



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101523217 B

(45) 授权公告日 2014. 03. 19

(21) 申请号 200780032976. 5

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2007. 09. 05

G01N 33/68 (2006. 01)

C12Q 1/68 (2006. 01)

(30) 优先权数据

PA200601145 2006. 09. 05 DK

PA200700262 2007. 02. 20 DK

(56) 对比文件

WO 2005012907 A1, 2005. 02. 10, 全文 .

CN 1854287 A, 2006. 11. 01, 全文 .

CN 1866023 A, 2006. 11. 22, 全文 .

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2009. 03. 05

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/DK2007/000399 2007. 09. 05

审查员 黄丽君

(87) PCT国际申请的公布数据

W02008/028489 EN 2008. 03. 13

(73) 专利权人 哈维德夫医院

地址 丹麦哈维德夫

(72) 发明人 莫滕·鲁瓦尔德 佩妮莱·拉文

耶斯珀·欧金-奥尔森

(74) 专利代理机构 北京银龙知识产权代理有限公司

公司 11243

代理人 钟晶

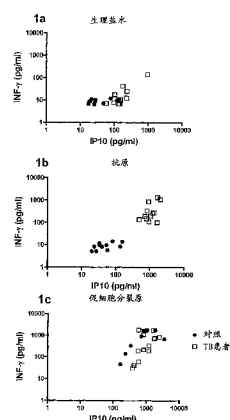
权利要求书2页 说明书48页 附图5页

(54) 发明名称

基于 IP-10 的免疫学监测

(57) 摘要

本发明的方法涉及一种免疫学方法,更具体地说,涉及一种基于 IP-10 的产生的用来测量哺乳动物内的细胞介导免疫反应性 (CMI) 的方法。本发明进一步公开了测量对使用全血或其它合适的生物样品的抗原的 CMI 的测定法和试剂盒。本发明的方法在是对人类、牲畜以及兽医学和野生动物应用有用的治疗和诊断方案,因此本发明还涉及用来诊断哺乳动物内的感染的方法。



1. IP-10 在制备用于诊断由分枝杆菌引起的感染的药物中的应用,该应用包括以下步骤:

- a) 用至少一种分枝杆菌特异性肽或蛋白受试抗原孵育从人获得的含有 T 细胞的样品,
- b) 通过测量所述样品中的 IP-10 的水平来测定所述受试抗原特异性细胞介导免疫应答,
- c) 将所测定的 IP-10 的水平与参考水平进行比较,以及
- d) 如果所述测定的 IP-10 的水平等于或大于参考水平,则确定所述人是否可能被至少一种分枝杆菌感染;和/或如果所述测定的 IP-10 的水平低于参考水平,则确定所述人是否不可能被至少一种分枝杆菌感染。

2. 根据权利要求 1 所述的应用,其中,所述样品被分为至少两部分,并且

- a) 用至少一种分枝杆菌特异性肽或蛋白受试抗原孵育所述样品的第一部分以产生应答样品,
- b) 用无活性溶液孵育所述样品的第二部分以产生空白样品,
- c) 测定在所述两部分中 IP-10 的水平,
- d) 通过将所述应答样品中测定的 IP-10 中减去从所述空白样品中测定的 IP-10 水平来确定样品的受试抗原依赖细胞介导免疫应答,
- e) 将所述受试抗原依赖细胞介导免疫应答或由该应答得到的数值与所述参考水平或由该参考水平得到的数值进行比较,
- f) 如果所述测定的受试抗原依赖细胞介导免疫的水平等于或大于参考水平,则确定出所述人是否可能有感染;和/或如果所述测定的受试抗原依赖细胞介导免疫的水平低于参考水平,则确定所述人是否不可能有感染。

3. 根据权利要求 2 所述的应用,该应用还包括将所述样品分为 3 部分,并且将所述样品的第三部分用 T 细胞活化剂进行孵育以产生阳性对照。

4. 根据权利要求 1~3 中任意一项所述的应用,其中,所述分枝杆菌选自自由结核分枝杆菌复合有机体、其中差别区域(RD1)没有被去除的分枝杆菌、以及人致病性分枝杆菌所组成的组中。

5. 根据权利要求 1~3 中任意一项所述的应用,其中,所述分枝杆菌特异性肽或蛋白受试抗原选自自由 RD-1 抗原、ESAT-6、CFP-10、TB7. 7、Ag85 和 HSP-65 所组成的组中。

6. 根据权利要求 1~3 中任意一项所述的应用,其中,所述样品得自血。

7. 根据权利要求 1~3 中任意一项所述的应用,其中,所述样品得自全血。

8. 根据权利要求 1~3 中任意一项所述的应用,该应用还包括:

- a) 测定对所述受试抗原刺激应答的 MCP-1 的水平,
- b) 将所测定的 IP-10 水平和 MCP-1 水平进行结合,以及
- c) 将所述结合的水平与结合的参考水平进行比较。

9. 根据权利要求 1~3 中任意一项所述的应用,该应用还包括:

- a) 测定对所述受试抗原刺激应答的 INF- γ 以及任选的 MCP-1 和/或 IL-2 的水平,
- b) 将所测定的 IP-10 水平和 INF- γ 以及任选的 MCP-1 和/或 IL-2 水平进行结合,以

及

- c) 将所述结合的水平与结合的参考水平进行比较。

10. 根据权利要求 1 ~ 3 中任意一项所述的应用, 其中, 所述的 IP-10 水平的测量由选自以下所组成的组中的免疫学方法确定: 基于 mRNA 的技术、酶联免疫吸附测定、流式荧光技术、转铁蛋白分析、免疫色谱侧流分析、放射性过敏原吸附试验、放射性免疫检定、免疫学干燥棒和免疫色谱试验。

11. 根据权利要求 1 ~ 3 中任意一项所述的应用, 其中, 所述的 IP-10 水平的测量由选自以下所组成的组中的免疫学方法确定: 免疫印记、酶扩增免疫测定技术和免疫荧光。

基于 IP-10 的免疫学监测

技术领域

[0001] 本发明主要涉及一种免疫学分析,并且特别涉及一种用于测量细胞介导免疫(cell-mediated immune,CMI)反应性的分析。更具体地说,本发明提供了一种使用全血或其它合适的生物样品来测量细胞介导对抗原的应答的分析和试剂盒。这种分析在对人类、牲畜的治疗和诊断方案以及兽医学和野生动物应用上是有利的。

[0002] 对细胞介导免疫应答的测量对多种传染性疾病和自身免疫疾病的免疫诊断是很重要的,这种对细胞介导免疫应答的测量作为对免疫活性的标记,并用作对 T 细胞对内源抗原和外源抗原(即,感染和疫苗)的应答进行的检测。

[0003] 本发明提供了一种通过孵育来自哺乳动物的样品来测量哺乳动物内的 CMI 的方法,所述哺乳动物的样品含有具有抗原的 T 细胞或者其它免疫系统细胞。随后检测到干扰素诱导蛋白 10(IP-10)的产生。这种免疫效应物的存在或水平进而表示了细胞介导对物体的应答度水平。

背景技术

[0004] 肺结核

[0005] 结核分枝杆菌(MTB)特异性免疫显性抗原的发现引领了用于肺结核(TB)诊断的新途径。早期的工作已显示出通过对测定的 MTB 抗原做出应答的 T-细胞来测定体外干扰素 γ (IFN- γ) 的产生的试验来代替结核菌素皮肤试验的潜能。与此同时,一个重大的进步就是发现了显著地提高了特异性的高度免疫原性抗原、早期分泌性抗原靶 6(ESAT-6)以及培养滤液蛋白 10(CFP-10)和的发现结核菌 7.7(TB7.7)。这些抗原在病原体的差异区 1(RD1)内进行编码,因此不存在在卡介苗(BCG)疫苗株和大部分的非结核分枝杆菌中(例外的情况包括堪萨斯分枝杆菌(*Mycobacterium kansasii*)、海分枝杆菌(*Mycobacterium marinum*)、苏加分枝杆菌(*Mycobacterium szulgai*))。对 RD1 编码的抗原 ESAT-6、CFP-10、TB7.7 的重叠的肽的 IFN- γ 应答形成了在两种获得许可并且商业可利用的试验中对 MTB 感染进行检测的基础。

[0006] 一种全血酶联免疫测定(ELISA)-康提伏朗-结核金(QuantiFERON-TBGold)(塞勒斯提有限公司,卡内基,维多利亚,澳大利亚(Cellestis Limited, Carnegie, Victoria, Australia))具有欧洲 CE 标志认证,并且最近得到了美国食品与药品管理局(FDA)的用于检测潜伏的 TB 感染和疾病的认证。

[0007] 一种使用外周血单个核细胞的酶联免疫斑点测定(ELISPOT)——结核感染 T 细胞斑点试验(T-SPOT.TB)(牛津免疫科技,牛津,英国(Oxford Immunotec, Oxford, UK)具有欧洲 CE 认证并且在 2005 年得到在加拿大使用的许可。T-SPOT.TB 仅使用 ESAT-6 和 CFP10。

[0008] 然而,目前可用的试验存在以下限制:

[0009] 1) 可能削弱在免疫抑制个体中的灵敏度(例如,人体免疫缺陷病毒(HIV)阳性或者接受免疫抑制药物治疗的患者),

[0010] 2) 在某些情况下需要相对大量的血液(3ml 每 QuantiFERON 试验以及 8ml 用于

T-SPOT. TB),这可能限制了其对婴儿和重病以及贫血儿童的使用,

[0011] 3) 这些试验没有区别对待活动性感染、潜伏性感染以及近期感染 (recentinfection)

[0012] 4) 没有证实这些试验能够预言谁将从新近 TB 或潜伏性 TB 发展为活动性 TB。

[0013] 大多的试验限制是由于测量非常低水平的效应参数 IFN- γ , 这种低水平甚至接近最敏感的方法的极限 (在 QuantiFERON 试验中低至 0.35IU/ml (17.5pg/ml) 并在 T-SPOT. TB 中为 5 点 / 单位面积 (spots/field))。为了增强灵敏度而减少截止点 (cut-off) 将最终导致损害试验的特异性。目前基于 QuantiFERON 测试的出版物表示了对人们进行的具有较低范围的 IFN- γ 的试验结果的重复试验在截止点水平附近有不同, 这强调了 QuantiFERON (QFT) 测试的假阳性和假阴性结果的潜在风险 (拜, M 等人 (Pai, M. et al))。

[0014] 为了克服这些测试的明显的弱点, 能够通过使用另外的结核分枝杆菌特异性抗原来提高灵敏度, 并且这已经在第三代 QuantiFERON (QFT) 试验中实现, QuantiFERON 管内试验 (QFT-IT) 目前含有被命名为 TB 7.7 (p4) 的增加的抗原, 并且能够提高灵敏度, 但是它仍然取决于在非常低的 IFN- γ 水平上的测量。

[0015] 其他人已经尝试了这种方法, 即, 最近所表示的是 IFN- γ 诱生单核因子 (MIG/CXCL9) 在用结核分枝杆菌特异性抗原 (ESAT-6/CFP10) 和纯蛋白衍生物 (PPD) 刺激后的体外被特异性地表达。然而 CXCL9 的灵敏度非常低, 而且比 IFN- γ 的还要低。另一个较小的研究是基于在 ESAT-6 刺激后的 CD4+T 细胞内的胞内细胞因子细胞计数, 如果 IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-10 或激活标记物 CD40L 能将 TB 与非 TB 疾病区别开来, 则对上述胞内细胞因子细胞计数进行试验。这些标记物中能没有发现能与 IFN- γ 相比或者优于 IFN- γ 的 (阿布拉莫 C 等人 (Abramo C, et al)) (休斯, A 等人 (Hughes, A. et al))。

[0016] 在目前出版的文献中仍然没有测定用来取代用于诊断 TB 感染的 IFN- γ 的敏感且特异的标记物。各种出版物公开了 IP-10 与感染相关, 但 IP-10 并不是作为在现有抗原刺激的感染诊断中的标记物而被公开。

[0017] 衣原体

[0018] 对生殖道衣原体感染的诊断从二十世纪 90 年代开始得到了迅速发展。例如聚合酶链反应 (PCR)、转录介导扩增 (TMA) 以及脱氧核糖核酸链置换分析法 (DNA strand displacement assay (SDA)) 的核酸扩增试验 (NAAT) 目前是主流。在美国和其它工业国家中使用最普遍并且研究最广泛的衣原体 NAAT 是阿普提玛 (Aptima) (基因探针 (Gen-Probe))、保力科技 (Probe-Tec) (贝迪医疗 (Becton-Dickinson)) 以及爱普力克 (Amplacor) (罗氏 (Roche))。Aptima 组合 II 测定试验同时用于沙眼衣原体以及引发淋病的淋病奈氏菌 (*Neisseria gonorrhoeae*)。用于衣原体的 NAAT 可以在从子宫颈 (女性) 或尿道 (男性) 中采集的分泌物样本上进行。

[0019] 目前, NAAT 仅在对泌尿生殖器样本的试验具有限制性的认证。所述 NAAT 具有大量代替培养、用于衣原体诊断的历史性的黄金标准, 以及诸如化学荧光增强探针检测法 2 型 II (PACE II) (基因探针 (Gen-Probe)) 的非扩增的探针试验。后一试验相对地不敏感, 仅能在无临床症状的妇女中成功检测到 60-80% 的感染, 并且通常给出假阳性的结果。培养在选择的环境下保持了有效, 并且它是目前唯一认证的对非生殖器样本进行试验的测定。

[0020] 因此, 对衣原体的诊断是建立在复杂的且资源需求的技术上, 例如 PCR, 而难以在

发展中国家得到利用。一种快速而简单的技术将提高对这种重要疾病的诊断测量。

[0021] CA 2,478,138 公开了趋化因子 CXCL10 多肽的血浓度的提高与呼吸道疾病(例如,非典型性肺炎(SARS)、流行性感冒和社区获得性肺炎(community-acquired pneumonia))有关,并有助于患者的诊断中。对忍受呼吸道疾病的患者提供了诊断和治疗的方法。

[0022] WO 05/091969 公开了用于传播性海绵状脑病(Transmissible Spongiform Encephalopathies, TSE)的标记物能在表现出临床体征之前检测到这种感染,该标记物在形成可检测的病理朊病毒细胞之前存在。IP-10 就是所公开的多种标记物中的一种,并且该申请没有公开任何抗原刺激。

[0023] US2004-038201 公开了在巨噬细胞内对不同的病原体应答而激活的不同的基因表达程序。IP-10 还是其中所提及的许多标记物中的一种,并且该申请没有公开任何抗原刺激。

[0024] 安娜丽莎·安茱莉等人(Annalisa Azzurri et al.)公开了 IFN- γ 诱导蛋白 10 以及正五聚蛋白 3 血浆浓度是用来监测结核分枝杆菌感染中的炎症和疾病活性的工具。该文章表示了 IP-10 血浆浓度在患有 TB 的患者中自发地增加,同样地,该对比文件没有公开任何抗原刺激。

[0025] WO 03/063759 公开了从对诊断或治疗有效的肽所获得的热休克蛋白(Hsp)的确认。该发明的化合物的效果是在外周血单核细胞上通过测量应答于随后的脂多糖(LPS)刺激的 IP-10 水平而进行试验的。不进行随后的 LPS 刺激而用试验化合物进行的直接刺激不能使 IP-10 水平增加。

[0026] WO 07/039400 公开了用于免疫重建综合症(Immune Restoration Syndrome)的诊断的方法和试剂盒,所述免疫重建综合症与感染了肺结核的患者和 HIV/TB 共同感染患者中的肺结核(TB-IRS)相关。为了诊断 TB-IRS,发明人检测了辅助 1 型 T 淋巴细胞(Th1)对 PPD 和 / 或 16 千道尔顿(KDA)的蛋白质的应答水平与该 Th1 对 ESAT-6、CFP-10、85B(阴性对照)的相应进行比较,并将 Th1 应答的上升用作 TB-IRS 的指示。

[0027] 为了克服目前使用抗原刺激的可利用的试验中削弱的灵敏度和可检测的 IFN- γ 的低水平的问题,本发明的发明人提出了使用不同于 IFN- γ 的生物标记物。

发明内容

[0028] 本发明提出了一种新颖的诊断原则。一种能检测例如肺结核利什曼原虫(tuberculosis leishmania)或衣原体的感染的试验系统,该试验系统建立在用抗原蛋白或抗原肽刺激免疫细胞后对趋化因子 IP-10 进行测量的基础上。

[0029] 所描述的试验系统 IP-10 比基于以 IFN- γ 作为特效参数的试验更灵敏,它改进了试验和诊断。由于在孵育时或在进行分析之前能稀释样品,因此能使用少量的血液进行该试验。该试验能在更短的孵育时间内进行。此外,所述试验系统可以允许在不同的感染阶段(例如活动性 TB 感染、新近 TB 感染以及潜伏性 TB 感染)之间进行区别对待。

[0030] 简而言之,能将本发明描述为一种免疫学方法,该方法包括孵育从具有至少一种抗原的哺乳动物获得的样品的步骤,测定在所述样品中的 IP-10 的水平以及将所述测定的 IP-10 的水平与参考水平进行比较,从而确定所述哺乳动物先前是否遇到过产生对该抗原的免疫学反应性的所述抗原,或先前是否遇到过产生对该抗原的免疫学交叉反应性的其它

抗原。

具体实施方式

[0031] 本发明提供了一种对受试者进行 CMI 应答的潜能和能力的分析。该分析是建立在测量由对抗原刺激做出应答的免疫系统的细胞产生的免疫效应物分子的基础上的。可以使用配体,例如对效应物有特异性的抗体而检测到所述免疫效应物,或者通过测量由基因编码的该效应物的表达水平来检测到所述免疫效应物。

[0032] 因此,本发明提供了用来测定受试者中 CMI 的应答度的装置,并且反过来,本发明提供一种用于诊断传染性疾病、病理状态、免疫活性水平以及 T 细胞对内源抗原或外源抗原的应答度的标记物的装置。

[0033] 本发明的一个方面涉及一种对受试者进行 IP-10 应答的潜能和能力的分析。该分析是建立在测量由对抗原刺激做出应答的免疫系统的细胞产生的 IP-10 的基础上的。可以使用配体,例如对 IP-10 有特异性的抗体检测到所述 IP-10 的产生,或者通过测量由基因编码的 IP-10 的表达水平来检测该 IP-10 的产生。本发明的发明人已经证实了这种使用两种不同类型的感染:肺结核和衣原体的试验原则。在肺结核的病例中,基于结核分枝杆菌特异性刺激并且随后进行 IP-10 测定的试验能确认感染有结核分枝杆菌的人。在衣原体的病例中,基于沙眼衣原体提取物刺激的试验能确认感染有衣原体的人。

[0034] 所描述的试验系统对生物标记物 IP-10 进行了测量,所述 IP-10 的水平高于目前可用的分析所基于的标记物——IFN- γ 的水平。这种基于 IP-10 的试验系统与基于例如 IFN- γ 作为效应参数的试验具有相同的特异性并更灵敏,它改善了对无免疫应答个体(实施例 10)的试验和诊断,由于样品能够在孵育期间或者在分析之前进行稀释(实施例 9 和 13),该试验能使用较少量的血液。如实施例 11 所示地,在数小时的孵育后能产生大量的 IP-10,因此它还提高了诊断的速度。在肺结核的病例中,试验系统可以允许在活动性 TB 感染、新近 TB 感染以及潜伏性 TB 感染之间进行区别对待,此外,该试验系统潜在地能确认人们发展为活动性 TB 的风险。所述试验系统基于使用免疫测定(即,ELISA 或流式荧光技术(Luminex))对 IP-10 的测定,并且该试验系统能潜在地开发为可用于低资源配制的场地友好的免疫色谱法(immunochromatographic)试验,其中,以肉眼可观察到的颜色反应来表示试验的结果。

[0035] 本发明所描述的分析解决了一系列的问题。

[0036] 目前可利用的分析对非常低水平的效应参数 IFN- γ 进行测量,该水平甚至接近最敏感的方法的极限(在肺结核病例的试验中,QuantiFERON 试验对正检验的截止点水平为 0.35 国际单位/ml (17.5pg/ml),并在 T-SPOT. TB 试验中为 5 点形成单位/场)。为了增强灵敏度而降低截止点(cut-off)将最终导致损害试验的特异性。基于 QuantiFERON 试验的出版物表示了对人们进行的具有较低范围的 IFN- γ 的试验结果的重复试验在截止点水平附近有不同,这强调了 QuantiFERON(QFT)测试的假阳性和假阴性结果的潜在风险。此外,目前的试验可能对不能在截止点水平之上对 IFN- γ 做出应答的免疫抑制个体给出假阴性的结果。由于进行抗原刺激后 IP-10 释放的量比 IFN- γ 要高得多,灵敏度更高了,更少的试验被认为是假阴性,试验的结果重复性更好并对免疫抑制个体的不确定的测试结果也更少了。

[0037] 此外,由于抗体诱导的 IP-10 分泌的浓度如此高,因此能够在孵育步骤之前或之后对样品进行稀释。这意味着,能够减少需要进行试验的样品材料(例如,全血)的量,例如说,在全血的例子中,低至或者甚至正好或低于 0.25ml,例如为 0.20ml,举例来说为 0.15ml,例如为 0.1ml,举例来说为 0.05ml。在优选实施方式中,能够在低至或者甚至低于 0.1ml 下进行试验。因此,能开发适于具有低血容量的患者(例如,儿童/婴儿或贫血者)的“迷你分析”。此外,通过使用例如来自例如针刺手指(finger-prick)的血液,所述迷你分析由于避免了血管穿刺而能变得更加使用者友好。

[0038] 进一步地说,在肺结核的病例中,目前可用的试验中没有能区别对待活动性感染和潜伏感染。本发明的发明人意外地发现在未刺激但孵育有样品的材料,即,空白样品(nil sample)(例如,全血)中 IP-10 的浓度在具有活动性疾病的患者中比具有潜伏性疾病的健康个体要高。本发明的发明人提出了能使用与抗原特异性试验结合的孵育含有无活性溶液(空白)样品材料中的 IP-10 的浓度来作为活动性感染(例如,肺结核)对潜伏性感染(例如,肺结核)的标记物。

[0039] 分析

[0040] 因此,本发明的一个方面涉及免疫学方法,该方法包括以下步骤:

[0041] a) 用至少一种受试抗原孵育从哺乳动物获得的样品

[0042] b) 测定所述样品中的 IP-10 的水平

[0043] c) 将所述测定的 IP-10 的水平与参考水平进行比较,从而确定所述哺乳动物先前是否遇到过产生对所述受试抗原的免疫学反应性的所述受试抗原,或者先前是否遇到过产生对所述受试抗原的免疫学交叉反应性的其它抗原。

[0044] 需要理解的是,本发明所描述的任意一种方法都是不依赖于平台的(platform independent)。因此,本发明可以使用任何一种免疫学方法,例如但不局限于此的 ELISA、Luminex、多元操作(Multiplex)、免疫印迹(Immunoblotting)、转铁蛋白分析(TRF-assays)、免疫色谱侧流分析(immunochromatographic lateral flow)、酶扩增免疫测定技术(EnzymeMultiplied Immunoassay Technique)、放射性过敏原吸附试验(RAST test)、放射性免疫检定、免疫荧光以及各种免疫学干燥棒检定(immunological dry stickassays)(例如,色谱棒试验(cromatographic stick test))。

[0045] 在第二个方面,本发明涉及一种用于诊断感染的方法,该方法包括以下步骤:

[0046] a) 用至少一种受试抗原孵育从哺乳动物获得的样品,在所述受试抗原不是 PPD 或 LPS 的条件下

[0047] b) 测定在所述样品中的 IP-10 的水平

[0048] c) 将所述测定的 IP-10 的水平与参考水平进行比较,如果所测定的 IP-10 水平在所述参考水平之上,从而确定哺乳动物是否感染了微生物

[0049] 本发明的发明人已证实的是,用所选择的受试抗原或用于评价的抗原进行的直接刺激足以获得能使经验丰富的人员推断出样品先前是否遇到过产生对所述受试抗原的免疫学反应性的所述受试抗原,或者先前是否遇到过产生的对所选择的受试抗原的免疫学交叉反应性其它受试抗原的数值(readout)。

[0050] 因此,在一种实施方式中,本发明还涉及一种如在此所描述的免疫学方法,其中,该方法排除了任何进一步的刺激或随后的刺激。

[0051] 随后的刺激或进一步的刺激可以覆盖任何类型的刺激,例如用生物学非活性物质或具有与炎症应答相关的生物学效应来启动或刺激样品,例如但不限于促细胞分裂原、细菌产物或生物活性蛋白。

[0052] 因此,在一种实施方式中,本发明涉及一种如在此所描述的免疫学方法,其中,该方法排除了任何用 LPS 进行的进一步的刺激或随后的刺激。

[0053] 因此,所述方法能用于对例如具有患传染病的高风险人群的感染的检测,所述传染病例如但不限于结核病、衣原体感染、利什曼虫病、锥虫病以及血吸虫病。

[0054] 本发明还涉及一种根据本发明的方法,其中,所述样品被分为至少两个部分,并且

[0055] a) 用受试抗原孵育所述样品的第一部分以产生应答样品

[0056] b) 用无活性溶液 (inactive solution) 孵育所述样品的第二部分以产生空白样品

[0057] c) 测定在所述两部分中 IP-10 的水平

[0058] d) 通过将所述从所述应答样品中测定的 IP-10 中减去从所述空白样品中测定的 IP-10 水平来确定样品的抗原依赖 IP-10 应答

[0059] e) 将所述受试抗原依赖 IP-10 应答或由该应答得到的数值与所述参考水平或由该参考水平得到的数值进行比较,

[0060] 从而确定所述哺乳动物先前是否遇到过该受试抗原并因而产生对该受试抗原的免疫学反应性,或者先前是否遇到过其它抗原产生对该受试抗原的免疫学交叉反应性和/或将发展为感染。

[0061] 在一种实施方式中,能够通过伴随用于评价的所选择的抗原一起加入的免疫刺激分子 (immunostimulatory molecule) 而增强分析性能,所述免疫刺激分子为选自白细胞介素 -2 (IL-2)、白细胞介素 -12 (IL-12)、肿瘤坏死因子 - α (TNF- α) 和免疫反应性纤维结合素 - γ (IFN- γ) 所组成的非限定性组的细胞因子。

[0062] 在另一种实施方式中,所述免疫刺激分子为可溶性受体 (例如, B7 分子的二聚体或多聚体 (CD80/CD86)) 或抗体 (例如,结合 CD28 的抗体)

[0063] 在另一种实施方式中,所述免疫刺激分子具有向 T 细胞提供协同刺激信号 (本领域技术人员已知为信号 2) 的性质,所述协同刺激信号不能单独诱导 IP-10 应答,但如果细胞对选择用于评价的抗原产生 CMI 应答,该协同刺激信号将增强 IP-10 应答。

[0064] 在另一种实施方式中,能够通过对在孵育步骤中发生的抗炎过程的抑制来实现对分析的增强。在一种实施方式中,能用抑制性抗体或可溶性受体来增强分析,所述抑制性抗体或可溶性受体连接有例如但不限于白细胞介素 4 (IL-4)、白细胞介素 -10 (IL-10) 和转化生长因子 - β (TGF- β) 的抗炎介导。

[0065] 在另一种实施方式中,可以由抗炎介导的抑制通过抑制或消除细胞群体用作为对 CMI 应答的抑制剂,例如调节性 T 细胞,来对分析进行增强。

[0066] 具体地,当术语纯蛋白衍生物 (Purified Protein Derivative) (PPD 或结核菌素) 使用于此时,它指非种特异性分子。通过对来自结核分枝杆菌或例如鸟分枝杆菌 (*M. avium*) 的其它分枝杆菌的混合物的蛋白质进行抽提而获得 PPD 或结核菌素。PPD 通常使用于对细胞免疫或对 BCG 或结核分枝杆菌所产生的 Th1 应答的存在所进行的试验。例如说,它可以从由康诺特公司 (Connaught Laboratories Limited) 从大母料 (large Master Batch),康

诺特结核菌素 (CT68) 中制备的结核菌素纯化蛋白衍生物 B (TubersolB) 得到, 或者以从国家血清研究中心 (Statens Serum Institute, SSI, 哥本哈根, 丹麦) 所得到的 RT23 的形式。

[0067] ESAT-6 蛋白 (早期分泌性抗原靶 6) 是从结核分枝杆菌短期培养滤液中提纯的主要的分泌抗原。当使用于此, ESAT-6、CFP-10 (培养滤液蛋白 10) 和 85B 可以从细胞裂解液和提纯通过重组技术或作为合成肽和生产而获得。例如说, ESAT 可以从国家血清研究中心作为重组蛋白而获得。

[0068] 结核菌素或 PPD (纯蛋白衍生物) 与 ESAT-6 (早期分泌性抗原靶 6)、CFP-10 (培养滤液蛋白 10) 和 TB7.7 不同, 所述 ESAT-6、CFP-10 和 TB7.7 仅由位于所述结核分枝杆菌基因组内的基因 (在 RD-1 区域) 进行编码, 并且它们不包含在卡介苗 (the Bacille of Calmette et Guérin, BCG)。结核菌素或 PPD (纯蛋白衍生物) 与 PPD 不同, 这是因为 PPD 也含有与例如卡介苗亚株以及多种具有低的致病性或者没有致病性的非结核分枝杆菌种共有的其它抗原。

[0069] 任选地, 该方法可以进一步包括将所述样品分成三部分, 并将该样品的第三部分用 T 细胞活化剂进行孵育以产生阳性对照。在此, 免疫细胞可以在例如三个分离的群: 空白对照 (例如, 生理盐水)、抗原刺激 (例如, 衣原体或肺结核特异性蛋白或其衍生物) 以及阳性对照 (例如, 植物凝集素) 中进行孵育。免疫细胞的形式可以为全血、稀释的全血或细胞群的各种提纯物, 例如外周血单个核细胞、单核细胞或 T 细胞。所述细胞可以从血液、尿液、胸液 (pleural fluid)、支气管液 (bronchial fluid)、漱口水 (oral washing)、组织活检 (tissue biopsy)、腹水 (ascites)、脓 (pus)、脑髓液 (cerebrospinal fluid)、抽吸物 (aspirate) 和 / 或滤泡液而获得。对免疫细胞进行孵育, 例如在 37°C 下孵育 4-24 小时。

[0070] 在一种实施方式中, 所述样品被分为至少两个部分, 并且

[0071] a) 用抗原孵育所述样品的第一部分以产生应答样品

[0072] b) 用无活性溶液孵育所述样品的第二部分以产生空白样品

[0073] c) 测定在所述两部分中 IP-10 的水平

[0074] d) 通过将所述应答样品中测定的 IP-10 中减去从所述空白样品中测定的 IP-10 水平来确定样品的抗原依赖 IP-10 应答

[0075] e) 将所述抗原依赖 IP-10 应答或由该应答得到的数值与所述参考水平或由该参考水平得到的数值进行比较,

[0076] f) 将所述抗原自发性 IP-10 应答或由该应答得到的数值与所述参考水平或由该参考水平得到的数值进行比较,

[0077] 从而确定所述哺乳动物先前是否遇到过该抗原并因而产生对该抗原的免疫学反应性, 或者先前是否遇到过产生对该抗原的免疫学交叉反应性的其它抗原, 并且如果哺乳动物对该治疗应答则由此确定是否该哺乳动物具有活动性感染、近期感染或潜伏性感染, 或者是否会发展为感染。

[0078] 更具体地说, 所述样品被分为至少 3 个部分, 并且

[0079] a) 用抗原孵育所述样品的第一部分以产生应答样品

[0080] b) 用无活性溶液孵育所述样品的第二部分以产生空白样品

[0081] c) 用刺激性溶液 (例如, 植物凝集素 (PHA)) 孵育所述样品的第三部分以产生促细胞分裂原样品

[0082] c) 测定在所述三部分中的 IP-10 的水平

[0083] d) 通过将所述应答样品中测定的 IP-10 中减去从所述空白样品中测定的 IP-10 水平来确定样品的抗原依赖 IP-10 应答

[0084] e) 将所述抗原依赖 IP-10 应答或由该应答得到的数值与所述参考水平或由该参考水平得到的数值进行比较,

[0085] f) 通过将所述促细胞分裂原样品中测定的 IP-10 中减去从所述空白样品中测定的 IP-10 水平来确定样品的促细胞分裂原依赖 IP-10 应答

[0086] g) 将所述细胞分裂原样依赖 IP-10 应答或由该应答得到的数值与所述参考水平或由该参考水平得到的数值进行比较,

[0087] h) 将抗原自发性 IP-10 应答或由该应答得到的数值与所述参考水平或由该参考水平得到的数值进行比较,

[0088] 从而确定哺乳动物先前是否遇到过该抗原并因而产生对该抗原的免疫学反应性, 或者先前是否遇到过产生对该抗原的免疫学交叉反应性的其它抗原, 并且由此确定该哺乳动物是否具有活动性感染、近期感染或潜伏性感染, 或者如果哺乳动物对该治疗进行应答则确定该哺乳动物是否会发展为感染, 或是否为免疫抑制。

[0089] 术语“促细胞分裂原”指的是促进细胞分裂的任何化学制品或化学成分。促细胞分裂原可以分别或同时地作用于 T 细胞和 B 细胞。因此, 术语促细胞分裂原覆盖了 T 细胞活化剂和 B 细胞活化剂, 并因此可替换地使用于此。

[0090] 本发明的促细胞分裂原覆盖了本领域技术人员已知的所有的促细胞分裂原, 例如但不限于植物凝集素 (PHA)、伴刀豆球蛋白 A (conA)、脂多糖 (LPS) 以及美洲商陆有丝分裂原 (pokeweed mitogen, PWM)。在本发明的一种优选实施方式中, 所述促细胞分裂原为 T 细胞活化剂, 并且该促细胞分裂原更优选为 PHA。在本发明的另一种优选实施方式中, 所述促细胞分裂原为单核细胞 / 巨噬细胞活化剂。

[0091] 然后通过本领域技术人员已知的细胞因子或趋化因子检测方法测定 IP-10 的产生, 所述方法例如但不限于基于抗体的技术 (antibody-based technologies), 举例来说, 多指标同步分析 (xMAP)、多路技术 (multiplexing)、Luminex、ELISA、酶联免疫斑点 (ELISPOT)、侧流棒分析 (lateral stick assay) 或者基于信使 RNA (mRNA) 技术, 例如实时聚合酶链式反应 (Real time polymerase chain reaction, RT-PCR) 或胞内流式细胞术检测 (Intracellular flow cytometry, IC-FACS)。

[0092] 对抗原 (例如, 衣原体提取抗原或肺结核特异性蛋白或其衍生物) 进行响应的 IP-10 的数量可以通过减去产生的 IP-10 的基数来确定, 并且基于该抗原特异性的 IP-10 应答来说明感染例如结核分枝杆菌的可能。

[0093] 本申请中的肺结核的数据是通过使用现有的技术: QuantiFERON® TB-Gold In-Tube 试验 (Cellestis, Carnegie, Australia) 而建立的, 其中, 全血直接被抽到预涂敷有生理盐水 (空白)、TB 特异性肽抗原 (抗原 (Ag)) 或促细胞分裂原 (PHA) 中的一种的真空采血管 (vacutainer tube) 内。该采血管在本优选实施方式中在 37°C 下孵育 18 小时, 其中通过 xMAP 技术在 Luminex 平台 (卢米尼克斯公司, 美国 (Luminex Corporation, USA)) 上测量到细胞因子的浓度后使用碧欧泉试剂 (Biosource reagents) (碧欧泉, 卡玛利洛, 美国 (Biosource Camarillo, USA)), 并因此能够将效应参数从传统的参数 IFN- γ 转化为在

更高的浓度下表达,并具有更好效果的 IP-10。

[0094] 本发明的高灵敏度使得该方法成为优秀的用来区分活动性感染、潜伏性感染、近期感染、儿童 / 新生儿感染和 / 或长期潜伏性感染的工具。因此,在一种实施方式中,本发明涉及一种方法,其中,具有空白的在参考水平之上的抗原依赖 IP-10 应答表示该哺乳动物具有活动性感染、潜伏性感染、近期感染和 / 或长期潜伏性感染。

[0095] 在另一种实施方式中,本发明涉及一种方法,其中试验中所用的样品材料(例如,全血)的量减少了。在使用全血的情况下,使用范围降低到 3-0.1ml,并且在使用外周血单个核细胞(PBMCs)的情况下,细胞数的范围为 1×10^6 - 0.05×10^6 。由于不需要对供体的血液动力学结果(haemodynamic consequence),或者对非常少量的样品材料(例如从脊髓液、胸液或脐带血获得的细胞)进行分析,这种适合于具有低血容量的病人(特别是儿童 / 因而或贫血患者)的“迷你分析”是具有创新意义的。

[0096] 与其它标记物的结合

[0097] 对与一种或多种下述的标记物结合的 IP-10 的测量可能减少假阳性的数量,并提高进行区分的能力。因此,在一种实施方式中,该方法还包括:

[0098] a) 确定对抗原刺激进行应答的 IP-10 和单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)水平,

[0099] b) 将所确定的 IP-10 和 MCP-1 的水平结合,并且

[0100] c) 将所述结合的水平与结合的参考水平进行比较。

[0101] 如本领域技术人员所公知的,所述结合的参考水平是通过测量健康人群中的 IP-10 水平和任何一种建议的组合标记物(例如但不限于 MCP-1)水平,并将所测定的 IP-10 和 MCP-1 水平通过计算(例如当不限于加法)而进行结合。根据所结合的参考水平的分布来选择的截止点上测定所结合的参考水平,例如健康人群平均数上 +2 标准偏差或者通过其它本领域技术人员已知的方法。

[0102] 其它可组合的标记物包括 IL-2 和 INF- γ 。

[0103] 在一种实施方式中,本发明公开了一种方法,该方法还包括

[0104] a) 测定对抗原刺激的进行应答的 INF- γ 和任选的 MCP-1 和 / 或 IL-2 的水平,

[0105] b) 结合所测定的 IP-10 和 INF- γ 以及任选的 MCP-1 和 / 或 IL-2 的水平,以及

[0106] c) 将所结合的水平与所结合的参考水平进行比较。

[0107] 在一种实施方式中,该方法包括

[0108] a) 测定对抗原刺激进行应答的 IP-10 的水平,

[0109] b) 将 IP-10 的水平与参考水平或由其得到的数值进行比较,

[0110] c) 确定所述哺乳动物先前是否遇到过所述抗原,并因此产生对该抗原的 IP-10 反应性

[0111] d) 测定对抗原刺激应答的 MCP-1 的水平

[0112] e) 将 MCP-1 水平与参考水平或由其得到的数值进行比较

[0113] f) 确定所述哺乳动物先前是否遇到过所述抗原,并因此产生对该抗原的 MCP-1 反应性

[0114] g) 结合所测定的 IP-10 反应性和 MCP-1 反应性

[0115] 从而确定该哺乳动物先前是否遇到过该抗原,并因此产生了具有至少一种生物标记物的对该抗原的免疫学反应性。

- [0116] 在一种实施方式中,该方法包括
- [0117] a) 测定对抗原刺激进行应答的 IP-10 的水平,
- [0118] b) 将 IP-10 的水平与参考水平或由其得到的数值进行比较,
- [0119] c) 确定所述哺乳动物先前是否遇到过所述抗原,并因此产生对该抗原的 IP-10 反应性
- [0120] d) 测定对抗原刺激应答的 IL-2 的水平
- [0121] e) 将 IL-2 水平与参考水平或由其得到的数值进行比较
- [0122] f) 确定所述哺乳动物先前是否遇到过所述抗原,并因此产生对该抗原的 IL-2 反应性
- [0123] g) 结合所测定的 IP-10 反应性和 IL-2 反应性
- [0124] 从而确定该哺乳动物先前是否遇到过该抗原,并因此产生了具有至少一种生物标记物的对该抗原的免疫学反应性。
- [0125] 在一种实施方式中,该方法包括,
- [0126] a) 测定对抗原刺激进行应答的 IP-10 的水平,
- [0127] b) 将 IP-10 的水平与参考水平或由其得到的数值进行比较,
- [0128] c) 确定所述哺乳动物先前是否遇到过所述抗原,并因此产生对该抗原的 IP-10 反应性
- [0129] d) 测定对抗原刺激进行应答的 INF- γ 的水平
- [0130] e) 将 INF- γ 水平与参考水平或由其得到的数值进行比较
- [0131] f) 确定所述哺乳动物先前是否遇到过所述抗原,并因此产生对该抗原的 INF- γ 反应性
- [0132] g) 结合所测定的 IP-10 反应性和 INF- γ 反应性
- [0133] 从而确定该哺乳动物先前是否遇到过该抗原,并因此产生了具有至少一种生物标记物的对该抗原的免疫学反应性。
- [0134] 在一种实施方式中,该方法包括,
- [0135] a) 测定对抗原刺激进行应答的 IP-10 的水平,
- [0136] b) 将 IP-10 的水平与参考水平或由其得到的数值进行比较,
- [0137] c) 确定所述哺乳动物先前是否遇到过所述抗原,并因此产生对该抗原的 IP-10 反应性
- [0138] d) 测定对抗原刺激进行应答的 INF- γ 和 / 或 MCP-1 和 / 或 IL-2 的水平
- [0139] e) 将 INF- γ 和 / 或 MCP-1 和 / 或 IL-2 水平与参考水平或由其得到的数值进行比较
- [0140] f) 确定所述哺乳动物先前是否遇到过所述抗原,并因此产生对该抗原的 INF- γ 和 / 或 MCP-1 和 / 或 IL-2 反应性
- [0141] g) 结合所测定的 IP-10 反应性和 / 或 INF- γ 和 / 或 MCP-1 和 / 或 IL-2 反应性
- [0142] 从而确定该哺乳动物先前是否遇到过该抗原,并因此产生了具有至少一种生物标记物的对该抗原的免疫学反应性。
- [0143] 诊断
- [0144] 在一种实施方式中,如以上所描述的,IP-10 可以用于对被怀疑有各种免疫状态

(例如感染)的受试者的诊断。当用于诊断时,根据本发明的方法可以帮助确定例如感染的免疫状态的存在,这经常通过评价临床症状和进一步的实验室试验来完成。该试验可以诊断感染的各种阶段,例如在没有任何症状的个体中新近受到的感染、在没有表现这种感染症状的个体上发作的多年前所受到的感染、患者具有感染症状的活动性感染。

[0145] 在另一种实施方式中,IP-10 可以用于对疑似肺结核(例如,活动性 TB 感染、潜伏性 TB 感染或新近 TB 感染)的受试者的诊断,并且特别用于那些具有从潜伏性发展为活动性肺结核的增加了的风险的患者,即,接受免疫抑制药物治疗的患者(即,单克隆抗体治疗(monoclonal antibody treatment)(抗 CD20 抗体(例如,美罗华®(Rituximab®))或 TNF- α 阻断治疗(TNF- α blocking treatment)(例如,类克®(Remicade®)、恩利®(Enbrel®)、阿达木单抗®(Humira®))),或者接受类固醇或肿瘤化疗的患者;或者那些忍受免疫抑制状况的患者(例如 HIV 感染、癌症、胰岛素依赖型糖尿病(IDDM)或非胰岛素依赖型糖尿病(NIDDM)、自身免疫性状况(autoimmune condition)、营养不良、老龄、静脉吸毒(intravenous drug use, IVDU)或遗传性免疫失调),以及那些近期感染的个体。实际上,下面的标准指导应该在进行药物治疗前将这些患者筛选为活动性 TB 感染、潜伏性 TB 感染或新近 TB 感染。

[0146] 目前,强烈推荐的是对那些参加 TNF- α 阻断治疗或的患者,或者那些对结核菌素皮内试验(TST)或结核分枝杆菌抗原特异性 IFN- γ 试验表现 HIV 阳性的患者进行筛选。研究表明,这些试验可能对上述提及的这类病人而言并不可靠,而 IP-10 由于具有更高的灵敏度而是更好的选择。

[0147] 在另一种实施方式中,IP-10 可以用于筛选疑似感染衣原体的患者(例如,泌尿生殖器感染(uro-genital infection)、盆腔炎和/或眼睛的感染)。

[0148] 本发明允许结合来自各种传染原的抗原,这些传染原能在同一个器官或解剖部位上繁殖,或者产生相同族的症状。通过结合不同特异性的抗原,能够对具有风险的患者进行筛选,或排除那些会产生不能进行区分的临床状况的普通病原体,例如泌尿生殖器感染;或者对那些对相同治疗敏感,例如,抗生素,的患者进行筛选。

[0149] 因此,在一种实施方式中,本发明涉及一种用于同时对至少两种感染进行筛选的方法,该方法包括

[0150] a) 从需要的患者获得一个样品,并将所述样品分成至少两个部分,

[0151] b) 用抗原刺激一个部分,其中所述抗原与选择用于评价的特异性感染原(specific infectious agent)相关(应答部分),用无活性溶液孵育所述样品的第二部分(空白部分)

[0152] c) 测量在所述两部分中的 IP-10 水平

[0153] d) 通过将所述应答部分中测定的 IP-10 中减去从所述空白部分中测定的 IP-10 水平来确定样品的抗原依赖 IP-10 应答

[0154] e) 将所述测定的抗原依赖 IP-10 水平与对所选择的感染原中的至少一种的参考水平进行比较,以及

[0155] f) 如果抗原依赖 IP-10 水平高于参考部分中的 IP-10 水平,则认为所述需要的患者感染了所选择的感染原中的至少一种。

[0156] 因此,本发明的方法可以应用于筛选具有感染疾病高风险的人们,例如在疾病地

区 (disease endemic area) 停留或旅行的人。

[0157] 因此,在本发明的一种实施方式中,所述传染病选自疟疾、结核病、脑膜炎、乙型肝炎、霍乱、利什曼原虫病 (leishmanina)、登革热以及脊髓灰质炎所组成的组中。

[0158] 在本发明的另一种实施方式中,所述传染病选自包括软性下疳 (chancroid)、衣原体感染、淋病、性病淋巴肉芽肿 (Lymphogranulomavenereum)、解脲脲原体 (Ureaplasma urealyticum)、人型支原体 (Mycoplasma hominis)、梅毒螺旋体 (Treponema pallidum)、乙型肝炎 (Hepatitis B)、单纯疱疹病毒 (Herpes simplex virus)、人类免疫缺陷病毒 (Human Immunodeficiency Virus)、人乳头状瘤病毒 (Human papillomavirus)、软疣 (Molluscum)、阴虱 (Phthirus pubis)、疥螨 (Sarcoptes scabiei) 和阴道毛滴虫 (Trichomonas vaginalis) 的性传播疾病。

[0159] 在本发明的又一种实施方式中,所述传染病选自可治疗胃肠传染原所组成的组,例如,志贺氏杆菌、大肠杆菌、弧形杆菌 (Campylobacter)、霍乱弧菌 (Vibrio cholerae bacteria)、微小隐孢子虫 (Cryptosporidium parvum)、沙门氏菌 (Salmonella bacteria) 以及伤寒沙门氏菌 (Salmonella typhi bacteria)。

[0160] 在本发明的另一种实施方式中,所述传染病选自抗生素不能治疗的胃肠传染原所组成的组,例如,轮状病毒 (rotaviruses)、诺沃克样病毒 (noroviruses)、腺病毒 (adenoviruses)、扎幌病毒 (sapoviruses) 和星形病毒 (astroviruses)。

[0161] 在本发明的更进一步的实施方式中,所述传染病选自以下的例如在血库中的要进行显影的血液病所组成的组:甲型肝炎、戊型肝炎、疟疾 (Malaria)、恰加斯病 (Chagas Disease)、巴贝斯虫病 (Babesiosis)、利什曼病 (Leishmaniasis)、猴泡沫病毒 (Simian foamy virus)、变异型克-雅氏病 (Creutzfeldt-Jacob Disease, vCJD)、克-雅氏病 (Creutzfeldt-Jacob Disease, CJD)、巨细胞病毒 (Cytomegalovirus, CMV) 以及爱泼斯坦-巴尔病 (Epstein-Barr Virus)。

[0162] 在本发明的一种实施方式中,所述传染病选自能引发细菌性脑膜炎、脑膜炎奈瑟菌 (Neisseria meningitidis)、肺炎链球菌 (Streptococcus pneumoniae)、单核细胞李斯特菌 (Listeria monocytogenes)、铜绿假单胞菌 (Pseudomonas aeruginosa)、金黄色葡萄球菌 (Staphylococcus aureus)、无乳链球菌 (Streptococcus agalactiae) 和流感嗜血杆菌 (Haemophilus influenza) 的细菌所组成的组。

[0163] 因此,本发明的一个目的在于做出种特异性诊断,这是因为特异性抗原的选择使得本领域技术人员对例如分枝杆菌属的不同种进行区分。

[0164] 预后 (Prognosis)

[0165] 在一种实施方式中,IP-10 可以用来预测诊断有例如感染的各种免疫状态的受试者的预后。当用于患者预后时,根据本发明的方法能帮助预测例如感染的免疫学状态的过程以及可能的结果,从而协助本领域技术人员选择合适的治疗方法并预测用于该状况的特定治疗的效果。

[0166] 监测

[0167] 在一种实施方式中,IP-10 可以用来对诊断有感染的受试者进行监测。当用于患者监测时,根据本发明的方法能帮助评估在治疗过程中或在治疗终止后的功效,例如监测并预测感染复发的可能。

[0168] 通过本发明的方法来监测治疗的功效的可能性是特别具有实质性的,这是因为(以结核分枝杆菌为例)

[0169] a) 通过简单的抽血代替了目前可用的方法,例如痰液显微镜方法、结核菌培养、X射线或其它方法,而方便地进行该方法,

[0170] b) 与痰液显微镜方法、结核菌培养、X射线或其它方法相比,本发明的方法具有更好的重复性

[0171] c) 与痰液显微镜方法、结核菌培养、X射线或其它方法、本发明的方法廉价,例如说,如果患者为疑似肺外结核,在活组织检查需要进行侵入性外科手术操作,或者如果患者为痰菌阴性,在支气管镜检查法中(bronchoscopy)需要进行侵入性外科手术操作。

[0172] d) 与基于 RD1 重叠肽的对肺结核的 IFN- γ 分析相比,本发明的方法更灵敏

[0173] e) 本发明的方法能在活动性肺结核和潜伏性肺结核之间进行区分,而其噤的免疫分析仅能区分感染或未感染。

[0174] 筛选(Screening)

[0175] 在一种实施方式中,根据本发明的方法用于筛选目的。即,使用本方法对事先未进行感染诊断的受试者通过测量 IP-10 的水平来进行评估,并使所测得的水平与预先指定(pre-specified)水平相互关联,来说明各种感染(例如结核分枝杆菌感染)的存在或不存在。在另一种实施方式中,根据本发明的方法用于筛选目的。即,使用本方法对事先未进行感染诊断的但是具有潜伏性疾病复发风险的受试者通过测量 IP-10 的水平来进行评估,根据预先指定水平来说明本发明,并将所测得的水平与各种感染(例如结核分枝杆菌感染)的存在或不存在进行关联。

[0176] 如先前所描述地,本发明的方法公开了一种用来同时对至少两种传染病进行筛选的方法。

[0177] 在本发明的另一种实施方式中,该方法可以用来对自献血者的血液进行各种疾病例如但不限于由寄生虫或病毒引发的感染进行筛选。

[0178] 接触者追踪(Contact tracing)

[0179] 在优选的实施方式中,IP-10 可以用于对暴露于各种感染,例如结核分枝杆菌的受试者的诊断。当用于接触者追踪时,根据本发明的方法能帮助确定感染的存在,例如结核分枝杆菌感染。

[0180] 在其它的实施方式中,IP-10 可以在爆发高传染性感染时用于对暴露于传染性情况下的受试者进行诊断,例如但不限于肺结核、冠状病毒(例如严重获得性呼吸道综合征(Severe Acquired Respiratory Syndrome))、流行性感冒(Influenza)、埃博拉病毒(Ebola virus)或马尔堡病毒(Marburg virus)。在肺结核病例中,当用于接触者追踪时,根据本发明的方法可以帮助确定感染的存在,这一般通过评价 TST 或目前可用的 IFN- γ 释放分析来完成。

[0181] 增加的检出病例(case finding)

[0182] 在优选的实施方式中,IP-10 可以用于对各种疾病,例如感染的诊断。当用于增加检出病例时,根据本发明的方法可以帮助确定感染,例如但不限于显微镜方法,由于缺少感染的微生物学迹象,难以诊断出阴性 TB,然而这种微生物学迹象经常是通过对临床症状、对治疗的应答来完成,并且缺少用来替代的诊断或通过耗时的分析(数周),例如痰培养

(sputum culture)。

[0183] 流行调查 (Prevalence study)

[0184] 在优选的实施方式中, IP-10 可以用于研究各种免疫学状态的流行程度, 例如但不限于在受试者人群中的感染, 例如儿童、HIV 阳性移民、难民、医护人员、学龄儿童、囚犯、实验人员。当用于流行调查时, 根据本发明的方法能够帮助确定感染的存在, 例如在受试者人群中的潜伏性 TB 或活动性 TB, 这经常通过 TST 来完成。

[0185] 研究目的

[0186] 在一种实施方式中, 当对潜在的新抗原进行筛选时, 研究机构可以利用 IP-10, 所述新抗原来源于选自分枝杆菌 (Mycobacteria)、革兰氏阳性细菌、革兰氏阴性细菌、李斯特菌 (Listeria)、肠球菌 (enterococci)、奈瑟菌 (Neisseria)、弧菌 (vibrio)、密螺旋体 (treponema (梅毒 (Syphilis)))、包柔氏螺旋体菌 (Borrelia)、细螺旋体 (leptospirae)、衣原体 (Chlamydia)、逆转录病毒 (猴免疫缺陷病毒 (SIV)、HIV-1 和 HIV-2)、冠状病毒例如严重获得性呼吸道综合症 (SARS) 和 NL-63、巨细胞病毒、轮状病毒、变形肺病毒 (metapneumovirus)、呼吸道合胞病毒 (respiratory syncytium virus, RSV)、痘病毒 (poxviruses)、艾伯斯坦-巴尔病毒 (Ebstein barr virus)、肠道病毒、麻疹病毒 (morbillivirus)、杆状病毒 (rhabdoviruses (狂犬病))、风疹病毒 (Rubivirus (风疹 (rubella)))、黄病毒 (flaviviruses (登革热、黄热病))、疱疹病毒、带状疱疹病毒 (varicella-zoster virus)、丙型肝炎和乙型肝炎、利什曼原虫 (Leishmania)、弓形虫 (Toxoplasma gondii)、锥虫 (trypanosoma)、疟原虫 (Plasmodium (恶性疟原虫 (falciparum)、间日疟原虫 (vivax)、卵形疟原虫 (ovale)、疟疾)、卡氏肺囊虫 (pneumocystis carinii, PCP) 以及各种的线虫、吸虫所组成的组的微生物, 这些抗体可以为例如脂类、多糖分子、蛋白质和肽。当用作实验室研究目的时, 根据本发明的方法能够帮助确认对所检测的用于开发疫苗和诊断试验的抗原、蛋白质或肽的免疫反应性。

[0187] 许多抗原分子, 例如说肽, 被确认为种特异性或疾病特异性, 但是由于缺少灵敏的标记物, 难以测定它们在体外诱导 T 细胞的能力。在用这种候选抗原刺激后, 测得的 IP-10 能用于筛选并确认潜在的受试者新抗原或分子。特别是在抗原是从结核分枝杆菌、沙眼衣原体、HIV-1 或丙型肝炎病毒 (HCV) 中获得的情况下; 研究机构在试验这些抗原的免疫原性时可以使用 IP-10, 即, 作为对 T 细胞的反应性的测量用于例如疫苗的开发。

[0188] 治疗效果

[0189] 本发明的发明人提出, 在治疗过程中, 重复试验孵育过程中 (空白样品) 的自发释放, 并且抗原诱导的 IP-10 (抗原样品) 能够用作治疗效果的标记物。如果自发的 IP-10 应答在治疗过程中下降, 可以认为该治疗是成功的, 相反, 如果没有观察到降低, 则必然想到治疗失败。

[0190] 本发明的发明人提出, 自发性的重复试验以及在例如 TB 治疗过程中的抗原诱导的 IP-10 能用作治疗效果的标记物。如果抗原刺激的 IP-10 应答在治疗过程中下降, 可以认为该治疗是成功的, 相反, 如果没有观察到降低, 则必然想到治疗失败。

[0191] 应该理解的是, 任何在此讨论的与根据本发明的测定相关的特征和 / 或方面适用于与根据本发明的“诊断 (diagnosis)”、“预后 (prognosis)”、“监测 (monitoring)”、“筛选 (screening)”、“研究目的 (research purposes)”、“接触者追踪 (contact tracing)”、“增

加的检出病例 (enhanced case finding)”以及“流行调查 (prevalence studies)”类似的表述,并且反之亦然。

[0192] 孵育步骤

[0193] 在血液从受试者抽出后的延长期以后, CMI 系统的细胞丧失了在全血中进行 CMI 应答的能力,并且在血液抽出后 24 小时,如果不进行延长细胞寿命的处理,例如但不限于在低于 10℃ 下进行保存,则无干扰应答通常会急剧降低。

[0194] 在一种实施方式中,劳动力的减少允许了在医疗点进行抗原对样品的刺激,例如医师诊所、诊疗所 (clinic)、门诊部 (outpatient facility) 以及兽医诊所 (veterinary clinics) 或者农场。一旦完成抗原刺激,就不再存在对新鲜而有活性的细胞的需要了。IP-10 和其它的生物标记物,例如细胞因子或免疫效应物分子在血浆中稳定,并因此,样品可以被储存、冷冻或运输而不需要特殊的条件或者与用于其它传染病或者其它疾病诊断的标准血浆样品相似的对时间的快速要求。

[0195] 所述孵育步骤可以为 5-144 小时,更优选为 5-120 小时,并且更优选为 12-24 小时或者它们之间的时间段。因此,在本发明的一种实施方式中,孵育时间为 5 小时、6 小时、7 小时、8 小时、9 小时、10 小时、11 小时、12 小时、13 小时、14 小时、15 小时、16 小时、17 小时、18 小时、19 小时、20 小时、21 小时、22 小时、23 小时、24 小时、26 小时、30 小时、36 小时、42 小时、48 小时、72 小时、96 小时、120 小时或 144 小时。

[0196] 由于 IP-10 以如此高的浓度分泌,因此能够在恒温箱外对样品进行孵育,即在实验室的桌子上、或者在具有稳定温度的水浴中、或在可运输的承载装置中。这对发展中国家或者具有基础实验室设备的门诊部是特别有用的。

[0197] 所述孵育步骤可以在范围为 20-43℃ 的温度下进行。因此,在本发明的一种实施方式中,孵育的温度可以为 16℃、18℃、20℃、22℃、25℃、26℃、27℃、28℃、29℃、30℃、31℃、32℃、33℃、35℃、37℃、38℃、39℃、40℃ 或 41℃。

[0198] 所述孵育步骤可以但不限于在 15℃ 到 40℃ 之间的不固定的温度下进行,更优选的为 18-37℃,并且更优选为 30-37℃。

[0199] 本发明的一种实施方式允许用稀释的样品进行刺激,这伴随着向细胞培养的增加的培养基。

[0200] 本发明的另一种实施方式允许用向细胞培养中加入了惰性稀释液 (例如,生理盐水) 的样品进行刺激。

[0201] 样品

[0202] 本发明的一种实施方式设想了一种用于测量受试者中 CMI 应答的方法,该方法包括从所述受试者收集样品,其中,所述样品包括免疫系统的细胞,该细胞能在用抗原进行刺激后产生免疫效应物分子,用抗原孵育所述样品,并随后测量免疫效应物的存在或水平的增加,其中所述免疫效应物分子的存在或水平的增加说明了所述受试者产生细胞介导免疫响应的能力。

[0203] 在一种实施方式中,所述样品来源于由血液、尿液、胸液、支气管液 (bronchial fluid)、漱口水 (oral washing)、组织活检 (tissue biopsy)、腹水 (ascites)、脓 (pus)、脑髓液 (cerebrospinal fluid)、抽吸物 (aspirate) 和滤泡液所组成的组中。

[0204] 在优选实施方式中,所述样品得自血。

[0205] 然而,所述样品还可以含有选自全血、来自胸液的单核细胞、外周血单核细胞(PBMC's)、T细胞、CD4T细胞、CD8T细胞、 γ δ T细胞(gamma-deltaT cells)、单核细胞、巨噬细胞以及自然杀伤细胞(NK cell)所组成的组中的细胞。

[0206] 常规地,当样品为全血时,用抗凝血剂(例如,肝素)来处理血液收集试管。尽管全血为优选并且是最方便的样本,本发明延伸到其它的含有免疫细胞的样品,例如但不限于胸液、腹水、淋巴液(lymph fluid)、脊髓液或脑髓液、组织液以及包括鼻腔液(nasal fluid)和肺液(pulmonary fluid)的呼吸道液。

[0207] 因而本发明的一种实施方式涉及一种方法,其中,所述样品来自血液、尿液、胸液、支气管液、漱口水、组织活检、腹水、脓、脑髓液(cerebrospinal fluid)、抽吸物(aspirate)和/或滤泡液。

[0208] 因此本发明的另一种实施方式涉及一种方法,其中,所述样品含有选自外周单个核细胞、T细胞、CD4T细胞、CD8T细胞、 γ δ T细胞(gamma-deltaT cells)、单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞(dendritic cell)以及自然杀伤细胞所组成的组中的细胞。

[0209] 在一种实施方式中,所述样品为全血,可以在其中存在抗原、促细胞分裂原或“空白”的三种合适容器中收集所述全血。在另一种实施方式中,可以随后将抗原、促细胞分裂原或“空白”加入到含有例如全血的样品的等分试样(alliquots)中。

[0210] 在另一种实施方式中,所述样品为全血,所述全血可以在含有抗原、促细胞分裂原或“空白”的收集管中进行收集,或可以将所述全血收集到加入了抗原、促细胞分裂原或空白的全血等分试样中。

[0211] 通常地,血液在抗凝毒素(优选肝素、作为替换地,例如柠檬酸盐或乙二胺四乙酸(EDTA))的存在下进行保藏。当加入血液时,所述抗凝血数存在于血液收集试管中。优选使用血液收集试管,但这种使用不是必须要与标准自动化实验系统相容,并且这些都要服从于大范围内和随机获得的取样的分析。血液收集试管同样最小化了处理成本,并减少了对全血和血浆的实验室暴露,并因此减少了实验室人员与病原体接触的风险,所述病原体例如但不限于人类免疫缺陷病毒。

[0212] 全血等分试样的体积范围可以为10 μ L-4000 μ l,例如但不限于50 μ L、100 μ l、200 μ l、300 μ l、400 μ l、500 μ l、600 μ l、700 μ l、800 μ l、900 μ l、1000 μ l、1100 μ l、1200 μ l、1300 μ l、1400 μ l、1500 μ l、1600 μ l、1700 μ l、1800 μ l、1900 μ l、2000 μ l、2100 μ l、2200 μ l、2300 μ l、2400 μ l、2500 μ l、2600 μ l、2700 μ l、2800 μ l、2900 μ l 或3000 μ l。

[0213] 可以在试管、组织培养孔(tissue culture wells)或其它容器中对样品进行孵育,并且以相关的浓度加入抗原、促细胞分裂原和“空白”。

[0214] 血液收集试管包括采血管或其它类似的器皿,但是也可以直接将血液抽出到开管(open tube)或毛细管中。

[0215] 试剂盒

[0216] 本发明还构思了一种试剂盒,该试剂盒用来估计受试者的展开细胞介导应答的能力。所述试剂盒为具有一个或多个间隔室的便利的分隔开的形式,所述间隔室适于接受来自受试者的样品,例如全血纯化细胞(whole blood purified cells)、活组织检查或其它材料。上述间隔室或其它间隔室还可以在样品为全血时含有肝素。

[0217] 通常地,所述试剂盒的形式为与一套说明一起包装以进行销售。所述说明通常是用受试者内测量 CMI 应答的方法的形式,所述方法包括从所述受试者收集样品,其中,所述样品含有能够在用抗原进行刺激后产生免疫效应物分子的免疫系统细胞,用试剂盒所提供的抗原孵育所述样品并随后测量 IP-10 的存在或水平的提高,其中所述免疫效应物分子的存在或水平说明了所述受试者展开细胞介导免疫应答的能力。

[0218] 在一种实施方式中,所述试剂盒含有抗原以及单克隆或多克隆的抗体,所述抗体与 IP-10 在免疫试验中进行特异性反应,或者特异性地连接所述抗体的部分以用作诊断剂。

[0219] 本发明所提供的试剂盒可以为多组成的形式,其中第一组成包括多样的血液收集试管,第二组成包括用于免疫效应物分子的基于抗体的检测装置并且第三组成包括一套说明,该说明包括以下:(i) 在血液收集试管中收集血液;(ii) 混合所述试管;(iii) 孵育所述试管;(iv) 离心分离所述试管并收集血浆;以及(v) 检测血浆中的免疫效应物分子。

[0220] 所述试验还可以为自动或半自动的,并且所述自动的情况可以由计算机软件进行控制。

[0221] 本发明的试验可以为自动或半自动的以进行高产量的筛选,或用来对来自一个受试者的大量免疫效应物分子进行筛选。通过计算机软件方便地控制自动化。本发明设计了一种计算机程序产品,因此,为了估计 IP-10 的存在或不存在或存在水平,所述产品包括(1) 接受对报告分子的确认作为输入值的编码,所述报告分子与标记的抗体或信使 RNA 相联

[0222] (2) 将所述输入值与参考值进行比较以测定所述报告分子水平和/或对所述报告分子所附着的分子的确定的编码;以及

[0223] (3) 储存上述编码的计算机可读媒介。

[0224] 本发明的另一方面延伸到用来估计 IP-10 的存在或不存在的计算机,所述计算机包括:(1) 机器可读数据储存媒介构成的数据储存材料,该数据储存材料编码有机器可读数据,其中,所述及其可读数据 I 包括输入值,该输入值对与标记的抗体或 mRNA 相连的报告分子进行识别;

[0225] (2) 用来储存指令的工作存储器,所述指令用来处理所述机器可读数据,

[0226] (3) 与所述工作存储器相连并连接到所述数据储存媒介上的中央处理单元,该中央处理单元用来处理所述机器可读数据以比较所述数值以提供对报告分子或者所述报告分子所附着的分子的识别或水平的估计;以及

[0227] (4) 与所述中央处理单元相连的输出硬件,以接收所述比较的结果。

[0228] 特异性和灵敏度

[0229] 任何给定诊断试验的灵敏度限定了具有阳性应答的个体的比例,这些个体由试验被正确地识别或诊断,例如如果所有具有给定状况的个体具有阳性试验结果,则灵敏度为 100%。给定筛选试验的特异性反映了不具有该状况的个体的比例,这些个体由试验被正确地识别或诊断,例如说,如果所有的不具有该条件的个体的试验结果为阴性,这特异性为 100%。

[0230] 灵敏度被定义为具有给定状况(例如,活动性 TB 感染)的个体的比例,这些个体由本发明所描述的方法被正确地识别或诊断(例如,具有阳性 IP-10 试验结果)。

[0231] 特异性在此被定义为不具有这种状况（例如，活动性 TB 感染）的个体的比例，这些个体由本发明所描述的方法被正确地识别或诊断（例如，具有阴性 IP-10 试验结果）。

[0232] 接收器工作特性 (Receiver-operating characteristic)

[0233] 诊断试验的准确性通过其接收器工作特性 (ROC) 而得到最好的描述（特别参见茨威格, M. H 和坎贝尔, G., 临床化学, 39 (1993) 561-577 (Zweig, M. H., and Campbell, G., Clin. Chem. 39 (1993) 561-577)）。ROC 图是在整个观察数据范围内由持续改变的判断阈值得出的所有的灵敏度 / 特异性对的图。

[0234] 实验室试验的临床效果依赖于其诊断的准确性，或者将受试者正确地划分到临床上相应的小组的能力。诊断的准确性衡量了试验正确地区别受调查受试者的两种不同状况的能力。这些状况为例如健康和疾病、潜伏性感染或近期感染对未感染或者良性疾病对恶性疾病。

[0235] 在各种情况中，通过对全部范围的判断阈值的灵敏度对 1- 特异性进行绘图，ROC 图描述了两种分布之间的重叠。y 轴为灵敏度，或者真阳性部分 [通过 (真阳性试验结果的数量) / (真阳性测试结果的数量 + 假阴性测试结果的数量) 确定]。也被称为存在疾病或状况时的阳性。它仅由感染小组计算得到。在 x 轴上为假阳性部分，或 1- 特异性 [通过 (假阳性结果的数量) / (真阴性测试结果的数量 + 假阳性测试结果的数量) 确定]。它是特异性的指标，并且完全通过未感染小组计算得到。

[0236] 由于真阳性和假阳性部分通过使用来自两种不同的小组的试验结果来进行完全独立的计算，所以 ROC 点不依赖于样品中的疾病的流行性。在 ROC 图上的各个点反应了相应于具体判断阈值的灵敏度 / - 特异性对。具有理想区别力的试验（在两种结果的分布上没有重叠）具有穿过左上角的 ROC 点，在此处，真阳性部分为 1.0 或 100%（理想灵敏度）且假阳性部分为 0（理想特异性）。对于不具有区别力的试验（两个组的结果具有相同的分布）的理论点为从左下角到右上角的 45° 对角线。大多数的点落在这两种极端之间。（如果 ROC 点完全落在 45° 对角线之下，通过对“阳性”的判断标准从“大于”逆转为“小于”就能进行修正，或反之亦然）。定性地，点越接近左上角，试验的整体准确性就越高。

[0237] 量化实验室试验的诊断准确性的一种方便的目的是通过一个数来表达该试验的性能。最普遍的全局性测量就是在 ROC 点下的面积。按惯例，该面积通常 ≥ 0.5 （如果不是，这可以逆转规则来使其面积在该范围内）。数值范围在 1.0（两组试验数值理想分离）到 0.5（在两组试验数值之间没有明显的分布差别）之间。所述面积不仅依赖于特殊点部分，例如最接近对角线的点或 90% 特异性处的灵敏度，还依赖于所有的点。这定量地描述性地表示了 ROC 点有多么接近理想点（面积 = 1.0）。

[0238] 这种新颖的标记物 IP-10 的临床应用可以通过与其它用于给定感染的诊断工具进行比较，并与它们结合来进行评估。在感染结核分枝杆菌的情况下，将通过与已建立的诊断工具所确定的标记物 IFN- γ 或使用接收器工作特性曲线分析的 TST 进行比较来评价新颖的标记物 IP-10 的临床应用。参见实施例 5。

[0239] 因此，本发明的优选实施方式的一个目的是提供一种用于检测哺乳动物是否遇到过抗原的免疫学方法，该方法包括：

[0240] a) 测定在所述哺乳动物的样品中产生的抗原特异性 IP-10 的水平

[0241] b) 建立从健康人群获得的 IP-10 水平的百分位数图

[0242] c) 基于在健康人群中所测定的 IP-10 水平和在对可疑抗原产生了免疫学反应性的人群中所测定的 IP-10 水平来建立 ROC(接收器工作特性)曲线

[0243] d) 选择所需的特异性

[0244] e) 从 ROC 曲线确定相应于所需的特异性的灵敏度

[0245] f) 从百分位数图相确定相应于所确定的灵敏度的 IP-10 水平;以及

[0246] g) 如果样品中 IP-10 水平等于或高于相应于所确定的特异性的 IP-10 水平,则预测个体对该抗原具有免疫学反应性,并且当样品中 IP-10 水平低于相应于所确定的特异性的总体 IP-10 水平,则预测个体不可能或者没有对该抗原具有免疫学反应性。

[0247] 因此,本发明的优选实施方式的另一个目的是提供一种用于检测哺乳动物是否遇到过抗原的免疫学方法,该方法包括:

[0248] a) 测定在所述哺乳动物的样品中产生的抗原特异性 IP-10 的水平

[0249] b) 建立从健康人群获得的 IP-10 水平的百分位数图

[0250] c) 基于在健康人群中所测定的 IP-10 水平和在对可疑抗原产生了免疫学反应性的人群中所测定的 IP-10 水平来建立 ROC(接收器工作特性)曲线

[0251] d) 选择所需的灵敏度

[0252] e) 从 ROC 曲线确定相应于所需的灵敏度的特异性

[0253] f) 从百分位数图相确定相应于所确定的灵敏度的 IP-10 水平;以及

[0254] g) 如果样品中 IP-10 水平等于或高于相应于所确定的灵敏度的 IP-10 水平,则预测个体对该抗原具有免疫学反应性,并且当样品中 IP-10 水平低于相应于所确定的灵敏度的总体 IP-10 水平,则预测个体不可能或者没有对该抗原具有免疫学反应性。

[0255] 根据本发明的方法的特异性可以从 70%到 100%,优选为 80-100%,更优选为 90-100%。因此,在本发明的一种实施方式中,本发明的特异性为 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%。

[0256] 根据本发明的方法的灵敏度可以从 70%到 100%,优选为 80-100%,更优选为 90-100%。因此,在本发明的一种实施方式中,本发明的灵敏度为 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%。参见实施例 5。

[0257] 将 IP-10 水平与一套参考对照数据或参考对照值,例如截止点值进行比较以确定是否受试者处于例如感染的增加的风险中或有此可能。

[0258] 为了提高检测的效率,可以将 IP-10 的血液浓度与一套参考对照数据进行比较以确定是否受试者可能被感染或者处于发展为例如感染的增加的风险中。

[0259] 为了提高检测的效率,可以将 PHA 诱导 IP-10 水平和抗原刺激的 IP-10 水平与一套参考对照数据进行比较以确定受试者是否被感染或者处于发展为感染或疾病的增加的风险中。

[0260] 为了确定是否患者处于发展为例如感染的增加的风险中,需要建立截止点(cut-off)。这种截止点可以通过实验室、医师而建立,或者建立在各个患者的病例基础上。

[0261] 作为替换地,截止点可以由阴极对照组的平均数、中位数或几何平均数来确定((例如,为感染的健康的未暴露的不具有 TB 感染的患者)+/- 源自标准偏差的一个或多个

标准偏差或值)。

[0262] 在抗原激发之后,某些个体对生物标记做出强烈应答而对其它的不应答。例如一些个体可能不表现出 IP-10 或 IFN- γ 应答,因而产生低水平的 IP-10 或 IFN- γ 。在这些情况下,对两种、三种、四种或更多的生物标记物进行同时测量将增加分析的灵敏度,并且增加了阳性应答的数量。通过将 IP-10 与一种或多种生物标记物进行结合,例如但不限于 IFN- γ 、IL-2 或 MCP-1,从而能够做出较少受到对单个生物标记物无反应的影响的诊断预测。

[0263] 在另一种优选实施方式中,IP-10 的测量与一种或多种其它的生物标记物的测量结合,并与结合的参考水平进行比较。所测量的生物标记物水平可以通过算数运算,例如加、减、乘和百分数算数处理、平方根、求幂以及对数函数,来进行结合。可以通过本领域技术人员已知的方法进行各种生物标记物的结合和各种计算结合的参考数值的方法。

[0264] 在另一种优选实施方式中,可以在将单个生物标记物浓度与参考水平,例如截止点,进行比较后,将生物标记物(例如但不限于与 IFN- γ 和 / 或 IL-2 结合的 IP-10)的单个的测量值进行结合。该方法产生的一个试验结果中不止覆盖了多个抗原,还覆盖了多个生物标记物。可以通过本领域技术人员已知的方法进行各种生物标记物的结合和各种计算结合的参考数值的方法。

[0265] 在本发明的一种实施方式中,生物标记物 IP-10 和选自 MCP-1、IL-2 和 INF- γ 所组成的组中的一种生物标记物的结合提供了与灵敏度和 / 或特异性相关的协同效应。

[0266] 在本发明的另一种实施方式中,生物标记物 IP-10、MCP-1 和 IL-2 的结合提供了与灵敏度和 / 或特异性相关的协同效应。

[0267] 在本发明的进一步实施方式中,生物标记物 IP-10、MCP-1 和 IFN- γ 的结合提供了与灵敏度和 / 或特异性相关的协同效应。

[0268] 在本发明的另一种实施方式中,生物标记物 IP-10、IL-2 和 IFN- γ 的结合提供了与灵敏度和 / 或特异性相关的协同效应。

[0269] 特别地,当协同使用于此时指的是其中多个生物标记物同时作用产生“结合的生物标记物信号”的现象,具有比通过仅知道单个生物标记物的灵敏度或特异性所预测的对诊断的更高的灵敏度或特异性,因此减少了假阳性的数量并提高了进行区别的能力。

[0270] 在以抗体为基础的读数中,例如但不限于 ELISA 或免疫色谱棒试验,两种或多种连接不同生物标记物的抗体将使生物标记的连接重量增加,因此发生协同作用并产生更强的相应且增加了试验的灵敏度。可以根据本文的教导而进行结合的读数。

[0271] 风险评估

[0272] 本发明的发明人疫情成功地确认了用于测量对抗原的细胞介导应答的新的标记物。在对抗原具有细胞介导免疫应答的受试者内标记物 IP-10 的浓度增加了。并且 IP-10 表现出是用来检测例如结核分枝杆菌感染的有效的标记物。

[0273] 灵敏度比任何其它已确定的标记物都要高,并且特异性与任何其它已确定的标记物差不多或者更好,参见例如实施例 4、实施例 5 和实施例 10。

[0274] 统计推理可以例如建立在患有与于年龄、职业、曝光度(exposure)、遗传背景、人类白细胞抗原类型(HLA-type)有关的疾病的风险的基础上。

[0275] 截止点可以基于试验个体的具体状况而改变,例如但不限于患病风险、职业、居住

地或曝光度。

[0276] 截止点可以基于试验个体的具体状况而改变,例如但不限于年龄、性别、遗传背景(即,人类白细胞抗原类型)、后天获得或遗传的受损的免疫功能(例如,HIV 感染、糖尿病、肾衰竭或肝功能衰竭患者、接受免疫调整药物治疗的患者,例如但不限于血脂类固醇、化疗、TNF- α 阻断剂、有丝分裂抑制剂)。

[0277] 对判断极限或截止点极限做出调整将决定用来测试对如果存在的感染的试验的灵敏度,或如果在该极限之下,决定试验排除感染或疾病的特异性。于是,原则就是在该截止点之上的数值说明了增加的风险且在该截止点之下的数值说明了减少的风险。

[0278] 此外,具有不清楚的结果的试验样品必须个别地进行解释。不清楚的结果定义为在促细胞分裂原刺激的样品(PHA)中的结果具有意料不到的低水平的 IP-10。用于不清楚的 IP-10 结果的最终的截止点可以根据研究组而决定,特别是在免疫抑制中,截止点水平可以选在较低的水平。

[0279] 截止点水平

[0280] 如本领域技术人员所通常了解的,对细胞介导免疫反应性进行扫描的方法是通过比较做出决定的过程。对任何一种做出决定的过程而言,需要基于患有疾病或目标状况的受试者,和/或不具有疾病、感染或目标状况的受试者的参考值。

[0281] 截止水平(或截止点)可以建立在多个判断标准上,包括将继续进一步的侵入式诊断试验的受试者的数量、所有的将继续进一步的侵入式诊断试验的受试者具有和/或发展成例如感染的平均风险、判断任一病者特异风险(patient specific risk)高于确定的风险水平(例如 400 中的 1 个或者 1 : 250(如通过团体筛选或者个体受试者而确定))的受试者应该继续进行进一步的侵入式诊断试验或本领域技术人员已知的其它判断标准。

[0282] 截止水平可以基于多种判断标准进行调整,例如但不限于试验个体的某些组。例如,在具有免疫缺陷的个体和具有高风险发展为活动性疾病的患者中,所述截止水平可以设得较低,在其它具有低风险发展为活动性疾病的健康的个体中截止点可以较高。

[0283] 本发明的一种实施方式公开了一种用于测定受试者是否具有感染的方法,该方法包括:

[0284] (a) 从受试者获得样品,以及

[0285] (b) 定量地确定存在于样品中的 IP-10 的浓度,存在于样品中的 IP-10 多肽的量的浓度等于或高于所选择的截止点,该截止点说明该受试者可能具有感染。

[0286] 更具体地说,本发明的一个方面涉及一种免疫学方法,该方法包括以下步骤:

[0287] a) 用至少一种受试抗原孵育从哺乳动物获得的样品

[0288] b) 测定在所述样品中的 IP-10 的水平

[0289] c) 将所述测定的 IP-10 的水平与参考水平进行比较,从而确定哺乳动物先前是否遇到过产生对该抗原的免疫学反应性的所述抗原,或先前是否遇到过产生对该抗原的免疫学交叉反应性的其它抗原。

[0290] 更具体地所,本发明的另一方面涉及一种免疫学方法,该方法包括以下步骤

[0291] a) 用至少一种受试抗原孵育从哺乳动物获得的样品,而不进行任何的随后的刺激并且在所述抗原不是 PPD 的条件下,

[0292] b) 测定在所述样品中的 IP-10 的水平

[0293] c) 将所述测定的 IP-10 的水平与参考水平进行比较,从而确定哺乳动物先前是否遇到过产生对所述抗原的免疫学反应性的所述至少一种抗原,或者先前是否遇到过产生对该抗原的免疫学交叉反应性的其它抗原。

[0294] 在一种实施方式中,本发明涉及一种根据本发明的方法,其中所述样品分为至少两部分,并且

[0295] a) 从具有至少一种抗原的哺乳动物获得的样品进行孵育,而不进行任何的随后的刺激并且在所述抗原不是 PPD 的条件下,以产生应答样品

[0296] b) 用无活性溶液孵育所述样品的第二部分以产生空白样品

[0297] c) 测定在所述两部分中 IP-10 的水平

[0298] d) 通过将所述从所述应答样品中测定的 IP-10 中减去从所述空白样品中测定的 IP-10 水平来确定样品的抗原依赖 IP-10 应答

[0299] e) 将抗原依赖 IP-10 应答或由该应答得到的数值与所述参考水平或由该参考水平得到的数值进行比较,

[0300] 从而确定哺乳动物先前是否遇到过由该抗原并因而产生对该抗原的免疫学反应性,或者先前是否遇到过其它抗原产生对该抗原的免疫学交叉反应性和/或将发展为感染。

[0301] 这种区别值是通过健康对照人群以及具有已知感染的人群的一个或多个参数进行测量所确定的值,从而在分析参数值和已知的健康对照人晕和感染患者人群的临床数据之间的关系的基础上,用预定的特异性或预定的灵敏度来测定这种确定感染人群的区别值,例如从本文的实施例中的详细讨论可以明显看出。以这种方式确定的区别值对于今后的个体试验中的相同的实验装置也是有效的。

[0302] 在本文所描述的具体的实验装置中(实施例 5),发现有利地作为截止值的 IP-10 阈值的范围为,但不限于从 14pg/ml 到 1000pg/ml。优选地,该截止点的范围为 100pg/ml 到 800pg/ml 之间,例如范围为 100-600,比如说范围为 150-400,例如范围为 150-300,比如说范围为 150-250 例如范围为 175-215。

[0303] 优选地,所述截止值为 180pg/ml、181pg/ml、182pg/ml、183pg/ml、184pg/ml、185pg/ml、186pg/ml、187pg/ml、188pg/ml、189pg/ml、190pg/ml、191pg/ml、192pg/ml、193pg/ml、194pg/ml、195pg/ml、196pg/ml、197pg/ml、198pg/ml、199pg/ml、200pg/ml、201pg/ml、202pg/ml、203pg/ml、204pg/ml、205pg/ml、206pg/ml、207pg/ml、208pg/ml、209pg/ml、210pg/ml、211pg/ml、212pg/ml、213pg/ml、214pg/ml、215pg/ml、216pg/ml、217pg/ml、218pg/ml、219pg/ml、220pg/ml、221pg/ml、222pg/ml、223pg/ml、224pg/ml 或 225pg/ml。

[0304] 样品的稀释、与其它参数结合的测量例如但不限于白细胞介素 -2、干扰素 γ 和/或巨噬细胞趋化蛋白 -1,或者其它参数将导致其它的截止值,这可以根据本文所教导的进行测定。其它的实验装置、其它样品、其它抗原以及其它参数将必然导致其它的截止值,这可以由本领域技术人员通过常规设定的操作或者例行试验根据本文的教导而进行测定。

[0305] 诱导的抗原特异性生物标记水平的水平也依赖于进行刺激所选择的抗原。某些抗原是比其它抗原更有效的诱导物,但是不同的可利用的抗原(即,肽)的数量将导致应答细胞数量的增加以及更高的生物标记物的产生。因此,截止点也是抗原依赖的,并且取决于疾

病。进一步地,其它的种具有其它的显著的组织相容性抗原报告能力,因此在不同种内试验的相同的抗体将产生不同的种特异性截止点。

[0306] 生物标记物的浓度的测量可以被转换为国际单位(IU)。IU指生物标记物的生物学活性,并是各种测量方法之间基准的参考。

[0307] 在本发明的其它实施方式中,截止点的确定可以与刺激指数(定义为抗原刺激的IP-10浓度除以未被刺激的血浆浓度)结合。

[0308] 发现刺激指数值的范围为,但不限于1-6或更高。优选地,所述刺激指数至少为1.25、1.5、1.75、2、2.25、2.5、2.75、3、3.25、3.5、3.75、或4。本发明的方法还公开范围为数百倍的刺激指数。按此,刺激指数值至少为10、20、50、75、100、200、300、或甚至考虑1000。

[0309] 对于潜伏性感染、近期感染、亚临床感染或活动性感染,截止点和刺激指数可以不同。更具体地,在结核分枝杆菌感染的病例中,对于例如肺外结核、肺结核或它们二者、治愈的感染、潜伏性TB而言,截止值和刺激指数可以不同。在HIV、其它协同感染、免疫抑制的存在下发现感染的情况下,截止点和刺激指数的变化水平可以不同。

[0310] 根据疾病存在的流行性或预期的流行性,可以根据疾病的严重性以及测定的结果,患者对该试验是阳性或阴性,来调整截止水平和/或刺激指数以获得所希望的少的假阳性或少的假阴性结果。在肺结核的病例中,本发明提出的分析具有对目前可利用的其它体外试验的明显的优势。由于抗原特异性IP-10的产生高于产生的IFN- γ (参见例如实施例4和实施例17),截止点和刺激指数可以在更宽的范围内进行调整,因此拓宽了诊断的机会。

[0311] 如果具有症状的单个患者需要进行诊断,或者该试验将用于对人群中大量的个体进行筛选,截止水平可以不同。

[0312] 截止点和刺激指数可以建立在结合的IP-10测量结果和其它生物标记物测量结果,例如但不限于白细胞介素-2、干扰素 γ (INF- γ)和/或巨噬细胞趋化蛋白-1(MCP-1)。复合的截止点和/或刺激指数可能导致其它的值,这可以根据本发明的教导进行测定。

[0313] 虽然用来测量这些分析物水平的任何一种已知的分析方法能用于本发明,对本领域技术人员显而易见的是,对各个标记物所使用的分析方法必须与用来对该特定的标记物产生参考数据的方法想法。如果对特定的标记物或者标记物的结合使用了新的分析方法,这基于该方法所产生的数据,将会产生一套新的参考数据。

[0314] 能在可商购得到的电脑程序统计安装包《统计分析系统》(Statistical Analysis System)(由赛仕软件研究所(SAS Institute Inc.)制造并销售),或者通过本领域技术人员已知的其它的多变量判别分析的方法或其它统计软件包或筛选软件上进行多变量判别分析以及其它风险评估。

[0315] 如对本领域技术人员显而易见地,在以上所讨论的任何一种实施方式中,改变阳性试验的风险截止水平或使用不同的前设风险(priori risk),这能应用于人群中的不同小组,可能改变对各个患者的判别分析的结果。

[0316] 在此所描述的稳定性试验提出,IP-10在常规处理下高度稳定(即,冷冻或在室温和低于10℃下储存更长的时间)因此,本发明得出结论,IP-10是用于临床的有吸引力的分析物。在此所示的数据表示,IP-10是用于预后、诊断、监测以及筛选感染病的潜在的重要的标记物。

[0317] 为了确定细胞介导免疫反应性的临床严重程度,用来评估 IP-10 测量的可检测的信号的方法需要参考或参考方法。

[0318] 所述参考还使得还使得能够将分析和方法变化、试剂盒变化、处理变化、将 IP-10 与其它生物标记物结合相关的变化以及其它的与 IP-10 不直接相关或间接相关的变化都考虑在内。

[0319] 在本发明的内容中,属于“参考”是指与数量、质量或类型有关的标准,其它的值和特征可以与之进行比较,例如标准曲线。

[0320] 所述参考数据反应了用于具有细胞介导免疫反应性的受试者(也被称为受影响、暴露的、接种过疫苗的、感染的或生病的)的 IP-10 水平和/或对正常受试者的(也被称为未受影响的、未暴露的、未接种过疫苗的、未感染的或健康的)IP-10 水平。

[0321] 在本发明的一种实施方式中,所述装置选自分析、免疫测定、棒、干棒、电气设备、电极、阅读器(分光光度计读数器(spectrophotometric reader)、红外线读数器(IR-readers)、同位素读数器(isotopic readers)及类似的读数器)组织化学以及整合有参照物、滤纸、可由裸眼观察到的颜色反应的类似的装置所组成的组中。

[0322] IP-10

[0323] 干扰素- γ 诱导蛋白 10(IP-10)或 CXCL10 是一种趋化因子。该 IP-10 基因通过原位杂交比对到 4q21 上。IP-10 表达由干扰素(IFNs,即干扰素- γ (IFN- γ))和非炎症刺激向上调控,并且它在各种组织和细胞类型中的多种 Th1 型非炎症疾病中表达。

[0324] 可以在基因文库(Gene Bank)中登录号 BC010954(gi15012099)下找到人类基因序列。

[0325] 趋化因子是一组小的(接近 8-14kD)大部分为基础的结构相关的分子,它们调节细胞对各种类型的白血球通过 7-跨膜、连接有 G 蛋白的受体的运输。趋化因子还在发育、内环境稳定以及免疫系统作用方面扮演至关重要的角色,并且它们影响中枢神经系统的细胞和参与血管生成和血管生成抑制的内皮细胞。基于 4 种保存的半胱氨酸残基中前两种的布置,趋化因子分为 2 种主要的亚科, α 亚科(CXC)和 β 亚科(CC);这两种趋化因子被 CXC 趋化因子中的一个氨基酸分离,并且接近 CC 趋化因子。基于谷氨酸-亮氨酸-精氨酸序列相邻以及在 CXC 基序的 N-末端的存在或不存在,CXC 趋化因子进一步再细分为 ELR 和非 ELR 型。ELR 型是对中性粒细胞的趋化因子,而非 ELR 型是对淋巴细胞的趋化因子。

[0326] IP-10 抑制了骨髓集落的形成,在或体内具有抗癌活性,是对人体单核细胞和 T 细胞的化学引诱物,并促进 T 细胞与内皮细胞结合。IP-10 是或体内血管再生的有效的抑制剂。IP-10 可以在炎症和肿瘤发生中参与调节血管生成。IP-10 还是 RAS 靶基因,并且大多数的结肠直肠癌中被过度表达。使用核磁共振光谱法能发现,IP-10 通过疏水裂隙(hydrophobic cleft)与 N 末端的 CXCR3 互相作用,所述疏水裂隙由 IP-10 的 N 环和 40s-环区域形成,类似于例如 IL8 的其它趋化因子的互相作用面。发现互相作用的额外的区域由疏水裂隙形成,所述疏水裂隙由 IP-10 的 N 末端和 30s 环形成。提出了一种机理,该机理涉及 30s 环,并且 β 链 2 的结构可能解释 IP-10 与 CCR3 的互相作用和拮抗作用。

[0327] 在肺结核的病例中,已经在淋巴结和肺结核肉芽肿中、TB 患者的胸液中和血清或血浆中、并在经历了免疫重建综合症的 TB-HIV 协同感染中发现了高水平的 IP-10。

[0328] IP-10 水平的测定

[0329] 免疫效应物分子优选为细胞因子,例如但不限于 IP-10。免疫效应物分子的存在或存在水平可以在分子本身的水平下进行测定,或者到基因被表达的程度下进行测定。IP-10 的水平通过传统的分析方法进行测量,例如本领域公知的免疫学方法。

[0330] 可以根据本文的教导,将免疫效应物的测量结果与其它的在基因、RNA 或蛋白质水平的免疫效应物的测量结果进行结合。

[0331] 如以上所述地,免疫效应物分子的检测可以在蛋白质或核酸水平进行。因此,所述免疫效应物分子的存在或存在水平的参考包括直接和间接的数据。例如说,高水平的 IP-10 的 mRNA 是表示 IP-10 水平增加的间接数据。免疫效应物的配体在检测这些分子和 / 或测定这些分子的数量上特别有用。

[0332] 对免疫效应物的抗体特别有用。用来分析本文所设计的方法的技术是本领域公知的,并且包括,例如夹心分析法 (sandwich assay)、xMAP 多元分析 (xMAP multiplexing)、Luminex、ELISA 和 ELISpot。所涉及的抗体包括部分抗体、哺乳类化 (例如人化) 抗体、重组抗体或合成抗体以及杂交链抗体和单链抗体。

[0333] 多克隆抗体和单克隆抗体通过用免疫效应物或者其抗原部分进行免疫而得到,并且任一类型可以用于免疫测定。获得这两种类型的血清的方法是本领域公知的。

[0334] 多克隆血清较次优选,但相对容易制得,通过给合适的实验室动物注射有效量的免疫效应物或其抗原部分,然后收集来自该动物的血清或血浆,并通过任何一种已知的免疫吸附技术将特异性血清分离。虽然通过该方法产生的抗体在实际上用于任何一种类型的免疫测定,但是由于产品潜在的异质性,它们通常次优选。

[0335] 由于能大量制备的能力以及产品的同质性,单克隆抗体在免疫测定中的使用是特别优选的。可以通过本领域技术人员公知的方法进行用于产生单克隆抗体杂交瘤细胞系的制备,所述杂交瘤细胞系通过将无限增殖细胞系和对抗免疫原制备的致敏淋巴细胞进行融合而得到。

[0336] 还能使用特异性抗体在竞争性荧光偏振免疫测定 (competitive fluorescent polarization immunoassay, CFIPA) 中通过直接测量 IP-10 获得检测,或者由二聚诱导荧光偏振 (dimerization induced fluorescence polarization, DIFP) 通过检测干扰素- γ 的同型二聚体化来获得。在任意一种情况下,检测和测定数量将低至或小于 6pg/ml。

[0337] 当将本发明的方法用于所提供的实施例材料中,分析检测的极限为 6pg/ml,做出改进后,该值可以更低。

[0338] 如果样品材料被稀释,在所述样品中的 IP-10 的浓度将降低,当仍然可以检测到 (参见实施例 9)。其它的试验方案和其它的参数将导致其它的数值,这能根据本文的教导而被测定。

[0339] 用来测定生物学标记物例如 IP-10 的技术多种技术以被本领域技术人员所知。免疫效应物的存在或存在水平可以通过 ELISA、Luminex、ELISPOT、基于 mRNA 的技术例如 RT-PCR 或胞内流式细胞术。

[0340] 流式荧光技术 (Luminex)

[0341] 干扰素- γ (IFN- γ) 已经成为在传染病免疫学,特别是 TB 免疫学的 Th1 应答中的黄金标准。由于与开发用于 Quantiferon 商业的 ELISA (参见实施例 10) 相比具有低的灵敏

度,由 Luminex 测定的 IFN- γ 是一种弱标记物。然而,通过 Luminex 轻易地检测到 IP-10,并能因而取代 IFN- γ 作为 Luminex 系统中的研究或筛选工具。

[0342] 在下列的实施例中所提供的数据是通过使用 Luminex 而产生的,这允许用流式细胞术对溶液中分析物进行多元分析。Luminex 使用合适的技术通过结合不同比例的两种荧光染料对在内部对 xMAP 微球体进行彩色编码。每一套小珠都与不同的包被抗体 (capture antibody) 共轭。R-藻红蛋白标记的检测抗体通过测量相对荧光强度允许了发生在微球体表面的抗原-抗体反应的量化。

[0343] 该系统能测量许多小量的样品,并且可以在一个 50 μ l 的样品中同时对高达 100 种不同的分析物进行测量。

[0344] 根据碧欧泉方案 (Biosource protocol) 得到目前的数据。简言之,从单个 IP-10 悬浮的小珠,以及 IFN- γ 试剂盒在预湿润的过滤器 96 平板孔 (plate wells) 中进行结合。用洗涤溶液洗涤小珠两次,并加入孵育缓冲液。

[0345] 样品 (在此 4-50 μ l) 在分析稀释中按 1 : 32、1 : 10、1 : 8 或 1 : 1 进行稀释,并加入到平板上。该平板在室温下,在滴定板振动器 (titer plate shaker) 上以 600rpm 孵育 2 小时。进行两次洗涤后,100 μ l 的检测抗体混合物加入到每个孔中,并将所述平板在滴定板振动器上在室温下培养 1 个小时。洗涤两次后,将 100 μ l 的链霉亲和素-R藻红蛋白溶液 (streptavidin-RPE solution) 加入到每个孔中。最终,孵育 30 分钟并洗涤 3 次后,100 μ l 的洗涤溶液加入到各个孔中,并将平板置于 Luminex 的 XY 平台上。

[0346] 从各个孔中,对最少 100 个分析物特异性小珠进行小珠荧光 (bead-fluorescence) 和 RPE 荧光 (RPE fluorescence) 分析。

[0347] 酶联免疫吸附测定 (ELISA)

[0348] 在下列的一些实施例中所提供的数据是根据碧欧泉协议 (Biosource protocol) 通过使用 ELISA 而产生的。将样品 (5-50 μ L) 加入到预装载有 IP-10 抗体的 96 平底平板的孔中。向所有的孔中加入 50 μ L 的生物素共轭物 (Biotin Conjugate)。所述平板被包覆并且在向孔通气前在室温下培养 3 小时,并用工作洗涤缓冲液 (Working Wash Buffer) 洗涤 4 次。然后将 100 μ l 的稀释的链霉亲和素-辣根过氧化物酶 (Streptavidin-HRP) 加入到所有的孔中,并且盖上所述平板并在室温下孵育 30 分钟。然后在向各个孔中加入 50 μ l 的稳定化的色原体 (Stabilized Chromogen) 之前,向孔内通气并用工作洗涤缓冲液洗涤 4 次,并且将所述平板在室温下避光孵育 30 分钟。最后向各个孔中加入 100 μ l 的停止液 (Stop Solution),并且将平板在 450nm 下在 ELISA 酶标仪上进行读数。免疫色谱试验 (ICT)

[0349] 免疫色谱试验 (Immunochromatographic tests, ICT)

[0350] 试验原则:ICT (例如,侧棒 (lateral stick)) 是一种体外免疫诊断试验,该试验利用了初级抗体 (Ab) 并且 1-4 种对 IP-10 全部特异的二级抗体。所述初级抗体附着在胶体金上并且浸渍到样品垫内,该样品垫具有在固定线路内含有一种二级抗体的通道 (lane)。

[0351] 第一步中,将所孵育的样品加入到所述样品点的左边部分。血清或血浆将流入允许任何 IP-10 存在的所述通道以连接到胶体金标记的初级抗体上。二级抗体在横跨所述通道的隔膜的通道中固定。当将卡封闭时,样品和在所述垫的通道上的被标记的初级抗体与隔膜的末端接触。随后,样品和被标记的初级抗体沿着隔膜通道穿过固定的二级抗体通道而移动。试验诠释:与金标记的初级抗体络合的任意的 IP-10 被隔膜上的二级抗体捕获,并

在通道内发生颜色交换。于是试验被诠释为 a. 在色度的基础上或者 b. 通过比较在应答样品（例如抗原刺激试验材料的血浆，如全血）上进行的和在空白样品上进行的两种试验，从抗原试验中色度的改变中减去空白试验中色度的改变并将该结果与参考进行比较。

[0352] 试验的读出装置也可以使用计算机界面而自动化或半自动化。可以建立这种设备从而使自动化的界面确定通道的色度的改变。

[0353] 感染

[0354] 本发明的一个方法涉及一种方法，其中，抗原特异性 IP-10 在参考水平以上的应答说明该哺乳动物先前由于例如感染阶段而遇到过该抗原或者先前遇到过产生对该抗原的免疫学交叉反应性的其它抗原，所述感染阶段例如是活动性疾病、活动性亚临床感染、近期感染或潜伏性感染或接种疫苗。

[0355] 微生物

[0356] 根据本发明，所述感染可能由微生物所导致，例如但不限于细菌、寄生虫、真菌、病毒、朊病毒和 / 或类病毒。

[0357] 在目前优选的实施方式中，所述微生物选自自由分枝杆菌、革兰氏阳性细菌、革兰氏阴性细菌、李斯特菌、肠球菌、奈瑟菌、弧菌、密螺旋体（梅毒）、包柔氏螺旋体菌、螺旋体、衣原体、逆转录病毒（SIV、HIV-1、HIV-2）、巨细胞病毒、痘病毒、艾伯斯坦 - 巴尔病毒、肠道病毒、麻疹病毒、杆病毒（狂犬病）、风疹病毒（风疹（rubella）、黄病毒（登革热、黄热病）、疱疹病毒、带状疱疹病毒、丙型肝炎和乙型肝炎、利什曼虫、弓形虫、锥虫、疟原虫（恶性疟原虫、间日疟原虫、卵形疟原虫、疟疾）、卡氏肺囊虫（PCP）、冠状病毒（例如严重获得性呼吸道综合症（SARS）、埃博拉或马尔堡以及各种的线虫、吸虫所组成的组中。

[0358] 在更优选的实施方式中，所述微生物选自自由分枝杆菌、利什曼原虫、衣原体、锥虫和血吸虫所组成的组。

[0359] 在其中一种或多种感染是或者曾经是由分枝杆菌引起的情况下，所述分枝杆菌属于结核分枝杆菌复合有机体（complex organisms）（结核分枝杆菌、牛分枝杆菌（*M. bovis*）以及非洲分枝杆菌（*M. africanum*）），分枝杆菌中差别区域（RD1）没有被删除（堪萨斯分枝杆菌、苏加分枝杆菌、海分枝杆菌、转黄分枝杆菌（*M. flavescens*）、胃氏分枝杆菌（*M. gastrii*）），人致病性分枝杆菌（鸟分枝杆菌（*M. avium*）和麻风分枝杆菌（*M. lepra*））以及其它非结核分枝杆菌。

[0360] 因此，在目前优选的实施方式中，所述分枝杆菌为结核分枝杆菌。

[0361] 在其中感染是或者曾经是由于衣原体所导致的情况中，所述衣原体可以选自自由沙眼衣原体、鼠型沙眼衣原体（*C. muridarum*）和猪衣原体（*C. suis*）、肺炎衣原体或鹦鹉热衣原体（*C. psittaci*）所组成的组中。

[0362] 在本发明的一种优选实施方式中，所述衣原体为沙眼衣原体。

[0363] 接种疫苗

[0364] 本发明的一个方法涉及一种方法，其中，抗原依赖 IP-10 在参考水平以上的应答说明该哺乳动物由于对本文所涉及的任一微生物进行了接种疫苗，因而先前遇到过该抗原或者先前遇到过产生对该抗原的免疫学交叉反应性的其它抗原。

[0365] 对建立在基于无活性材料基础上的疫苗的应答可能导致低水平的抗原特异性 IFN- γ 的释放，并且由于 IP-10 大量释放，它能用于检测在临床前、临床试验并在随后的惯

用设定中疫苗的应答。

[0366] 结核

[0367] 结核（通常缩写为 TB）是由结核分枝杆菌细菌导致的传染病，它通常作用在肺部（肺结核）但也能感染体内所有其它的器官，例如总数神经系统（脑膜炎）、淋巴系统、循环系统（粟粒性结核 (miliary tuberculosis)）、生殖系统、骨骼和关节。结核分枝杆菌感染还可以保持无症状阶段，这通常被知晓为潜伏性、休眠的或亚临床 TB 感染。

[0368] 在目前优选的实施方式中，本发明的方法涉及一种诊断并监测各种，例如结核的不同的表现（活动性结核病、活动性显微镜学阳性或显微镜学阴性 TB 感染、潜伏性结核感染以及新近结核感染）的方法。

[0369] 该免疫分析基于通过与存在抗原的细胞（例如单核细胞 / 巨噬细胞）反应的抗原特异性 T 淋巴细胞对所选择的 MTB 的分泌蛋白的肽序列进行应答来评价 IP-10 的产生。这些肽序列由于其免疫原性和它们的特异性而被选择，并且潜在地，能类似地使用其它的肽。

[0370] 为了对诊断具有痰 - 阳性肺结核的患者健康接触的近期感染、为了用潜伏期感染诊断健康、为了在肺结核或肺外结核的情况下监测催治疗的应答，并为了区别潜伏性感染和活动性结核病状态，能用所述方法和试剂盒诊断活动性结核病。

[0371] 衣原体

[0372] 衣原体是一种对于被任何属于衣原体门的细菌所感染的常用术语。沙眼衣原体是引发人眼和生殖器疾病的主要的感染。通常发现衣原体仅在人体细胞内存活，并且是世界上最普遍的通过性传播在人群中的传染之一——美国每年发生大约 4 百万起衣原体感染的病例。不是所有被感染的人表现出感染症状。感染有衣原体的大约全部男性的一半以及全部女性的 3/4 没有症状并且不知道他们被感染了。这种感染能变得严重，但如果及时发现可以通过抗生素而易于治愈。同样重要地，眼睛的衣原体感染是世界上导致可预防的失明最普遍的原因。

[0373] 在目前优选的实施方式中，本发明涉及一种诊断并监测衣原体的方法。

[0374] 该免疫分析基于通过与存在抗原的细胞（例如单核细胞 / 巨噬细胞）反应的抗原特异性 T 淋巴细胞对粗抗原 (crude antigens) 或纯化的抗原（例如但不限于肽）进行应答来评价 IP-10 的产生。潜在地，这些肽序列能由于其免疫原性和它们的特异性而被选择，并且能类似地使用其它的肽。

[0375] 抗原

[0376] 对适于本发明的抗原（也被称为受试抗原和为评价而选择的抗原）的选择取决于本领域技术人员要评价的感染的类型，因此，所选择的抗原是与疾病相关的。例如说，当监测 MTB 感染时，任何可利用的 MTB 抗原可以产生必要的应答并且反之亦然。许多抗原已经用于现有的商业分析中。应该理解的是，上述和下文讨论的与根据本发明的所述受试抗原相关的任何特征和 / 或方面适用于为评价而选择的抗原的类似表达。

[0377] 其中，认为所述感染与结核有关，所述抗原或至少一种抗原选自由 RD-1 抗原、ESAT-6、CFP10、TB7.7、抗原 85 (Ag 85)、牛分枝杆菌热休克蛋白 65 (HSP-65)、抗原 85A (Ag85A)、抗原 85B (Ag85B)、结核杆菌分泌蛋白 51 (MPT51)、结核杆菌分泌蛋白 64 (MPT64)、TB10.4、结核分枝杆菌 8.4 (Mtb8.4)、晶状体球蛋白 (hspX)、Mtb12、Mtb9.9、Mtb32A、磷酸盐转运体系统 -1 (PstS-1)、PstS-2、PstS-3、MPT63、Mtb39、Mtb41、MPT83、71 千

道尔顿、前脑啡肽原 68 (PPE68) 和 LppX 所组成的组。

[0378] 在目前优选的实施方式中,抗原或至少一种抗原选自 ESAT-6、CFP-10、TB 7.7、Ag 85、HSP 65 和 RD-1 抗原所组成的组中。

[0379] 在本发明的另一种实施方式中,所述抗原为 ESAT-6。

[0380] 在本发明的另一种实施方式中,所述抗原为 CFP-10。

[0381] 在本发明的另一种实施方式中,所述抗原为 TB 7.7。

[0382] 在本发明目前优选的实施方式中,所述抗原为 RD-1 抗原。

[0383] 许多研究机构致力于确认由单个传染原严格表达的抗原,所谓的微生物特异性或疾病特异性抗原。在结核分枝杆菌的病例中,特异性抗原在不同的感染阶段中表达,例如但不限于休眠的阶段、潜伏的阶段、活动性的阶段、新近的阶段、肺部的阶段、肺外的阶段、局部的阶段或治愈阶段。

[0384] 可以使用上述抗原进行本发明的方法,从而提供用来确定这些特异性阶段的工具(例如,结核分枝杆菌潜伏性感染)。

[0385] 在优选的实施方式中,当产生应答样品时,可以加入来自同一微生物的多种抗原。通过加入具有不同组织类型优选性的多种抗原,分析的强度增加了。在结核的病例中,ESAT-6、CFP-10 和 TB7.7 蛋白质抗原肽的结合增加了试验覆盖最宽组织类型的可能,并因此提供了在不同的患者人群中的更强并且更可靠的测试结果。

[0386] 其中,所述感染被认为是与衣原体相关的,所述抗原或至少一种所述抗原选自血清型 D 提取物 (Sero var D extract)、主要外膜蛋白 (major outer membrane protein, MOMP)、富含半胱氨酸的外膜蛋白 (cysteine-rich outer membrane proteins, OMPs)、外膜蛋白 2 (OMP2)、OMP3、多态 OMPs (Poly-morphic OMPs, POMPs)、衣原体肺炎的二磷酸腺苷/三磷酸腺苷移位酶、孔蛋白 B 蛋白 (porin B protein, PorBs) 和 CT521 所组成的组中。

[0387] 如从本发明所显示地,感染原可以不同。在本发明的一种实施方式中,所述抗体或至少一种所述抗体选自以下所组成的组中:固定的上鞭毛体 (fixed-epimastigotes)、固定的锥鞭毛体 (fixed-trypomastigotes)、分裂的上鞭毛体 (disrupted-epimastigotes)、分裂的锥鞭毛体 (disrupted-trypomastigotes)、从上鞭毛体纯化的抗原部分、从上鞭毛体半纯化的抗原部分、锥鞭毛体排泄-分泌物抗原 (trypomastigote excretory-secretory antigens, TESA)、显性变异抗原型 (variable antigen type, VAT)、表面可变糖蛋白 (variable surface glycoprotein, VSG)、例如 TS13 的反式唾液酸酶 (trans-sialidase, TS)、无鞭毛体表面蛋白-2 (amastigote surface protein-2, ASP2)、肾膜蛋白-11m (KMP-11m)、直肠腺瘤 (CRA)、Ag30、JL8、T 细胞抗原受体 (TCR27)、Ag1、JL7、H49、TCR39、PEP-2、Ag36、JL9、多抗原肽 (MAP)、胎儿弯杆菌表面蛋白 (SAPA)、TCNA、Ag13、TcD、B12、TcE、JL5、A13、1F8、Tc-24、Tc-28、Tc-40、Cy-hsp70、MR-HSP70、Grp-hsp78、癌胚抗原 (CEA)、C 反应蛋白 (CRP)、SA85-1.1、FCaBP (鞭毛状钙结合蛋白 (flagellar Ca^{2+} -binding protein))、FL-160 (160kDa 的鞭毛表面蛋白 (flagellar surface protein))、以及 FRA (鞭毛重复蛋白抗原 (flagellar repetitive antigen)), 该抗原与锥虫有关。

[0388] 在本发明的优选实施方式中,所述抗原或至少一种所述抗原选自固定的上鞭毛体、固定的锥鞭毛体、分裂的上鞭毛体、分裂的锥鞭毛体、从上鞭毛体纯化的抗原部分、从上

鞭毛体半纯化的抗原部分、锥鞭毛体排泄 - 分泌物抗原 (TESA)、显性变异抗原型 (VAT)、表面可变糖蛋白 (VSG)、例如 TS13 的反式唾液酸酶 (TS)、无鞭毛体表面蛋白 -2 (ASP2)、FCaBP (鞭毛状钙结合蛋白)、FL-160 (160kDa 的鞭毛表面蛋白 (flagellar surface protein))、以及 FRA (鞭毛重复蛋白抗原 (flagellar repetitive antigen)) 所组成的组中。

[0389] 在其中所述感染与血吸虫有关时,所述抗原至少一种所述抗原选自自由分裂的血吸虫卵、排泄 / 分泌糖蛋白 (excreted/secreted glycoproteins, ES)、外被糖蛋白 (tegumental glycoproteins, TG)、可溶性虫卵抗原 (soluble egg antigen, SEA)、可溶性曼氏血吸虫提取物 (soluble extract of *S. mansoni*, SWAP)、钥孔血蓝蛋白 (keyhole limpet haemocyanin, KLH)、RP26、Sj 31、Sj 32、副肌球蛋白 (paramyosin)、Sm62-IrV5、Sm37-SG3PDH、Sm28-GST、Sm14-FABP、PR52- 细丝蛋白、PL45- 磷酸甘油酸酯激酶、PN18- 亲环素、MAP3、Sm23、MAP4、Sm28-TPI、Sm97、鸡传染性贫血因子 (CAA)、结肠癌抗原 (CCA) 以及曼氏血吸虫热休克蛋白 70 (*Schistosoma mansoni* heat shock protein 70) 所组成的组。

[0390] 在本发明的优选实施方式中,所述抗原或至少一种所述抗原选自自由排泄 / 分泌糖蛋白 (ES)、外被糖蛋白 (TG)、可溶性虫卵抗原 (SEA)、可溶性曼氏血吸虫提取物 (SWAP)、钥孔血蓝蛋白 (KLH) 以及 RP26 所组成的组中。

[0391] 对于利什曼原虫,所述抗原或至少一种所述抗原选自自由分裂的鞭毛体、利什曼原虫素、rGBP、rORFF、rgp63、rK9、rK26、rK39、PN18- 亲环素、MAP3、Sm23、MAP4、Sm28-TPI、Sm97、CAA 和 CCA 所组成的组中。

[0392] 事实上,根据本发明,任何一种对进行分析的物种具有抗原特异性的抗原都是有用的。

[0393] 在另一种优选实施方式中,可以将一系列的来源于不同疾病的不同的抗原进行结合以使筛选工具对个体疾病具有低特异性,而对“感染”具有高灵敏度。与例如来自于士兵们在任务过程中被暴露到的微生物 (例如,疟疾、结核、利什曼原虫、血吸虫和 / 或锥虫) 的抗原的调色板 (palette) 结合的试剂盒将使得医生能进行一种快速筛选试验来代替一系列的不同试验。

[0394] 在本发明的另一种优选实施方式中,结合的试剂盒可以含有来自感染器官 (例如引起盆腔炎的奈氏种或衣原体种) 的不同的微生物的抗体,或者含有来自引起常见症状的传染原的抗体 (例如由弯曲菌和志贺氏杆菌感染引起的可治疗的腹泻,可以与由例如轮状病毒引起的不可治疗的腹泻区别开来)。

[0395] 受试者

[0396] 所涉及的“受试者”包括人类或非人类物种,包括灵长类、家畜类动物 (例如绵羊、牛、猪、马、驴、山羊)、实验室试验动物 (例如小鼠、大白鼠、兔子、天竺鼠、仓鼠)、伴侣动物 (例如狗、猫)、鸟类物种 (例如禽鸟、笼鸟 (aviary bird))、爬行动物和两栖动物。因此,本发明能用于人类药物,并能应用于牲畜和兽医学以及野生动物。

[0397] 总概

[0398] 本说明任何对现有技术的涉及不是,也不应该被视为接受该现有技术的任何形式的建议形成了在任何国家的公知常识。

[0399] 本申请中所有引用的专利文献以及非专利文献都通过参考其全部内容而结合于

此。

[0400] 显然地,本发明的一个方面的优选特征和特性可以应用到本发明的其它方面中。本发明可以以其它特定的形式进行实施而不悖其其实质或基本特性。因此,前述的实施方式被考虑为进行全面地阐述而不是对描述与此的发明进行限制。因此本发明的范围在随附的权利要求书中而不是通过以上的描述进行说明,并且通过在此的引用应该包括在权利要求等同的意思和范围内的所有改变。

[0401] 应该理解的是,以上所讨论的与根据本发明的方法相关的任何特征和 / 或适用于类似的方法或诊断。

[0402] 在整个说明书中所使用的单词“含有 (comprise)”,或例如“comprises”或“comprising”的变形将被理解为表示包含了所陈述的要素、整体或步骤或要素、整体或步骤的组,但不排除任何其它的要素、整体或步骤,或者要素、整体或步骤的组。

[0403] 下面,将通过以下的非限制性附图和实施例的方式对本发明进行描述。

附图说明

[0404] 图 1

[0405] 血浆中的 IFN- γ 、IP-10 以及 IFN- γ 之间的比较关系。用生理盐水 (未刺激的) (1a)、结核分枝杆菌特异性抗原 (1b) 或促细胞分裂原 (1c) 中的一种刺激全血 20-24 小时。通过 ELISA (IFN- γ) 或多元操作 (IP-10) 测量血浆上清液中细胞因子的产生。

[0406] 图 2

[0407] 分别由 Quantiferon ELISA 和 Luminex 测得的抗原特异性 IFN- γ 和 IP-10 细胞因子产生 (即,空白抗原 (Ag-Nil)) 之间的比较。单位 (Values) 为 pg/mL。直线表示表 2 中范围的中值。

[0408] 图 3

[0409] 反应了 IP-10 分析的灵敏度和特异性的接收器操作特征曲线 (ROC curve)。X 轴表示 1- 特异性, Y 轴表示灵敏度。

[0410] 图 4

[0411] 抗原特异性 IP-10 和 IFN- γ 的产生之间的比较。IFN- γ 未经稀释而进行测量,而 IP-10 以 1 : 8 稀释进行分析。

[0412] 图 5

[0413] 抗原特异性 FN- γ 和 IP-10/CXCL10 的在 Quantiferon 试验为阴性或不确定的患者内的产生。将 6 位管内 Quantiferon (QFT-IT) 阴性以及 1 位 QFT-IT 不确定的 TB 患者的全血用生理盐水或结核分枝杆菌特异性抗原刺激 20-24 小时。通过 ELISA (IFN- γ) 或多元操作技术 (IP-10) 测量血浆上清液中细胞因子的产生。特异性抗原的产生由被该抗原刺激的样品减去未经刺激的样品来表示。直线表示了中值。(威氏符号秩次检验 (Wilcoxon signed rank test))

[0414] 实施例

[0415] 在下面的实施例中,使用结核分枝杆菌和沙眼衣原体感染作为试验原理的例子来对 IP-10 分析进行证实。

[0416] 一般方法

[0417] 在实施例 1-17 中,我们使用全血刺激来证实所述原理,在实施例 18 中,我们使用纯化的单核细胞 (PBMCs)。

[0418] 全血刺激

[0419] 1. 将体积为 1ml 的肝素化血液抽出到三个真空采血管中 (Cellestis, 澳大利亚), 所述采血管涂敷有

[0420] a) 生理盐水,以产生未受刺激的样品或空白样品 (可互换使用)

[0421] b) 得自蛋白质 ESAT-6、CFP-10 和 TB-7.7 的肽以产生抗原样品 (Ag)

[0422] c) 植物凝集素,以产生促细胞分裂原样品。

[0423] 2. 将上述采血管在 37℃ 下孵育 20-24 小时。

[0424] 3. 将上述采血管以 2000rpm 离心分离 10 分钟

[0425] 4. 收集血浆并在或者低于 -40℃ 以下冷冻

[0426] 分离外周血单核细胞 (PBMCs)

[0427] 1. 通过密度梯度离心 (淋巴细胞分离剂; 奈克明制药 (Nycomed)) 将 PBMCs 从全血中分离,并在液氮中冷冻直到使用

[0428] 2. 将 PBMCs 解冻并在 RPMI 1640 中进行再悬浮,补充加入 1% 的青霉素 / 链霉素、1% 的非必需氨基酸、1% 的谷氨酰胺、1% 的丙酮酸 (pyrovat)、1% 的羟乙基哌嗪乙磺酸 (HEPES)、和 10% 的人 AB 血清 (本地血库,瑞格绍斯佩泰立特 (Rigshospitalet),哥本哈根),

[0429] 3. 通过苯胺黑染色测定细胞的成活力和数量

[0430] 4. 以总体积为 100 μ L 中 1.25×10^5 个细胞 / 孔,在圆底微量滴定板 (能肯 (Nunc)) 上培养上述细胞,一式三份

[0431] 制备沙眼衣原体血清型 D 株提取抗原

[0432] 1. 所述沙眼衣原体血清型 D 株 (UW-3/Cx) 在人宫颈癌细胞 229 (HeLa 229cell) 内繁殖并使用多洗提技术 (multielution technique) 分成 30 窄分子量组分。

[0433] 2. 将 SPG (蔗糖 - 磷酸盐 - 谷氨酸) 缓冲液中的沙眼衣原体血清型 D 在 30,000 下离心分离 30 分钟

[0434] 3. 将沉淀 (Pellet) 以 1 : 1 在无菌水和利姆里还原样品缓冲液 (laemmli-reducing sample buffer) 中进行再悬浮,然后煮沸 5 分钟。

[0435] 4. 重复超声处理后,将悬浮液在 30,000 下离心分离 30 分钟。

[0436] 5. 将悬浮的粗沙眼衣原体血清型 D 株提取物用作为抗原。

[0437] 用血清型 D 抗原刺激 PBMC

[0438] 1. 如以上所描述地将 PBMCs 涂敷在平板上 (plated),并用以下进行刺激

[0439] a. 2 μ g/mL 的血清型 D 抗原以产生抗原样品

[0440] b. 无抗原以产生未被刺激样品

[0441] 2. 将细胞在加湿的空气 (5% CO₂ 和 95% 空气) 中在 37℃ 下进行培养

[0442] 3. 5 天后收集悬浮物用于 IP-10 的定量

[0443] 4. 收集血浆并在或低于 -40℃ 下冷冻

[0444] 生物标记物的测量

[0445] Luminex :

[0446] 在 luminex 平台上并根据碧欧泉方案 (Biosource protocol) 进行 IP-10 和 / 或 MCP-1 和 / 或 IL-2 的测量。

[0447] 1. 来自单个 IP-10、IL-2、MCP-2 和 / 或 IFN- γ 试剂盒的悬浮的小珠在预湿润的过滤器 96 平板孔中进行结合。

[0448] 2. 将所述小珠用洗涤溶液洗涤两次, 并加入孵育缓冲液。

[0449] 3. 将样品在分析稀释液中以 1 : 1、1 : 8、1 : 10 或 1 : 20 进行稀释, 并向所述平板加入 100 μ l。

[0450] 4. 在室温下, 将所述平板在滴定板振动器上以 600rpm 孵育 2 小时。

[0451] 5. 进行两次洗涤后, 100 μ l 的检测抗体混合物加入到每个孔中, 并将所述平板在滴定板振动器上在室温下培养 1 个小时。

[0452] 6. 洗涤两次后, 将 100 μ l 的链霉亲和素-R 藻红蛋白溶液 (streptavidin-RPEsolution) 加入到每个孔中。

[0453] 7. 孵育 30 分钟并洗涤 3 次后, 100 μ l 的洗涤溶液加入到各个孔中, 并将平板置于 Luminex 的 XY 平台上。

[0454] 8. 从各个孔中, 对最少 100 个分析物特异性小珠进行小珠荧光和 RPE 荧光分析。

[0455] IP-10ELISA

[0456] 使用来自碧欧泉 (英杰 (Invitrogen), 美国) 的一步型 ELISA (single steptype ELISA) 进行 IP-10 测量。

[0457] IFN- γ ELISA

[0458] 使用一步夹心型 ELISA (single step sandwich type ELISA) —QuantiferonIFN- γ ELISA (Cellestis, 澳大利亚) 进行 IFN- γ 测量。使用制造商提供的软件分析 IFN- γ 的水平 (版本 2.50)。该 Cellestis ELISA 试剂盒在国际单位 (U) 下操作 (1 单位 /mL 相应于 50pg/mL 的浓度), 在现有的样品中, 将 ELISAIFN- γ 结果表示为 pg/mL。

[0459] Quantiferon 试验 (QFT-IT 试验)

[0460] 用 Quantiferon ELISA 对 IFN- γ 产生进行测量。根据制造商说明, 未被刺激的样品的 IFN- γ 应答从用结核分枝杆菌特异性抗原刺激的样品和在促细胞分裂原样品中的 IFN- γ 应答中减去。如果对于特定抗原的应答 ≥ 17.5 pg/mL (0.35IU/mL) 并 $\geq 25\%$ 的未被刺激的值, 则无论促细胞分裂原刺激的 IFN- γ 应答如何, 认为该 QTF-IT 结果为“阳性”; 如果对特定抗原的应答 < 17.5 pg/mL (0.35IU/mL) 并且促细胞分裂原刺激的 IFN- γ 应答 ≥ 25 pg/mL (0.5IU/mL), 则认为该 QTF-IT 结果为“阴性”。如果对特定抗原的应答 < 17.5 pg/mL (0.35IU/mL) 并且促细胞分裂原刺激的 IFN- γ 应答 ≤ 25 pg/mL (0.5IU/mL); 或者在未被刺激样品中的 IFN- γ 应答 ≥ 400 pg/mL (8IU/mL), 而不考虑抗原特异性或者促细胞分裂原刺激的应答, 认为该 QTF-IT 结果为“不确定的”。

[0461] 实施例 1

[0462] 通过来自感染有结核分枝杆菌的患者的具有结核分枝杆菌特异性抗原的全血刺激而诱导高水平的血浆 IP-10。

[0463] 对来自丹麦 ($n = 2$) 和几内亚比索 ($n = 9$) 的 12 位具有痰阳性肺结核患者和 11 位健康的非 TB 暴露的丹麦对照 (年轻的医生、来自希维杜尔医院 (Hvidovre Hospital) 的传染病部门和临床研究单位的研究人员和学生) 的全血进行测试。没有患者是 HIV 阳性。

该研究被哥本哈根和弗雷德里克斯堡公社 (Copenhagen and Frederiksberg Commune) 的伦理委员会以及几内亚比索的伦理委员会所证实。

[0464] 结果

[0465] 通过 Luminex IP-10、Luminex IFN- γ 或商业的 Quantiferon-IFN- γ ELISA 测得的用空白、抗原或促细胞分裂原孵育的全血样品的血浆中 IFN- γ 和 IP-10 的水平 (中值和范围) 列于表 1。

[0466] 用结核分枝杆菌特异性抗原孵育之后 IP-10 的产生与患者中的结核分枝杆菌感染强烈相关;用感染结核分枝杆菌的患者的结核分枝杆菌特异性抗原进行刺激过程中,诱导了全血培养物的血浆中非常高的 IP-10 水平,1025pg/ml (范围:497.3-2080.4pg/ml),而在 11 位没有已知接触或者信号感染有结核分枝杆菌的健康的丹麦个体 (对照) 的全血培养物中,发现 IP-10 水平非常低,为 40.4pg/ml (范围:19.7-158.8)。这两组之间的差别非常显著, $p < 0.0001$ 表示 IP-10 释放确实为抗原诱导。

[0467] 1024pg/ml (范围:497-2080pg/ml) 的抗原刺激的 IP-10 的量极大地高于通过 ELISA 测定的 IFN- γ 的 223.5 (99-1283pg/ml) 和 Luminex 90.7pg/ml (37-464pg/ml) ($p = 0.01$ 和 0.001) 的水平。

[0468] 与 IP-10 相比,极大降低的 IFN- γ 血浆水平是通过 Qunatiferon-ELISA 所测定的,但是在 TB 感染或非 TB 感染之间的差别仍然显著。通过 Luminex 测定的 IFN- γ 甚至比通过 QFT-IFN- γ ELISA 测定的 IFN- γ 更低,并将因此不再进一步讨论。

[0469] 结论:P-10 是对结核分枝杆菌的高度特异性标记物,当全血来自用结核分枝杆菌特异性抗原刺激感染的人时。由于 IP-10 的高水平释放,它能更便于进行测量,并且具有极大的潜力作为更加灵敏的标记物。

[0470] 表 1

[0471]

在生理盐水、抗原或促细胞分裂原刺激的全血的血浆中产生的 IFN- γ 和 IP-10 (pg/ml) ^a , 所述全血来自:		
	对照 (n=11)	TB 患者(n=12)
IFN-γ (ELISA)		
生理盐水	8.5 (6.5-11.5)	10.3 (6.5-134.5)
抗原	8.9 (5.0-14.0)	223.5 (99.0-1283.0) ^b
促细胞分裂原	1613.0 (45.5-1798.5)	272.8 (31.5-1750.5)
IFN-γ (多元)		
生理盐水	5.0 (5.0-11.5)	5.0 (5.0-70.2)
抗原	5.0 (5.0-11.8)	90.7 (37.3-464.2) ^b
促细胞分裂原	291.9 (5.0-2980.7)	160.9 (5.0-2913.4)
IP-10		
生理盐水	27.1 (17.7-140.6)	150.9 (61.1-991.9) ^c
抗原	40.4 (19.7-158.8)	1025 (497.3-2080.4) ^b
促细胞分裂原	993.5 (164.0->2800)	843.0 (384.4-2587.9)

[0472] 表 1. 全血培养物中的 IFN- γ 和 IP-10 的产生

[0473] 全血用生理盐水 (未被刺激)、结核分枝杆菌特异性抗原或促细胞分裂原进行刺激 20-24 小时。通过 ELISA (IFN- γ) 和多元 (IFN- γ , IP-10) 测量产生的细胞因子。^a 值是中位数 (范围)。^b 是显著辨别 ($P < 0.0001$)。^c 是显著差别 ($P < 0.0005$)。^d 为显著差别 ($P < 0.008$)。克鲁斯凯-沃利斯检验 (Kruskal-Wallis test)。

[0474] 实施例 2

[0475] 在未被刺激的全血培养物 (空白样品) 中提高的 IP-10 自发性释放, 该全血来自具有活动性 TB 感染的患者; IP-10 作为对活动性疾病的标记物。

[0476] 如从表 1 中可以看出, 与健康对照相比 (27.1 pg/ml (17.7-140.6)) $p = 0.0005$, 在未被刺激的全血样品 (空白) 中 (150.9 pg/ml (61.1-991.9)) 具有活动性的肺结核患者具有 5.6 倍更高的 IP-10 血浆水平。在具有活动性肺结核的来自几内亚比索和丹麦患者之间, 在空白血浆中的 IP-10 没有显著的差异 ($p = 0.67$)。

[0477] 结论: 这说明了决定与抗原刺激的 IP-10 释放结合的自发性 IP-10 释放能用于区别健康个体和具有活动性 TB 的患者。

[0478] 实施例 3

[0479] IFN- γ 和 IP-10 释放之间的关系

[0480] IFN- γ 和 IP-10 在全血培养物中的释放之间具有有力的联系, 但是 IP-10 具有更大的强度。在空白刺激、抗原刺激或促细胞分裂原刺激后, 个体对 IP-10 进行应答, 并且

相应的 ELISA IFN- γ 在图 1a-c 中示出。在 IP-10 和 ELISA IFN- γ 在抗原刺激的全血的血浆的水平之间具有有力的联系 (斯皮曼 (spearman) $r = 0.87$, 95% C. I. $0.71-0.95$, $p < 0.0001$) (图 1b), 并在促细胞分裂原刺激的全血的血浆中的水平也有联系, 虽然不再相同的水平上 ($r = 0.54$, 95% C. I. $0.15-0.78$, $p = 0.008$) (图 1c)。

[0481] 结论: IP-10 和 IFN- γ 在全血培养物中的释放相关联, 但是 IP-10 具有更高的强度。这使得在体外 TB 试验中 IP-10 作为比 IFN- γ 更好的标记物。

[0482] 实施例 4

[0483] 抗原特异性 IP-10 的产生比抗原特异性 IFN- γ 的产生要更高

[0484] 为了确定对存在于培养物中的抗原进行应答所释放的细胞因子的量 (即, 抗原特异性 (Ag-特异性))。抗原特异性细胞因子应答被计算为 Δ 值 (deltavalue) (=在抗原刺激的全血培养物中的细胞因子的产生减去未被刺激的全血培养物的血浆中释放的量)。该 Δ 值允许将抗原特异性 IFN- γ 与 IP-10 细胞因子的产生进行比较。如图 2 所示, IP-10 分析测量到比抗原特异性 IFN- γ (216.5pg/ml (80.5-1273.0pg/ml)) $p = 0.006$ (曼-怀二氏检验 (Mann-Whitney)) 更高的抗原特异性 IP-10 的值 (870.4pg/ml (260.5-1575.9pg/ml))。中值和范围列于表 2 中。

[0485] 结论: IP-10 以更高量释放 ($p = 0.006$), 因此 IP-10 易于测量并是比 IFN- γ 更好的标记物。

[0486] 表 2

[0487]

	对照 (n=11)	TB (n=12)	P-值
INF- γ , Quantiferon Elisa (pg/ml)			
空白抗原, 中位数 (范围)	-0.5 (-3.5-3.5)	216.5 (80.5-1273.0)	<0.0001
IP-10, Luminex (pg/ml)			
空白抗原, 中位数 (范围)	10.8 (1.1-27.6)	870.4 (260.5-1575.9)	<0.0001

[0488] 表 2. 分别通过 Quantiferon ELISA 和 Luminex 测得的抗原特异性 INF- γ 和 IP-10 细胞因子产生的比较 (克鲁斯凯-沃利斯检验)。

[0489] 实施例 5

[0490] IP-10 分析的非常高灵敏度和特异性

[0491] 使用 TB 作为试验原理的例子证实了 IP-10 分析的非常高的灵敏度和特异性。本发明所描述的 IP-10 分析的高灵敏度和特异性使用基于抗原特异性 IP-10 (抗原刺激的减去空白) 的值的水平的 ROC 曲线分析进行测定。目前的 ROC 曲线分析建立在实施例 1 中所描述的 12 位 TB 患者和 11 位健康对照的基础上。在图 3 中证实了 IP-10 试验完美地将具有活动性肺结核和健康对照分隔开来。在该试验中, IP-10 试验具有 1.0 的曲线下面积 (Area Under the Curve, AUC)。

[0492] 结论: IP-10 分析用于结核分枝杆菌感染的诊断表现出 100% 的灵敏度和 100% 的特异性, 这是比目前用于体外 TB 试验中更好的性能。在此, IP-10 试验能清楚地区分具有或不具有肺结核感染的患者区别开来。建立在这种有限的材料的基础上, 能够将截止点设

定在 27.6pg/ml 到 260.5pg/ml 之间,并得到完全的分离。

[0493] 实施例 6

[0494] IP-10 是用于免疫抑制下潜伏性 TB 的有效标记物

[0495] 用空白、一种结核分枝杆菌特异性抗原 (ESAT6) 或促细胞分裂原 (PHA) 刺激来自 6 位具有类风湿性关节炎 (RA) 的正接受皮质类固醇和氨甲蝶呤©的患者的全血。使用以上描述的 Luminex 测量上清液中的 IP-10 的浓度。患者 1-3 为已知的 Quantiferon 试验阴性并且患者 4-6 为 Quantiferon 试验阳性。

[0496] 如表 3 中所示,所有的患者尽管免疫抑制,都对阳性促细胞分裂原对照展开的高水平的 IP-10 应答。在所有具有潜伏性 TB (阳性 Quantiferon 测试) 的患者中观察到了高水平的 ESAT6 刺激的 IP-10 (范围 668-2800pg/ml)。总而言之,基于 IP-10 的试验能用于诊断具有免疫抑制的患者中的潜伏性 TB 感染。

[0497] 表 3

[0498]

患者	QFT 试验	空白	ESAT6	促细胞分裂原
1	-	35	184	1141
2	-	87	95	2800
3	-	38	47	2800
4	+	34	2800	1589
5	+	63	1605	2800
6	+	31	668	1393

[0499] 表 3. 6 位具有类风湿性关节炎的患者用空白、ESAT-6 (用于 Quantiferon 试验中的一种抗原) 或促细胞分裂原进行刺激,通过 Luminex 测量 IP-10。前三位患者为 Quantiferon 试验阴性并且后三位为 Quantiferon 试验阳性。所有的患者都没有活动性的 TB 疾病症状,但忍受并经历对严重的 RA 的大量的免疫抑制药物治疗 (用于生物治疗,即, TNF- α 阻断剂)。

[0500] 实施例 7

[0501] IP-10 作为已知在年轻时暴露在 TB 下的健康人中的潜伏性 TB 的标记物

[0502] 使用以上描述的方法对两位已知在年轻时暴露在 TB 下的人 (RV 和 AKA), 已证实 PPD 转化并且没有肺结核化学预防也没有并存病 (co-morbidity) 测试 IP-10 应答性。从以前的实现已知接收器为 Quantiferon 阳性。这两位试验人员与强抗原 (ESAT-6) 反应,特异性 IP-10 应答 (302.9pg/ml-916.1pg/ml) 参见表 9。试验人员 RV 每两个月试验两次,试验结果有较好的重复性 (数据未示出)。

[0503] 结论: IP-10 为用于潜伏性肺结核感染的有力的标记物

[0504] 表 4

[0505]

患者	QFT 试验	空白	抗原 (仅 ESAT6 刺激)	促细胞分裂原
AKA	+	22.5	325.4	631
RV	+	10.4	926.5	491.5

[0506] 表 4. 对两位已知在年轻时暴露在 TB 下的健康患者进行肺结核抗原应答 (ESAT6) 试验。

[0507] 实施例 8

[0508] 在结合有抗原特异性 IP-10 释放的自发性 IP-10 水平能将具有或不具有潜伏性 TB 感染的健康人从具有活动性 TB 的患者进行区分。

[0509] 在实施例 6 (表 3) 中, 显示了自发性 (空白) IP-10 水平在潜伏性肺结核感染 34pg/ml (范围为 31-63pg/ml) 和具有类风湿性关节炎的未感染患者 (38pg/ml (范围 35-87pg/ml)) 中都低。这些水平和在未感染健康供给者 (27.1pg/ml (范围 17.7-140.6pg/ml), 表 1) 以及潜伏性感染的供给者 (22.5-10.4pg/ml, 表 4) 中相似地低。如果将所有的没有活动性肺结核的患者集合起来, 并且将这些低水平与具有活动性 TB 的患者中所发现的自发性 IP-10 释放的高水平 (150.9pg/ml (范围 61.1-991.9)) (表 1) 相比, 发现了高度显著的差异性 ($p < 0.0001$, Mann Whitney)

[0510] 结论: 自发性和抗原特异性 IP-10 释放的结合能够用于区分活动性肺结核感染和潜伏性肺结核感染。

[0511] 实施例 9

[0512] 可以进行血浆样品的稀释而不会损失 IP-10 测试的灵敏度

[0513] 样品的稀释是通过加入稀释溶液逐步降低浓度。已试验如果将孵育后的血浆样品进行稀释, 成倍地干扰了具有高和低 IP-10 浓度的血浆样品之间关系, 并且这种稀释影响了 IP-10 分析的灵敏度。将样品在由碧欧泉 Luminex 试剂盒 (Biosource Luminex) 提供的试验稀释液中进行稀释。

[0514] 如表 5 所示地, 样品的稀释导致了在抗原和促细胞分裂原刺激的全血的血浆中以及未被刺激的 (空白) 全血血浆中 IP-10 水平逐步的降低。

[0515] 表 5

[0516]

IP-10			
	稀释因子	患者 A	患者 B
空白	1:2	22.5	10.4
	1:4	11.7	5.2
	1:8	4.4	2.9
	1:16	1.3	1.3
抗原	1:2	631	491
	1:4	430	327
	1:8	396	197
	1:16	277	130
促细胞分裂原	1:2	325	927
	1:4	225	541
	1:8	139	438
	1:16	89	326

[0517] 表 5. 来自空白、抗原和促细胞分裂原刺激的全血的血浆在分析稀释液中以 1 : 2 至 1 : 16 进行稀释,并且使用 using Luminex 分析 IP-10 水平。

[0518] 在表 5 中发现甚至在样品被稀释了 16 倍之后,抗原特异性 IP-10 浓度仍保持非常高 (275pg/ml 和 128pg/ml)。

[0519] 图 4 表示了由 7 位对照和 8 为结核病患者对抗原特异性 IFN- γ 和 IP-10 进行试验的应答。对样品进行在 1 : 8 倍稀释后,测量抗原特异性 IP-10 的产生,并且在未稀释的样品中测量 IFN- γ 应答。再次发现,高度特异性的 IP-10 值说明 IP-10 是用于结核分枝杆菌感染 ($p = 0.0003$),甚至在 1 : 8 倍的稀释下的有力的标记物。此外,按 1 : 8 稀释的 IP-10 值 (中位数 1097pg/ml (范围 225-3045pg/ml)) 比未稀释样品材料所分析的 IFN- γ 要高 (中位数 269pg/ml (范围 81-1273pg/ml)) $p = 0.014$ (威氏配对符号秩次检验 (Wilcoxon matched pairstest))。

[0520] 这些结果证实了 IP-10 是非常有利的用于诊断分析的标记物,并且该 IP-10 试验能用于其中样品材料非常稀少的试验设备中。这开拓了对 IP-10 试验的全范围的应用,其中在仅能获得非常少量的样品材料情况下可以对样品进行稀释 (在稀释之前或之后) (可直接地应用于例如用于具有非常低血容量的婴儿的商业产品)。

[0521] 结论:这证明了可以对血浆样品进行稀释而不会损失 IP-10 的灵敏度。

[0522] 实施例 10

[0523] IP-10 比 IFN- γ 更灵敏,并且改进了肺结核感染在体外的诊断

[0524] 为了探究 IP-10 是否具有潜能以提高目前的 QFT-IT 试验的灵敏度,对 IP-10 在具有阴性或不确定的 QFT-IT 实验结果的肺结核患者中的应答进行了试验 (关于患者特性和个体测量参见表 6)。这些患者,换而言之都是在 IFN- γ 试验中的假阴性。图 5 表示了

在 7 位具有 TB 和阴性或不确定 QFT-IT 试验的患者中的抗原特异性 IP-10 和 IFN- γ 应答。由 QFT-IT ELISA 测定的抗原特异性 IFN- γ 应答的范围为 0-12.8pg/ml, 反而抗原特异性 IP-10 应答的范围为 0-532pg/ml。这 7 位患者中, 3 位也是具有抗原特异性应答低于 10pg/ml 的 IP-10 无应答, 然而其它 4 位患者以 IP-10 水平为 318pg/ml (范围 196-532pg/ml) 的中值进行应答。这 4 位具有阴性 QFT-IT 试验和阳性 IP-10 应答的患者中, 两位是 HIV 共感染分别有 CD4 细胞计数 32 个细胞/ μ l 和 300 个细胞/ μ l。促细胞分裂原特异性 IP-10 释放在所有的供给者中都高, 从 394pg/ml 到 2800pg/ml。这些令人惊讶的发现强调了基于 IP-10 的体外试验与基于 IFN- γ 的试验相比所增加的灵敏度。

[0525]

供试者 编号	国家 ^a	年龄 (岁)	诊断 ^b	显微镜方法 /培养物	HIV	CD4 (细胞/ μ l)	IFN- γ (pg/ml) ^c		QFT-IT ^d 结果		IP-10(pg/ml) ^e		IP-10 结果 ^e
							生理盐水	抗原	生理盐水	抗原	生理盐水	抗原	
1	GB	50	pTB	+/n.d. ^g	阳性	300	8	7	32	72	383	520	阳性
2	GB	45	pTB	+/n.d.	阳性	333	13	13	596	97	106	757	阴性
3	GB	50	pTB	+/n.d.	阳性	n.d.	7	10	1446	98	107	2800	阴性
4	DK	39	epTB	+/+	阳性	767	3	2	1051	29	39	2800	阴性
5	DK	36	pTB	+/+	阴性	n.d.	38	44	249	716	1040	2800	阳性
6	DK	41	pTB	+/+	n.d.	n.d.	7	20	291	31	227	556	阳性
7	DK	26	epTB	+/+	阳性	32	20	28	30	301	834	394	阳性

表 6. 对具有活动性 TB 和阴性或不确定 QFT-IT 实验结果的患者进行 IP-10 应答试验。

a GB-几内亚比索 (Guinea Bissau); DK-丹麦

b pTB-肺结核、epTB-肺外结核

c 用生理盐水、结核分枝杆菌特异性抗原 (ESAT-6、CFP-10 和 TB7.7) 或者促细胞分裂原 (PHA) 中的一种刺激全血 20-24 小时。通过 ELISA (FN- γ) 和多元法 (IP-10) 测量趋化因子的产生

d 根据制造商说明, 阳性 QFT-IT 应答定义为在空白应答之上的 17.5 pg/ml 的抗原特异性应答

e 阳性 IP-10 应答被定义为任意地基于 11 位健康对照平均结果+3 标准品偏差的中值 (来自实施例 4 的患者), 在空白应答之上 36 pg/ml 的抗原特异性 IP-10 应答

g n.d.—未进行

h 不确定的

[0526] 实施例 11

[0527] 强烈的抗原特异性 IP-10 应答可以在短期和长期的孵育中产生

[0528] 在表 7 中,我们列出了来自典型的 TB 患者的在 6-120 小时的孵育下检查的未被

刺激的和抗原刺激的应答。如从表 7 中所示,能够在非常短的孵育时间内用抗原刺激诱导 IP-10 应答。在 6 小时产生 $> 1\text{ng}$ 的应答并且在 120 小时的孵育过程中保持了 3-6ng 的非常高的应答。这些发现证实了 IP-10 测试的性能非常坚固并且能在非常短 (< 6 小时) 和非常长的孵育时间内进行。

[0529] 表 7

[0530]

时间 小时	IP-10 (pg/ml)	
	生理盐水	抗原
6	93	1173
12	117	3467
24	93	5467
48	96	5867
120	80	6133

[0531] 表 7. 来自典型的 TB 患者的在 6-120 小时的孵育下检查的未被刺激的 (生理盐水) 和抗原刺激的应答。

[0532] 实施例 12

[0533] 可以在孵育温度范围下产生强抗原特异性 IP-10 应答

[0534] 如从表 8 中可以看出的,能够在宽范围的温度下用抗原刺激诱导 IP-10 应答。在 30°C 下产生 $> 200\text{pg/ml}$ 的抗原特异性 IP-10,表明在 30°C 以下的孵育是可能的,并且在温度范围为例如 $30-37^{\circ}\text{C}$ 下的孵育将产生有力的抗原特异性应答。

[0535] 表 8

[0536]

温度 ($^{\circ}\text{C}$)	生理盐水	抗原
20.0	8	6
30.0	4	221
37.0	5	852

[0537] 表 8. 来自典型 TB 患者的在 $20-37^{\circ}\text{C}$ 下 24 小时孵育检查的未被刺激的或抗原刺激的应答。IP-10 的值为 pg/ml 。

[0538] 实施例 13

[0539] 少量的全血能在孵育前进行稀释并仍产生强烈的 IP-10 应答

[0540] 1ml ($1:0$)、 0.5ml ($1:1$) 和 0.1ml ($1:10$) 的全血的样品在 RPMI-1640 上稀释到总体积为 1ml 。稀释后的全血在 QFT-IT 试管内刺激 24 小时。未对数值对稀释因子进行修正。如表 9 所示地,能够在进行孵育前在 RPMI-1640 上对全血进行稀释,并仍然产生 $> 80\text{pg/ml}$ 的抗原特异性 IP-10 应答。这说明了能进行进一步的稀释并且能开发使用非常少量的血或细胞的试验试剂盒。

[0541] 表 9

[0542]

稀释	N (未被刺激)	A (抗原刺激)
1:0	93	5467
1:1	40	2933
1:10	13	93

[0543] 表 9. 使用小等分量的来自典型 TB 患者全血在 RPMI-1640 上稀释后的未被刺激的或抗原刺激的应答。IP-10 的值为 pg/ml。

[0544] 实施例 14

[0545] 在 25℃ 下 IP-10 的稳定性

[0546] 在分析前, 将由 PHA 刺激的来自四位供给者全血得到的血浆等分量在 25℃ 下储存 1/2 小时、1 小时、2 小时、4 小时、8 小时或 24 小时。从表 10 可以显然看出, IP-10 是非常稳定的分子, 它们甚至在 25℃ 下放置 24 小时也不会分解。

[0547] 表 10

[0548]

		供给者 1	供给者 2	供给者 3	供给者 4
在 25℃ 下的时间	0 小时	63	769	482	127
	½ 小时	57	649	471	115
	1 小时	72	754	461	116
	2 小时	68	728	438	115
	4 小时	62	727	487	126
	8 小时	66	693	459	137
	24 小时	77	763	455	149

[0549] 表 10. 在 25℃ 下的 IP-10 稳定性 (以 pg/ml 进行测量)。

[0550] 实施例 15

[0551] 在 5℃ 下 IP-10 的稳定性

[0552] 在分析前将由 PHA 刺激的来自四位供给者全血得到的血浆等分量在 5℃ 下储存 12 小时、24 小时、72 小时、144 小时或 216 小时 (9 天)。从表 11 可以显然看出, IP-10 是非常稳定的分子, 它们甚至在 5℃ 下放置 216 小时 (9 天) 也不会分解。

[0553] 表 11

[0554]

		供给者 1	供给者 2	供给者 3	供给者 4
在 25℃ 下的时间	0 小时	63	769	482	127
	12 小时	71	646	丢失	134
	1 天	69	664	501	144
	3 天	78	784	539	166
	6 天	81	883	495	187
	9 天	93	728	520	183

[0555] 表 11. 在 5℃ 下的 IP-10 稳定性

[0556] 实施例 16

[0557] 在冷冻融化循环中 IP-10 的稳定性

[0558] 在分析前将由 PHA 刺激的来自四位供给者全血得到的血浆等分量进行 5 次 (×5) 的冰冻 (-80℃) 然后解冻。从表 12 可以显然看出, IP-10 是对冰冻 / 解冻非常稳定的分子, 它们甚至在 5 次冻融循环下也不会分解。

[0559] 表 12

[0560]

		供给者 1	供给者 2	供给者 3	供给者 4
冻融循环	×0	63	769	482	127
	×1	66	879	388	131
	×2	74	793	513	122
	×3	70	795	486	126
	×4	65	952	459	126
	×5	80	746	483	142

[0561] 表 12. IP-10 的冻融稳定性

[0562] 实施例 17

[0563] IP-10 作为诊断生物标记物是不依赖于平台的

[0564] 不仅通过 Luminex 能测量 IP-10 水平, 在实施例 17 中对来自 4 位具有活动性 TB 的患者和 4 位健康对照的样品使用 ELISA 技术进行测量 (碧欧泉 (Biosource))。

[0565] 如从表 13 中可以理解的是, 全部 4 位患者产生了高于 457pg/ml 的抗原特异性 IP-10, 而对照组均产生低于 13pg/ml 的 IP-10。

[0566] 表 13

[0567]

	抗原特异性 IP-10 (pg/ml)
对照 1	9
对照 2	13
对照 3	0
对照 4	0
患者 1	457
患者 2	626
患者 3	719
患者 4	620

[0568] 表 13. 从 4 位对照和 4 位患者通过 ELISA 技术测得的抗原特异性 IP-10 的产生。

[0569] 实施例 18

[0570] 将 IP-10 测量结果与其它已知的生物标记物进行结合以产生更强的结合的标记物,并增加阳性应答的数量

[0571] 由于未知的原因,某些个体在抗原激活后对某一种生物标记物应答强烈而对另一种其次的抗原激发不应答。例如某些个体可能不表现 IP-10 或 IFN- γ 应答,或仅产生非常低水平的 IP-10 或 IFN- γ 。在这种情况下,同时测量这两种、三种、四种或更多种的生物标记物将增加分析的灵敏度并增加阳性应答的数量。通过结合 IP-10 和例如 IFN- γ 的测量结果,因此能够做出较少受到单个标记物无反应影响的诊断预测。

[0572] 一种实现这种结合的生物标记物策略的方法参见表 15,其中 IP-10 和来自表 6 的 Quantiferon 按以下模型 (matrix) 进行结合:如果患者对至少一种试验反应阳性,则认为该患者被感染。在所列出的实施例中,没有通过 IP-10 试验为阳性的阴性 QFT-IT 应答。

[0573] 表 14

[0574]

患者 nr	QFT-IT 结果	IP-10 结果	结合的 QFT-IT/IP-10 结果
1	阴性	阳性	阳性
2	阴性	阴性	阴性
3	阴性	阴性	阴性
4	阴性	阴性	阴性
5	阴性	阳性	阳性
6	阴性	阳性	阳性
7	不确定	阳性	阳性

[0575] 表 14. 将 QFT-IT 和 IP-10 试验结果进行结合,并阐述为如果患者在至少一种测试为阳性,则认为该患者被感染。对于 IP-10 试验的截止点定义在空白相应之上的 36pg/ml 的抗原特异性 IP-10 应答,这种应答任意地基于在 11 位健康对照平均结果 +3 标准偏差 (实施例 4 中的患者)。

[0576] 另一种构建结合的生物标记物的更复杂的方法参见表 16。抗原特异性 IP-10 和 IFN- γ 应答通过加法和乘法而结合。对 7 位未暴露的对照和 8 位具有活动性 TB 的患者进行评估。从表 14 看出抗原特异性 IP-10 和 IFN- γ 应答的中位值和范围,以及这种相加或相乘后的 IP-10 和 IFN- γ 的中位值和范围。通过加法在最高应答对照和对低应答患者之间的跨度得到增加对 IFN- γ 为从 62pg/ml,并且对 IP-10 为从 1727pg/ml,到 1863pg/ml,并且通过乘法到 164642 (pg/ml)²。这种通过乘法在跨度上的令人意外的斯塔克增加 (stark increase) 还增加了相对倍数差别,基于难以置信的 379274 倍平均值,这是与具有 619 倍的在患者和对照之间的差别抗原特异性 IP-10 或者具有 1074 倍差别的 IFN- γ 相比。

[0577] 表 15

[0578]

		抗原特异性 IP-10	抗原特异性 IFN- γ	加法	乘法
对照 n=7	中位值	0	0	2	2
	最小值	0	0	0	0
	最大值	63	2	62	62
患者 n=8	中位值	8779	215	9074	2019761
	最小值	1800	64	1865	164704
	最大值	24355	1018	25373	25146884

[0579] 表 15. 抗原特异性 IP-10 和抗原特异性 IFN- γ 相加或相乘以构建 IP-10/IFN- γ 生物标记物的结合。将小于 0 的抗原特异性测量结果标准化到 0。

[0580] 实施例 19

[0581] 使用 IP-10 分析对沙眼衣原体感染的诊断

[0582] 从来自 7 位具有沙眼衣原体感染的患者和 7 位没有衣原体感染记录史的供给者中分离 PBMC。将 PBMC 在 5 天培养物中进行刺激,并使用 luminex 分析上清液中的 IP-10 生成以及使用 ELISA 分析 IFN- γ 生成。

[0583] 从表 16 可以看出通过用沙眼衣原体血清型 D 提取物抗原刺激来诱导高水平 ($> 0.5\text{ng/ml}$) 的 PBMC 培养物上清液 IP-10,所述沙眼衣原体血清型 D 来自忍受沙眼衣原体生殖器感染的患者。显然地,一些对照对这种非特异性刺激进行应答,但是应答水平较低。有 $> 0.5\text{ng/ml}$ 的高抗原特异性 IP-10 产生。

[0584] 综上, IP-10 是一种用于沙眼衣原体感染的新颖的诊断生物标记物。

[0585] 表 16

[0586]

		IP-10 (pg/ml)			IFN- γ (pg/ml)		
		空白	抗原	抗原特异性	空白	抗原	抗原特异性
对照	对照 01	0	252	252	128	2184	2056
	对照 10	45	14	-31	148	146	-2
	对照 18	226	820	594	0	474	474
	对照 20	282	998	716	4	2514	2510
	对照 25	66	1240	1175	30	296	266
	对照 28	0	2	2	40	112	72
	对照 31	10	4	-6	84	162	78
	中位数	45	252	252	40	296	266
患者	患者 01	14	2472	2458	0	7808	7808
	患者 03	2	1449	1446	84	2976	2892
	患者 04	498	3725	3227	10	8206	8196
	患者 05	13	1317	1304	36	7516	7480
	患者 12	21	4707	4686	0	10214	10214
	患者 18	1	503	502	4	6264	6260
	患者 02	58	1680	1621	10	4016	4006
	中位数	14	1680	1621	10	7516	7480

[0587] 表 16. 在 PBMC 中培养 5 天后空白、抗原以及抗原特异性的 IP-10 水平

[0588] 参考文献

[0589] 阿布拉莫 C, 美加戈登 KE, 加西亚 D, 弗兰肯 KL, 克莱因 MR, 科克 AJ 等人著, 在巴西肺结核患者中的由干扰素 γ 诱导的单核因子以及 IFN- γ 对结核分歧杆菌 ESAT-6 和 CFP-10 融合蛋白的应答. 微生物学 (Abramo C, Meijgaarden KE, Garcia D, Franken KL, Klein MR, Kolk AJ et al. Monokine induced by interferon gamma and IFN-gamma response to a fusion protein of Mycobacterium tuberculosis ESAT-6 and CFP-10 in Brazilian tuberculosis patients. Microbes)

[0590] 布盖瑞特, A·G·卡瑟兰, V·马丁内斯、C·拉斯科, V·德凯, B·奎尔, E·维克特, P·H·拉格朗日, D·塞雷尼和 B·奥特朗. 2006. 在肺结核和 HIV 共同感染患者中的结核菌素特异性 Th1 应答诱导免疫重建综合症的探索. 艾滋病 20 :F1-F7 (Bourgarit, A., G. Carcelain, V. Martinez, C. Lascoux, V. Delcey, B. Gicquel, E. Vicaut, P. H. Lagrange, D. Sereni, and B. Autran. 2006. Explosion of tuberculin-specific Th1-responses

induces immune restorationsyndrome in tuberculosis and HIV co-infected patients.AIDS 20 :F1-F7)。

[0591] 休, A·J, 哈钦森, T·古丁, N·J·弗利兹, S·R·霍尔兹沃思和 P·D·约翰逊. 2005. 使用 ESAT-6 和胞内细胞因子计量学诊断结核分枝杆菌. 临床实验免疫学. 142 : 132-139 (Hughes, A. J. , P. Hutchinson, T. Gooding, N. J. Freezer, S. R. Holdsworth, and P. D. Johnson. 2005. Diagnosis of Mycobacterium tuberculosisinfection using ESAT-6and intracellular cytokine cytometry. Clin. Exp. Immunol. 142 :132-139)

[0592] 派, M. , R·乔希、S·格拉、D·K·门迪拉塔, P·纳朗, S·卡兰特里, A·L·莱因戈尔德, J·M·小科尔弗德, L·W·莱利和 D·门吉斯. 2006. 使用干扰素 γ 分析对医护人员进行对肺结核的系列试验. 美国呼吸和重症护理医学杂志 (Pai, M. , R. Joshi, S. Dogra, D. K. Mendiratta, P. Narang, S. Kalantri, A. L. Reingold, J. M. Colford Jr, L. W. Riley, and D. Menzies. 2006. Serial Testing ofHealth Care Workers for Tuberculosis using Interferon- γ Assay. Am. J. Respir. CritCare Med)。

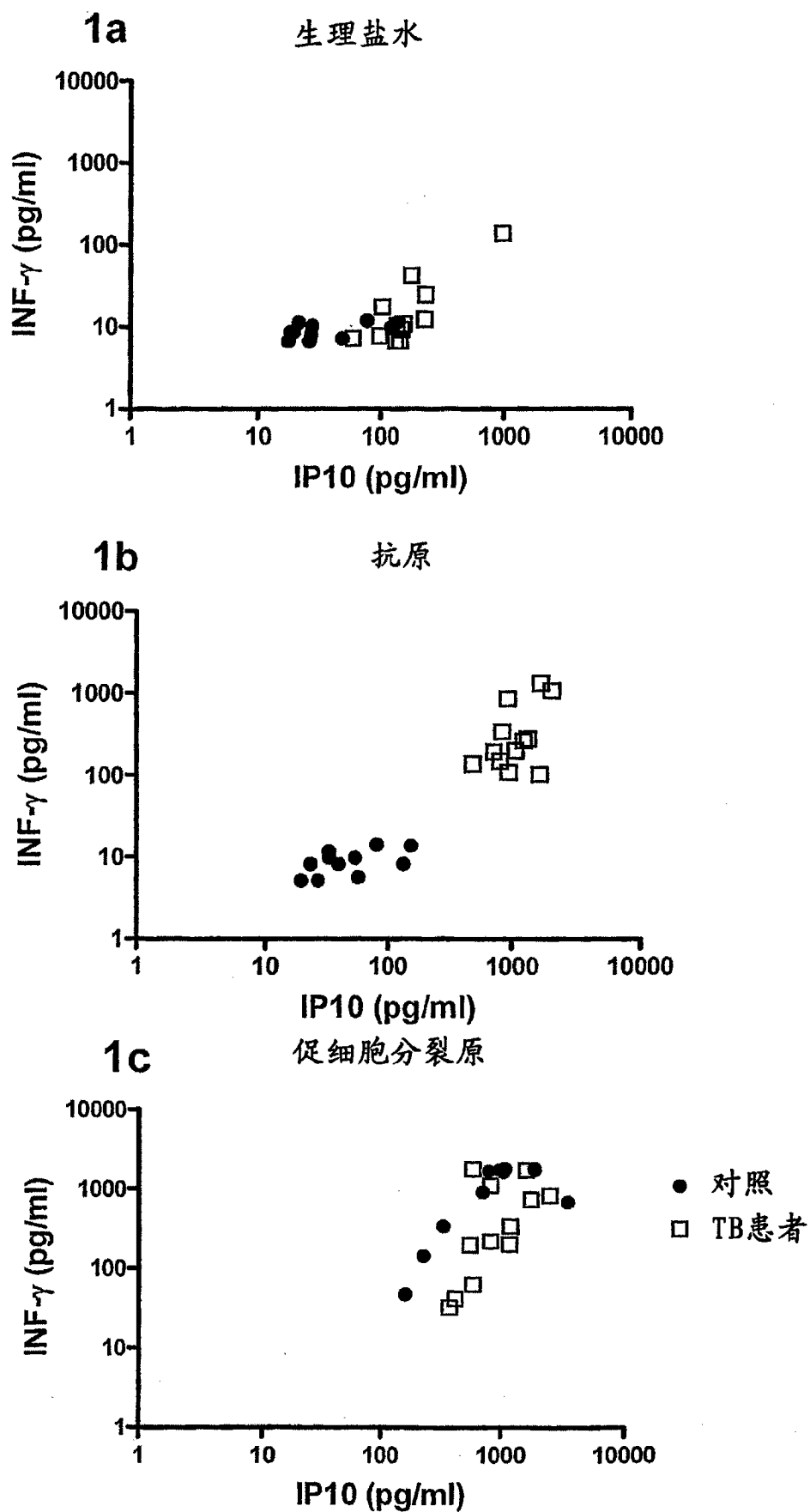


图 1

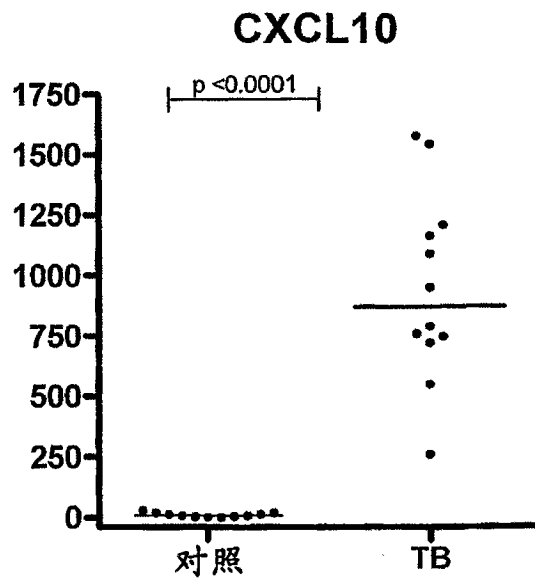
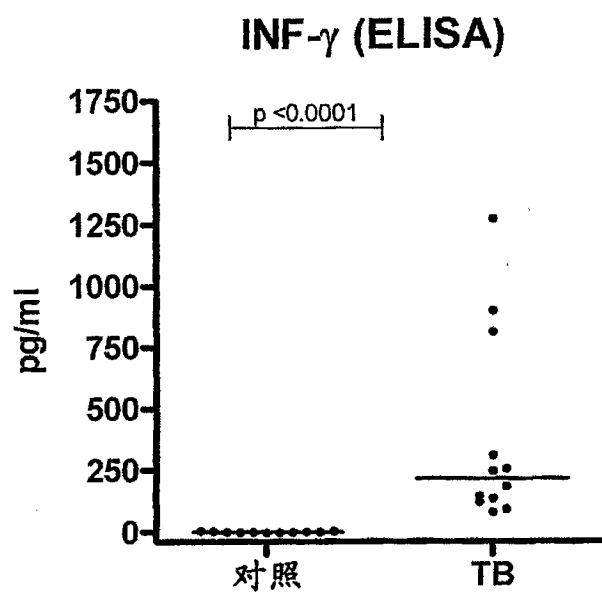


图 2

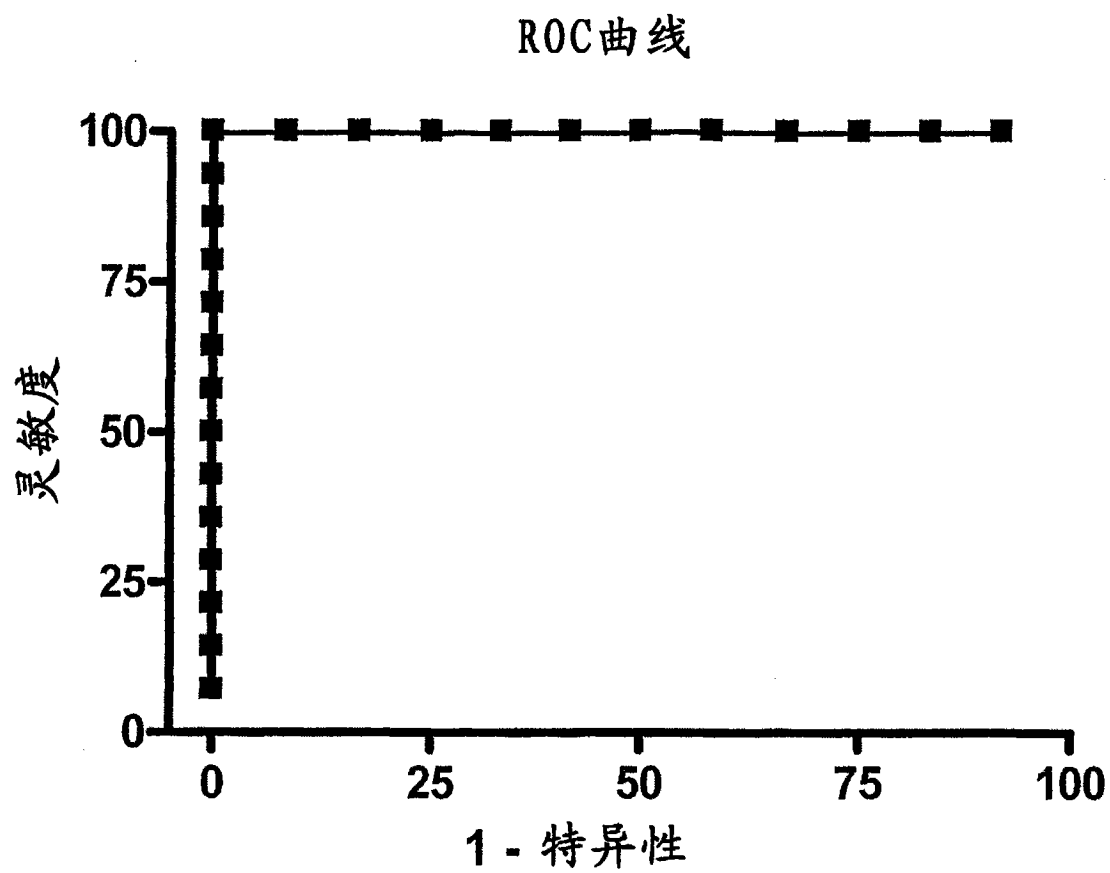


图 3

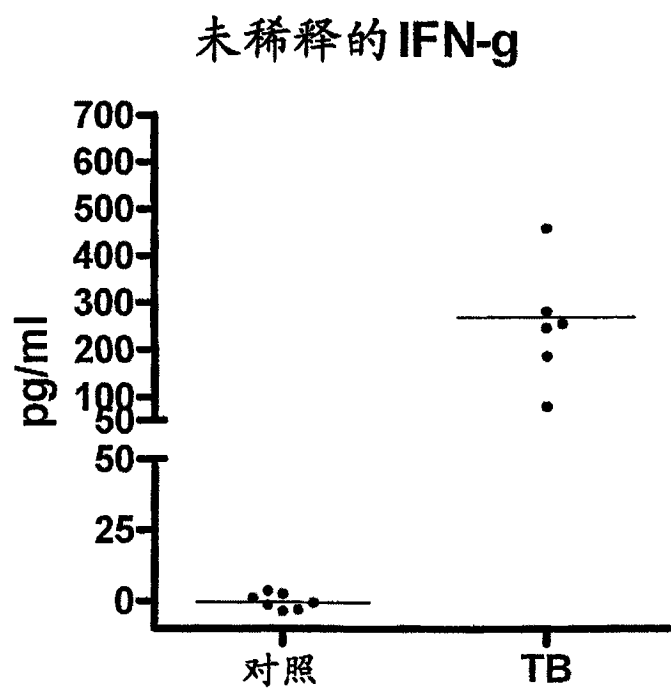
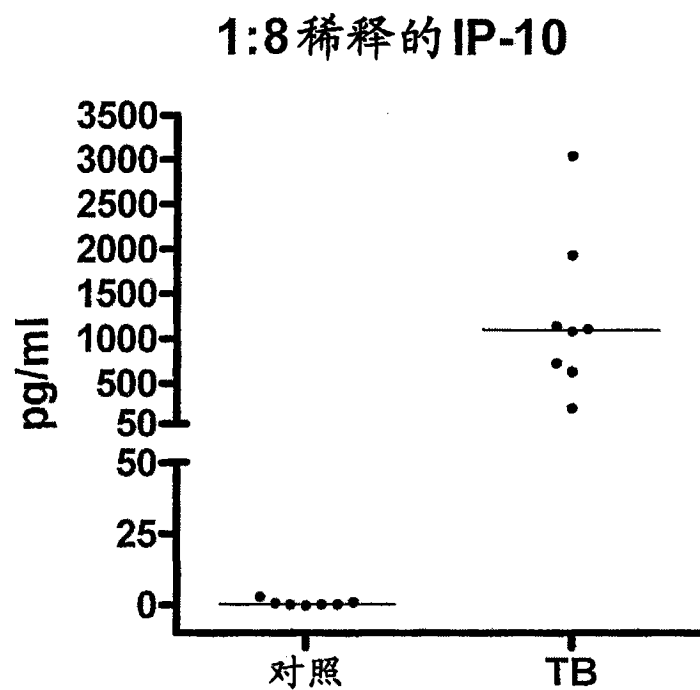


图 4

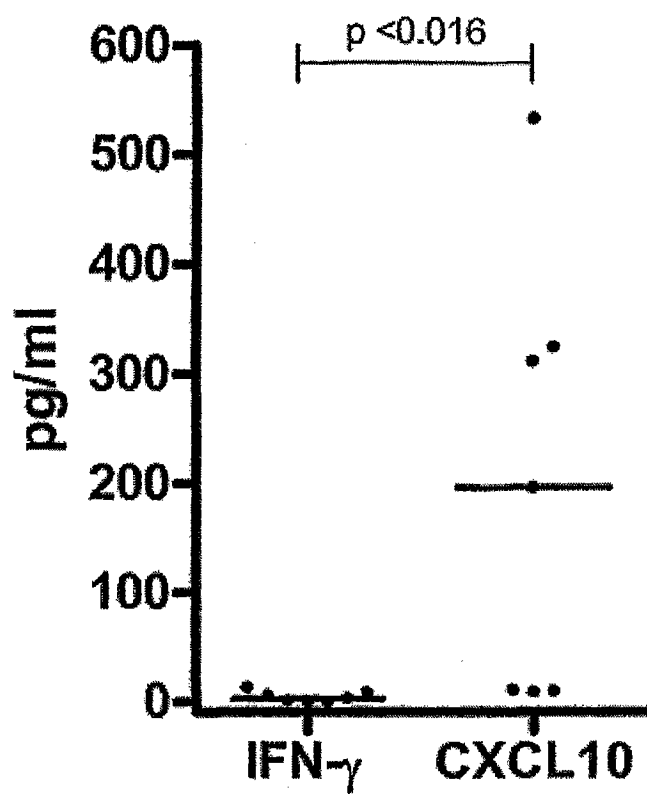


图 5