение 3 ч с подходящими биотинилированными mAb к IFN- $\gamma$  или к IL-2. Затем на 2 ч добавляли комплекс стрептавидин-HRP с последующим раствором субстрата. SFC подсчитывали с использованием автоматизированного сканера ELISPOT (Autoimmune Diagnostika GmbH).

План исследования.

Информацию о социально-демографических данных до воздействия ТВ и последующую историю болезни (анамнез) получали у родителей или опекунов каждого ребенка или из медицинской документации и записывали в базу данных исследования. Детей считали вакцинированными BCG, если была доступна явная документация и/или присутствовал рубец. Всем детям проводили клиническую оценку, TST и венопункцию для IGRA (QFT-G-IT и собственный анализ ELISpot). Кровь брали в течение первого обследования после получения информированного согласия от родителей или опекунов и перед началом противотуберкулезного лечения. Рентгенографию органов грудной клетки проводили у всех демонстрирующих симптомы детей, у детей с положительной TST и у всех контактирующих сроком менее 5 лет. У детей с подозрением на легочный ТВ получали по три образца мокроты или утренних желудочных аспиратов для детекции Mycobacterium tuberculosis (посредством микроскопии, полимеразной цепной реакции и культуры). В избранных случаях по решению педиатра проводили компьютерную томографию (СТ) грудной клетки. В период исследования в инфекционном отделении подозреваемых или выявленных случаев внелегочного ТВ не наблюдали. Исследование получило одобрение местного этического комитета, а также получали информированное согласие на исследование от родителей или опекунов.

Определение исследуемых групп.

Исследуемых детей классифицировали как неинфицированных, случаи LTBI или случаи заболевания активным легочным ТВ в соответствии с определением American Academy Guidelines (American Academy of Pediatrics. [Tuberculosis], In: Pickering L.K., Baker C.J., Kimberlin D.W., Long S.S. eds. Red Book: 2009 Report of the Committee on Infectious Diseases. 28th ed. Elk Grove Village, IL: American Acad-

emy of Pediatrics: 2009:[680-701]). В случае противоречивых результатов TST/QFT-G-IT детей определяли в соответствующую группу на основании результата TST в соответствии с самыми последними руководствами США и Европы (American Academy of Pediatrics. [Tuberculosis]. In: Pickering L.K., Baker C.J., Kimberlin D.W., Long S.S. eds. Red Book: 2009 Report of the Committee on Infectious Diseases. 28th ed. Elk Grove Village, IL: American Academy of Pediatrics: 2009:[680-701], Amanatidou V. et al., см. выше). В частности, детей без симптомов с отрицательной TST определяли как неинфицированных. Диагноз LTBI каждому ребенку определяли при положительной TST и отсутствии клинических или рентгенологических обоснований активного TB. Случаи активного TB определяли по двум категориям: подтвержденный TB, дети с *Mycobacterium tuberculosis*, культивируемой или детектируемой посредством микроскопии или молекулярных способов из мокроты или культуры желудочного аспирата, и возможный TB: отсутствие микробиологического подтверждения, но присутствие всех из следующих критериев: (A) клинические симптомы и признаки активного TB, (B) аномальная рентгенография и/или скан КТ, соответствующий TB легких, (C) ответ на терапию TB и (D) или контакт с TB в анамнезе или путешествие в страну с эндемичным TB в пределах периода последних 24 месяцев (Amanatidou V. et al., см. выше).

#### Статистический анализ.

Категорийные данные сравнивали с использованием критерия хи-квадрат (или точного критерия Фишера, когда ожидаемые размеры групп были меньше чем пять). Для непрерывных измерений, когда предполагали, что зависимая переменная представляет собой не распределенную нормально интервальную переменную, для тестирования зависимостей в непарных анализах использовали критерий Вилкоксона-Манна-Уитни. Соответствие тестов оценивали посредством К-статистики Коэна с согласованностью, рассматриваемой как "слабая" для  $k \leq 0,2$ , "посредственная" для  $0,2 < k \leq 0,4$ , "умеренная" для  $0,4 < k \leq 0,6$ , "значительная" для  $0,6 < k \leq 0,8$  и "оптимальная" для  $0,8 < k \leq 1,0$ . Для определения лучших пороговых значений результатов ELISpot IL-2 и IFN- $\gamma$  для различения детей с активным или латентным TB относительно специфичных антигенов M. tuberculosis проводили анализ кривой рабочих характеристик приемника (ROC) и регистрировали соответствующие чувствительность и специфичность. Также рассчитывали площадь под кривой ROC (AUC) и 95% доверительный интервал (CI). Статистический анализ проводили с использованием статистического программного обеспечения SPSS для Windows, версии 14.0. Статистически значимым считали  $P < 0,05$ .

#### Результаты.

В исследование включали семьдесят пять детей (мальчиков); средний возраст: 75 месяцев; интерквартильный размах [IQR] 39-116. Предыдущая вакцинация BCG была задокументирована у 21 (28,0%) ребенка.

Диагноз заболевания подтвержденным TB поставили 5 детям. У всех этих детей присутствовали симптомы, соответствующие TB (например, постоянный кашель, лихорадка, ночная потливость или потеря массы) и/или заболеванию легких, задокументированные посредством рентгенографии грудной клетки и подтвержденные результатами сканирования КТ, и *Mycobacterium tuberculosis* детектировали в культурах и/или микроскопически и/или посредством полимеразной цепной реакции. Возможный TB диагностировали у 20 детей. У всех этих детей проводили исследование по меньшей мере трех желудочных аспиратов или мокроты на детекцию *Mycobacterium tuberculosis* с отрицательными результатами. В табл. 1 представлен статус вакцинации BCG, размер TST и результат QFT-G-IT в соответствии с конечным диагнозом.

Таблица 1. Статус вакцинации BCG, размер TST и результат QFT-G-IT в соответствии с конечным диагнозом у исследуемых детей

	Неинфицированные n=29 n (%)	Латентный TB n=21 n (%)	Возможное заболевание TB n=20 n (%)	Подтвержденное заболевание TB n=5 n (%)
Возраст, месяцы (медиана и IQR)	77 (28-101)	116 (61-151)	52 (27-82)	47 (8-97)
Вакцинация BCG	5	12	1	0
TST, диаметр уплотнения (мм)				
<5	28	0	0	1
≥5 и <10	1	1	2	0
≥10 и <15	0	5	1	1
≥15	0	15	17	3
Результат QFT-G-IT				
отрицательный	29	5	3	5
положительный	0	15	17	0
неопределенный	0	1	0	0

BCG - бацилла Кальметта-Герена, TST - туберкулинов кожная проба, IGRA - анализ высвобождения интерферона- $\gamma$ .



Несогласованные результаты TST/QFT-G-IT получали у четырех детей (один ребенок с подтвержденным TB, положительный QFT-G-IT и отрицательная TST, и три ребенка с возможным TB, отрицательный QFT-G-IT и положительная TST). Общая согласованность между IGRA и TST (не принимая во внимание неопределенный результат) была существенной со значением  $k=0,679$ .

Результаты ELISpot IFN- $\gamma$  и IL-2.

Результаты ELISpot суммированы в табл. 2.

Таблица 2. Результаты ELISpot

	Неинфицированные n=29	Латентный TB n=21	Возможное заболевание TB n=20	Подтвержденное заболевание TB n=5	P для неинфицированных детей по сравнению с инфицированными детьми	P для латентного заболевания по сравнению с выраженным заболеванием
IFN- $\gamma$ ELISpot						
- 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)	875 (200-3532)	<0,0001	0,691
- гибрид 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
IL-2 ELISpot						
- 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
- гибрид H1	20 (1-50)	180 (35-535)	195 (95-595)	430 (265-1635)	<0,0001	0,247
- Ag85B	20 (10-75)	40 (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

Сравнивая неинфицированных детей и детей с TB инфекцией (LTBI и возможное и подтвержденное заболевание TB), у инфицированных детей получили значимо более высокие средние значения, чем у неинфицированных детей, учитывая ответы ELISpot IFN- $\gamma$  на ESAT-6 ( $p<0,0001$ ), CFP-10 ( $p<0,0001$ ), гибрид H1 ( $p<0,0001$ ) или AlaDH ( $p=0,001$ ), тогда как, различия в Ag85B ( $p=0,063$ ) и PstS1 ( $p=0,512$ ), были незначимыми. Рассматривая результаты ELISpot IL-2, получали значимо различные результаты с ESAT-6, CFP-10, гибридом H1 и AlaDH ( $p=0,001$ ); но не с Ag85 ( $p=0,063$ ).

Сравнивая результаты детей с LTBI и с заболеванием TB (вероятное и подтвержденное заболевание), различия для ELISpot IFN- $\gamma$  были значимыми, только учитывая ответ на антиген AlaDH ( $p=0,021$ ) (табл. 2). В отношении ELISpot IL-2 значимые отличия подтверждали для антигена AlaDH ( $p<0,0001$ ), тогда как при оценке других антигенов различий не наблюдали. Сравнивая результаты неинфицированных детей и детей с LTBI, значимое отличие наблюдали в ответах ELISpot IFN- $\gamma$  на ESAT-6 ( $p>0,0001$ ), CFP-10 ( $p>0,0001$ ), гибрид H1 ( $p=0,001$ ), смесь ( $p=0,017$ ) и в ответах ELISpot IL-2 на ESAT-6 ( $p>0,0001$ ), CFP-10 ( $p>0,0001$ ), гибрид H1 ( $p>0,0001$ ) и смесь ( $p>0,0001$ ).

Анализ ROC продемонстрировали, что, учитывая ответ на AlaDH, для значения ELISpot IL-2 12,5 SCF на миллион PBMC (после вычитания фоновых пятен) чувствительность в различении латентного и активного TB составляла 100%, а специфичность составляла 81%. Для ELISpot IFN- $\gamma$  характеристика была намного хуже: для лучшего порогового значения 42,0 SCF на миллион PBMC чувствительность составляла 88%, а специфичность 56% (см. фигуру).

Сходные результаты получали у взрослых пациентов с LTBI, см. табл. 3.

Таблица 3. Результаты ELISpot у взрослых

	Неинфицированные n=31	Латентный ТВ n=39	Возможное заболевание ТВ n=12	Подтвержденное заболевание ТВ n=18
ELISpot IFN-γ				
- ESAT-6	29	343	301	342
- CFP-10	34	298	276	722
- гибрид H1	52	312	221	173
- Ag85B	71	179	114	102
- AlaDH	24	99	266	328
- PstS1	51	43	72	86
ELISpot IL-2				
- ESAT-6	7	215	114	433
- CFP-10	5	227	148	471
- гибрид H1	14	198	201	445
- Ag85B	25	52	63	217
- AlaDH	2	8	193	429
- PstS1	9	29	37	13

Как продемонстрировано в качестве примеров, характеристики анализов ELISpot на основе интерферона-γ и IL-2 у детей и взрослых при использовании в качестве стимулятора (антигена) AlaDH *Mycobacterium tuberculosis* обеспечивают дифференциацию латентного и острого состояния туберкулезной инфекции. Кроме того, как и ожидалось, антигены, включенные в настоящее время в коммерчески доступные IGRA, такие как ESAT-6 и CFP-10, позволяют дифференцировать только неинфицированных и инфицированных индивидуумов.

Кроме того, смесь или композиция микобактериальных AlaDH и ESAT-6 *Mycobacterium tuberculosis*, а также CFP-10, позволяет определять туберкулезную инфекцию у индивидуума с более высокой чувствительностью и специфичностью. Как показано посредством анализа ROC, при использовании анализа ELISpot, основанного на IL-2, чувствительность в различении латентного и активного состояния достигала 100%, при этом специфичность составляла 96%. Характеристика анализа ELISpot интерферона-γ с использованием антигена AlaDH была не такой хорошей, как у анализа ELISpot на основе IL-2, но все еще обеспечивала дифференциацию двух различных типов состояния.

Кроме того, как продемонстрировано, способы и системы анализа по настоящему изобретению при использовании антигена AlaDH особенно пригодны для различения детей с активной формой и детей с латентной формой ТВ.

## СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Lionex GmbH

<120> Состояние туберкулезной инфекции у индивидуума

<130> 3441-11\_PCT

<150> EP12176506.9

<151> 2012-07-16

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 371

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 1

Met Arg Val Gly Ile Pro Thr Glu Thr Lys Asn Asn Glu Phe Arg Val  
1 5 10 15

030721

Ala Ile Thr Pro Ala Gly Val Ala Glu Leu Thr Arg Arg Gly His Glu  
20 25 30

Val Leu Ile Gln Ala Gly Ala Gly Glu Gly Ser Ala Ile Thr Asp Ala  
35 40 45

Asp Phe Lys Ala Ala Gly Ala Gln Leu Val Gly Thr Ala Asp Gln Val  
50 55 60

Trp Ala Asp Ala Asp Leu Leu Leu Lys Val Lys Glu Pro Ile Ala Ala  
65 70 75 80

Glu Tyr Gly Arg Leu Arg His Gly Gln Ile Leu Phe Thr Phe Leu His  
85 90 95

Leu Ala Ala Ser Arg Ala Cys Thr Asp Ala Leu Leu Asp Ser Gly Thr  
100 105 110

Thr Ser Ile Ala Tyr Glu Thr Val Gln Thr Ala Asp Gly Ala Leu Pro  
115 120 125

Leu Leu Ala Pro Met Ser Glu Val Ala Gly Arg Leu Ala Ala Gln Val  
130 135 140

Gly Ala Tyr His Leu Met Arg Thr Gln Gly Gly Arg Gly Val Leu Met  
145 150 155 160

Gly Gly Val Pro Gly Val Glu Pro Ala Asp Val Val Val Ile Gly Ala  
165 170 175

Gly Thr Ala Gly Tyr Asn Ala Ala Arg Ile Ala Asn Gly Met Gly Ala  
180 185 190

Thr Val Thr Val Leu Asp Ile Asn Ile Asp Lys Leu Arg Gln Leu Asp  
195 200 205

Ala Glu Phe Cys Gly Arg Ile His Thr Arg Tyr Ser Ser Ala Tyr Glu  
210 215 220

Leu Glu Gly Ala Val Lys Arg Ala Asp Leu Val Ile Gly Ala Val Leu  
225 230 235 240

Val Pro Gly Ala Lys Ala Pro Lys Leu Val Ser Asn Ser Leu Val Ala  
245 250 255

His Met Lys Pro Gly Ala Val Leu Val Asp Ile Ala Ile Asp Gln Gly  
260 265 270

Gly Cys Phe Glu Gly Ser Arg Pro Thr Thr Tyr Asp His Pro Thr Phe  
275 280 285

Ala Val His Asp Thr Leu Phe Tyr Cys Val Ala Asn Met Pro Ala Ser  
290 295 300

Val Pro Lys Thr Ser Thr Tyr Ala Leu Thr Asn Ala Thr Met Pro Tyr  
305 310 315 320

Val Leu Glu Leu Ala Asp His Gly Trp Arg Ala Ala Cys Arg Ser Asn  
325 330 335

Pro Ala Leu Ala Lys Gly Leu Ser Thr His Glu Gly Ala Leu Leu Ser  
340 345 350

Glu Arg Val Ala Thr Asp Leu Gly Val Pro Phe Thr Glu Pro Ala Ser  
355 360 365

Val Leu Ala  
370

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ определения состояния туберкулезной инфекции у индивидуума, включающий:

- а) определение уровня цитокинов, продуцируемых мононуклеарными клетками после стимуляции мононуклеарных клеток, где указанные мононуклеарные клетки получены от указанного индивидуума; и
- с) сравнение уровня цитокинов, определенных на стадии а), с контрольным значением, где увеличение уровня относительно контрольного значения свидетельствует о переходе из латентного в активное состояние, а снижение уровня относительно контрольного значения свидетельствует о переходе из активного в латентное состояние, характеризующийся тем, что мононуклеарные клетки стимулируют микобактериальной аланиндегидрогеназой (AlaDH), и

где определяемые цитокины представляют собой IL-2.

2. Способ определения состояния туберкулезной инфекции у индивидуума, включающий:

- а) определение уровня IL-2, продуцируемого мононуклеарными клетками после стимуляции мононуклеарных клеток, полученными от указанного индивидуума после стимуляции в первый момент времени;
- б) определение уровня IL-2, продуцируемого мононуклеарными клетками после стимуляции мононуклеарных клеток, где указанные мононуклеарные клетки получают от указанного индивидуума во второй момент времени; и
- с) сравнение уровня IL-2, определенных на стадии а), с уровнем, определенным на стадии б), где увеличение уровня относительно уровня, определенного на стадии а), свидетельствует о переходе из латентного в активное состояние, а снижение уровня относительно уровня, определенного на стадии а), свидетельствует о переходе из активного в латентное состояние, характеризующийся тем, что мононуклеарные клетки стимулируют микобактериальной аланиндегидрогеназой (AlaDH).

3. Способ по п.1 или 2, где AlaDH представляет собой аланиндегидрогеназу *Mycobacterium tuberculosis*.

4. Способ по любому из пп.1-3, где мононуклеарные клетки происходят из полученного у индивидуума образца, выбранного из образца ткани или образца жидкостей организма.

5. Способ по п.4, где образец ткани представляет собой образец крови.

6. Способ по п.4, где образец жидкостей организма представляет собой бронхоальвеолярный лаваж и мочу.

7. Способ по любому из пп.1-6, где уровень или количество IL-2 определяют на уровне белка или на уровне нуклеиновых кислот.

8. Способ по п.7, где уровень или количество IL-2 определяют иммунологическим анализом или способами ПЦР.

9. Способ по п.8, где иммунологический анализ - это ELISpot или ELISA.
10. Способ по п.9, где контрольное значение в ELISpot IL-2 составляет менее 25.
11. Способ по любому из пп.1-10, где индивидуумы являются детьми.
12. Применение способа по п.1 или 2 для прогноза клинического исхода или определения курса лечения индивидуума, пораженного туберкулезной инфекцией.
13. Применение набора в способе по любому из пп.1-11 у индивидуума, где указанный набор содержит средства для определения уровня цитокинов, продуцируемых мононуклеарными клетками после стимуляции мононуклеарных клеток, где указанные мононуклеарные клетки получают от указанного индивидуума, стимулирующий агент, который представляет собой микобактериальную аланиндегидрогеназу (AlaDH), и инструкции о том, как использовать указанный тестовый набор, где определяемые цитокины представляют собой IL-2.
14. Применение набора по п.13, где указанный набор представляет собой ELISpot или ELISA или указанный набор представляет собой набор для ПЦР.
15. Применение микобактериальной аланиндегидрогеназы в способе по любому из пп.1-11 в качестве стимулятора для дифференциации латентного состояния и активного состояния туберкулезной инфекции у индивидуума.
16. Применение по п.15, где индивидуумы являются детьми.
17. Применение композиции, содержащей микобактериальную аланиндегидрогеназу (AlaDH) в способе по любому из пп.1-11 для дифференциации латентного состояния и активного состояния туберкулезной инфекции у индивидуума.
18. Применение по любому из пп.13-17, где AlaDH представляет собой аланиндегидрогеназу *Mycobacterium tuberculosis*.

