



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108693345 A

(43)申请公布日 2018.10.23

(21)申请号 201810327405.4

(22)申请日 2018.04.12

(71)申请人 北京睿达时代科技有限公司

地址 100000 北京市朝阳区西大望路甲12
号2号楼(国家广告产业园区孵化器
23834号)

(72)发明人 杜建 刘宇红 张晓 鲁迪迈

(74)专利代理机构 北京冠和权律师事务所

11399

代理人 朱健 陈国军

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

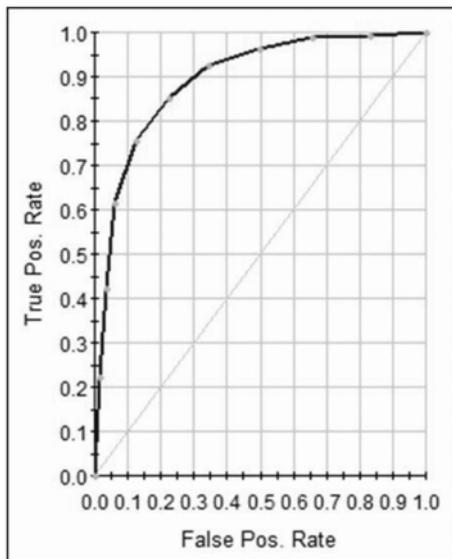
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54)发明名称

针对结核病筛查与诊断的组合血清标记物
检测试剂

(57)摘要

本发明涉及生物医学和临床诊断技术领域，公开了一种针对结核病筛查与诊断的组合血清标记物检测试剂及其在结核病筛查、诊断、治疗反应监测中的应用。本发明检测试剂由同时检测下述4种血清标记物的检测试剂组成：结核分枝杆菌Ag85B抗体、白细胞介素-6、白细胞介素-8、白细胞介素-18。本检测试剂适用于酶联免疫吸附测定、基于Luminex的多分析谱分析法、单分子蛋白阵列检测法、侧流免疫测定和核酸适配体技术。本发明检测试剂具有适用面广、使用简便快捷、结果准确、检测成本低等特点，经临床测试，利用本发明检测试剂进行结核病筛查，其诊断结果准确性完全达到了世卫组织对结核病筛查技术临床应用的相关要求。



1. 一种针对结核病筛查与诊断的组合血清标记物检测试剂，其特征在于：所述组合血清标记物检测试剂由同时检测下述血清标记物的检测试剂组成：结核分枝杆菌Ag85B抗体、白细胞介素-6、白细胞介素-8、白细胞介素-18。

2. 如权利要求1所述的组合血清标记物检测试剂，其特征在于：所述组合血清标记物检测试剂中还包括至少一种检测下述血清标记物的检测试剂：C-反应蛋白、 α 1-抗胰蛋白酶、纤维蛋白原、结合珠蛋白、 β 2-巨球蛋白、cAMP-受体蛋白、细胞间粘附分子-1、基质金属蛋白酶抑制剂-1、II型肿瘤坏死因子受体、白细胞介素-1受体拮抗剂、 α -肿瘤坏死因子、血管内皮生长因子、基质金属蛋白酶-2、血管细胞粘附分子-1、白细胞介素-17、干细胞因子。

3. 如权利要求1或2所述的组合血清标记物检测试剂，其特征在于所述组合血清标记物检测试剂适用于下述生物检测方法：酶联免疫吸附测定、基于Luminex的多分析谱分析法、单分子蛋白阵列检测法、侧流免疫测定、核酸适配体技术。

4. 如权利要求1或2所述的组合血清标记物检测试剂，其特征在于：所述组合血清标记物检测试剂的检测对象为血液样本或尿液样本。

5. 如权利要求1或2所述的组合血清标记物检测试剂在制备结核病筛查检测试剂盒中的用途。

6. 如权利要求1或2所述的组合血清标记物检测试剂在制备结核病诊断检测试剂盒中的用途。

7. 如权利要求1或2所述的组合血清标记物检测试剂在制备结核病治疗反应监测试剂盒中的用途。

针对结核病筛查与诊断的组合血清标记物检测试剂

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医学和临床诊断技术领域,尤其涉及一种针对结核病筛查与诊断的组合血清标记物检测试剂及其在临床治疗中的应用。

背景技术

[0002] 结核病是由结核杆菌感染引起的慢性传染病。结核杆菌可能侵入人体全身各种器官,但主要侵犯肺脏,称为肺结核病。作为当今世界的第一大传染性疾病,每年结核病的感染人数达到20亿人,因结核病死亡的患者人数不少于150万人,其致死人数仍高于其他任何一种传染病,导致此情况的重要原因之一是由于结核病经由飞沫传播,扩散速度极快,预防非常困难。因此,快速准确地筛查和诊断结核病可以为患者赢得宝贵的治疗时间,以便提供及时的治疗从而减少死亡事件的发生,同时,也可明显缩短患者带菌时间,从而在很大程度上减少疾病传播和扩散。

[0003] 由于结核病缺少特征性的体征和症状,目前主要依靠实验室检测方法进行诊断,通常检测患者痰液中的结核菌。然而,痰液检测仍具有很大的局限性:(1)部分患者没有痰液,造成标本获得困难,并限制了适用人群;(2)痰液成分不稳定,在不同个体或同一个体不同留样时间之间的变化很大,而且极易混入唾液,从而影响检测结果的准确性;(3)痰液的处理不易标准化,导致其检测灵敏度降低;(4)部分检测需要进行结核菌培养,造成检测耗时长,易延误诊断,并增加了检测成本。

[0004] 根据免疫学理论,人体感染结核后会出现相应的免疫反应,表现为体内血清标记物的变化,另一方面,与痰液相比,血液样本成分相对稳定,更容易获取,且其处理易于标准化。根据以上思路,美国Broad研究院(The Broad Institute)于2012年在美国申请了发明专利“Methods and devices for tuberculosis diagnosis using biomarker profiles.”(US 9702886B2),并于2017年获得授权,该专利首次提出了20个基于血液的生物标记物可以用于结核病的诊断检测。该专利的主要发明人Rushdy Ahmad博士也是本发明的发明人之一。

[0005] 然而,研究人员在此后数年的深入研究中发现:上述专利中公开的标记物及其组合尚无法达到世界卫生组织(WHO)于2014年提出的结核病快速筛查诊断要求,即满足敏感性(患者中检测呈阳性的比例) $\geq 90\%$,同时特异性(无疾病人群中检测呈阴性的比例) $\geq 70\%$ 的标准。另一方面,鉴于上述专利所涉及的标记物数量过多,若全部采用不仅会导致检测成本过高,而且由于检测流程过于繁杂而使其失去了现实可行性,因而不具有临床应用价值。

[0006] 另外,据我们所知,目前尚未见到其他基于血清标记物的诊断技术应用于结核病筛查与诊断的相关报道,也没有类似的检测技术或检测试剂盒正式应用于临床实践中。

发明内容

[0007] 为了克服现有结核病诊断方法灵敏度低、准确性不理想、检测耗时长、有效样本难

获得、适用人群窄、样本成分不稳定、样本处理难以标准化、检测成本高等缺陷。本发明在上述美国专利(US 9702886B2)的基础上,通过大量的筛选验证实验,研制获得了一种新的针对结核病筛查与诊断的组合血清标记物检测试剂。

[0008] 本发明针对结核病筛查与诊断的组合血清标记物检测试剂,其特征在于:所述检测试剂是由同时检测下述4种血清标记物的检测试剂组成的:结核分枝杆菌Ag85B抗体、白细胞介素-6、白细胞介素-8、白细胞介素-18。

[0009] 进一步地,本发明组合血清标记物检测试剂中还可以包括至少一种检测下述血清标记物的检测试剂:C-反应蛋白、 α 1-抗胰蛋白酶(AAT)、纤维蛋白原、结合珠蛋白、 β 2-巨球蛋白、cAMP-受体蛋白、细胞间粘附分子-1(ICAM-1)、基质金属蛋白酶抑制剂-1(TIMP-1)、II型肿瘤坏死因子受体(TNFR-2)、白细胞介素-1受体拮抗剂、 α -肿瘤坏死因子、血管内皮生长因子(VEGF)、基质金属蛋白酶-2(MMP-2)、血管细胞粘附分子-1(VCAM-1)、白细胞介素-17、干细胞因子(SCF)。

[0010] 基于本发明检测试剂的检测对象主要为非特异性血清标记物,因此我们认为任何可以用于进行蛋白质水平检测的现有技术和未来可能产生的技术,均可以采用本发明检测试剂对上述血清标记物进行测定,其检测结果可以用于结核病的筛查、诊断和临床治疗评价。

[0011] 因此,进一步地,上述本发明组合血清标记物检测试剂适用于下述生物检测方法:酶联免疫吸附测定(ELISA)、基于Luminex的多分析谱分析法、单分子蛋白阵列检测法(SIMOA)、侧流免疫测定(Lateral flow immunoassay)、核酸适配体技术。

[0012] 进一步地,上述本发明组合血清标记物检测试剂的检测对象为血液样本或尿液样本。

[0013] 此外,本发明还涉及上述组合血清标记物检测试剂在制备结核病筛查检测试剂盒中的用途。

[0014] 进一步地,本发明还涉及上述组合血清标记物检测试剂在制备结核病诊断检测试剂盒中的用途。

[0015] 进一步地,本发明还涉及上述组合血清标记物检测试剂在制备结核病治疗反应监测试剂盒中的用途。

[0016] 本发明针对结核病筛查与诊断的组合血清标记物检测试剂具有适用面广、使用简便快捷、结果准确、样本易获得、检测成本低等特点;在一定程度上克服了现有方法灵敏度低、准确性不理想、检测耗时长、样本难获得、适用人群窄、样本成分不稳定、样本处理难以标准化、检测成本高等缺陷。经临床测试,利用本发明检测试剂进行结核病筛查,其诊断结果准确性完全达到了世界卫生组织对结核病筛查技术临床应用的相关要求,即当敏感性不低于90%时,特异性不低于70%。另外,由于本发明检测试剂仅采用了4种血清标记物的检测试剂的组合即可达到临床应用的检测目标,不仅大大简化了检测试剂组成和检测操作过程,利于其产业化推广,而且有效降低了检测成本,经测算,本发明检测试剂产品的单价可控制在10-20元,因此可为大规模的结核病筛查节约大量成本,在惠及广大患者的同时,助力我国的结核病防控工作。

附图说明

[0017] 图1为本发明组合血清标记物检测试剂对结核病诊断的ROC曲线图。

具体实施方式

[0018] 以下通过特定的具体实例说明本发明的实施方式,本领域技术人员可由本说明书所揭露的内容轻易地了解本发明的其他优点与功效。本发明还可以通过另外不同的具体实施方式加以实施或应用,本说明书中的各项细节也可以基于不同观点与应用,在没有背离本发明的精神下进行各种修饰或改变。

[0019] 在进一步描述本发明具体实施方式之前,应理解,本发明的保护范围不局限于下述特定的具体实施方案;还应当理解,本发明实施例中使用的术语是为了描述特定的具体实施方案,而不是为了限制本发明的保护范围。

[0020] 除非另外定义,本发明中使用的所有技术和科学术语与本技术领域技术人员通常理解的意义相同。除实施例中使用的具体方法、设备、材料外,根据本技术领域的技术人员对现有技术的掌握及本发明的记载,还可以使用与本发明实施例中所述的方法、设备、材料相似或等同的现有技术的任何方法、设备和材料来实现本发明。

[0021] 实施例1:结核病筛查试验

[0022] 研究纳入人群:有结核可疑症状需要鉴别诊断结核者(有咳嗽症状大于2周者);

[0023] 纳入样本量:300名受试者;

[0024] 检测样本:受试者血液标本(共300份);

[0025] 检测方法:对每份血样中的71个血清标记物用单分子蛋白阵列检测法(Single Molecule Array,SiMOA)定量测试,并用Bead Array法定量检测结核分枝杆菌Ag85B抗体;

[0026] 结果分析:采用机械学习方法(TreeNet:Stochastic Gradient Boosting)对检测结果进行分析;

[0027] 试验结果:发现只有将结核分枝杆菌Ag85B抗体与白介素-6(IL-6)、白介素-8(IL-8)和白介素-18(IL-18)共4种血清标记物进行组合,其检测结果才能够达到临床使用的检测目标(参见附图1)。

[0028] 当仅使用IL-6、IL-8和IL-18的组合时,其最佳的检测效果为:

[0029] 敏感性=79%;特异性=72%;

[0030] 而将结核分枝杆菌Ag85B抗体加入该组合后(本发明方案),其检测效果提高到:

[0031] 敏感性=83%;特异性=83%;

[0032] 敏感性提高了4%,特异性提高了11%。

[0033] 敏感性和特异性可以通过改变临界值进行调整,当其中一个值升高时,另一个值会有所降低。本发明人将敏感性调整到90%时,特异性仍能保持在70%,达到了世界卫生组织对结核病筛查技术临床应用的相关要求。

[0034] 实施例2:结核病筛查扩大试验

[0035] 基于实施例1的结果,我们在更大的样本上进行了验证。

[0036] 研究纳入人群:来自多国的结核病患者和有结核可疑症状需要鉴别诊断结核者;

[0037] 纳入样本量:583名受试者,其中诊断结核的患者278人,非结核患者305人;

[0038] 检测样本:受试者血液标本(共583份);

[0039] 检测方法:对每份血样中的血清标记物用单分子蛋白阵列检测法(Single

Molecule Array, SiMOA) 定量测试;

[0040] 结果分析:采用机械学习方法(TreeNet:Stochastic Gradient Boosting)对检测结果进行分析;

[0041] 试验结果:结果证实只有将结核分枝杆菌Ag85B抗体与白介素-6(IL-6)、白介素-8(IL-8)和白介素-18(IL-18)共4种血清标记物进行组合,其检测结果才能够接近或达到临床使用的检测目标。

[0042] 当仅使用IL-6、IL-8和IL-18的组合时,其最佳的检测效果为:

[0043] 敏感性=80%;特异性=65%;

[0044] 而将结核分枝杆菌Ag85B抗体加入该组合后(本发明方案),其检测效果获得显著提高:

[0045] 敏感性=86%;特异性=69%;

[0046] 敏感性提高了6%,特异性提高了4%。从而验证了实施例1的研究结果。

[0047] 以上对本发明优选的具体实施方式和实施例作了详细说明,但是本发明并不限于上述实施方式和实施例,在本领域技术人员所具备的知识范围内,还可以在不脱离本发明构思的前提下作出各种变化。

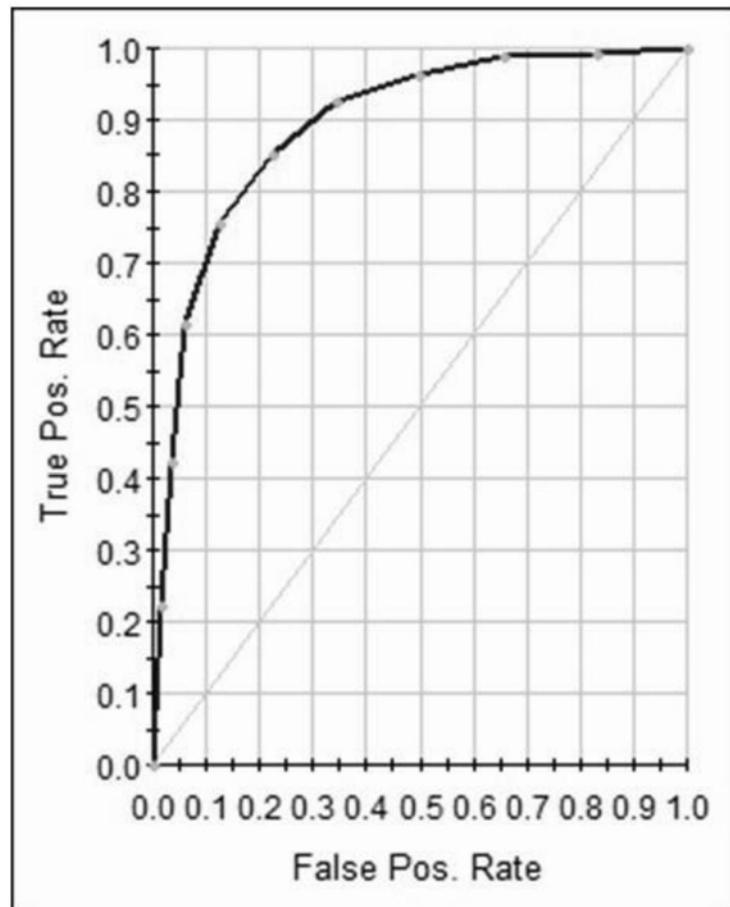


图1

专利名称(译)	针对结核病筛查与诊断的组合血清标记物检测试剂		
公开(公告)号	CN108693345A	公开(公告)日	2018-10-23
申请号	CN201810327405.4	申请日	2018-04-12
[标]发明人	杜建 刘宇红 张晓 鲁迪迈		
发明人	杜建 刘宇红 张晓 鲁迪迈		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/53 G01N33/6893		
代理人(译)	朱健 陈国军		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

本发明涉及生物医学和临床诊断技术领域，公开了一种针对结核病筛查与诊断的组合血清标记物检测试剂及其在结核病筛查、诊断、治疗反应监测中的应用。本发明检测试剂由同时检测下述4种血清标记物的检测试剂组成：结核分枝杆菌Ag85B抗体、白细胞介素-6、白细胞介素-8、白细胞介素-18。本检测试剂适用于酶联免疫吸附测定、基于Luminex的多分析谱分析法、单分子蛋白阵列检测法、侧流免疫测定和核酸适配体技术。本发明检测试剂具有适用面广、使用简便快捷、结果准确、检测成本低等特点，经临床测试，利用本发明检测试剂进行结核病筛查，其诊断结果准确性完全达到了世卫组织对结核病筛查技术临床应用的相关要求。

