

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202192908 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.03.23

(51) Int. Cl. C12Q 1/6883 (2018.01)
C12Q 1/689 (2018.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.03.05

(54) СПОСОБЫ, ОТНОСЯЩИЕСЯ К ТУБЕРКУЛЕЗУ

(31) 1907157.0

(32) 2019.05.21

(33) GB

(86) PCT/GB2020/050524

(87) WO 2020/234555 2020.11.26

(71) Заявитель:

ПИБИДИ БИОТЕК ЛИМИТЕД; ЗЕ
ЮНИВЕРСИТИ ОФ НОТТИНГЕМ
(GB)

(72) Изобретатель:

Свифт Бенджамин, Рис Кэтрин (GB)

(74) Представитель:

Нилова М.И. (RU)

(57) Изобретение относится к способу диагностики заболевания туберкулезом (ТБ) у субъекта. Способ включает смешивание специфичного в отношении микобактерий бактериофага с образцом мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) от субъекта с последующим определением наличия или отсутствия последовательности ДНК микобактерии в ДНК, выделенной из смеси. Согласно настоящему изобретению предложен чувствительный и специфичный тест на наличие начальной стадии ТБ, т.е. асимптомной инфекции с высоким риском развития активного ТБ, или на наличие латентной туберкулезной инфекции (ЛТИ), т.е. асимптомной инфекции, которая маловероятно разовьется в активный туберкулез, у субъекта.

A1

202192908

202192908

A1

СПОСОБЫ, ОТНОСЯЩИЕСЯ К ТУБЕРКУЛЕЗУ

Область техники

Настоящее изобретение относится к способам характеристики статуса заболевания туберкулезом (ТБ) у субъекта так, что может быть идентифицирован индивидум с начальной стадией ТБ, асимптомной или латентной туберкулезной инфекцией (ЛТИ). Настоящее изобретение также относится к способам лечения, способам улучшения прогноза туберкулеза и наборам для применения при оценке статуса заболевания туберкулезом у субъекта.

Уровень техники

По оценкам одна треть населения мира инфицирована *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), организмом, обуславливающим заболевание туберкулезом (ТБ). По оценкам в 2017 году во всем мире заболевание ТБ развилось у 10 миллионов человек. Случаи заболевания ТБ встречаются во всех странах и возрастных группах, но самая высокая распространенность наблюдается у взрослых в Индии, Китае, Индонезии, Филиппинах, Пакистане, Нигерии, Бангладеш и Южной Африке. В том же году по оценкам было 1,3 миллиона случаев смерти, связанных с ТБ, среди ВИЧ-отрицательных людей и еще 300000 случаев смерти среди ВИЧ-положительных людей. У человека ТБ является основной причиной смерти от одного инфекционного агента. В 2017 году доля людей с ТБ, умерших от этого заболевания, составляла 16%, это ниже 23% в 2000 году, но это далеко от показателя в 10%, необходимого для достижения цели стратегии Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) по ликвидации туберкулеза на 2020 год (Global Tuberculosis Report 2018, World Health Organization; https://www.who.int/tb/publications/global_report/en/).

Историческое понимание заболевания ТБ является бинарным; на одной стадии, латентная ТБ-инфекция (ЛТИ), определяемая как состояние стойкого иммунного ответа на *M. tuberculosis* без клинически проявляемых свидетельств активного заболевания ТБ, пациент не имеет симптомов, и репликация *M. tuberculosis* находится на низком уровне и контролируется иммунной системой. Латентная ТБ-инфекция позволяет *M. tuberculosis* недетектируемо персистировать в популяциях. Индивидум может иметь латентную ТБ-инфекцию в течение многих лет, при этом она не детектируется. Согласно современным оценкам число людей с латентной ТБ-инфекцией во всем мире колеблется от 1,7 миллиарда до более чем 2 миллиардов (23–27% населения мира). Напротив, на стадии активного заболевания ТБ у пациента имеются симптомы из-за патологии, возникающей в результате неконтролируемой репликации *M. tuberculosis*.

Только у части индивидуумов с ЛТИ разовьется активное заболевание ТБ. Риск развития активного ТБ среди инфицированных индивидуумов в течение жизни составляет 5-15%, при этом риск является самым высоким в первые 2 года после инфицирования. Клинически латентная инфекция, по-видимому, представляет собой ряд исходов, от предположительно устраненной инфекции до субклинического заболевания без явных симптомов. Недавние доказательства подтверждают существование переходной стадии инфекции *Mtb* у человека, называемой начальной стадией ТБ, которая является клинически латентной, но характеризуется повышенным риском прогрессирования в активный ТБ при отсутствии дальнейшего вмешательства, а также транскрипционным профилем крови хозяина, который перекрывается с заболеванием (Cobelens F, *et al.*, From latent to patent: rethinking prediction of tuberculosis. *The Lancet Respiratory Medicine* 2017; 5(4): 243-4; Zak DE, *et al.*, A blood RNA signature for tuberculosis disease risk: a prospective cohort study. *Lancet* 2016; 387: 2312–22). У индивидуумов с начальной стадией ТБ еще не развились индуцированные клинические симптомы, рентгенологические отклонения или микробиологические доказательства, соответствующие активному ТБ.

В настоящее время лечение ЛТИ является основным терапевтическим вмешательством, доступным для предотвращения развития активного заболевания ТБ у тех, кто уже инфицирован *Mtb*. Профилактическое лечение ТБ при ЛТИ расширяется, но большинство тех, для кого это было бы полезно, еще не обращаются за помощью. Одной из причин этого является недостаточная диагностика у людей с ЛТИ по множеству причин, включая отсутствие симптомов или субклинические симптомы, это означает, что люди не обращаются за медицинской помощью, и невозможность точного тестирования ТБ, когда люди действительно обращаются к медицинским работникам.

Таким образом, существует потребность в быстром, простом и точном тесте, который позволяет детектировать начальную стадию ТБ в достаточно ранний момент времени, чтобы обеспечить эффективное вмешательство и лечение. Принимая во внимание данное обстоятельство, было разработано настоящее изобретение.

Сущность изобретения

Согласно первому аспекту настоящего изобретения предложен:

способ диагностики заболевания у асимптомного субъекта-человека, причем указанный способ включает:

получение образца мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК), выделенных у указанного субъекта;

смешивание специфичного в отношении микобактерий бактериофага D29 с образцом МКПК с получением смеси;

инкубирование смеси в условиях, обеспечивающих лизис микобактерий;
выделение ДНК из смеси;

определение наличия или отсутствия последовательности ДНК микобактерии в ДНК, выделенной из смеси, с помощью одного или более из: выполнения ПЦР на ДНК, выделенной из смеси, с использованием прямого и обратного праймеров, специфичных в отношении последовательности ДНК микобактерии, и/или выполнения секвенирования, подходящего для идентификации последовательности ДНК микобактерии, и необязательно определения гомологии между последовательностью ДНК микобактерии, если она присутствует, и известными последовательностями ДНК микобактерии;

необязательно выполнение теста клеточно-опосредуемого иммунного ответа, специфичного в отношении микобактерии (СМІ), на образце, выделенном от субъекта, для получения положительного или отрицательного результата теста СМІ-ответа;

причем у указанного асимптомного субъекта-человека диагностируют наличие начальной стадии туберкулеза (ТБ), когда присутствует последовательность ДНК микобактерии, либо с положительным, либо с отрицательным результатом теста СМІ-ответа, если он имеется; и

причем у указанного асимптомного субъекта-человека диагностируют наличие латентной туберкулезной инфекции (ЛТИ), когда отсутствует последовательность ДНК микобактерии и имеется положительный результат теста СМІ-ответа.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен:

способ диагностики начальной стадии туберкулеза (incipient tuberculosis) у субъекта-человека, причем указанный способ включает:

получение образца мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК), выделенных у указанного субъекта;

смешивание специфичного в отношении микобактерий бактериофага с образцом МКПК с получением смеси;

инкубирование смеси в условиях, обеспечивающих лизис микобактерий;

выделение ДНК из смеси;

определение наличия одной или более последовательностей ДНК микобактерии в ДНК, выделенной из смеси;

причем наличие последовательности ДНК микобактерии свидетельствует о том, что указанный субъект имеет начальную стадию туберкулеза.

Согласно одному варианту реализации субъект-человек представляет собой асимптомного субъекта-человека, т. е. у субъекта не проявляются какие-либо симптомы активного заболевания туберкулезом.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен:

способ предсказания наличия у субъекта риска развития или наличия начальной стадии туберкулеза (ТБ), причем указанный способ включает:

получение образца мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК),
5 выделенных у указанного субъекта;

смешивание специфичного в отношении микобактерий бактериофага с образцом МКПК с получением смеси;

инкубирование смеси в условиях, обеспечивающих лизис микобактерий;

выделение ДНК из смеси;

10 выявление наличия последовательностей ДНК микобактерии в указанной ДНК;
причем наличие последовательностей ДНК микобактерии свидетельствует о том, что указанный субъект имеет риск развития или имеет начальную стадию ТБ.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен:

способ предсказания наличия у субъекта риска развития активного туберкулеза (ТБ),
15 причем указанный способ включает:

получение образца мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК),
выделенных у указанного субъекта;

смешивание специфичного в отношении микобактерий бактериофага с образцом МКПК с получением смеси;

20 инкубирование смеси в условиях, обеспечивающих лизис микобактерий;

выделение ДНК из смеси;

25 выявление наличия последовательностей ДНК микобактерии в указанной ДНК;
причем наличие последовательностей ДНК микобактерии свидетельствует о том, что указанный субъект имеет риск развития активного ТБ.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен:

способ оценки прогноза заболевания туберкулезом (ТБ) у субъекта, причем
указанный способ включает:

получение образца мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК),
выделенных у указанного субъекта;

30 смешивание специфичного в отношении микобактерий бактериофага с образцом МКПК с получением смеси;

инкубирование смеси в условиях, обеспечивающих лизис микобактерий;

выделение ДНК из смеси;

35 выявление наличия последовательностей ДНК микобактерии в указанной ДНК,
выделенной из смеси;

причем наличие последовательностей ДНК микобактерии свидетельствует о том, что указанный субъект имеет риск возникновения начальной стадии ТБ и/или развития активного заболевания ТБ.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен:

5 способ лечения туберкулеза (ТБ) у субъекта, нуждающегося в этом, причем указанный способ включает:

получение образца моноклеарных клеток периферической крови (МКПК), выделенных у указанного субъекта;

10 использование анализа опосредуемого бактериофагом высвобождения ДНК микобактерии для выявления наличия начальной стадии ТБ у указанного субъекта; и, если выявлена начальная стадия ТБ,

введение указанному субъекту одного или более противотуберкулезных лекарственных средств или терапии.

Анализ опосредуемого бактериофагом высвобождения ДНК микобактерии означает
15 любой анализ или способ, описанный в данном документе, с помощью которого специфичный в отношении микобактерии бактериофаг (т. е. бактериофаг, который будет селективно лизировать микобактерии или конкретный вид или штамм микобактерии) используют для лизиса микобактерий в образце, чтобы высвободить ДНК микобактерии, после чего наличие ДНК микобактерии в образце подтверждают любым подходящим
20 методом, например, ПЦР с использованием праймеров, специфичных в отношении микобактерии, или путем секвенирования следующего поколения.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен:

способ лечения начальной стадии туберкулеза (ТБ) у субъекта, нуждающегося в этом, причем указанный способ включает:

25 получение образца моноклеарных клеток периферической крови (МКПК), выделенных у указанного субъекта;

смешивание специфичного в отношении микобактерий бактериофага с образцом МКПК с получением смеси;

инкубирование смеси в условиях, обеспечивающих лизис микобактерий;

30 выделение ДНК из смеси;

выявление наличия микобактериальных последовательностей в ДНК; и

введение указанному субъекту одного или более лекарственных средств или терапии против начальной стадии ТБ.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен:

способ улучшения прогноза туберкулеза (ТБ) у субъекта, причем указанный способ включает:

получение образца мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК), выделенных у указанного субъекта;

5 использование анализа опосредуемого бактериофагом высвобождения ДНК микобактерии для выявления наличия начальной стадии ТБ у указанного субъекта; и, если выявлена начальная стадия ТБ,

введение указанному субъекту одного или более противотуберкулезных лекарственных средств или терапии.

10 Подходящие противотуберкулезные лекарственные средства или виды терапии в соответствии с любым аспектом настоящего изобретения будут известны специалистам в данной области техники и могут быть выбраны на основании клинических или других показаний. Подходящие противотуберкулезные лекарственные средства или виды терапии могут включать рифампицин, гидрохлорид этамбутола, пиразинамид и изониазид (с
15 гидрохлоридом пиридоксина), которые можно вводить субъекту по отдельности (одно противотуберкулезное лекарственное средство или терапия) или в любой подходящей комбинации более чем одного противотуберкулезного лекарственного средства или терапии.

В варианте реализации в соответствии с любым аспектом настоящего изобретения
20 образец мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) может быть выделен у субъекта с помощью любого подходящего метода, например, центрифугирования в градиенте плотности (например, Ficoll-Paque), выделения с использованием пробирок для подготовки клеток (CPT™), выделения с использованием пробирок SepMate™ или выделения с использованием агента для агрегации эритроцитов, например, HetaSep™.

25 Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложено:

применение бактериофага для измерения в образце крови, выделенном у субъекта-человека, наличия одного или более микобактериальных биомаркеров при изготовлении набора для оценки того, подвержен ли указанный субъект-человек риску развития или
30 наличия у него начальной стадии туберкулеза (ТБ) или активного заболевания туберкулезом.

Согласно одному варианту реализации в соответствии с любым аспектом настоящего изобретения определение наличия одной или более последовательностей ДНК микобактерии в ДНК может включать выполнение полимеразной цепной реакции, например, с использованием праймеров, специфичных в отношении микобактерии.

Согласно одному варианту реализации в соответствии с любым аспектом настоящего изобретения одна или более последовательностей ДНК микобактерии могут содержать, например, элемент IS6110 и/или элемент IS900.

Согласно одному варианту реализации в соответствии с любым аспектом настоящего изобретения способ может включать секвенирование одной или более последовательностей ДНК микобактерии и необязательно определение гомологии между последовательностью ДНК микобактерии и известными последовательностями ДНК микобактерии. Известные последовательности ДНК микобактерии могут включать последовательности, выявленные из опубликованных баз данных последовательностей, или они могут включать последовательности ДНК, выявленные у ТБ-инфицированных индивидуумов, с которыми субъект, как известно или предположено, контактировал.

Согласно одному варианту реализации в соответствии с любым аспектом настоящего изобретения субъект может представлять собой субъекта-человека. Согласно одному варианту реализации в соответствии с любым аспектом настоящего изобретения субъект может представлять собой млекопитающее, такое как, но не ограничиваясь перечисленными, примат, человекообразная обезьяна или человек. Согласно одному варианту реализации в соответствии с любым аспектом настоящего изобретения субъект может быть выбран по меньшей мере из одного из: асимптомного субъекта и/или ТБ-контактировавшего субъекта. Согласно одному варианту реализации в соответствии с любым аспектом настоящего изобретения субъект может быть выбран по меньшей мере из одного из: асимптомного субъекта-человека и/или ТБ-контактировавшего субъекта-человека. Асимптомный субъект означает любого субъекта, у которого не проявляются какие-либо симптомы активного заболевания туберкулезом, которые обычно используют для подтверждения диагноза. Такие симптомы могут быть определены с помощью клинической или радиологической оценки. Кроме того, субъект может иметь отрицательный результат теста при микроскопии мазка мокроты и/или микобактериальной культуры. ТБ-контактировавший субъект означает любого субъекта, который вступал в контакт с другим индивидуумом, который, как известно или предположено, имеет туберкулезную инфекцию. ТБ-контактировавшего субъекта можно выявить с помощью отслеживания ТБ-контактов.

Согласно одному варианту реализации в соответствии с любым аспектом настоящего изобретения у субъекта может быть ослабленный иммунитет и/или подавленный иммунитет. Как ослабленный иммунитет, так и подавленный иммунитет можно рассматривать как состояния иммунодефицита. Ослабление иммунитета у субъекта может быть вызвано заболеванием, которое прямо или косвенно вызывает подавление

иммунитета. Примеры таких заболеваний включают определенные виды рака (например, лейкоз, лимфому, множественную миелому, разные виды рака костного мозга, разные виды рака клеток крови), хронические инфекции, например, синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД), вызванный инфекцией вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), и различные гормональные и метаболические нарушения, включая анемию, гипотиреоз и гипергликемию. Согласно одному варианту реализации субъект может быть инфицирован ВИЧ. Подавление иммунитета у субъекта также может быть вызвано неполноценным питанием, старением, введением иммуносупрессорного агента, лекарственного средства или иммуносупрессора (например, химиотерапии, модифицирующего заболевание противоревматического препарата (DMARD), иммуносупрессорного препарата, вводимого в связи с трансплантацией органа (лекарственное средство против отторжения), стероида, включая кортикостероид, например, глюкокортикоид), воздействием токсинов окружающей среды или злоупотреблением алкоголем, наркотиками или никотином. Согласно одному варианту реализации субъект может принимать или принимал иммуносупрессорное лекарственное средство, в частности, одно или более лекарственных средств, выбранных из группы, состоящей из: химиотерапии, DMARD, лекарственного средства против отторжения и глюкокортикоида.

Согласно одному варианту реализации в соответствии с любым аспектом настоящего изобретения субъект может представлять собой ТБ-контактировавшего субъекта, и приемлемо, когда способ выполняют на образце МКПК, полученных от субъекта в течение 12 месяцев, 6 месяцев, 5 месяцев, 4 месяцев, 3 месяцев, 2 месяцев или 1 месяца после контакта субъекта с ТБ-инфицированным индивидуумом.

Согласно одному варианту реализации в соответствии с любым аспектом настоящего изобретения бактериофаг может представлять собой (мико)бактериофаг D29 или TM4, предпочтительно D29. Другие бактериофаги, подходящие для лизирования микобактерий, будут известны специалистам в данной области техники, например, см. Hatfull GF. (2018) Mycobacteriophages. *Microbiol Spectr.* 2018;6(5):10.1128/microbiolspec.GPP3-0026-2018. doi:10.1128/microbiolspec.GPP3-0026-2018.

Согласно одному варианту реализации в соответствии с любым аспектом настоящего изобретения инкубирование смеси в условиях, обеспечивающих лизис микобактерий, может включать инкубацию при приблизительно 37°C в течение приблизительно или менее чем 6 часов, 5 часов, 4 часов, 3,5 часа, 3 часов, 2,5 часа, 2 часов, 1,5 часа или 1 часа, предпочтительно приблизительно 3,5 часа.

Согласно одному варианту реализации в соответствии с любым аспектом настоящего изобретения необязательный тест СМІ-ответа может включать тест на основе анализа высвобождения интерферона-гамма (IGRA). Примером подходящего теста IGRA является анализ QuantiFERON-TB Gold Plus ((QFT) Qiagen Inc). Другие тесты СМІ-ответа, специфичного в отношении микобактерий, будут известны специалистам в данной области техники.

Различные дополнительные аспекты и варианты реализации настоящего изобретения будут понятны специалистам в данной области техники с учетом настоящего раскрытия.

Все документы, упомянутые в этом описании, полностью включены в данный документ посредством ссылки.

«И/или», при использовании в данном документе, следует понимать как конкретное раскрытие каждого из двух указанных признаков или компонентов вместе или друг без друга. Например, «А и/или В» следует рассматривать как конкретное раскрытие каждого из (i) А, (ii) В и (iii) А и В, как если бы каждое из них было изложено в данном документе по отдельности.

Если контекст не требует иного, описания и определения признаков, изложенные выше, не ограничиваются каким-либо конкретным аспектом или вариантом реализации настоящего изобретения и в равной степени применимы ко всем аспектам и вариантам реализации, которые описаны.

Специалисты в данной области техники также поймут, что, хотя настоящее изобретение было описано в качестве примера со ссылкой на несколько вариантов реализации. Оно не ограничивается раскрытыми вариантами реализации, и альтернативные варианты реализации могут быть созданы, не отступая от объема настоящего изобретения, определенного в прилагаемой формуле изобретения.

Если не указано иное, способ, включающий этапы, может быть выполнен в любом подходящем порядке. Таким образом, этапы могут быть выполнены в любом подходящем порядке.

Гомологию последовательностей можно измерить с использованием известных методов. Например, пакет UWGCG предоставляет программу BESTFIT, которую можно использовать для расчета гомологии (например, при использовании с настройками по умолчанию) (Devereux *et al* (1984) Nucleic Acids Research 12, 387-395). Алгоритмы PILEUP и BLAST можно использовать для вычисления гомологии или для выравнивания последовательностей (обычно с настройками по умолчанию), например, как описано в Altschul S. F. (1993) J Mol Evol 36:290-300; Altschul, S, F *et al* (1990) J Mol Biol 215:403-10.

Программное обеспечение для выполнения анализов BLAST общедоступно через Национальный центр биотехнологической информации (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Алгоритм BLAST выполняет статистический анализ сходства между двумя последовательностями; см., например, Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5787. Одной мерой сходства, обеспечиваемой алгоритмом BLAST, является наименьшая суммарная вероятность ($P(N)$), которая обеспечивает показатель вероятности того, что совпадение между двумя нуклеотидными или аминокислотными последовательностями может произойти случайно. Например, последовательность считается сходной с другой последовательностью, если наименьшая суммарная вероятность при сравнении первой последовательности со второй последовательностью меньше примерно 1, предпочтительно меньше примерно 0,1, более предпочтительно меньше примерно 0,01 и наиболее предпочтительно меньше примерно 0,001.

Краткое описание графических материалов

Фигура 1 представляет собой график, показывающий результаты теста клеточно-опосредуемого иммунного ответа, специфичного в отношении микобактерии (СМІ) (тест IGRA: анализ QuantiFERON-TB Gold Plus ((QFT) Qiagen Inc) в начальных условиях для ряда асимптомных субъектов, определенные в группе 2 в ходе исследования. Все субъекты, включенные в Фиг. 1, показали положительный результат теста QFT в один или более моментов времени в течение исследования, и все они не имели симптомов в начальных условиях. Ось Y показывает произвольно присвоенный номер участника для каждого субъекта, ось X показывает соотношение между Антигеном-1 и Митогеном (антиген для положительного контроля), определенное с использованием набора QFT. Субъекты, соответствующие присвоенным номерам участников 455, 493 и 494, имели положительный результат теста на основе анализа опосредуемого бактериофагом высвобождения ДНК микобактерии (Actiphage™) в начальных условиях.

Фигура 2 представляет собой график, показывающий результаты анализа QuantiFERON-TB Gold Plus ((QFT) Qiagen Inc) во временной точке 3 месяца (приблизительно 8-12 недель) для ряда асимптомных субъектов, определенные в группе 2 в ходе исследования. Все субъекты, включенные в Фиг. 2, показали положительный результат теста QFT по меньшей мере во временной точке 3 месяца, и все они не имели симптомов в начальных условиях и через 3 месяца. Ось Y показывает произвольно присвоенный номер участника для каждого субъекта, ось X показывает соотношение между Антигеном-1 и Митогеном (антиген для положительного контроля), определенное с использованием набора QFT. Субъекты, соответствующие присвоенным номерам участников 455, 493 и 494, имели положительный результат теста QFT и анализа

опосредуемого бактериофагом высвобождения ДНК микобактерии (Actiphage™) во временной точке 3 месяца.

Фигура 3 представляет собой изображение геля, на котором показаны продукты ПЦР, полученные с использованием праймеров, специфичных в отношении микобактерии, сконструированных для амплификации области из 123 п.о. элемента IS6110. Дорожки 1 и 19: маркер мол. массы ДНК NEB 100 п.о., Дорожки 2-15: исследуемые образцы, полученные с использованием способа на основе анализа опосредуемого бактериофагом высвобождения ДНК микобактерии (Actiphage™), при этом Дорожка 3 и Дорожка 10 представляют образец, полученный от участника номер 455, с МКПК, приготовленными с использованием Ficoll или Hetasep, соответственно. Дорожка 16 – положительный контроль ПЦР (1 мкл ДНК БЦЖ), Дорожка 17 – холостая проба, Дорожка 18 – отрицательный контроль ПЦР (без матрицы, водный контроль).

Подробное описание изобретения

У человека туберкулез (ТБ) является основной причиной смерти от одного инфекционного агента. Болезнетворный организм, *M. tuberculosis* (Mtb), персистирует в популяциях, вызывая асимптомную латентную инфекцию (ЛТИ); резервуар для будущего заболевания. По проспективным оценкам у 5–10% популяции ЛТИ разовьется туберкулез, обычно в течение 2-летнего периода после инфицирования. Патобиологические механизмы, лежащие в основе прогрессирования в активный туберкулез и его степени тяжести, плохо изучены.

Всемирная организация здравоохранения установила, что срочно необходимы тесты, которые позволяют с высокой степенью уверенности прогнозировать развитие заболевания ТБ в ближайшем будущем. Идеальные тесты могли бы обеспечить значительно повышенную прогностическую ценность в отношении развития активного заболевания ТБ среди инфицированных индивидуумов, чем доступные в настоящее время тесты ЛТИ, чтобы достичь целей ВОЗ по лечению и устранению заболевания (Consensus meeting report: development of a Target Product Profile (TPP) and a framework for evaluation for a test for predicting progression from tuberculosis infection to active disease. Женева: Всемирная организация здравоохранения; 2017 (WHO/HTM/TB/2017.18)).

Доступные ранее диагностические тесты недостаточно чувствительны или специфичны, чтобы обеспечить точное выявление всех случаев ЛТИ. Кроме того, тесты плохо прогнозируют, будет ли ЛТИ у индивидуума прогрессировать до активного ТБ в будущем (т. е. имеется ли у индивидуума начальная стадия ТБ). Это приводит к большому количеству индивидуумов, которым потребуется лечение, чтобы предотвратить один

случай активного ТБ, и, таким образом, является дополнительным препятствием для расширения программного контроля ТБ.

Принятые ранее диагностические тесты ЛТИ, такие как анализы высвобождения интерферона-гамма (IFN- γ) (IGRA) или туберкулиновые кожные пробы (TST, например, проба Манту), измеряют Т-клеточный ответ на *Mycobacterium tuberculosis* и, следовательно, косвенное доказательство воздействия *M. tuberculosis*. Тесты, которые опираются на иммунный ответ пациента, могут по определению не давать результатов до тех пор, пока не индуцирован измеримый Т-клеточный ответ, для развития такого ответа требуется время (по меньшей мере 6 недель после инфицирования). Возникающая в результате отсрочка постановки диагноза дает больше времени для бактериальной репликации до постановки диагноза и, следовательно, до начала лечения, что приводит к ухудшению прогноза для пациентов и повышению вероятности передачи инфекции в сообществах. Кроме того, этот ответ иммунной памяти уменьшается у стареющих пациентов, пациентов с ослабленным иммунитетом или подавленным иммунитетом, что приводит к неточным (ложноотрицательным или неопределенным) результатам тестов. Например, субъекты, получающие иммуносупрессорные агенты, могут иметь ложноотрицательные результаты TST (Agarwal S. *et al.*, 2014, Steroids Decrease Prevalence of Positive Tuberculin Skin Test in Rheumatoid Arthritis: Implications on Anti-TNF Therapies. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2014(5759):430134) или ложноотрицательные или неопределенные результаты IGRA (Belliere and Blancher, 2017, QuantiFERON test interpretation in patients receiving immunosuppressive agents: an alert. *European Respiratory Journal* Apr 2017, 49 (4) 1602102; DOI: 10.1183/13993003.02102-2016). Тестирование, основанное на иммунном ответе на Mtb, также может привести к ложному определению риска развития активного заболевания ТБ у тех индивидуумов, у которых инфекция была эффективно устранена иммунной системой, или тех, кто ранее был вакцинирован против Mtb (ложноположительные результаты). Исследования показали, что положительная прогностическая ценность туберкулиновой кожной пробы и анализов высвобождения интерферона- γ для прогнозирования развития активного заболевания ТБ в течение двух лет составляет 1,5 и 2,7%, соответственно (Consensus meeting report: development of a Target Product Profile (TPP) and a framework for evaluation for a test for predicting progression from tuberculosis infection to active disease. Женева: Всемирная организация здравоохранения; 2017 (WHO/HTM/TB/2017.18)).

Кроме того, современные методы тестирования имеют эксплуатационные требования, которые делают их непрактичными или слишком дорогими для использования в удаленных местах или в тех странах, где ТБ представляет наибольшие

проблемы. Кроме того, некоторые диагностические тесты ТБ требуют получения от субъекта мокроты, что обычно невозможно у асимптомных индивидуумов.

Начальная стадия ТБ

Начальная стадия ТБ описывает недавно признанную классификацию туберкулеза, при которой индивидуумы являются асимптомными, но характеризуются повышенным риском прогрессирования до активного ТБ при отсутствии дальнейшего вмешательства по сравнению с индивидуумами с ЛТИ. У индивидуумов с начальной стадией ТБ еще не развились индуцированные клинические симптомы, рентгенологические отклонения или микробиологические свидетельства, соответствующие активному ТБ (Drain, P *et al.* 2018. Incipient and Subclinical Tuberculosis: a Clinical Review of Early Stages and Progression of Infection. *Clin Microbio Rev.* 31 (5): e00021-18). Постулат о том, что может существовать длительная асимптомная фаза ранней стадии заболевания, во время которой патология развивается до клинического проявления активного заболевания, в настоящее время общепринят. Это состояние указывает на начальную стадию туберкулеза. У некоторых индивидуумов с начальной стадией туберкулеза прогрессирование в активное заболевание может не развиваться в течение 12 месяцев или дольше.

До настоящего времени диагностика начальной стадии ТБ вызывала сложности, поскольку отсутствовал удовлетворительный положительный тест на это патологическое состояние, который отличает его от латентного ТБ (ЛТИ; асимптомный ТБ, который маловероятно разовьется в активный ТБ из-за эффективного устранения или сдерживания иммунной системой). Традиционно диагностика начальной стадии ТБ основывается на положительном тесте, обычно ассоциированном с ЛТИ, таком как IGRA, который рассматривается в комбинации с первоначальным отсутствием клинических или радиологических симптомов, которое затем заменяется наличием одного или более клинических или радиологических симптомов, или положительном результате микробиологического теста, поскольку развивается активный ТБ. Это означает, что начальную стадию ТБ обычно можно диагностировать только в ретроспективе, когда уже появились симптомы активного ТБ. Эта неспособность отличить начальную стадию ТБ от ЛТИ до развития симптомов активного ТБ может привести к ненужному лечению индивидуумов, у которых маловероятно когда-либо разовьется активный ТБ (т. е. индивидуумов с ЛТИ, а не начальной стадией ТБ), и/или к потенциально отсроченному лечению индивидуумов с начальной стадией ТБ, что означает повышенную вероятность передачи и ухудшение прогноза для этих пациентов.

Тестирование ЛТИ

Анализ высвобождения интерферона-γ

Анализы высвобождения интерферона- γ (интерферона-гамма) (IGRA) являются примерами тестов клеточно-опосредуемого иммунного ответа (CMI) и представляют собой тесты, используемые для диагностики некоторых инфекционных заболеваний, в частности, туберкулеза. Анализ высвобождения интерферона- γ (IFN- γ) опирается на тот факт, что Т-лимфоциты будут высвобождать IFN- γ при воздействии специфических антигенов.

Одним из примеров анализа IFN- γ является анализ QuantiFERON-TB Gold Plus ((QFT) Qiagen Inc), который определяет количество IFN- γ , продуцируемого в ответ на антигены ESAT-6 и CFP-10 из *Mycobacterium tuberculosis*. Результат представляют как поглощение в ИФА или рассчитанный уровень IFN- γ в МЕ/мл.

Другим примером IGRA является анализ T-SPOT.TB (Oxford Immunotec), который представляет собой твердофазный метод иммуноферментных пятен (ELISPOT), выполняемый на моноклеарных клетках периферической крови, которые инкубируют с пептидами ESAT-6 и CFP-10. Результат представляют как количество Т-клеток, продуцирующих IFN- γ . Индивидуум считается положительным на инфекцию *Mycobacterium tuberculosis*, если количество пятен в лунках с антигеном ТБ превышает определенный порог по сравнению с лунками с отрицательным контролем.

Туберкулиновая кожная проба Манту

Проба Манту (туберкулиновая кожная проба; PPD-проба) представляет собой инструмент для скрининга ТБ-инфекции, основанный на ответе иммунной памяти на внутрикожную инъекцию глицеринового экстракта туберкулина, полученного из культур *Mycobacterium tuberculosis*. Т-клетки, сенсibilизированные предшествующей инфекцией, привлекаются к участку кожи, где они высвобождают лимфокины, индуцирующие уплотнение (обособленное бледное возвышение кожи) диаметром от 6 до 10 мм через 48-72 часа.

Принятые в настоящее время тесты ЛТИ (такие как анализы высвобождения интерферона- γ или туберкулиновая кожная проба) на инфекцию *M. tuberculosis* являются несовершенными в качестве тестов на начальную стадию ТБ (ИТТ) по трем основным причинам:

1. Они косвенно измеряют инфекцию *M. tuberculosis*; то есть они измеряют Т-клеточный ответ на *M. tuberculosis*. Это отсроченный ответ после инфекции Mtb (у человека может потребоваться приблизительно 6 недель для его развития), это означает, что в момент положительного тестирования недавно инфицированного индивидуума бактерия успеет реплицироваться, что ухудшает прогноз для индивидуума и увеличивает возможность передачи другим. Кроме

того, эти косвенные тесты не могут различить вакцинированных, ранее инфицированных и инфицированных в текущий момент индивидуумов.

2. Они нечувствительны для определенных подгрупп населения. Индивидуумы с ослабленным иммунным ответом, такие как стареющие индивидуумы, индивидуумы с ослабленным иммунитетом (такие как ВИЧ-инфицированные) или индивидуумы, принимающие иммуносупрессорные препараты, будут иметь пониженную способность к вызову Т-клеточного ответа и, следовательно, с меньшей вероятностью получают положительный результат теста, даже если они инфицированы *M. tuberculosis*.

3. Тесты ЛТИ плохо предсказывают, прогрессирует ли туберкулез у индивидуума в активную форму в будущем.

ВОЗ изложила свои ожидания относительно клинически полезного теста на начальную стадию ТБ (ИТТ) в Consensus meeting report: development of a Target Product Profile (TPP) and a framework for evaluation for a test for predicting progression from tuberculosis infection to active disease. Женева: Всемирная организация здравоохранения; 2017 (WHO/HTM/TB/2017.18). Указывается, что такие тесты следует рассматривать как подтверждающие тесты, причем отрицательный результат обеспечивает ограниченную информацию, но положительный результат указывает на то, что, вероятно, разовьется активное заболевание ТБ. В оптимальном варианте ИТТ могут применяться для скрининга тех, кто недавно подвергся воздействию МТВ, например, контактировавших с пациентами, инфицированными туберкулезом (ТБ-контакты). Отслеживание ТБ-контактов представляет собой способ, используемый для остановки распространения ТБ в сообществе. Он включает обнаружение и информирование людей о контакте с инфицированным человеком (ТБ-контакты), чтобы при необходимости они могли получить консультацию, тестирование и лечение. Идеальный ИТТ будет обладать характеристиками, которые позволят увеличить масштаб стратегий отслеживания контактов для облегчения массовых кампаний по тестированию и лечению.

Характеристики идеального теста на начальную стадию ТБ:

- Тест должен быть отрицательным у индивидуумов, никогда не подвергавшихся воздействию ТБ, включая индивидуумов, у которых могут быть симптомы других (респираторных) заболеваний, но которым поставлен другой диагноз.

- Тест должен быть отрицательным у индивидуумов, инфицированных *Mtb*, но не имеющих начальной стадии ТБ. Они могут иметь персистентную ТБ-

инфекцию, положительный результат теста ЛТИ (TST или IGRA), но у них не разовьется заболевание ТБ в течение следующих 2 лет.

- Тест должен быть отрицательным у индивидуумов, лечившихся от ЛТИ.

5 • Тест должен быть положительным у индивидуумов, у которых ТБ разовьется в течение короткого периода времени после проведения теста (например, 2 года), и у которых нет никаких признаков повторного воздействия после выполнения теста.

- Тест должен быть положительным у индивидуумов с симптоматическим заболеванием ТБ.

10 • Тест должен быть отрицательным у индивидуумов, прошедших курс лечения ТБ и считающихся излеченными.

ВОЗ определила эксплуатационные характеристики для тестов на начальную стадию ТБ:

Эксплуатационные характеристики	Оптимальные	Минимальные
Количество этапов, которые должен выполнить оператор	<2, без шагов с отсчетом времени	<10, 1-2 шага с отсчетом времени
Измерения объема	Отсутствует	Измерительный прибор обеспечен в наборе
Приготовление образца	Отсутствует или полностью интегрировано	Позволяет центрифугировать/инкубировать
Анализ данных	Интегрированный	Интегрированный
Время до получения результатов	<24 часов	2-5 дней
Биобезопасность	Универсальные меры предосторожности	Универсальные меры предосторожности, уровень биобезопасности II
Рабочая температура	От 5 до 50°C, влажность 90%	От 5 до 30°C, влажность 70%
Реагенты	Все необходимое в тестовом наборе	До 2 внешних реагентов, восстановление не требуется
Стабильность тестового набора/реагента	24 месяца при 40°C и влажности 90%, должен выдерживать стресс во время	12 месяцев при 30°C и влажности 70%, для транспортировки требуется

	транспортировки (3 дня при 50°C)	холодовая цепь
Оборудование	Предпочтительно оборудование не требуется. Если необходим прибор: маленький, портативный или переносной прибор (<1 кг), который может работать от батареи или солнечной энергии в местах с перебоями в электроснабжении	Централизованная тестовая платформа, подходящая для использования в лабораториях.
Утилизация отходов	Стандартная утилизация инфицированных отходов в медицинской организации	Стандартная утилизация инфицированных отходов в медицинской организации

В WO2015049516 описана разработка авторами настоящего изобретения способа детектирования жизнеспособных микобактерий в жидкостях организма с использованием фага в комбинации с амплификацией ДНК (анализ опосредуемого бактериофагом высвобождения ДНК микобактерии) и его применимость для демонстрации низкой степени бактериемии *M. bovis* (менее 10^2 клеток на мл) в крови инфицированного крупного рогатого скота (Swift BM *et al.*, Evidence of Mycobacterium tuberculosis complex bacteraemia in intradermal skin test positive cattle detected using phage-RPA. Virulence 2016; 7 (7): 779-88).

Способ на основе анализа опосредуемого бактериофагом высвобождения ДНК микобактерии (Actiphage™) теперь адаптирован для детектирования инфекции Mtb человека. В данном документе описаны результаты исследования по проверке концепции с применением высокочувствительного способа на основе анализа опосредуемого бактериофагом высвобождения ДНК микобактерии Actiphage™ в хорошо охарактеризованных клинических когортах. Способ детектирования начальной стадии ТБ, описанный в данном документе, обеспечивает ряд преимуществ по сравнению с принятыми в настоящее время тестами ЛТИ, включая повышенную специфичность (вероятность того, что результат теста будет отрицательным, когда заболевание отсутствует) и чувствительность (вероятность того, что результат теста будет положительным при наличии заболевания) для пациентов, у которых вероятно разовьется активное заболевание ТБ, улучшенную отчетность по ложноположительным результатам,

быстроту получения результатов (менее 24 часов) и отсутствие необходимости транспортировки в холодовой цепи. Все это очень предпочтительные признаки в соответствии с характеристиками, определенными ВОЗ для идеальных тестов на начальную стадию ТБ.

Описывается возможность ранней диагностики с помощью раскрытого способа при детектировании субъектов-людей с начальной стадией ТБ, то есть асимптомных индивидуумов (включая тех, которые ранее могли быть выявлены, как имеющие ЛТИ), подверженных риску развития активного заболевания ТБ. Продемонстрировано, что начальная стадия ТБ у человека ассоциирована, и может быть выявлена на этом основании, с детектированием жизнеспособных микобактерий в крови (например, бактериемии *Mtb*) во время ранней стадии инфицирования.

Доказательства ТБ-ассоциированной бактериемии *Mtb*, даже во время активного ТБ, неясны. Предыдущие исследования с применением тестов на основе культивирования и амплификации нуклеиновых кислот (NAAT) в образцах крови пациентов с активным ТБ не оправдали ожиданий (Shenai S. *et al.* Exploring alternative biomaterials for diagnosis of pulmonary tuberculosis in HIV-negative patients by use of the GeneXpert MTB/RIF assay. J Clin Microbiol 2013; 51(12): 4161-6). Сообщалось об улучшении детектирования *Mtb* для активного заболевания ТБ более высокой степени тяжести и после анализа больших объемов крови, это позволяет предположить, что эти способы ограничены недостаточной чувствительностью. Ожидается, что титр *Mtb* в крови во время активного заболевания ТБ будет значительно выше, чем во время ранних асимптомных фаз туберкулезной инфекции (то есть вскоре после контакта с инфицированным индивидуумом или инфицированием от него), поэтому неожиданно, что тестирование жизнеспособных *Mtb* в крови должно быть эффективным определяющим фактором начальной стадии ТБ или прогностическим фактором для последующего активного заболевания ТБ. Не желая быть связанными какой-либо конкретной теорией, авторы настоящего изобретения полагают, что относительная недоступность ДНК внутриклеточных *Mtb* в циркулирующих МКПК является важным фактором, способствующим недостаточной чувствительности других методов детектирования *Mtb*. Подход, описанный в данном документе, преодолевает это посредством опосредуемого фагом лизиса внутриклеточных *Mtb*, что эффективно высвобождает бактериальную ДНК для чувствительного NAAT на втором этапе. Подход, описанный в данном документе, обеспечивает неожиданное преимущество, заключающееся в том, что даже субъекты на ранних стадиях инфекции ТБ, когда титр циркулирующих микобактерий в крови может быть очень низким, могут быть эффективно

выявлены. Преимущества быстрого и недорогого анализа, который обеспечивает положительный микробиологический диагноз, при отсутствии мокроты, очевидны.

Примеры

Пример 1

5 ВИЧ-серонегативных взрослых пациентов (возраст ≥ 18 лет) зачисляли в 4 группы в соответствии со следующими критериями (дополнительные данные приведены в Таблице 1):

10 1. Активное заболевание ТБ (легочный туберкулез; ЛТБ) – на основании положительных результатов Xpert-Ultra (Xpert MTB/RIF Ultra, Cepheid Inc) или культуры Mtb из образцов из дыхательных путей у пациентов с подтверждающими клиническими и радиологическими характеристиками заболевания (n=15)

2. Асимптомные недавние ЛТБ-контакты, выявленные при отслеживании контактов, с положительным результатом теста QuantiFERON-TB Gold Plus ((QFT) Qiagen Inc) и нормальной рентгенограммой грудной клетки (n=18)

15 3. Контрольная группа с острыми респираторными заболеваниями, не являющимися туберкулезом, – пациенты, первоначально направленные в противотуберкулезную службу с симптомами, указывающими на подозрение на ЛТБ, но у которых впоследствии было диагностировано заболевание, не являющееся туберкулезом, и подтверждено отрицательным результатом микробиологического тестирования на Mtb (n=5)

20 4. Здоровая контрольная группа – участники без симптомов и с отрицательным результатом QFT, не имевшие в анамнезе предшествующего ТБ-контакта (n=28)

25 При зачислении все участники предоставили образцы крови для тестирования на основе анализа опосредуемого бактериофагом высвобождения ДНК микобактерии Actiphage[™] на бактериемию жизнеспособных микобактерий и прошли 12-месячное проспективное клиническое наблюдение. Кроме того, в группе 2 повторяли тесты QFT и Actiphage[™] через 8-12 недель для выявления событий сероконверсии IGRA (QFT) (т. е. тех участников, которые имели отрицательный результат QFT в первый момент времени, но 30 положительный во второй момент времени, предположительно, из-за отсроченного Т-клеточного ответа/отсроченной детектируемости IFN- γ). Участников группы 2 оставляли в исследовании, если они имели положительные результаты QFT во второй момент времени; ни один из этих участников не получал химиопрофилактики. Перед началом противотуберкулезного лечения у пациентов с активным ЛТБ брали образцы 35 (группа 1).

Клинические и лабораторные команды не были осведомлены о результатах тестирования на основе анализа опосредуемого бактериофагом высвобождения ДНК микобактерии Actiphage[™] и группах исследования, в которых были взяты образцы, соответственно, до конца исследования. Утверждение этических норм было предоставлено региональным Комитетом по исследованиям и этике (REC 15/EM/0109), и все участники предоставили письменное информированное согласие при зачислении.

Тестирование QFT и Xpert-Ultra проводили в соответствии с инструкциями производителя, и культивирование Mtb проводили в соответствии со стандартными методами. Отрицательный результат культивирования Mtb означает отсутствие размножения бактерий после 8-недельного инкубационного периода.

Данные QFT ИФА для участников, которые были определены как асимптомные участники, ранее имевшие контакты с ЛТБ (группа 2), проиллюстрированы на Фигурах 1 и 2 (в начальных условиях и через 3 месяца, соответственно).

Для теста на основе анализа опосредуемого бактериофагом высвобождения ДНК микобактерии (Actiphage[™]) кровь (5 мл) собирали в пробирки с натриевой солью гепарина (Sarstedt) и хранили при комнатной температуре до обработки. МКПК выделяли из 2 мл аликвот крови в соответствии с инструкциями производителя с помощью одного из двух альтернативных методов: i. Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare) с использованием пробирок LeucoSep[™] (Sigma) и ii. Hetasep (Stem Cell Technologies).

МКПК ресуспендировали в 200 мкл сред Actiphage[™], затем образцы переносили в пробирки Actiphage[™] Rapid (PBD Biotech Ltd) и добавляли бактериофаг D29 (20 мкл; $\sim 10^7$ БОЕ). Образцы инкубировали в течение 3,5 часа при 37°C, а затем центрифугировали (13000×g; 3 мин, комнатная температура). Элюат из пробирок Rapid, содержащий высвободившуюся ДНК микобактерии, дополнительно концентрировали (Zymo DNA Clean and Concentrator-5; Zymo Research/Cambridge Bioscience), и ДНК Mtb детектировали с использованием ПЦР-анализа, специфичного в отношении элемента IS6110, с использованием прямого и обратного праймеров 5'-CCTGCGAGCGTAGGCGTCGG-3' и 5'-CTCGTCCAGCGCCGCTTCGG-3', которые приводят к получению продукта ПЦР длиной 123 п.о. (Eisenach *et al.*, Detection of Mycobacterium tuberculosis in sputum samples using a polymerase chain reaction. Am Rev Respir Dis. 1991 Nov;144(5):1160-3).

В исследование зачислили шестьдесят шесть участников (Таблица 1). Из 15 участников с активным ЛТБ (группа 1) у одного были признаки милиарного заболевания с единственной церебральной туберкулемой. Остальная часть группы 1 не имела рентгенологических или клинических признаков поражения нескольких органов. Из 18 участников группы 2 у одного была сероконверсия QFT при последовательном

тестировании. Остальные были QFT-положительными в оба момента времени, и все имели нормальную рентгенограмму грудной клетки по сообщению торакального радиолога. У всех пяти участников контрольной группы с острым респираторным заболеванием, не являющимся туберкулезом (группа 3), ЛТБ исключили с помощью бронхоскопии, и они получили эффективное лечение антибиотиками от внебольничной пневмонии.

В Таблице 1 показано, что 11 из 15 (73%) участников когорты активного ЛТБ (группа 1) и 3 из 18 асимптомных ТБ-контактировавших участников (группа 2) имели положительный результат теста на основе анализа опосредуемого бактериофагом высвобождения ДНК микобактерии Actiphage[™] (это были участники, которым были присвоены номера участников 455, 493 и 494). Оставшиеся 4 участников группы 1, 15 участников группы 2 и все участники обеих контрольных групп (группа 3 и группа 4) имели отрицательный результат теста на основе анализа опосредуемого бактериофагом высвобождения ДНК микобактерии Actiphage[™].

На Фигуре 3 показаны полосы положительной ПЦР ожидаемого размера (123 п.о.) для одного из участников группы 2 (присвоен номер участника 455) при использовании праймеров, специфичных в отношении микобактериального элемента IS6110.

У всех участников исследования также тестировали уровень С-реактивного белка (СРБ), чтобы определить наличие воспаления. Кроме того, всех участников в группе 1, группе 3 и Actiphage-положительных участников в группе 2 также тестировали с использованием микроскопии мазка мокроты, теста Xpert-Ultra и путем измерения количества дней до получения положительной культуры микобактерий из образцов из дыхательных путей.

В когорте ЛТБ (группа 1, активное заболевание ТБ) положительный результат анализа опосредуемого бактериофагом высвобождения ДНК микобактерии Actiphage[™] был ассоциирован с положительным результатом мазка мокроты, более высоким начальным уровнем СРБ и более коротким временем культивирования микобактерий. В асимптомной ТБ-контактировавшей группе (группа 2) участники имели нормальный (в том же диапазоне, что и у здоровых контролей) начальный уровень СРБ и отсутствие способности образовывать микобактериальную культуру в начальных условиях (т. е. отсутствие детектируемого размножения бактерий после 8 недель инкубации). Из 3 участников с положительным результатом Actiphage[™], выявленных в начальных условиях в группе 2, у двоих через 7 месяцев развилось активное заболевание ЛТБ с положительной культурой. Отсутствие клинических, радиологических и микробиологических доказательств ТБ на момент обращения в сочетании с развитием активного заболевания в

более поздний момент времени соответствует диагнозу начальной стадии ТБ. Это демонстрирует применимость анализа опосредуемого бактериофагом высвобождения ДНК микобактерии в диагностике начальной стадии ТБ и его способность отличать субъектов с начальной стадией ТБ от субъектов с ЛТИ. Анализ последовательности всего генома изолятов Mtb в двух случаях в группе 2, у которых развился активный ТБ, подтвердил бактериальное происхождение от их соответствующих источников заболевания. Третий Actiphage™-положительный субъект группы 2 имел сероконверсию QFT (т. е. отрицательный результат QFT при первом тестировании с последующим положительным результатом через 3 месяца), но у него не развился активный ТБ в течение срока исследования (12 месяцев). После 12-месячного наблюдения ни у одного Actiphage™-отрицательного участника из группы 2 не развился активный ТБ. Таким образом, анализ опосредуемого бактериофагом высвобождения ДНК микобактерии, очевидно, не дает каких-либо ложноотрицательных результатов для активного ТБ среди когорты группы 2, это демонстрирует, что этот анализ является эффективным тестом на начальную стадию ТБ. Кроме того, можно с большей уверенностью считать, что те асимптомные случаи, у которых был отрицательный результат анализа опосредуемого бактериофагом высвобождения ДНК микобактерии (Actiphage™) и положительный результат теста QFT, имеют латентную ТБ-инфекцию (т. е. низкий риск развития активного заболевания ТБ), в сравнении с использованием только теста QFT.

В качестве клинической диагностики у пациентов с симптомами и подозрением на активный ЛТБ в начальных условиях (т. е. группы 1 и 3) анализ опосредуемого бактериофагом высвобождения ДНК микобактерии (тест Actiphage™ Rapid) имел чувствительность и специфичность (95% ДИ) 73,3% (48,1 – 89,1) и 100% (56,6 – 100), соответственно.

В качестве клинической диагностики начальной стадии ТБ (высокий риск развития активного ТБ) у асимптомных пациентов в начальных условиях (т. е. группы 2 и 4) анализ опосредуемого бактериофагом высвобождения ДНК микобактерии (тест Actiphage™ Rapid) имел чувствительность и специфичность (95% ДИ) 100,0% (15,8–100,0) и 97,3% (88,0–99,9), соответственно.

При применении ко всей когорте в начальных условиях (все группы) чувствительность и специфичность (95% ДИ) для детектирования активного ЛТБ составила 73,3% (48,1–89,1) и 94,2% (84,1–98,4), соответственно.

		Пациенты с симптомами		
		Активное заболевание ТБ (ЛТБ) (N=15)		Острое респираторное заболевание, не являющееся туберкулезом (N=5)
Результат Astipha [™] в начальных условиях		Положительный (n=11)	Отрицательный (n=4)	Отрицательный
Мужской пол (%)		5 (45,5)	2 (50)	2 (40)
Возраст (годы; среднее значение ± стандартное отклонение)		31,5 (±13,9)	38,8 (±13,5)	50 (±21,7)
Родился в Великобритании (%)		3 (27,2)	1 (25)	2 (40)
Вакци нация БЦЖ	Да (%) ^{\$}	4 (36,4)	2 (50)	2 (40)
	Неизвестно (%)	0	0	0
ИМТ (кг/м ² ; среднее значение ± стандартное отклонение)		19,9 (±3,6)	20,9 (±3,0)	25,7 (±5,3)
Характ еристи ки заболе вания ТБ	Положительны й мазок	7	0	0
	Отрицательный мазок	4	4	0
	Xpert-Ultra Grade	Средний - высокий	Очень низкий - низкий	Все отрицательные
	СРБ (медиана, ИКШ)	63 (от 36 до 65)	41 (от 27 до 45,5)	84 (от 45 до 110)
	Дни до положительной микобактериал ьной культуры (медиана, ИКШ)	15 (от 10,5 до 22)	21 (от 21 до 21)	1 культура из крови (<i>S. aureus</i>) 1 культура из мокроты (<i>M. avium</i> , 6 дней)

		Асимптомные пациенты		
		Недавние ЛТБ-контакты с положительным QFT (N=18)	Здоровые контроли: Без положительного QFT или ТБ-контакта (N=28)	
Результат Actiphage™ в начальных условиях		Положительный (n=3)	Отрицательный (n=15)	Отрицательный
Мужской пол (%)		1 (33,3)	10 (55,6)	11 (39,3)
Возраст (годы; среднее значение ± стандартное отклонение)		25,3 (±6,4)	54,7 (±12,3)	38,9 (±14,6)
Родился в Великобритании (%)		1 (33,3)	5 (33,3)	10 (35,7)
Вакцинация БЦЖ	Да (%) ^{\$}	2 (66,7)	7 (63,6)	12 (50)
	Неизвестно (%)	0	4 (26,7)	4 (14,3)
ИМТ (кг/м ² ; среднее значение ± стандартное отклонение)		21,9 (±2,0)	26,2 (±6,9)	27,1 (±8,2)
Характеристики заболевания ТБ	Положительный мазок	0	Неприменимо	Неприменимо
	Отрицательный мазок	2	Неприменимо	Неприменимо
	Xpert-Ultra Grade	Средний*	Неприменимо	Неприменимо
	СРБ (медиана, ИКШ)	5 (от 5 до 5) [^]	10 (от 5 до 13,75)	5 (от 5 до 10)
	Дни до положительной культуры (медиана, ИКШ)	26 (от 23,5 до 28,5)*	Неприменимо	Неприменимо

Таблица 1. Демографические и клинические характеристики всех субъектов в этом исследовании. (БЦЖ, бацилла Кальмета-Герена; ТБ, туберкулез; ИМТ, индекс

массы тела; СРБ, С-реактивный белок; *S. aureus*, *Staphylococcus aureus*; *M. avium*, *Mycobacterium avium*). *Представлены данные на момент поступления (т. е. через 7 месяцев после начальных условий) с активным (положительная культура) ТБ у двух контактов, ^Значения СРБ относятся к данным, собранным в начальных условиях, 5 согласующимся с данными для других групп, §Проценты, рассчитанные в подгруппе, для которой был известен статус БЦЖ.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ диагностики заболевания у асимптомного субъекта-человека, причем указанный способ включает:

5 получение образца мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК), выделенных у указанного субъекта;

 смешивание специфичного в отношении микобактерий бактериофага D29 с указанным образцом МКПК с получением смеси;

 инкубирование указанной смеси в условиях, обеспечивающих лизис микобактерий;

10 выделение ДНК из указанной смеси;

 определение наличия или отсутствия последовательности ДНК микобактерии в указанной ДНК, выделенной из смеси, с помощью одного или более из: выполнения ПЦР на ДНК, выделенной из смеси, с использованием прямого и обратного праймеров, специфичных в отношении последовательности ДНК микобактерии, и/или выполнения
15 секвенирования, подходящего для выявления последовательности ДНК микобактерии, и необязательно определения гомологии между последовательностью ДНК микобактерии, если она присутствует, и известными последовательностями ДНК микобактерии;

 необязательно выполнение теста на клеточно-опосредуемый иммунный ответ, специфичный в отношении микобактерии (СМІ), на образце, выделенном у указанного
20 субъекта, для получения положительного или отрицательного результата теста на СМІ-ответ;

 причем у указанного асимптомного субъекта-человека диагностируют наличие начальной стадии туберкулеза (ТБ), когда присутствует последовательность ДНК микобактерии, либо с положительным, либо с отрицательным результатом теста СМІ-
25 ответа, если он имеется; и

 причем у указанного асимптомного субъекта-человека диагностируют наличие латентной туберкулезной инфекции (ЛТИ), когда отсутствует последовательность ДНК микобактерии и имеется положительный результат теста СМІ-ответа.

30 2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанная последовательность ДНК микобактерии содержит элемент IS6110 или элемент IS900.

3. Способ по п. 1 или п. 2, отличающийся тем, что указанный асимптомный субъект-человек представляет собой ТБ-контактировавшего субъекта.

4. Способ по п. 3, отличающийся тем, что указанный способ выполняют на образце МКПК, полученных от указанного асимптомного субъекта-человека в пределах 12 месяцев, 6 месяцев, 5 месяцев, 4 месяцев, 3 месяцев, 2 месяцев или 1 месяца после контакта указанного асимптомного субъекта-человека с ТБ-инфицированным индивидуумом.
5. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что инкубирование указанной смеси в условиях, обеспечивающих лизис микобактерий, включает инкубацию при приблизительно 37°C в течение приблизительно или менее чем 6 часов, 5 часов, 4 часов, 3,5 часа, 3 часов, 2,5 часа, 2 часов, 1,5 часа или 1 часа, предпочтительно приблизительно 3,5 часа.
6. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что указанный дополнительный тест СМІ-ответа включает тест на основе анализа высвобождения интерферона-гамма (IGRA).
7. Способ предсказания наличия у субъекта риска развития или наличия начальной стадии туберкулеза (ТБ), причем указанный способ включает:
- получение образца мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК), выделенных у указанного субъекта;
 - смешивание специфичного в отношении микобактерий бактериофага с указанным образцом МКПК с получением смеси;
 - инкубирование указанной смеси в условиях, обеспечивающих лизис микобактерий;
 - выделение ДНК из указанной смеси;
 - выявление наличия последовательностей ДНК микобактерии в указанной ДНК;
- причем наличие последовательностей ДНК микобактерии свидетельствует о том, что указанный субъект имеет риск развития или имеет начальную стадию ТБ.
8. Способ оценки прогноза заболевания туберкулезом (ТБ) у субъекта, причем указанный способ включает:
- получение образца мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК), выделенных у указанного субъекта;
 - смешивание специфичного в отношении микобактерий бактериофага с указанным образцом МКПК с получением смеси;
 - инкубирование указанной смеси в условиях, обеспечивающих лизис микобактерий;

выделение ДНК из указанной смеси;

выявление наличия последовательностей ДНК микобактерии в указанной ДНК, выделенной из смеси;

5 причем наличие последовательностей ДНК микобактерии свидетельствует о том, что указанный субъект имеет риск наличия начальной стадии ТБ и/или развития активного заболевания ТБ.

9. Способ лечения туберкулеза (ТБ) у субъекта, нуждающегося в этом, причем указанный способ включает:

10 получение образца мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК), выделенных у указанного субъекта;

использование анализа опосредуемого бактериофагом высвобождения ДНК микобактерии для выявления наличия начальной стадии ТБ у указанного субъекта; и, если выявлена начальная стадия ТБ,

15 введение указанному субъекту одного или более противотуберкулезных лекарственных средств или терапии.

10. Способ лечения начальной стадии туберкулеза (ТБ) у субъекта, нуждающегося в этом, причем указанный способ включает:

20 получение образца мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК), выделенных у указанного субъекта;

смешивание специфичного в отношении микобактерий бактериофага с указанным образцом МКПК с получением смеси;

инкубирование указанной смеси в условиях, обеспечивающих лизис микобактерий; 25 выделение ДНК из указанной смеси;

выявление наличия микобактериальных последовательностей в указанной ДНК; и

введение указанному субъекту одного или более лекарственных средств или терапии против начальной стадии ТБ.

30 11. Способ улучшения прогноза туберкулеза (ТБ) у субъекта, причем указанный способ включает:

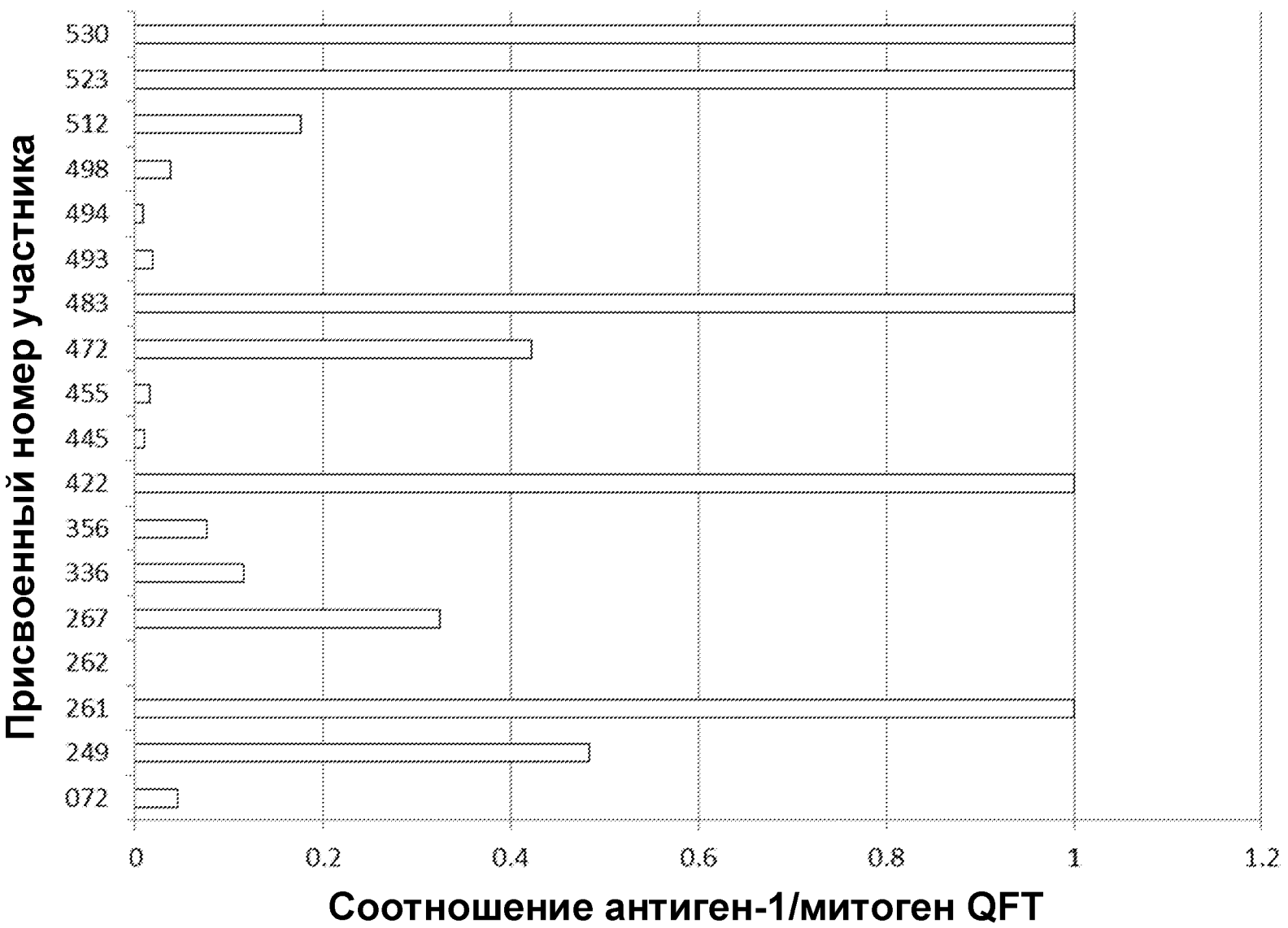
получение образца мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК), выделенных у указанного субъекта;

использование анализа опосредуемого бактериофагом высвобождения ДНК микобактерии для выявления наличия начальной стадии ТБ у указанного субъекта; и, если выявлена начальная стадия ТБ,

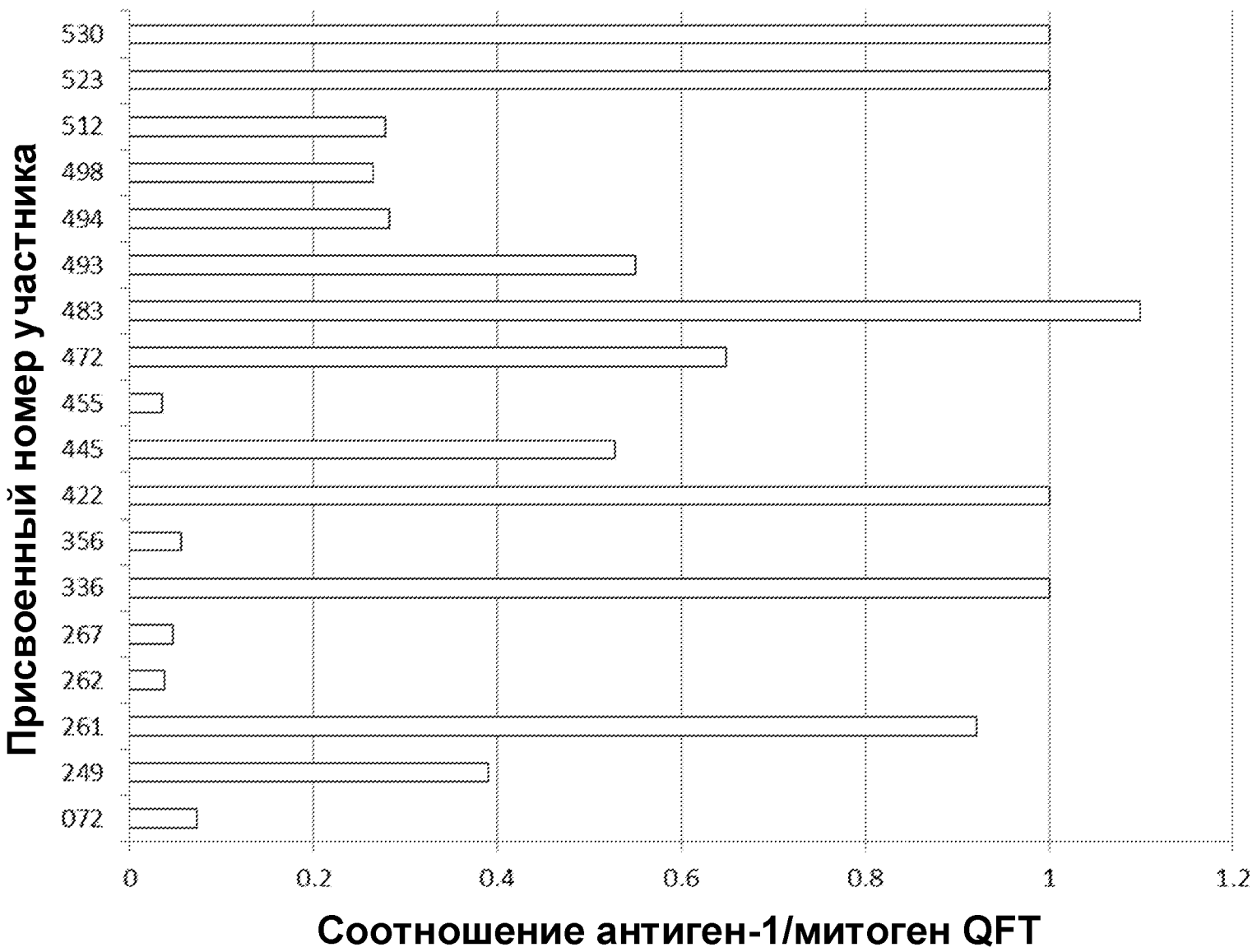
5 введение указанному субъекту одного или более противотуберкулезных лекарственных средств или терапии.

12. Применение бактериофага для измерения в образце крови, выделенном у субъекта-человека, наличия одного или более микобактериальных биомаркеров при изготовлении набора для оценки того, имеет ли указанный субъект-человек риск развития или наличия у
10 него начальной стадии туберкулеза (ТБ) или активного заболевания туберкулезом.

Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3

