



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108474797 A

(43)申请公布日 2018.08.31

(21)申请号 201680076852.6

(22)申请日 2016.12.29

(30)优先权数据

10-2015-0189371 2015.12.30 KR

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.06.28

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/KR2016/015455 2016.12.29

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/116154 KO 2017.07.06

(71)申请人 仁荷大学校产学协力团

地址 韩国仁川

(72)发明人 李珍洙

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

代理人 苗堃 金世煜

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 15/14(2006.01)

G12N 5/0783(2006.01)

C07K 16/24(2006.01)

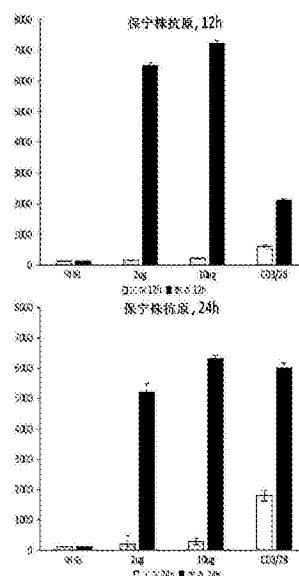
权利要求书1页 说明书17页
序列表2页 附图5页

(54)发明名称

通过检测外周血单个核细胞的 γ 干扰素分泌来诊断恙虫病的诊断方法

(57)摘要

本发明涉及利用外周血单个核细胞(Peripheral blood mononuclear cell; PBMC)的 γ -干扰素(interferon- γ ; INF- γ)分泌测定的恙虫病(scrub typhus)诊断方法,本发明的恙虫病诊断方法通过用恙虫病东方体提取物对从感染了恙虫病东方体的患者分离的外周血单个核细胞或者包含外周血单个核细胞的血液进行处理而进行抗原刺激,从而确认了INF- γ 生成增加,而在来自非感染者的外周血单个核细胞中几乎没有INF- γ 生成的变化,因此仅通过上述INF- γ 生成浓度的测定也能够简单地诊断恙虫病,进而,本发明的恙虫病诊断方法与以往的诊断恙虫病的间接免疫荧光法和用于基因型分析的PCR分析相比,诊断的正确率显著提高,不仅能够完全代替以往的诊断方法,而且能够显著提高对诊断结果的可信度。



1. 一种恙虫病 (scrub typhus) 诊断方法, 其特征在于, 包括:

(a) 步骤, 从预要判断是否受到恙虫病东方体 (*Orientia tsutsu gamushi*) 感染的患者分离出血液或者外周血单个核细胞 (Peripheral blood mononuclear cell; PBMC) 的步骤;

(b) 步骤, 将恙虫病东方体提取物处理到所述 (a) 步骤中分离的血液或者外周血单个核细胞, 以进行抗原刺激的步骤; 及

(c) 步骤, 检测从外周血单个核细胞中所分泌出来的 γ -干扰素 (interferon- γ ; INF- γ) 的浓度, 以判断是否被恙虫病东方体感染的步骤。

2. 根据权利要求1所述的恙虫病诊断方法, 其特征在于, 所述 (b) 步骤中,

恙虫病东方体提取物选自吉列姆株 (Gilliam strain)、卡普株 (Karp strain)、保宁株 (Boryoung strain)、卡托株 (Kato strain) 及川崎株 (Kawasaki strain) 组成的群中的1种以上的菌株提取。

3. 根据权利要求1所述的恙虫病诊断方法, 其特征在于, 所述 (b) 步骤中,

恙虫病东方体提取物, 包括: 56kDa型特异性抗原 (56kDa type specific antigen; TSA)。

4. 根据权利要求1所述的恙虫病诊断方法, 其特征在于, 所述 (b) 步骤为,

将0.5-10 μ g/ml浓度的恙虫病东方体提取物处理于外周血单个核细胞中, 反应时间为12-24小时。

5. 根据权利要求1所述的恙虫病诊断方法, 其特征在于, 所述 (c) 步骤中,

γ -干扰素的浓度可通过ELISA方法、流式细胞分析 (flow cyto metry)、ELISPOT或者实时PCR进行检测。

6. 根据权利要求1所述的恙虫病诊断方法, 其特征在于,

当所述 (c) 步骤中所检测的 γ -干扰素的浓度高于非感染者时, 则可判断为是被恙虫病东方体感染。

7. 根据权利要求1所述的恙虫病诊断方法, 其特征在于,

γ -干扰素从外周血单个核细胞所包含的CD3+T细胞或者CD56+NK细胞 (natural killer cell) 中生成。

8. 利用权利要求1至权利要求7的任一项目的恙虫病诊断方法的恙虫病诊断试剂盒, 其特征在于,

包括:

恙虫病东方体提取物; 及

抗- γ -干扰素 (anti-interferon- γ ; anti-INF- γ) 抗体。

通过检测外周血单个核细胞的 γ 干扰素分泌来诊断恙虫病的 诊断方法

技术领域

[0001] 本申请主张于2015年12月30日提出申请的大韩民国专利第10-2015-0189371号的优先权,所述专利文件作为本申请的参考文献。

[0002] 本发明涉及一种通过检测外周血单个核细胞(Peripheral blood mononuclear cell; PBMC)的 γ 干扰素(interferon- γ ; INF- γ)分泌来诊断恙虫病(scrub typhus)的诊断方法,更具体地,包括:从疑似感染了恙虫病东方体的患者体内分离出外周血单个核细胞或包括外周血单个核细胞的血液,然后,对其处理恙虫病东方体抽取物,以检测受到抗原刺激之后所生成的 γ 干扰素的浓度的步骤。

背景技术

[0003] 恙虫病在全球范围上发病,尤其包括马来西亚、泰国、菲律宾等国家在内,频发于中国、日本及澳大利亚,在韩国农村地区被患有称作为怪疾的绝大多数患者当中,据悉,大多数实为染上了恙虫病。恙虫病主要发病于秋季,这主要与作为其传播媒介的螨幼虫(chigger)的密度有关,就韩国而言,该病也较多地发生在苍白纤恙螨(*Leptotrombidium pallidum*)的幼虫较多出现的10-11月份,并发病于全国范围。

[0004] 据悉,恙虫病东方体(*O. tsutsugamushi*; 恙虫病菌)是寄生于专性细胞内(obligated intracellular)的革兰氏阴性杆菌。另外,恙虫病菌是恙虫病(Scrub typhus)的病原体,其作为急、慢性感染,发病症状包括:肺炎(pneumonitis)、脑炎(encephalitis)、出疹、发热及头疼等。

[0005] 其症状或者流行病症状,根据恙虫病东方体的各个群(血清型),在不同情况下呈现不同程度的差异。属于同等群内的菌株之间存在血清学关联,但是,不同群的菌株之间的血清学交叉反应则较弱或者全无。恙虫病东方体被分类为是一个种类,但是其具有很多抗原结构不同的血清型,根据抗原的差异,将其分类为吉列姆(Gilliam)、卡普(Karp)、卡托(Kato)等的血清型。在韩国国内则除了吉列姆、卡普以外,还被分类为原株(Kangwon)和保宁株(Boryong),其血清学反应与熟知的既有的原型菌株不同。

[0006] 如上所述,用于决定抗原性的多样性的恙虫病东方体的细胞膜蛋白抗原中存在种特异性抗原和血清型特异性抗原等。提纯恙虫病东方体,并通过聚丙烯酰胺凝胶电泳和免疫印迹(immunoblotting)对其抗原进行分析得出,存在70、60、54~56、46~47kDa的主要抗原(Takahashi K等, Microbiol. Immunol. 29:475, 1985),其中,46~47kDa、54~56kDa及70kDa的蛋白质具有抗原性,而56kDa和46~47kDa蛋白质则为菌株特异抗原(Tamura A等, Microbiol. Immunol. 26:321, 1982)。一般被认为,恙虫病的临床症状较轻,且根据其症状容易进行临床诊断,但是,根据报告数据,其存在很多非典型性临床症状,如果并无全身淋巴腺肿胀或者焦痂形成等的恙虫病特征性所见的话,那么很难与细螺旋体病、皮疹热及肾综合征出血热等的急性热性疾病进行鉴别。

[0007] 另外,如果未能够及时接受治疗或者未能在发病初期接受治疗的话,患者会患上

肺炎、脑膜炎、肾衰竭及多器官衰竭 (multi-organ failure), 甚至死亡, 并且受感染者当中的一部分会患有慢性感染。因此, 用于早期诊断的正确的诊断方法, 在降低死亡率及并发症而言是至关重要的, 因此, 需要开发一种能够有效诊断恙虫病的诊断方法。

[0008] 以往的传统技术而言, 为了诊断恙虫病, 使用了临床特征、受感染菌株的分离及鉴定、基于间接免疫荧光法 (indirect immunofluorescence assay; IFA) 的血源型分析 (serotyping) 及免疫优学 56kDa 型特异性抗原 (56kDa type specific antigen; TSA) 的基于 PCR 扩增的基因型分析等。另外, 公开专利第 2002-0020281 (公开日: 2002 年 03 月 15 日) 记载了利用包括连接有从恙虫病东方体 (*Orientia tsutsugamushi*) 的抗原决定基由来的两种以上的蛋白质的基因的 DNA 的载体中培养转换形质的菌株而获得的基因重组蛋白质抗原来诊断恙虫病的诊断方法。但是, 所述间接免疫荧光法虽然使用于恙虫病的诊断上, 但是, 其需要培养菌体, 从而, 需要有细胞培养设施, 也需要花费维护费用, 而且在发病初期难以进行诊断, 并发生交叉反应, 需要熟练度较高的分析其结果的专家。而通过 PCR 的基因型分析则为, 当受感染的菌株的量较少时, 基因无法得到完好的扩增, 存在需要检查装备和高费用的缺点。

[0009] 另外, γ 干扰素 (interferon- γ ; INF- γ) 在其宿主防御中, 对基于先天性免疫细胞的微生物鉴定及细胞内病原菌的细胞媒介性免疫 (cell mediated immunity) 的发达起到至关重要的角色 (Schroder 等, JLeukoc Biol. 2004Feb; 75 (2): 163-89)。尤其是, 对于特定抗原很敏感的 T 细胞当被同一个抗原再次刺激时, 会分泌出 INF- γ , 其 INF- γ 的分泌程度适用于诊断结核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 及巴西利什曼菌 (*Leishmania braziliensis*) 等的细菌或者病菌的诊断 (Pai 等, Ann Intern Med. 2008; 149 (3): 177-, Turgay N 等, Am J Trop Med Hyg. 2010Oct; 83 (4): 822-4)。

[0010] 为此, 本发明人为了开发能够简单且正确地辨别是否患有恙虫病东方体感染的诊断方法, 通过认真努力, 发现并确认, 从恙虫病东方体感染患者的血液中所分离出来的外周血单个核细胞中, 处理恙虫病东方体提取物的话, INF- γ 的生成会增加, 相反, 来自非感染者的外周血单个核细胞中, 则并未发生 INF- γ 的生成变化, 通过此完成了该发明。

发明内容

[0011] 本发明的目的在于, 提供一种通过检测来自恙虫病感染疑似患者的外周血单个核细胞中所分泌的 INF- γ 浓度, 来诊断恙虫病的诊断方法。

[0012] 为了实现上述目的, 本发明提供恙虫病 (scrub typhus) 的诊断方法, 其包括以下步骤: (a) 从预要判断是否受到恙虫病东方体 (*Orientia tsutsugamushi*) 感染的患者分离出血液或者外周血单个核细胞 (Peripheral blood mononuclear cell; PBMC) 的步骤; (b) 将恙虫病东方体提取物处理到所述 (a) 步骤中分离的血液或者外周血单个核细胞, 以进行抗原刺激的步骤; 及 (c) 检测从外周血单个核细胞中所分泌出来的 γ -干扰素 (interferon- γ ; INF- γ) 的浓度, 以判断是否被恙虫病东方体感染的步骤。

[0013] 根据本发明一优选实施例, 所述 (b) 步骤中, 恙虫病东方体提取物可选自由吉列姆株 (Gilliam strain)、卡普株 (Karp strain)、保宁株 (Boryoung strain)、卡托株 (Kato strain) 及川崎株 (Kawa saki strain) 组成的群中的 1 种以上的菌株提取。

[0014] 根据本发明另一优选实施例, 所述 (b) 步骤中, 恙虫病东方体提取物可包括: 56kDa

型特异性抗原(56kDa type specific antigen;TSA)。

[0015] 根据本发明又另一实施例,所述(b)步骤为,可将0.5-10 μ g/ml浓度的恙虫病东方体提取物处理于外周血单个核细胞中,反应时间为12-24小时。

[0016] 根据本发明另一优选实施例,所述(c)步骤中, γ -干扰素的浓度可通过ELISA或者流式细胞分析进行检测。

[0017] 根据本发明另一优选实施例,当所述(c)步骤中所检测的 γ -干扰素的浓度高于非感染者时,则可判断为是被恙虫病东方体感染。

[0018] 根据本发明另一优选实施例, γ -干扰素可通过包含于外周血单个核细胞中的CD3+T细胞或者CD56+NK细胞(natural killer cell)所生成。

[0019] 本发明还提供恙虫病诊断试剂盒,其利用所述恙虫病诊断方法,包括:恙虫病东方体提取物;及抗- γ -干扰素(anti-interferon- γ ;anti-INF- γ)抗体。

[0020] 本发明还提供恙虫病(scrub typhus)的诊断及治疗方法,其包括:(a)从预要判断是否受到恙虫病东方体(*Orientia tsutsugamushi*)感染的患者分离出血液或者外周血单个核细胞(Peripheral blood mononuclear cell;PBMC)的步骤;(b)将恙虫病东方体提取物处理到所述(a)步骤中分离的血液或者外周血单个核细胞,以进行抗原刺激的步骤;及(c)检测从外周血单个核细胞中所分泌出来的 γ -干扰素(interferon- γ ;INF- γ)的浓度,当检测到每孔细胞数量为 1×10^5 个的外周血单个核细胞生成750pg/ml浓度以上的 γ -干扰素时,则诊断为感染上恙虫病的步骤;及(d)为被诊断为感染上恙虫病的患者给药恙虫病治疗剂的步骤。

[0021] 根据本发明一优选实施例,所述恙虫病治疗剂可选自由盐酸多西霉素(doxycycline)、氯霉素(chloramphenicol)、利福平(rifampin)、阿奇霉素(azithromycin)、克拉霉素(clarithromycin)、罗红霉素(roxithromycin)、氟喹诺酮(fluoroquinolones)及替加环素(tigecycline)组成的群当中的1种以上。

[0022] 本发明的通过检测外周血单个核细胞(Peripheral blood mononuclear cell;PBMC)的 γ 干扰素(interferon- γ ;INF- γ)分泌来诊断恙虫病(scrub typhus)的诊断方法为,通过确认从恙虫病东方体感染患者的血液中所分离出来的血液或者外周血单个核细胞中,处理恙虫病东方体提取物或来自恙虫病东方体的抗原,以刺激抗原时,INF- γ 的生成会增加,相反,来自非感染者的外周血单个核细胞中,则并未发生INF- γ 的生成变化,从而,仅通过检测所述INF- γ 的生成浓度,就能够简单地诊断出是否患有恙虫病。

[0023] 进一步地,本发明的诊断恙虫病的诊断方法,其相比于传统的用于诊断恙虫病的间接免疫荧光法(IFA)及用于基因型分析的PCR分析,明显提高了诊断正确度,不仅能够完全替代传统的诊断方法,而且还能够明显提高其诊断结果的可信度。

附图说明

[0024] 图1图示了将保宁血清型恙虫病东方体的抗原提取物,按照各个浓度及时间,处理于来自恙虫病患者的外周血单个核细胞,以刺激抗原时,所检测到的 γ 干扰素生成程度的检测数据;

[0025] 图2图示了将川崎血清型恙虫病东方体的抗原提取物,按照各个浓度,处理于非感染者及来自恙虫病患者的外周血单个核细胞,以刺激抗原时,所检测到的 γ 干扰素生成程

度的检测数据;

[0026] 图3图示了将外周血单个核细胞利用保宁血清型恙虫病东方体进行抗原刺激之后所检测到的 γ 干扰素生成程度的检测数据,按照非感染者群(N)、患有保宁血清型恙虫病东方体感染的患者群(G1)及nPCR结果为阴性的患者群(G2)进行分类的图;

[0027] 图4图示了对56kDa型特异性抗原进行FSI5抗体预处理之后,对于非感染者及来自恙虫病患者的外周血单个核细胞中处理具有保宁血清型的恙虫病东方体提取物,以进行抗原刺激之后,所检测到的 γ 干扰素的生成程度的数据;

[0028] 图5a图示了通过CD3阳性细胞确认的 γ 干扰素的分泌程度的数据;

[0029] 图5b图示了通过CD56阳性细胞的确认的 γ 干扰素的分泌程度的数据。

[0030] 最佳实施方式

[0031] 以下,详细说明本发明。

[0032] 如上所述,当恙病患者并无恙虫病的特征性所见时,很难与细螺旋体病、皮疹热及肾综合征出血热等的急性热性疾病鉴别,而且如果未能够及时接受治疗或者未能在发病初期接受治疗的话,患者会患上肺炎、脑膜炎、肾衰竭及多器官衰竭(multi-organ failure),甚至死亡,并且受感染者当中的一部分会患有慢性感染,导致引发并发症,因此,需要开发一种能够有效诊断恙虫病的诊断方法。

[0033] 本发明提供一种通过检测外周血单个核细胞(Peripheral blood mononuclear cell;PBMC)的 γ 干扰素(interferon- γ ;INF- γ)分泌来诊断恙虫病(scrub typhus)的诊断方法,以求解决上述问题。从恙虫病受感染者患者所分离出的血液或外周血单个核细胞中,处理恙虫病东方体提取物或来自恙虫病东方体的抗原,对其进行抗原刺激的话,INF- γ 的生成会增加,从而,能够简单且正确地判断是否感染恙虫病东方体,而且,其相比于传统的用于诊断恙虫病的间接免疫荧光法(IFA)及用于基因型分析的PCR分析,明显提高了诊断正确度,不仅能够完全替代传统的诊断方法,而且还能够明显提高其诊断结果的可信度。

[0034] 因此,本发明涉及一种诊断恙虫病(scrub typhus)的诊断方法,其包括:

[0035] (a)从预要判断是否受到恙虫病东方体(*Orientia tsutsugamushi*)感染的患者分离出血液或者外周血单个核细胞(Peripheral blood mononuclear cell;PBMC)的步骤;

[0036] (b)将恙虫病东方体提取物处理到所述(a)步骤中分离的血液或者外周血单个核细胞,以进行抗原刺激的步骤;及

[0037] (c)检测从外周血单个核细胞中所分泌出来的 γ -干扰素(interferon- γ ;INF- γ)的浓度,以判断是否被恙虫病东方体感染的步骤。

[0038] 本发明的一实施例中,为了比较作为诊断恙虫病而被认为是金标准工具(gold standard tool)的间接免疫荧光法(Indirect Immunofluorescence Assay;IFA)的正确度和利用检测INF- γ 分泌来进行诊断的诊断方法,选择13名出现典型的临床特征的恙虫病东方体感染患者和选择10名非感染者作为对象,进行了分析。

[0039] 通过IFA的诊断结果得出,如表3所示,在13名患者当中,并未检测出恙虫病吉列姆血清型及卡普血清型,而其中11名患者对保宁血清型表现出阳性反应。另外,13名患者当中的9名患者对川崎血清型表现出阳性反应,并与保宁血清型表现出交叉反应。

[0040] 另外,为了分析所述患者所感染上的恙虫病的基因型,利用患者血液进行了巢式PCR(nested PCR;nPCR),巢式PCR首次先大范围地包括目标位置进行扩增,并利用扩增产物

再进一步地紧密于目标位置进行扩增,这是为了确认首次的PCR扩增的片段是特异性 (specific) 扩增还是非特异性 (non-specific) 扩增而使用。

[0041] 其结果得出,如表3所示,通过nPCR的11名患者为保宁 (Patients Group:G1),而2名患者为阴性 (Patients Group:G2),而通过间接免疫荧光法 (IFA) 的诊断结果得出,对恙虫病东方体出现临床症状的患者当中,有2名患者 (Patient Nos.P04及P10) 为阴性,从而,因IFA与nPCR的诊断结果的差异,得出,仅利用传统的诊断方法是无法正确地诊断恙虫病。但是,通过nPCR被确认为阴性的上述2名患者 (Patient Nos.P12及P13) 和通过IFA被确认为阴性的上述2名患者 (Patient Nos.P04及P10),在利用本发明的诊断方法进行诊断的结果,得出,其INF- γ 的生成均有所增加,因此,可以得知,通过IFA及nPCR的诊断结果存在错误。

[0042] 本发明为了提供一种不仅能够简单并正确地诊断是否感染恙虫病,且相比于传统的诊断方法,能够明显提高其诊断正确度的诊断方法,而开发了通过检测外周血单个核细胞的 γ 干扰素分泌来诊断恙虫病的诊断方法。

[0043] 进一步具体说明上述方法,首先,(a) 步骤是从需要判断是否感染恙虫病东方体 (*Orientia tsutsugamushi*) 的患者分离出血液或外周血单个核细胞 (Peripheral blood mononuclear cell; PBMC) 的步骤。

[0044] 所述外周血单个核细胞 (Peripheral blood mononuclear cell; 外周血单核球; PBMC) 是指具有存在于血液内的球形核的细胞,该种外周血单个核细胞中包括有:B细胞、T细胞、巨噬细胞 (macrophage)、树突细胞 (dendritic cell)、自然杀伤细胞 (NK cell, natural killer cell) 等的免疫细胞。从血液中分类PBMC的方法一般使用分层液 (Ficoll) 方法,分层液是将砂糖和表氯醇相互聚合的化合物,一般使用约40万分子量。当分层液溶于水时,其从低黏度溶液变为高密度溶液,因此,其用于形成密度梯度的物质,以分离细胞、病菌及细胞器等。就PBMC而言,因其相比于包含于血液中的红血球 (red blood cell; RBC)、颗粒球 (granulocytes) 及死细胞更轻,且相比于血浆 (plasma) 则更重,因此可被分离。

[0045] 所述 (a) 步骤中的患者是指包括人类、牛、狗、豚鼠、兔子、鸡、昆虫等在内的需要被治疗的任意个体。另外,对象包括:参与到未出现任意疾病临床所见的临床研究试验的任意对象、或参与到流行病学研究的对象、或作为对照群而使用的对象。

[0046] 其次,(b) 步骤为从所述分离出来的血液或外周血单个核细胞中处理恙虫病东方体提取物,以进行抗原刺激的步骤。

[0047] 所述恙虫病东方体提取物可从已知的具有血清型的恙虫病东方体提取,例如,可选自由吉列姆株 (Gilliam strain)、卡普株 (Karp strain)、保宁株 (Boryoung strain)、卡托株 (Kato strain) 及川崎株 (Kawasaki strain) 组成的群中的1种以上的菌株提取,但并不限于此。

[0048] 另外,所述恙虫病东方体提取物,包括:56kDa型特异性抗原 (56kDa type specific antigen; TSA),并且,可根据需要仅提纯56kDa型特异性抗原而予以使用。

[0049] 进而,所述恙虫病东方体提取物的制备方法,可为将已知的具有血清型的恙虫病东方体提取物接种于L929细胞、Vero细胞、HEL、MRC5细胞、BHK、McCoy及EVC-304细胞等并培养之后,利用离心分离及密度梯度法,将受恙虫病东方体感染的细胞分离出来,所述被接种恙虫病东方体提取物的细胞株为,除了上述列举的细胞以外,只要是能够用于制备恙虫病

东方体提取物,就并不给予特别的限制。

[0050] 本发明一实施例中,使用了恙虫病保宁血清型(Boryoung serotype)及川崎血清型(Kawasaki serotype),并将所述两个菌株分别感染到EVC-304细胞,然后,利用离心分离及密度梯度法制备了恙虫病东方体提取物。

[0051] 本发明中,在所述(b)步骤中,可添加0.5-10 μ g/ml的恙虫病东方体抗原提取物,其反应时间为12-24小时,优选地,可利用保宁血清型提取物5 μ g/ml、川崎血清型提取物2.5 μ g/ml来处理,其处理时间为16小时。

[0052] 本发明另一实施例中,为了确认使用多少抗原才能够不引发细胞凋亡,即为了确认不引发细胞凋亡的适中抗原量,在恙虫病东方体提取物的浓度及其处理时间为不同的情况下,检测了INF- γ 的生成浓度,其检测得出,如图1所示,其为12-24小时,如图2及图3所示,对于保宁血清型的峰值响应(peak response)为2~10 μ g/ml之间,而对于川崎血清型的峰值响应则为0.5~2.5 μ g/ml。

[0053] 最后,(c)步骤为通过检测从外周血单个核细胞所分泌的 γ -干扰素(interferon- γ ; INF- γ)浓度,来判断是否感染有恙虫病东方体的步骤。

[0054] 所述INF- γ 浓度检测为,可无限次地使用本领域熟知的细胞因子浓度检测方法,但是,优选为,可通过ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)方法、流式细胞分析(flow cytometry)、ELISPOT(enzyme-linked immunoSpot)或者实时PCR(RT-PCR)来进行检测。

[0055] 所述ELISA为,以酵素为标记物的利用抗原抗体反应的抗原或抗体量的检测方法,一般将该检测方法统称为酵素免疫分析法。一般而言,将酵素(过氧化物酶,peroxidase)结合于抗体中,并利用其反应来实现,一般在微孔板内其反应会完成,因此可进行微量分析。

[0056] 所述流式细胞分析为,以激光为基础,通过利用电探技术将流动的细胞停止或送出,以对细胞进行细数、分类、探知生物标记并利用于蛋白质工程的生物物理学技术。其能够同时进行身体多变量分析(Multivariable analysis)和每秒数千个粒子的化学分析。流式细胞分析大部分用于健康障碍,尤其是用于诊断血液癌,但是也可适用于临床试验等的基本研究方面。

[0057] 本发明中,在所述(c)步骤中所检测到的 γ -干扰素浓度高于非感染者时,可判断为感染上恙虫病东方体。

[0058] 这时,所述“非感染者”是指,并无从医疗机构被诊断为是恙虫病的既往病历,且并无可被疑似为是恙虫病的协同焦痂或皮疹的发热疾病的病历的健康正常的成年人。

[0059] 所述(c)步骤中,对于非感染者而言,将保宁血清型提取物5 μ g/ml处理于 1×10^5 个的PBMC时,检测得知,生成1000pg/ml以下的 γ -干扰素,优选地,生成900pg/ml以下的 γ -干扰素,更优选地,生成800pg/ml以下的 γ -干扰素,最优选地,生成750pg/ml以下的 γ -干扰素。

[0060] 因此,所述(c)步骤中,当检测到每孔细胞数量为 1×10^5 个的PBMC生成750pg/ml浓度以上的 γ -干扰素时,可判断为感染上恙虫病东方体,优选地,每孔细胞数量为 1×10^5 个的PBMC生成800pg/ml浓度以上的 γ -干扰素,更优选地,每孔细胞数量为 1×10^5 个的PBMC生成900pg/ml浓度以上的 γ -干扰素,最优选地,每孔细胞数量为 1×10^5 个的PBMC生成1000pg/ml浓度以上的 γ -干扰素时,可判断为感染上恙虫病东方体。

[0061] 用于诊断的阳性预测值(positive predictive value)和阴性预测值(negative predictive value),分别按照以下数学式1及数学式2求值。

[0062] 表1

[0063]

结果	疾病(+)	疾病(-)	合计
检查(+)	a	b	a+b
检查(-)	c	d	c+d
合计	a+c	b+d	

[0064] 数学式1

$$[0065] \quad \text{阳性预测值} = \frac{a}{(a+b)}$$

[0066] 数学式2

$$[0067] \quad \text{阴性预测值} = \frac{d}{(c+d)}$$

[0068] 根据诊断阈值(threshold)的检查的阳性、阴性预测值如下表2所示。当阈值为750pg/ml以上时,可预期非常优秀的阳性、阴性预测值。

[0069] 表2

[0070] 根据阈值(threshold)的检查阳性、阴性预测值

[0071]

阈值(pg/ml)	阳性预测值(%)	阴性预测值(%)
700	92.8	100
≥750	100	100

[0072] 本发明的又一实施例中,根据表3的PCR基因型分析结果,将恙虫病患者分类为:利用PCR基因型分析确认到菌株的抗原性为保宁血清型菌株感染的患者群(G1)、利用PCR基因型分析并未确认到菌株的血清型的群(G2)、表4的非感染者群(N),进行了分析,其检测方法为,从各个患者分离出来的PBMC中分别处理保宁血清型菌株提取物及川崎血清型菌株提取物,以进行抗原刺激,然后利用ELISA方法检测了INF- γ 浓度。其结果确认为,如表3所示,当处理保宁血清型菌株提取物时,保宁血清型菌株感染患者群全体相比于非感染者群(表4),其INF- γ 的浓度明显增加。

[0073] 另外,还确认到,保宁血清型菌株感染患者群即便是处理了川崎血清型菌株提取物,其INF- γ 生成也有明显增加,这是指保宁血清型和川崎血清型之间存在较强的交叉反应。

[0074] 从所述PCR分析结果,当虽然并未生成扩增产物却分泌出相比所述750pg/ml更高浓度的 γ -干扰素时,可判断为,当前被感染的恙虫病东方体的数量较少,或者存在于血液内的菌株数量较少,或者之前曾被恙虫病东方体感染过。

[0075] 具体地,如本发明表3所示,在nPCR结果中被判定为阴性判定的G2群而言,得知,通过恙虫病东方体保宁血清型菌株提取物处理,PBMC的INF- γ 生成明显增加,鉴于此可预测为,被感染的恙虫病东方体的数量较少,或者存在于血液内的菌株数量较少,或者当前之前

曾被恙虫病东方体感染过。

[0076] 在IFA检查中被判定为阴性判定的患者 (Patient Nos.P04及P10), 也如本发明表3所示, 得知, 通过恙虫病东方体保宁血清型菌株提取物处理, PBMC的INF- γ 生成明显增加, 通过此可以知晓, 菌株感染之后并在充分形成抗体之前的时期, 也能够检测PBMC的INF- γ 生成, 以能够更早一步诊断是否患有恙虫病。

[0077] 即, 如上述所述, 得知, 因IFA结果和nPCR结果之间的差异, 仅仅通过以往的诊断方法是难以正确的诊断是否患有恙虫病, 但是如果使用本发明的通过检测外周血单个核细胞的 γ 干扰素分泌来诊断恙虫病的诊断方法, 则能够提高恙虫病的诊断正确度。

[0078] 本发明中, γ 干扰素可借助包含于外周血单个核细胞的CD3+T细胞或者CD56+NK细胞 (natural killer cell) 而生成。

[0079] 本发明一实施例中, 为了了解用于生成 γ 干扰素的主要抗原都有哪些, 从而, 确认了一般被熟知为是作为恙虫病东方体的高度免疫原性的56kDa型特异性抗原 (56kDa type specific antigen; TSA) 是否与INF- γ 生成存在关联。如图4所示, 得知, 通过处理被熟知为对于56kDa型特异性抗原具有特异性的FS15抗体, 确认到INF- γ 生成约减少50%左右。即, 确认到56kDa型特异性抗原在从恙虫病患者分离的PBMC中, 是作为INF- γ 的分泌的优质蛋白质。但是, 借助FS15并不能INF- γ 的分泌大部分阻断, 因此, 可视为干涉INF- γ 分泌的还另有其因。

[0080] 本发明的另一实施例中, 为了分选出干涉PBMC的INF- γ 生成的细胞, 而通过阻断PBMC中所生成的INF- γ 分泌, 并利用流式细胞分析仪, 分析了作为T细胞或者NK细胞 (natural killer cell) 的标记的CD3及CD56。如图5a及5b所示, 得知, 从非感染者分离出的PBMC中, 并未发现从CD3+细胞及CD56+细胞中生成INF- γ , 而相反, 通过添加保宁血清型菌株提取物, 而被抗原刺激的来自恙虫病感染患者的PBMC中, 发现从CD3+细胞及CD56+细胞中生成有INF- γ 。

[0081] 即, 得出, 通过恙虫病东方体提取物的刺激而被包含于外周血单个核细胞中的CD3+T细胞或者CD56+NK细胞 (natural killer cell) 中, 生成了INF- γ 。

[0082] 本发明中, 为了阻断INF- γ 的分泌, 而使用了蛋白转运抑制剂 (Brefeldin A; BFA), 蛋白转运抑制剂作为由丝状细菌 *Penicillium bre feldianum* 等生产的大环内酯类抗生素的一种, 其阻碍三聚体G蛋白质的活性化或者效应器的耦合。并阻碍从内质网至高尔基体的膜泡运输, 并使得高尔基体的板层结构丢失, 以将糖基转移酶等的高尔基体蛋白质逆行运输至内质网。反式高尔基体网络 (TGN) 中虽然并不阻碍朝向细胞膜的运输和细胞内摄取, 但是融合TGN与内涵体。利用蛋白转运抑制剂处理细胞的话, 浅载于高尔基体的ADP-核糖化因子 (ARF)、外被体蛋白会快速地朝向细胞质游离。

[0083] 分析本发明的表3结果, 可知, 虽然确认了无法从两个患者 (P12及P13) 中确认因nPCR的扩增, 但是, 从所述两个患者分离的PBMC则因保宁血清型菌株提取物的刺激, 而呈现较强的INF- γ 的生成。通过此可预测为是, 保宁血清型恙虫病东方体的感染量及其少量, 或者存在于血液内的菌株较少而未能被nPCR检测出来, 或者曾被保宁血清型菌株感染过, 从而获取到长期免疫记忆力。即, 以图5a及图5g的结果为基础, 可被视为是, 通过保宁血清型菌株提取物, 在NK细胞及T细胞中形成免疫记忆。

[0084] 本发明提供利用上述方法的诊断试剂盒。

[0085] 所述诊断试剂盒可包括：恙虫病东方体提取物；及抗- γ -干扰素(anti-interferon- γ ; anti-IFN- γ)抗体。

[0086] 所述恙虫病东方体提取物是用于进行PBMC抗原刺激的，也能够以来自恙虫病东方体的56kDa型特异性抗原的形态提供。这时，所述恙虫病东方体提取物可从已知的具有血清型的恙虫病东方体菌株提取，例如，可选自由吉列姆株(Gilliam strain)、卡普株(Karp strain)、保宁株(Boryoung strain)、卡托株(Kato strain)及川崎株(Kawasaki strain)组成的群中的1种以上的菌株提取，但并不限于此。

[0087] 本发明的诊断试剂盒所包含的抗- γ -干扰素(anti-interferon- γ ; anti-IFN- γ)抗体，可优选为，单独提供或者固定于固体基质上而予以提供。

[0088] 当被固定于固体基质上时，所述抗体为，如文献上所述般，可利用多种方法进行固定(Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow & Lane; Cold Spring Harbor, 1988)。作为适当的固体基质，可例举：细胞培养板、ELISA板、管状及聚合物膜。除此以外，还包括：放样板、合成玻璃、琼脂糖珠、杯子、扁平壳(flat packs)或者其他由固体支撑体所被支撑或附着于其的或者具备涂层的東西。

[0089] 另外，根据本发明的诊断试剂盒，可包括用于免疫学分析的试剂。所述免疫学分析可包括：能够检测对于本发明抗体的抗原的结合的所有方法。这些方法为本利用公知常识，例如：免疫细胞化学及免疫组织化学、放射线免疫分析法(radioimmunoassays)、酵素结合免疫法(ELISA: Enzyme Linked Immunoabsorbent assay)、免疫印迹法(immunoblotting)、法尔试验(Farr assay)、沉淀素反应法、浊度计法、免疫扩散法、计时-电力电泳法、单向免疫扩散法及免疫荧光法。

[0090] 免疫学分析时所使用的药剂，包括：适当的载体、可生成可检测信号的标识、溶剂、清洗剂。另外，当标识物质为酵素时，可包括：可检测酵素活性的基质及反应抑制剂。作为适合的载体则并不限于此，其可以是：例如本领域公知的生理学方面可使用的缓冲液当中的某一种(例如：PBS)的可溶性载体，或者例如聚苯乙烯、聚乙烯、聚丙烯、聚酯、聚丙烯腈、氟树脂、交联右旋糖酐、多聚糖的不溶性载体、例如在乳胶上金属涂层的磁性微粒的高分子、其他纸张、玻璃、金属、琼脂糖及其组合。

[0091] 作为可生成可检测信号的标识，可使用：酵素、荧光物质、发光物质及放射性物质。酵素可使用：过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -D-牛乳糖酶、糖苷酶、苹果酸酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、转化酵素等，荧光物质可使用：异硫氰酸荧光素、藻胆蛋白等，发光物质可使用：异亮氨酸、光泽精等，放射性物质可使用： I_{131} 、 C_{14} 、 H_3 等。但是，除了上述例示以外，只要能够用于免疫学分析法的，均可使用。

[0092] 除此以外，所述试剂盒可以是用于实施免疫印记、免疫沉淀分析法、补体结合分析法、流式细胞分析或者蛋白质芯片等，各个分析方法均可额外地包括适合的构成。

[0093] 以下，通过实施例，进一步具体说明本发明。下述实施例仅为用于例示本发明，对于本领域技术人员而言，显而易见地，本发明范围并不受限于这些实施例。

[0094] 本发明还提供一种恙虫病(scrub typhus)的诊断及治疗方法，该方法包括：(a)从预要判断是否受到恙虫病东方体(*Orientia tsutsugamushi*)感染的患者分离出血液或者外周血单个核细胞(Peripheral blood mononuclear cell; PBMC)的步骤；(b)将恙虫病东方体提取物处理到所述(a)步骤中分离的血液或者外周血单个核细胞，以进行抗原刺激的

步骤;及(c)检测从外周血单个核细胞中所分泌出来的 γ -干扰素(interferon- γ ;INF- γ)的浓度,当检测到每孔数量为 1×10^5 个的外周血单个核细胞生成750pg/ml浓度以上的 γ -干扰素时,则诊断为感染上恙虫病的步骤;以判断是否被恙虫病东方体感染的步骤;及(d)为被诊断为感染上恙虫病的患者给药恙虫病治疗剂的步骤。

[0095] 根据本发明一优选实施例,所述恙虫病治疗剂可选自由盐酸多西霉素(doxycycline)、氯霉素(chloramphenicol)、利福平(rifampin)、阿奇霉素(azithromycin)、克拉霉素(clarithromycin)、罗红霉素(roxithromycin)、氟喹诺酮(fluoroquinolones)及替加环素(tigecycline)组成的群当中的1种以上,但是,只要是通常能够用于治疗恙虫病的,则均可使用。

[0096] 根据本发明的恙虫病(scrub typhus)诊断及治疗方法,通过尽早地正确诊断恙虫病感染与否,而及时为患者给药,从而能够有效地预防或治疗恙虫病,且能够为患者提供早期治疗,从这一点来看,是非常有用的。

具体实施方式

[0097] 实施例1

[0098] 利用间接免疫荧光法(Indirect Immunofluorescence Assay;IFA),确认是否感染恙虫病东方体

[0099] 为了诊断恙虫病,选择疑似恙虫病感染患者,并从所选择的疑似恙虫病感染患者中抽取血液。本发明实验的研究题目为,恙虫病东方体引起的恙虫病患者的INF- γ 生成(INF- γ production in scrub typhus patient challenged with *O. tsutsugamushi*),其所有协议均获得韩国仁荷医科大学医院的临床试验审查委员会(Institutional Review Board; IRB)的审核及批准,且涉及本研究的所有患者均签订了同意书。

[0100] 对于呈现作为恙虫病的典型性临床特性的发热、皮疹、焦痂(eschar)的13名患者,实施了对于保宁(Boryoung)、川崎(Kawasaki)、吉列姆(Gilliam)及卡普(Karp)血清型的IFA分析。

[0101] 首先,通过在全血(whole blood)中处理EDTA而取得了患者的血清。各个血清利用PBS(phosphate buffered saline, pH=7.4)依次稀释2倍,从1:40至1:1280,稀释到微孔板(U-bottomed microplates)。

[0102] 将血清样品的稀释液处理于载玻片的各个圆形抗原点(each prototype antigen spots),其中,所述载玻片上附着有保宁(Boryoung)、川崎(Kawasaki)、吉列姆(Gilliam)及卡普(Karp)血清型的恙虫病东方体(*O. tsutsugamushi*)的培养细胞,并且将载玻片置于保湿室(moist chamber)并在37℃条件下,反应30分钟,然后,利用含有0.05% tween20的PBS(PBST),将反应完毕的载玻片清洗3次,然后,处理荧光共轭的goat anti-human IgG(Jackson laborotory, 美国),并在保湿室以37℃条件,反应30分钟。利用上述所述的方法进行3次清洗之后,干燥并利用anti-fainting mounting media(Vecta shield, Vector, CA)予以固定。然后,利用荧光显微镜(fluorescence microscope; Axioskop 2, CarlZeiss, 德国)以x200倍率进行观察。

[0103] 通过IFA诊断恙虫病时,之前仁荷医科大学医院长期收集了数据及实验数据,以该收集的数据及实验数据为基础,当IgG抗血清(antisera)滴度超过血清的1:160稀释以上

时,则判断为是阳性。

[0104] 如下表3所示,得知,13名的恙虫病患者中,对于保宁血清型恙虫病东方体(*O. tsutsugamushi*)的IFA检查为阳性的患者为11名。而利用PCR基因型分析所确认到的菌株的血清型为保宁血清型的11名患者当中,有7名患者对川崎抗原呈IFA阳性反应,从而,确认到其与保宁抗原存在较强的交叉反应。2名恙虫病患者的血液在IFA检查中均呈现阴性。

[0105] 通过这些结果,确认到,IFA虽然是作为诊断恙虫病的金标准工具(gold standard tool),但仅通过IFA是并不充分的。

[0106] 实施例2

[0107] 利用PCR分析对受感染的恙虫病东方体进行基因型分析

[0108] 首先,从每个疑似恙虫病感染患者的全血中获取白皮层(Buffy coat)。DNA提取则利用QIAamp DNAm mini kit(Qiagen,Hilden,德国),按照包括于所述试剂盒的说明书实施。将DNA稀释到50 μ l的灭菌处理的蒸馏水中,并为了检测出恙虫病东方体的56kDa型特定抗原,而实施了巢床PCR(nested PCR;nPCR)。

[0109] 为了实施nPCR,制备了2个引物对(GenoTech),用于1次PCR实施的引物对是基于对56-kDa型特异性抗原基因进行编码的来自保宁株(Bryoung strain,Genbank accession number:L04956)、卡普株(Karp strain,Genbank accession number:M33004)、吉列姆株(Gilliam strain,Genbank accession number:M33267)及川崎株(Kawasaki strain,Genbank accession number:M63383)的保守DNA序列,进行制备的,且其引物对序列信息如下,通过1次引物对扩增的扩增产物的大小为1900bp。

[0110] 1次引物对

[0111] 【序列号1】1F:5'-ATAATTAATGTATTTTCGAACG-3'

[0112] 【序列号2】2R:5'-CCTKCAAAGGACTTTTAGCT-3'

[0113] 用于实施2次PCR的引物对如下,通过2次引物对扩增的扩增产物的大小为1600bp。

[0114] 2次引物对

[0115] 【序列号3】1Fn:5'-AACACAGTGTTTATAGATTGTTTA-3'

[0116] 【序列号4】2Rn:5'-RCATTAATTGCTACACCAAGT-3'

[0117] 56-kDa型特异性抗原基因的第一次PCR扩增利用了1F及2R引物对,第二次PCR扩增利用了1Fn及2Rn引物对。通过所述第二次PCR生成的扩增产物是通过NCBI(National center for Biotechnology Information)BLAST程序来确认序列及鉴定。

[0118] 表3

[0119]

患者组	患者 编号	IFA (IgG)*		nPCR	IFN- γ (pg/ml)	
		保宁株	川崎株	菌株	保宁株	川崎株
G1	P 01	++	++	保宁株	5694	5300
	P 02	+++	-	保宁株	4558	5140
	P 03	++	++	保宁株	4469	1080
	P 04	-	-	保宁株	3861	77
	P 05	+++	++	保宁株	2615	3071
	P 06	+++	+++	保宁株	2553	ND
	P 07	++	-	保宁株	2406	4300
	P 08	++	++	保宁株	2255	2053
	P 09	++	++	保宁株	1726	ND
	P 10	-	-	保宁株	1676	92
	P 11	++	++	保宁株	1193	2515
G2	P 12	++	++	NA	1700	ND
	P 13	++	++	NA	4183	ND

[0120] *血清稀释:1:40~1:80 (-), 1:160~1:640 (++) , 1:1280~ (++) NA, 未被扩增 (not amplified); ND, 未实施 (not done)。

[0121] 如上述表3所示,将恙虫病患者分类为:利用PCR基因型分析确认到受保宁血清型恙虫病东方体 (*O. tsutsugamushi*) 感染的患者群 (G1) 及利用PCR基因型分析并未确认到菌株的血清型的恙虫病患者群 (G2), 而非感染者群 (N), 则如表4所示,进行了单独分类。从11名患者中确认到保宁血清型的感染 (G1), 而2名患者在nPCR检查中确认为阴性 (G2) (表3)。

[0122] 实施例3

[0123] 恙虫病东方体粗抗原 (crude antigen) 的提纯及准备

[0124] 将恙虫病东方体保宁血清型 (*Orientia tsutsugamushi* Boryoung serotype, 疾病管理本部资源管理本部NCCP NO.14794) 及川崎血清型 (*Orientia tsutsugamushi* Kawasaki serotype, Genbank accession number: M63383) 接种于ECV-304细胞 (血管内皮细胞, Cell Line Service, 德国), 然后, 在37℃下培养7天, 以诱导菌株的增殖。受恙虫病东方体感染的ECV-304细胞则利用包括10% (v/v) 胎牛血清 (fetal bovine serum, 美国corning cellgro公司产品) 的M199 (韩国welgene公司产品) 培养基 (culture medium) 进行了培养。

[0125] 所述受感染的ECV-34细胞的培养程度利用间接免疫荧光检查方法 (indirect immunofluorescence assay; IFA) 进行了检测, 当确认到90%以上的感染率时, 再次感染到

5个150mm组织培养盘的ECV304细胞上,通过上述方法确认到的受感染的细胞,则为了大量生产恙虫病东方体外膜囊泡,再次感染到30个150mm组织培养基盘(tissue culture dish,韩国SPL公司产品)上。

[0126] 然后,将所培养出的感染细胞悬浮于培养基中,并且在4℃下,以13000rpm,进行30分钟的离心分离,以分离为没有受到感染细胞培养上清液和受恙虫病东方体感染的细胞小球。

[0127] 被恙虫病东方体感染的EVC-304细胞再次悬浮于包括由33mM的三盐酸(tri-hydrochloride)和250mM TS-缓冲标识的蔗糖(sucrose) pH7.4溶液,利用直径1mm的玻璃球碾碎细胞1分钟,以诱导细胞内的恙虫病东方体向外显出来。将所取得的恙虫病东方体在4℃下,以1200rpm,进行3分钟的离心分离,以去除细胞残渣,而取得恙虫病东方体悬浊液。所取得的恙虫病东方体悬浊液添加到90%分层液(percoll;美国GE life science公司产品),使得90%分层液编程40%分层液密度的浓度,然后,以14,000rpm,进行60分钟的离心分离,分离为来自细胞的残渣层和仅由菌株构成的层。收集所取得的恙虫病东方体层,并利用磷酸缓冲盐水(Phosphate buffered saline;PBS)清洗2次,再次悬浮于灭菌磷酸缓冲盐水中,然后利用液态氮进行冻结,最终取得提纯的恙虫病东方体。

[0128] 将提纯的恙虫病东方体于PBS重新混悬之后,利用30% power (Sonic Dismembrator Model 300, Fisher),在冰块上反复进行20次的驱动10秒/停止30秒动作,以进行声波降解法处理(sonication),然后,以13000rpm,进行5分钟离心分离,而回收上清液,利用BCA检测法(PIERCE,美国)来检测包含于上清液上的蛋白质的浓度。为了将所取得的所述上清液用于抗原刺激,而保管于-70℃。

[0129] 实施例4

[0130] PBMC分离及恙虫病东方体抗原刺激

[0131] 4-1: PBMC分离

[0132] 外周血单核核细胞(Peripheral blood mononuclear cells; PBMC)为,通过在从恙虫病患者(13名)群集非感染者(10名)群(Normal group)中分离出来的全血中处理EDTA之后,使用Ficoll-Hypaque (Histopaque; Sigma Chemical Co., 美国),并借助密度梯度离心分离法所分离得出的。

[0133] 然后,利用RPMI1640 (Wellgene, 韩国)将所分离的PBMC清洗2次,然后,为了进行抗原刺激(antigen stimulation),利用含有10% FBS (Hyclon, Thermo Scientific, USA)的RPMI1640培养基重新进行混悬。

[0134] 4-2: 恙虫病东方体抗原的刺激

[0135] 为了恙虫病东方体特异性INF- γ 反应,将 6×10^5 个PBMC混悬于包含有10% FBS及100U/ml青霉素(Gibco, 美国)的RPMI1640培养基200 μ l中,然后,在96孔(BD Biosciences, 美国)上分株PBMC细胞,以使每孔具有 1×10^5 个PBMC细胞,并分别处理于实施例3中所准备的具有保宁血清型及川崎血清型的恙虫病东方体提取物,以进行抗原刺激。通过恙虫病东方体提取物的INF- γ 与抗-CD3及抗-CD28抗体刺激进行了比较。

[0136] 为了确认不引发细胞凋亡的抗原适当量,将保宁血清型菌株提取物的浓度分别以2 μ g/ml及10 μ g/ml进行处理,并在37℃下,加湿5% CO₂条件下,培养了12小时及24小时,川崎血清型的浓度则以0.5 μ g/ml、2.5 μ g/ml、5 μ g/ml及10 μ g/ml进行处理,并在37℃下,加湿5%

CO₂条件下,培养了12小时。

[0137] 培养之后,取得培养上清液之后,在实施ELISA assay之前,在20℃下进行保管。

[0138] 4-3:利用ELISA方法的INF- γ 浓度检测

[0139] 在实施酵素免疫检测法(enzyme-linked immunosorbent assay;ELISA)之前,首先,在聚苯乙烯材质的96孔板(NUNC,Thermo Scientific,美国)上,以3 μ g/ml浓度,处理溶于0.1M磷酸盐缓冲液(sodium phosphate buffer(pH=9.0)的抗-INF- γ (mouse anti-INF- γ ;BD Bioscience)抗体,并进行涂层。

[0140] 然后,在4℃下,反应一个晚上,然后清除残留于孔板上的溶液。在各个孔板上填满溶有1%BSA(GA biochem,Georgia,USA)的PBS溶液200 μ l,然后,在常温下静置2个小时之后,利用含有0.05%的吐温20(tween 20;USB,ohio,USA)的PBS缓冲液清洗3次。在各孔中加入上述经过菌刺激的单细胞的细胞上清液100 μ l,在常温下反应2小时后,利用与上述相同的方法清洗3次,并处理标识有生物素的抗-INF- γ (biotin labeled anti-INF- γ (BD Bioscience,USA)抗体,反应时间为1个小时。

[0141] 然后,再利用含有0.05%吐温20的PBS缓冲液清洗3次之后,在各个孔内处理抗生物素蛋白荧光共轭的辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase;BD Biosciences,USA),反应一个小时,然后,利用含有0.05%吐温20的PBS缓冲液清洗3次,处理100 μ l基质(TMB,KPL,MD,USA),进行反应。出现充分发色之后,利用停止液(stop solution)添加1M磺酸(H₂SO₄) 100 μ l,停止反应。

[0142] 然后,利用ELISA比迪克仪器(BioTek Instruments,USA),在450nm下,检测了光学密度(optical densities;OD)。

[0143] 其结果,如图1所示,添加恙虫病东方体提取物之后的反应时间被检测为是12-24小时,如图1及图2所示,来自恙虫病患者的PBMC,因保宁血清型及川崎血清型恙虫病东方体提取物的刺激,而生成高浓度的INF- γ 。对于保宁抗原的峰值响应(peak response)为2~10 μ g/ml,相反,对于川崎抗原的峰值则为0.5~2.5 μ g/ml。

[0144] 以上述结果为基础,之后的实验利用保宁血清型提取物5 μ g/ml、川崎血清型提取物2.5 μ g/ml,培养了16个小时。

[0145] 实施例5

[0146] 通过INF- γ 生成确认,确认是否被恙虫病东方体感染

[0147] 为了确认是否能够利用本发明的恙虫病诊断方法,是否能够实际诊断被恙虫病东方体感染与否,而从实施例4-1分离出的PBMC上,以实施例4-3条件,处理恙虫病东方体提取物之后,利用ELISA方法检测了INF- γ 的生成程度。下述表4作为对照群(control group),表示从非感染者群10名分离的PBMC,利用保宁菌株进行处理之后,所检测的 γ -干扰素的浓度结果。

[0148] 表4

[0149]

正常组	
NO.	IFN- γ (pg/ml)
N 1	448
N 2	370
N 3	47
N 4	283
N 5	123
N 6	701
N 7	384
N 8	632
N 9	459
N 10	324

[0150] 其结果,如上述表3及图3所示,当处理了保宁抗原提取物时,恙虫病患者的INF- γ 相比于非感染者群(表4)明显增加。将受保宁血清型恙虫病东方体(*O. tsutsugamushi*)感染的患者的PBMC利用保宁血清型菌株提取物刺激的情况比起利用川崎血清型菌株提取物刺激的情况,生成了相对而言更高的INF- γ 。

[0151] 另外,确认到,确认被保宁血清型恙虫病东方体(*O. tsutsugamushi*)感染的患者群(G1),即便是处理了川崎血清型提取物,其INF- γ 生成也明显增加,这是指,保宁血清型和川崎血清型之间存在较强的交叉反应。

[0152] IFA检查中呈现阴性的情况下,在PBMC中的INF- γ 的生成明显增加,从而可知,菌株感染之后,在并未充分形成抗体成分之前的时间段,也能够PBMC检测INF- γ 的生成,从而能够尽早地诊断恙虫病(表3)。

[0153] 在nPCR为阴性的群(G2)也确认到INF- γ 的浓度明显增加,其可判断为,受恙虫病东方体的数量较少,或者血液内存在的菌株数较少,或者之前曾被恙虫病感染过。这时,nPCR即便是阴性,INF- γ 的浓度检测也有利于诊断恙虫病(表3)。

[0154] 实施例6

[0155] PBMC中诱导INF- γ 生成的抗原的确认

[0156] 为了了解用于生成INF- γ 的主要抗原都有哪些,而确认了一般被认为是作为恙虫病东方体的高度免疫原性的56kDa型特异性抗原(56kDa type specific antigen;TSA)是否与INF- γ 有关。

[0157] 利用于实施例5同样的方法实施了实验,在处理保宁血清型恙虫病东方体提取物1小时之前,处理了作为对于56kDa型特异性抗原具有特异性的FS15抗体(仁荷医科大学微生物教师Kang jae seung教授研究室)。

[0158] 其结果,如图4所示,得知,相比于利用恙虫病东方体提取物进行抗原刺激的群,预处理FS15的群的INF- γ 生成约减少50%,呈现明显的减少。即,确认到,56kDa型特异性抗原,在从恙虫病患者分离的PBMC中,是为了INF- γ 分泌的优质蛋白质。但是,通过FS15并不能阻断大部分的INF- γ 的分泌,因此,可视为,还存在有干涉INF- γ 分泌的其他因素。

[0159] 实施例7

[0160] 利用流式细胞分析的PBMC细胞内的INF- γ 的浓度确认

[0161] 本发明中,为了确认PBMC中干涉INF- γ 生成的细胞,而利用流式细胞分析(flow cytometry),确认了通过恙虫病东方体提取物抗原刺激的细胞内的INF- γ 浓度。

[0162] 首先,利用保宁血清型恙虫病东方体提取物,以实施例5同样的方法,刺激PBMC之后,添加了5 μ g/ml浓度的蛋白转运抑制剂(Brefeldin A;BFA,eBioscience,USA)。阳性对照群处理了抗CD3/CD28(anti-CD3/CD28;BD Biosciences,USA),并在37℃下,活性6小时。PBMC以1200rpm,进行了5分钟的离心分离,然后,为了固定并渗透性(permeabilization),处理了0.4ml的Cytotfix/cytoperm缓冲液(BD Biosciences,USA),从而进行再次混悬。

[0163] 具备渗透性的细胞(permeabilized cell)染色表面标识的CD3FITC(Biolegend)及CD56Percep(Biolegend),然后利用INF- γ (eBioscience)染色,并在冰块状态下反应30分钟。

[0164] 反应结束之后,进行清洗,然后,将细胞处理于含有0.4多聚甲醛(paraformaldehyde;PFA)的PBS 350 μ l中进行重新混悬之后,利用FACS caliber(Becton Dickinson,USA)实施流式细胞分析。数据则利用Flowjo软件(Flowjo)进行分离。

[0165] 其结果,如图5a及5b所示,得知,从非感染者分离出的PBMC上的CD3+细胞及CD56+细胞中并未生成INF- γ ,而相反,通过添加保宁血清型提取物而抗原刺激的来自恙虫病感染患者的PBMC的CD3+细胞及CD56+细胞中则生成了INF- γ 。

[0166] 即,通过恙虫病东方体提取物处理而引起的抗原刺激,确认到,外周血单个核细胞中含有的CD3+细胞及CD56+细胞(natural killer cell)中生成了INF- γ 。

[0167] 以上,详细记述了本发明内容的特定部分,就本领域技术人员而言,显而易见地,这些具体记述仅为优选实施形态,而本发明范围并不受限于此。因此,本发明实质范围由所附权利要求范围及其等价物所定义。

[0168] 工业可利用性

[0169] 本发明的通过检测外周血单个核细胞(Peripheral blood mononuclear cell; PBMC)的 γ 干扰素(interferon- γ ; INF- γ)分泌来诊断恙虫病(scrub typhus)的诊断方法,确认了从恙虫病东方体感染患者分离的血液或者外周血单个核细胞中,处理恙虫病东方体提取物或者来自恙虫病东方体的抗原,进行抗原刺激时,其INF- γ 生成增加,而相反地,来自非感染者的外周血单个核细胞的INF- γ 生成则并无变化,因此,仅通过检测所述INF- γ 的生成浓度,就能够简单诊断恙虫病。

[0170] 进而,本发明的恙虫病诊断方法相比于以往的用于诊断恙虫病的间接免疫荧光法(IFA)及用于基因型分析的PCR分析,明显提高诊断正确度,不仅能够完全地替代以往的诊

断方法,而且还能够明显提高对于诊断结果的可信度。

<110>	仁荷大学校产学协力团	
<120>	通过检测外周血单个核细胞的 γ 干扰素分泌来诊断恙虫病的诊断方法	
<130>	PCT5036768	
<150>	KR 10-2015-0189371	
<151>	2015-12-30	
<160>	4	
<170>	KoPatentIn 3.0	
<210>	1	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	正向引物	
<400>	1	
	ataattaatg tattttcgaa cg	22
<210>	2	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	反向引物	
<400>	2	
	cctkcaaagg acttttagct	20
<210>	3	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	正向引物	
<400>	3	
	aacacagtgt tttatagatt gttta	25
<210>	4	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	反向引物	
<400>	4	

rcattaattg ctacaccaag t

21

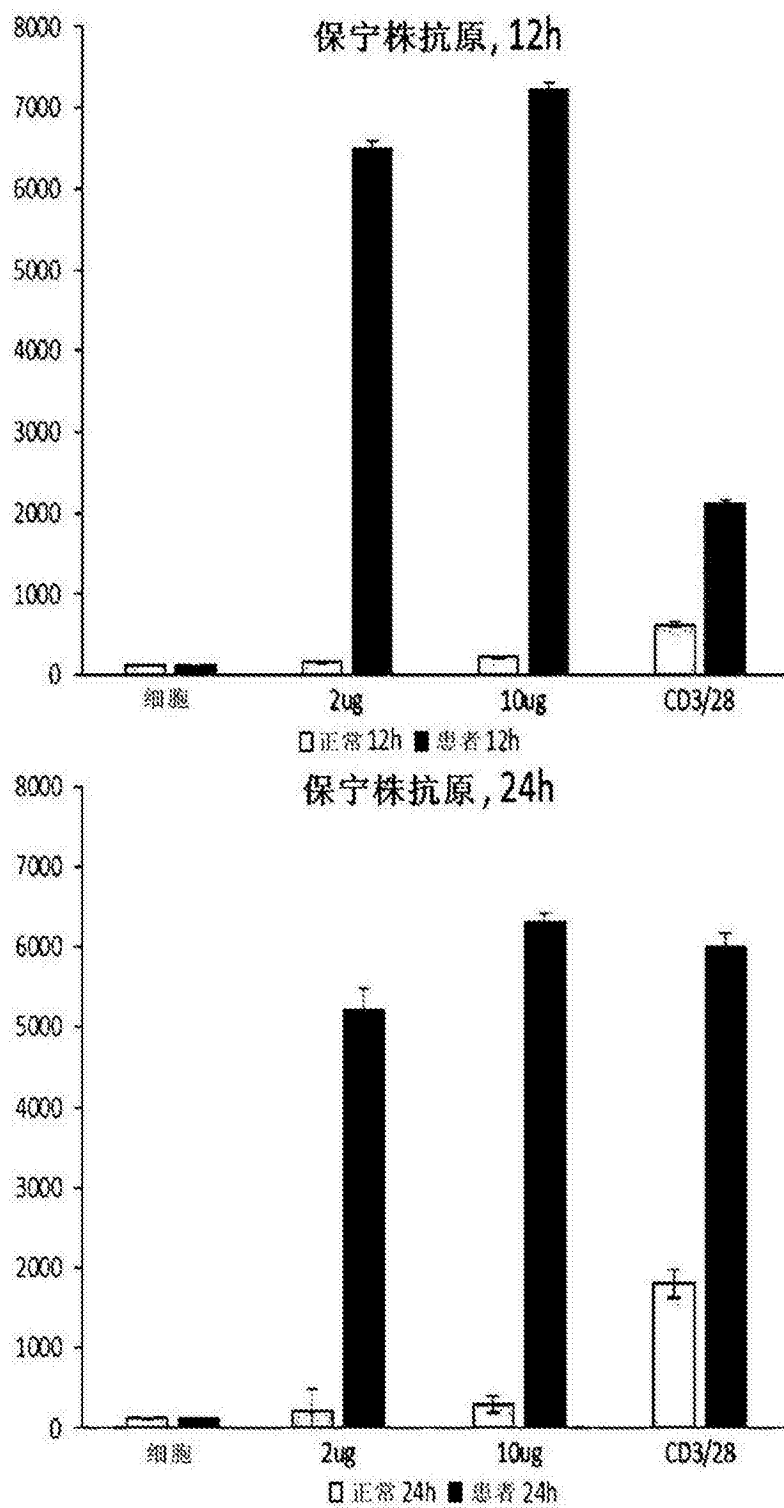


图1

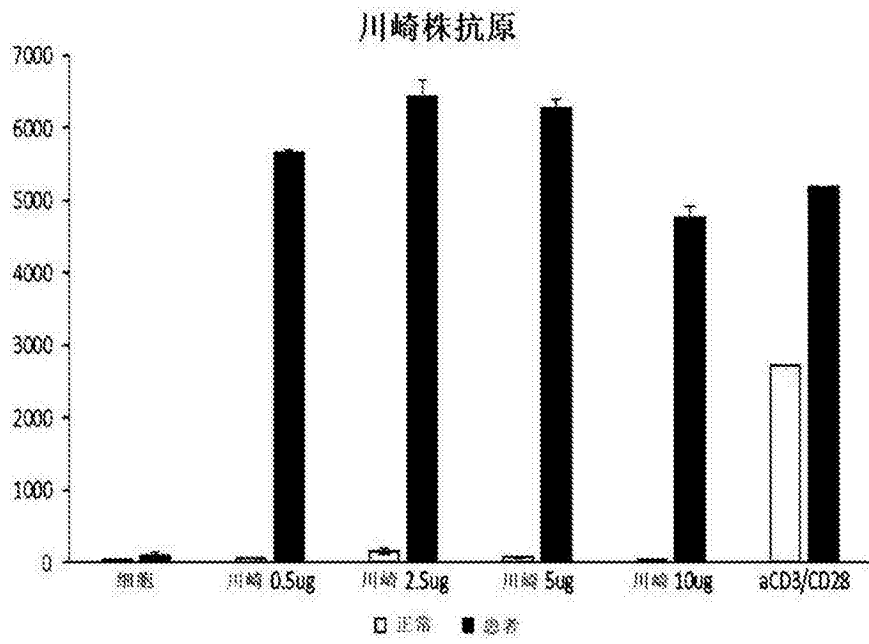


图2

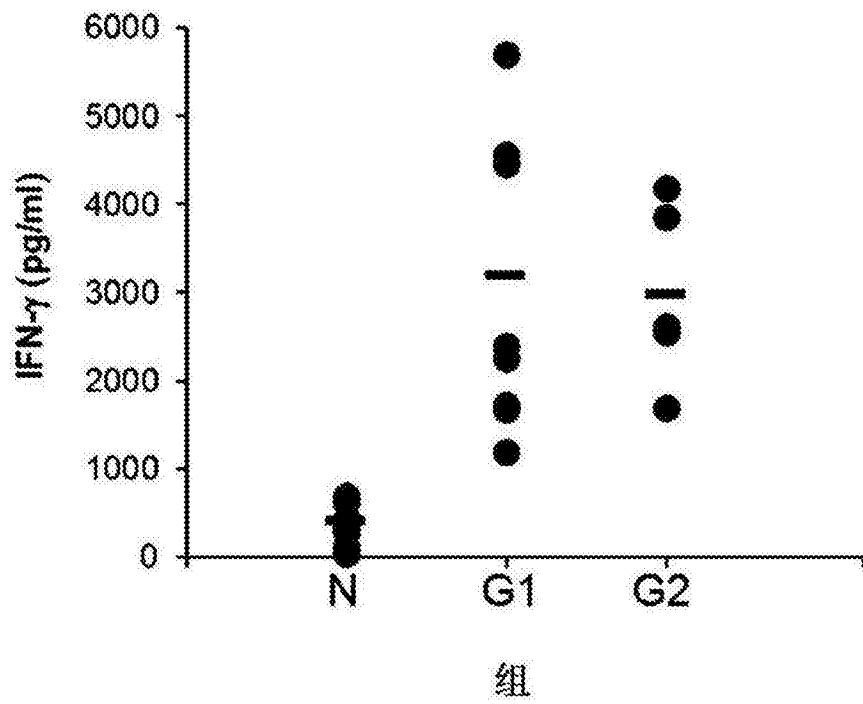


图3

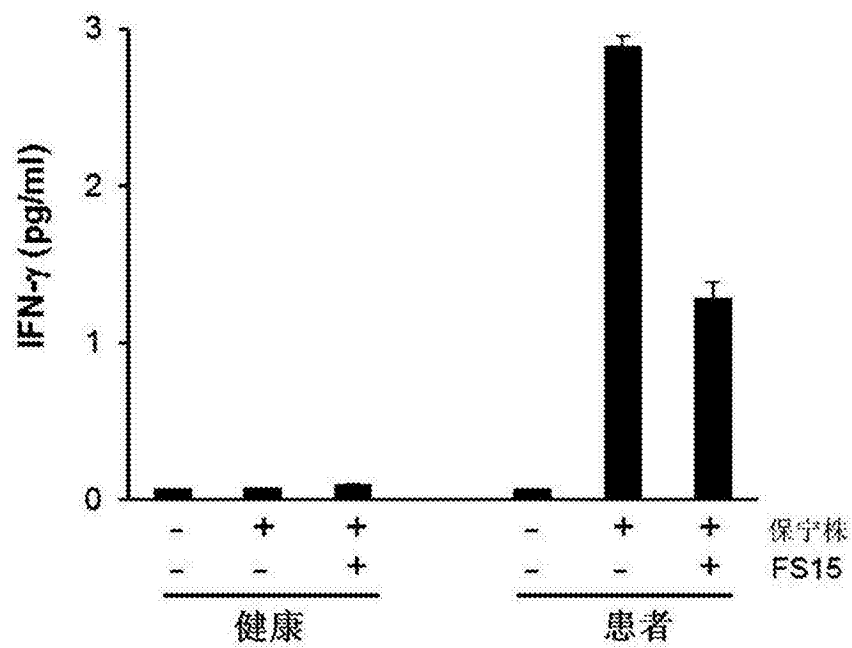


图4

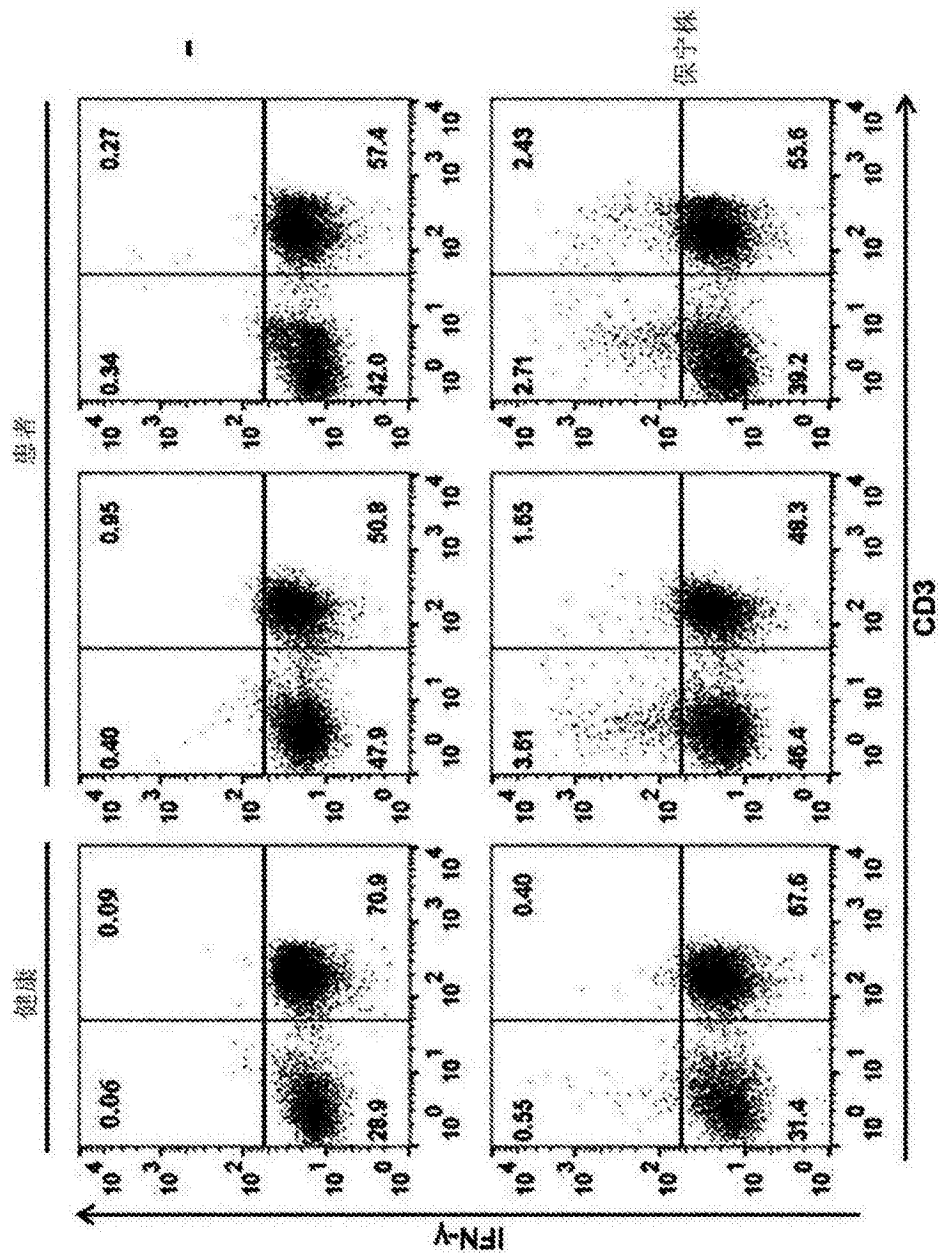


图5a

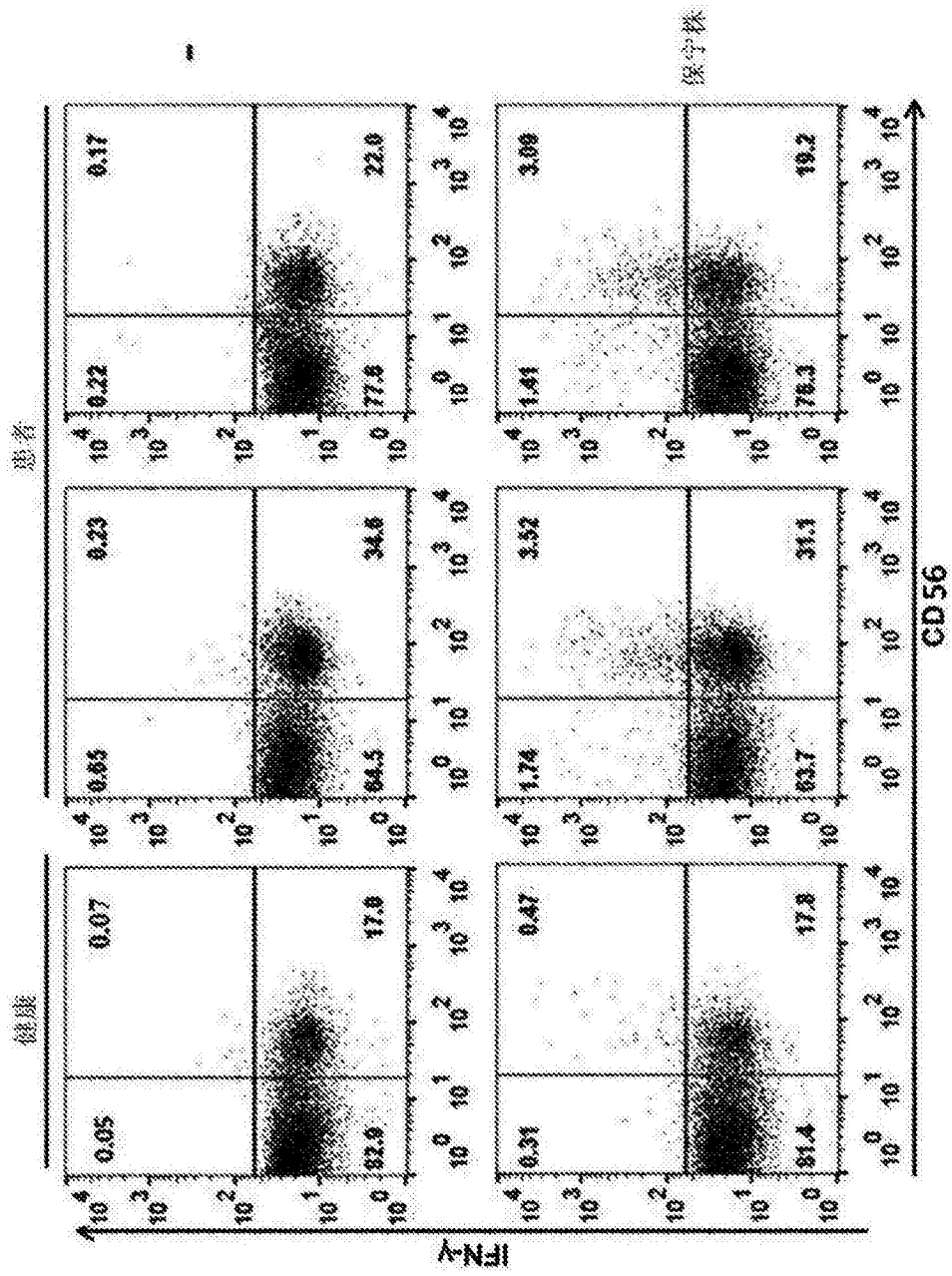


图5b