

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200480041129.1

[51] Int. Cl.
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/573 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)

[43] 公开日 2007年1月31日

[11] 公开号 CN 1906486A

[22] 申请日 2004.12.16
[21] 申请号 200480041129.1
[30] 优先权
 [32] 2004. 1. 30 [33] US [31] 60/540,296
 [32] 2004. 1. 30 [33] SE [31] 0400191-3
[86] 国际申请 PCT/SE2004/001883 2004.12.16
[87] 国际公布 WO2005/073721 英 2005.8.11
[85] 进入国家阶段日期 2006.7.28
[71] 申请人 滕德拉股份公司
 地址 瑞典哥德堡
[72] 发明人 T·本特松 M·维克斯特伦

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商
 标事务所
 代理人 李 瑛

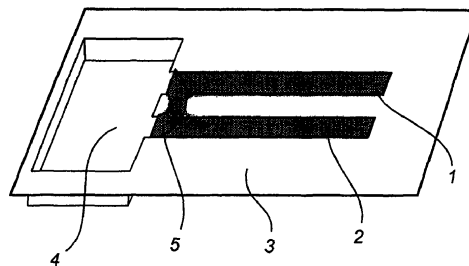
权利要求书5页 说明书17页 附图1页

[54] 发明名称

检测牙周病的检验试剂盒

[57] 摘要

通过分析来自患者口腔的样品诊断患者牙周病的检验试剂盒。检验试剂盒至少包括用于检测来源于细菌的第一物质的第一检测试验和检测来源于患者免疫或炎症系统的第二物质的第二检测试验。最优选地，所述第一物质为诸如来源于牙龈卟啉单胞菌的 arg-gingipain 的细菌毒性产物，所述第二物质为人中性粒细胞弹性蛋白酶。



1. 通过分析来自患者口腔的样品检测患者牙周病的检验试剂盒，其中所述试剂盒至少包括：检测源自细菌的第一物质的第一检测试验，以及检测源自患者免疫或炎症系统的第二物质的第二检测试验。
2. 按照权利要求 1 的检验试剂盒，其中所述的第一检测试验至少包括具有用于结合所述源自细菌的第一物质的结合位点的第一亲和配体，所述第二检测试验至少包含具有用于结合所述源自患者免疫或炎症系统的第二物质的结合位点的第二亲和配体。
3. 按照权利要求 1 或 2 的检验试剂盒，其中所述第一物质为细菌毒性产物。
4. 按照权利要求 3 的检验试剂盒，其中所述的第一物质为酶。
5. 按照权利要求 4 的检验试剂盒，其中所述酶为蛋白酶。
6. 按照权利要求 5 的检验试剂盒，其中所述的蛋白酶选自来源于牙龈卟啉单胞菌 (*Porphyromonas gingivalis*) 的 arg-gingipain 和来源于福赛斯拟杆菌 (*Bacterioides forsythus*) 的 48 kDa 蛋白酶。
7. 按照权利要求 3 的检验试剂盒，其中所述的第一物质为毒素。
8. 按照权利要求 7 的检验试剂盒，其中所述的毒素为来源于伴放线放线杆菌 (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*) 的白细胞毒素。
9. 按照前述权利要求中任一项的检验试剂盒，其中所述的第二物质为白细胞产物。

10. 按照权利要求 9 的检验试剂盒, 其中所述的白细胞产物为天然丝氨酸蛋白酶。

11. 按照权利要求 10 的检验试剂盒, 其中所述的天然丝氨酸蛋白酶为人中性白细胞弹性蛋白酶。

12. 按照权利要求 1-8 中任一项的检验试剂盒, 其中所述的第二物质为细胞因子。

13. 按照权利要求 12 的检验试剂盒, 其中所述的细胞因子为白细胞介素。

14. 按照权利要求 13 的检验试剂盒, 其中所述的白细胞介素选自白细胞介素-1 β 、白细胞介素-6 和白细胞介素-8。

15. 按照权利要求 12 的检验试剂盒, 其中所述细胞因子为炎症介质。

16. 按照权利要求 15 的检验试剂盒, 其中所述的炎症介质选自肿瘤坏死因子- α 和前列腺素 E₂。

17. 按照权利要求 2 至 16 中任一项的检验试剂盒, 其中所述的第一亲和配体为显示与所述第一物质选择性结合的第一抗体, 所述的第二亲和配体为显示与所述第二物质选择性结合的第二抗体。

18. 按照权利要求 17 的检验试剂盒, 其中每个所述的第一和第二检测试验都提供免疫色谱测定。

19. 按照前述任一权利要求的检验试剂盒, 进一步包含配备有接收

所述样品的样品存贮器的支架，其中所述第一和第二检测试验被安排在所述的支架上，其直接或通过使所述样品存贮器与所述检测试验隔离的可移动安排的隔离工具与所述样品存贮器相接触。

20. 按照前述任一权利要求的检验试剂盒，进一步包含用于稀释和调节用于所述检测试验的所述样品的附加缓冲液。

21. 按照权利要求 20 的检验试剂盒，进一步包含与所述样品存贮器分开的缓冲液存贮器。

22. 按照前述任一权利要求的检验试剂盒，进一步包含至少一个用于获得所述样品的取样装置。

23. 按照前述任一权利要求的检验试剂盒用于检测牙周病的用途。

24. 诊断牙周病和/或预测所述疾病的发展风险的方法，所述方法包括：分析来自患者口腔的样品中来源于细菌的至少第一物质的存在和来源于患者免疫或炎症系统的第二物质的存在。

25. 按照权利要求 24 的方法，其中所述第一物质为细菌毒性产物。

26. 按照权利要求 25 的方法，其中所述的第一物质为酶。

27. 按照权利要求 26 的方法，其中所述的酶为蛋白酶。

28. 按照权利要求 27 的方法，其中所述的蛋白酶选自来源于牙龈卟啉单胞菌的 arg-gingipain 和来源于福赛斯拟杆菌的 48 kDa 蛋白酶。

29. 按照权利要求 25 的方法，其中所述的第一物质为毒素。

30. 按照权利要求 29 的方法, 其中所述的毒素为来源于伴放线放线杆菌的白细胞毒素。

31. 按照权利要求 24 - 30 中任一项的方法, 其中所述的第二物质为白细胞产物。

32. 按照权利要求 30 的方法, 其中所述的白细胞产物为天然丝氨酸蛋白酶。

33. 按照权利要求 32 的方法, 其中所述的天然丝氨酸蛋白酶为人中性白细胞弹性蛋白酶。

34. 按照权利要求 24 - 30 中任一项的方法, 其中所述的第二物质为细胞因子。

35. 按照权利要求 36 的方法, 其中所述的细胞因子为白细胞介素。

36. 按照权利要求 35 的方法, 其中所述的白细胞介素选自白细胞介素-1 β 、白细胞介素-6 和白细胞介素-8。

37. 按照权利要求 36 的方法, 其中所述细胞因子为炎症介质。

38. 按照权利要求 37 的方法, 其中所述的炎症介质选自肿瘤坏死因子- α 和前列腺素 E₂。

39. 按照权利要求 24 - 38 中任一项的方法, 其中所述的分析包括用选择性地检测所述第一物质存在的第一方法和选择性检测所述第二物质存在的第二方法分析所述样品。

40. 按照权利要求 39 的方法，其中所述的第一方法包括使用显示与所述第一物质选择性结合的第一抗体，而其中所述的第二方法包括使用显示与所述第二物质选择性结合的第二抗体。

41. 按照权利要求 40 的方法，其中所述第一和第二方法中的至少一种包括使用免疫色谱测定。

检测牙周病的检验试剂盒

技术领域

本发明涉及检测牙周病的检验试剂盒。本发明还涉及用于牙周病的诊断和发展风险预测的方法。

背景技术

西方世界大约 7-15% 的成年人患有牙周炎，这使得它成为我们最常见的疾病之一。它是一种多种因素疾病，在牙齿和齿龈之间的凹处 (pocket) 存在致病菌是必要的而不是充分的判据。宿主的炎症和免疫系统也在疾病的发生中起到至关重要的作用。牙周炎的发展被认为是对齿龈下细菌的慢性炎症反应，其导致牙齿支持组织的破坏。它周期性发作并在早期可能被忽视。

破坏过程被认为是宿主防御系统和牙周袋内特殊细菌菌种之间复杂的相互作用的结果。牙周病出现和发展中所涉及的致病菌包括，但不限于，牙龈卟啉单胞菌 (*Porphyromonas gingivalis*) (以前表示为 *Bacteroides gingivalis*)，福赛斯拟杆菌 (*Bacteroides forsythus*) (现在也称为 *Tannerella forsythensis*)，伴放线放线杆菌 (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*)，齿垢密螺旋菌 (*Treponema denticola*) 和中间普雷沃氏菌 (*Prevotella intermedia*)。

在较近的几年中，细菌的毒性产物 (主要是毒素和酶) 的重要性被广泛地研究，并且被认为在发病机制中起主要作用 (Eley 和 Cox (2003))。细菌被认为经历不同的生长阶段，并在这些阶段中在牙周袋内具有或多或少的破坏性。活性细菌产生毒性产物以有助于其在牙周袋中的存活和营养。在高细菌活性期间，那些毒性产物导致牙齿支持组织的破坏和宿主防御系统效能的减弱。

现今牙科医生是通过测量牙周袋的探诊深度、诊察附着在牙槽骨上的牙齿的 X 光照片并参考探诊出血 (bleeding on probing) 评估牙周炎。致病因素包括吸烟习惯、压力和牙周炎的家族病史。该方法严重依赖于牙科医生的主观鉴定。探诊深度仅仅是对过去的附着丧失的测量,其在现在发生的牙周炎或其未来的发展中帮助很小。探诊出血能够表明复原过程而不是破坏过程。

有时候微生物样本被采集并送到实验室通过培养或 DNA 技术 (Socransky (1994) 开发的棋盘式 DNA-DNA 杂交技术) 进行分析。但是,需要大约一个星期的时间获得结果,并且仅能显示某些细菌的存在,其不是必然表明牙周炎。

进行了大量的工作在来自患者口腔的液体,例如龈缝液 (GCF) 中寻找能够诊断或预测牙周炎发生的化合物,主要是蛋白质,例如酶或细胞因子。

直到现在还有大量的测试和测定法被开发 (Armitage (2003))。这些测定法致力于鉴定细菌、细菌的毒性产物或宿主蛋白质。

用于研究它们在牙周炎中的治疗或预后价值的宿主来源的蛋白质主要包括来自人炎症系统的产物。这些蛋白质的作用是配合 (orchestrate) 炎症和免疫应答,重新塑造组织或帮助杀死侵入的细菌。

研究得最多的预期用于诊断牙周炎的宿主来源蛋白质包括天然的丝氨酸蛋白酶 (组织蛋白酶 G、azurocidin、蛋白酶 3、弹性蛋白酶)、胶原酶、转氨酶 (美国专利 4,981,787, 5,834,226 和 4,801,535)、碱性磷酸酶、 β -葡萄糖苷酸酶 (美国专利 6,277,587)、二肽基肽酶 (dipeptidyl peptidase)、中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白 (美国专利 5,866,432)、基质金属蛋白酶 (美国专利 5,736,341 和 6,280,687) 和细胞因子,例如白细胞介素 (特别是 IL-1 β (美国专利 5,328,829)、IL-6 和 IL-8) 和炎症介质,例如前列腺素 E₂ 和肿瘤坏死因子 α (TNF- α)。

基质金属蛋白酶 (MMP's) 被认为是牙周病的标志。美国专利 5,736,

341 公开了对 MMP-8 存在的检测，美国专利 5,866,432 公开了对中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白存在的检测以及美国专利 6,280,687 公开了 MMP-13 的存在。这三个专利提出了一种基于免疫色谱原理的用于牙周炎诊断和发展预测的快速牙科检验 (chair side test)。然而，在 Oringer (2002) 所给出的来自美国牙周病学协会的报告文件中，指出了需要进行附加的研究以证实 MMP's 在牙周病的发展中的作用。

美国专利 6,406,873 宣称单独的或结合的两炎症介质 (纤溶酶原激活物抑制剂 2 和组织纤溶酶原激活物) 能够诊断牙周炎。

美国专利 5,248,595 描述了同时分析多达三种不同的牙周病原体的方法。

Chapple (1997) 综述了传统的和现在使用的牙周诊断方法并得出结论，检测标志物，例如龈缝液中碱性磷酸酶的存在，与临床评估，例如分析组织颜色、探诊牙周袋深度和检测牙齿松动度相比更加灵敏和具有特异性。Chapple 还得出结论，结合两种或多种该标志物能够产生最准确的用于诊断正在发生的或将要发生的疾病活动性的手段，但是其没有显示该组合。

Jin 等 (1999) 通过使用 DNA 探针技术研究了牙周袋中牙周病原体，即细菌的存在与龈缝液 (GCF) 中弹性蛋白酶之间的相关性。

Nisengard 等 (1992) 描述了用于检测牙龈卟啉单胞菌，伴放线放线杆菌和中间普雷沃氏菌存在的快速胶乳凝集检验。

Lamster 等 (1994) 研究了临床附着丧失和它与来自人白细胞的 β -葡萄糖苷酸酶的相互关系。

Eley 和 Cox (1996) 开发了一种牙科检验，其基于特异于来自牙龈卟啉单胞菌的 gingipain 的酶底物。

最近，开发了许多评估牙周病活动性的方法。然而，上述方法中没有一种提供了足够灵敏和特异的试验以诊断牙周炎及其破坏模式。非特异性方法的一个结果是几个实际没有患牙周炎的患者将被治疗。临床观察例如探诊深度不够可靠，因为深的牙周袋不是必然包含正在发生的炎症，X 光线照相术评估必须结合详细的临床观察以给出正确

的诊断，仅仅是在牙周袋中存在病原菌不能准确地反映疾病活动性。而且迄今为止开发的基于检测宿主或细菌来源蛋白质的酶学方法的诊断还不是足够特异的，因为酶底物可以被多种不同的酶切割。

还研究了不同的细胞因子，但是没有设计出快速且特异的检验。

因此牙科医生需要牙科检验试剂盒，其优选

- 是快速的，可在几分钟内产生结果。
- 需要最少的时间和工作努力。
- 是耐用的并且能够在临床环境中粗略地处理。
- 提供容易解释的结果。
- 在室温下或在冰箱中具有长的保存期限。
- 适合牙科诊所的托盘，是环保的并且提供良好的患者信息材料。

发明内容

本发明的一个目的在于克服现有技术的缺陷并提供符合现在牙科医生需要的检验试剂盒。更具体地说，本发明旨在提供用于检测牙周病的检验试剂盒和方法，其是特异的、灵敏的并且易于使用。

本发明的发明人发现了包括检测源自细菌的物质和源自人免疫或炎症系统的物质的共存的方法可以被用于这个目的。

本发明可以被用于帮助牙科医生和牙科保健员向他们的患者提供更加有效的牙周病治疗。本发明的检验试剂盒和方法可以被用于筛选可疑牙齿，以追踪观察先前的治疗，决定最合适的治疗形式，选择正确种类的抗生素和告知患者每天良好的口腔卫生的重要性。

在第一个方面，本发明涉及通过分析来自患者口腔的样品诊断患者的牙周病的检验试剂盒，所述试剂盒包括用于检测源自细菌的第一物质的第一检测试验和用于检测源自患者免疫或炎症系统的第二物质的第二检测试验。

优选地，本发明涉及通过分析来自患者口腔的样品诊断患者的牙周病的检验试剂盒，所述试剂盒至少包括第一检测试验，其至少含有具有用于结合源自细菌的第一物质的结合位点的第一亲和配体，和第

二检测试验，其至少含有具有用于结合源自患者免疫或炎症系统的第二物质的结合位点的第二亲和配体。

优选地，所述患者是哺乳动物，最优选是人。

来自所述第一检测试验的结果结合来自所述第二检测试验的结果被用于检测牙周病。

优选所述第一物质是由所述细菌产生的蛋白质。优选所述蛋白质是细菌毒性产物，更优选是酶或毒素。优选的酶为蛋白酶，例如来自牙龈卟啉单胞菌的 arg-gingipain 和来自福赛斯拟杆菌的 48 kDa 蛋白酶。有益毒素的例子是来自伴放线放线杆菌的白细胞毒素。

第二物质优选是白细胞产物、细胞因子或人炎症介质。优选的白细胞产物是天然丝氨酸蛋白酶，更优选的是人中性白细胞弹性蛋白酶。优选的细胞因子是白细胞介素 - 1 β 、白细胞介素 - 6 和白细胞介素 - 8。有益炎症介质的例子是肿瘤坏死因子 - α 。

细菌来源的第一物质和如上定义的第二物质，优选人中性白细胞弹性蛋白酶的共存应该显示活性细菌和活性免疫或炎症系统二者，并且这表明了牙周破坏。

显然即使在科学界已经充分确定了牙周病是一种多种因素疾病，但还没有人开发同时分析样品中细菌和宿主来源的产物的检验。

检验试剂盒还可以包括第三检测试验，其至少含有具有用于结合源自细菌或源自如上定义的患者免疫或炎症系统，优选源自细菌的第三物质的结合位点的第三亲和配体，并且在一些实施方案中甚至进一步可以含有用于结合附加物质的检测试验。

优选地，第一亲和配体是表现与所述第一物质选择性结合的抗体，而第二亲和配体是表现与所述第二物质选择性结合的抗体。

抗体的使用优于其它方法（例如酶学方法），因为一旦被开发和检验了交叉反应性，抗体对其目标就具有高的特异性，并且能够检测不同于酶的化学物质，如毒素和细胞因子。此外，研制针对新抗原的新抗体的方法是本领域技术人员所公知的。

优选本发明检验试剂盒中的所述检测试验包括免疫色谱测定。

使用免疫色谱测定/方法的优点之一是它们能够容易地生产和使用，具有长的保存期限，产生快速结果并且能够被设计为非常特异于预期检测的物质。

所述检验试剂盒进一步优选含有支架，其配备有接收样品的样品存贮器，其中所述第一和第二检测试验被安排在所述支架上，直接或通过可移动安排的隔离工具与所述样品存贮器接触，该工具使所述样品存贮器与所述检测试验隔离。所述试剂盒也可以含有附加的用于稀释和调节用于所述检测试验的所述样品的缓冲液，优选在与所述样品存贮器分开的缓冲液存贮器中，和至少一个用于获得样品的取样装置。

本发明所述检验试剂盒中含有的单个检测试验可以共同或单独提供。在检测试验分开出售的情况下，伴随取出的 GCF 等的样品在每个试验中被单独分析，结果被结合以诊断牙周病。

本发明的检验试剂盒和方法用于牙周病的牙科检验，其中牙科医生或牙科保健员从牙周袋中取出如 GCF 样品。该样品通过检测试剂盒中提供的试验进行分析，来自这些试验的结果根据预先确定的标准进行判断以评估正在发生的牙周病的发生。

在第二个方面，本发明涉及诊断牙周病和/或预测所述疾病的发展风险的方法，所述方法包括分析来自患者口腔的样品中至少源自细菌的第一物质的存在和源自患者免疫或炎症系统的第二物质的存在，第一和第二物质如上述所定义。

此外，本发明的诊断方法也可以包括如上的检测附加物质存在的方法。

优选地，本发明的方法包括使用显示与所述第一物质选择性结合的第一抗体，其中所述第二方法包括使用显示与所述第二物质选择性结合的第二抗体。

更优选地，所述第一和第二方法的至少一种包括使用免疫色谱测定。

附图说明

图 1 显示检验试剂盒的实施方案，其中两种免疫色谱测定被安排在配备有样品存贮器的支架上。

发明详述

本发明涉及通过分析来自患者口腔的样品检测患者牙周病的检验试剂盒，其中所述试剂盒至少包括第一检测试验，其至少含有具有用于结合源自细菌的第一物质的结合位点的第一亲和配体，和第二检测试验，其至少含有具有用于结合源自患者免疫或炎症系统的第二物质的结合位点的第二亲和配体。

优选地，所述来自患者口腔的样品是龈缝液、植入物周围沟液、唾液或漱口水样品。

龈缝液（GCF）是从牙周袋流入口腔的液体。在炎症情况下，GCF 分别含有炎性细胞、细菌及其副产物，其内容物可以被用作破坏性牙周炎的标志物。收集 GCF 是最低程度的侵入性过程，液体提供生化指示物的定量来源，其反映了患者的反应以及细菌的攻击。

植入物周围沟液是牙齿被牙植入物替代的情况下的 GCF 等同物，即从植入物部位流入口腔的液体。

如果希望进行第一和第二物质的位点特异性检测，GCF 和植入物周围沟液是优选的，因为可以从每个被检查的牙齿表面获得截然不同的样品。

唾液或漱口水样品可以被用于获得不是位点特异性的检测或诊断。

在本文中使用的术语“牙周病”和牙周炎在广义上应被理解为包括诸如牙周炎、植入物周围炎（其中支持植入物的组织被分解），以及如 1999 国际牙周疾病和病况分类研讨会所定义的其它形式的牙周病这类疾病。

牙周病原菌，例如牙龈卟啉单胞菌（*porphyromonas gingivalis*）、福赛斯拟杆菌（*Bacteroides forsythus*）、伴放线放线杆菌（*Actinobacillus actinomycetemcomitans*）、齿垢密螺旋菌

(*Triponema denticola*) 和中间普雷沃氏菌 (*Prevotella intermedia*) 能够存在于口腔中以及牙齿和不含其的健康牙龈之间的牙周袋中，其导致牙周病的发展。细菌需要一定的生长条件和营养物质的存在以成为活性的。活性细菌产生毒性产物（例如以上提及的毒素和酶）以帮助其存活和营养。

牙龈卟啉单胞菌和福赛斯拟杆菌都产生已知为胰蛋白酶样丝氨酸蛋白酶的分子量为约 50 kDa 的蛋白水解酶。来自牙龈卟啉单胞菌的蛋白酶之一被命名为 arg-gingipain，来自福赛斯拟杆菌的蛋白酶之一是 48 kDa 蛋白酶。伴放线放线杆菌产生 116 kDa 的白细胞毒素，其是孔形成白细胞毒素 (pore-forming leukotoxins) 的毒素内重复 (repeats-in-toxin) 外蛋白家族的成员，对人多形核白细胞具有特异的细胞毒性。

在优选的实施方案中，所述第一物质是细菌毒性产物，优选是酶，如蛋白酶，更优选来自牙龈卟啉单胞菌的 arg-gingipain 和来自福赛斯拟杆菌的 48 kDa 蛋白酶或者毒素，更优选来自伴放线放线杆菌的白细胞毒素。

毒性产物的存在可以激发宿主的炎症反应和免疫系统，从而在感染部位聚集防御系统细胞，例如多形核 (PMN) 白细胞。

白细胞不能应付感染部位大量的细菌和细菌产物，来自白细胞粒 (leukocyte granulates) 的酶被释放到牙周袋中。这些最初为了杀死侵入的细菌的酶对周围组织具有高破坏性。人中性白细胞弹性蛋白酶已显示出降解牙齿周围的许多支持组织。弹性蛋白酶经常被发现存在于牙周袋中与其蛋白酶抑制剂 ($\alpha - 1$ 抗胰蛋白酶) 相结合。然而，来自牙龈卟啉单胞菌的蛋白酶已显示出降解人血清中蛋白酶抑制剂 $\alpha - 1$ 抗胰蛋白酶和 $\alpha - 2$ 巨球蛋白，在牙周或植入物周围袋中剩下高破坏形式的弹性蛋白酶。

本文中，“源自免疫或炎症系统”的物质是指源自参与免疫或炎症系统的细胞的物质。该物质可以由所述细胞分泌，或者可以源自所述细胞的溶解，例如用于配合免疫和炎症应答或者重新塑造组织或者

杀死侵入的细菌。

第二物质可以是白细胞产物，诸如天然丝氨酸蛋白酶，优选人中性白细胞弹性蛋白酶或者细胞因子，诸如白细胞介素，优选选自白细胞介素-1 β 、白细胞介素-6以及白细胞介素-8、或者炎症介质，优选肿瘤坏死因子- α 或者可能为前列腺素E₂。

最优选地，所述第二物质为人中性白细胞弹性蛋白酶。

适合本发明的检测的源自患者免疫或炎症系统的其它物质包括，但不限于，胶原酶、转氨酶、碱性磷酸酶、 β -葡萄糖苷酸酶、二肽基肽酶、中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白和基质金属蛋白酶。

最优选地，所述第一物质为细菌毒性产物，而所述第二物质为人中性白细胞弹性蛋白酶。

至少细菌来源的第一物质和如前文所定义的第二物质，优选人中性白细胞弹性蛋白酶的共存应该显示活性细菌和活性免疫或炎症系统二者，并且这表明了牙周病。因此检测至少所述第一物质和所述第二物质的共存是有益的。

在某些情况下，本发明的检验试剂盒包括用于检测所述样品中附加物质的附加检测试验，优选所述附加物质选自如前文所述的源自细菌的物质。

在优选的实施方案中，本发明的检验试剂盒所述第一亲和配体包含显示与所述第一物质选择性结合的第一抗体，而所述第二亲和配体包含显示与所述第二物质选择性结合的第二抗体。

本文中，“抗体”是指单克隆抗体、多克隆抗体、合成产生的抗体或者抗体等同物及其功能性片段。

特别适合本发明的抗体为特异性结合于任意以上提到的第一或第二物质的抗体。针对人中性白细胞弹性蛋白酶的抗体可从MP Biomedicals购得。针对来自伴放线放线杆菌的白细胞毒素的抗体已经被研制出来(Johansson et al. 2000)，针对来自牙龈卟啉单胞菌的蛋白酶的抗体也已经被研制出来(Nakagawa et al. 2001)。

本文中，“试验”是指检测样品中一种或多种物质存在和/或测定

其数量的方法。基于试验的分析结果为可检测的反应，例如颜色、荧光、吸光率和/或发光上的变化，传导性的变化、放射性的变化等。

适合与本发明检验试剂盒一起使用的检测试验可以基于几种免疫学方法之一。该方法包括，但不限于，免疫色谱法、免疫测定法、免疫凝集法、荧光免疫法、免疫发光法、比浊免疫法、ELISA 和浊度测定法。

在本发明的检验试剂盒的优选实施方案中，所述第一和第二检测试验提供免疫色谱测定、优选具体为所谓“色条试验(strip-test)”，其作为侧向流动试验实施。有几种免疫色谱测定的不同变体是本领域技术人员所公知的。每种免疫色谱测定优选使用两种特异于待检测物质的不同抗原决定簇的抗体。

此外，可以使多于一种检测试验配合一个单独的色条试验，以便两种或者多种特定物质的存在能够在在一个单独的条带上被检测到。

而且，如本领域技术人员所知，可以设计免疫色谱测定以使得样品中需要有预定临界数量的被寻找物质以产生阳性信号。

本发明还涉及诊断牙周疾病和/或预测所述疾病的发展风险的方法，所述方法包括分析来自患者口腔的样品中源自细菌的至少第一物质的存在以及源自患者免疫或炎症系统的第二物质的存在。

在本发明的方法中，来自患者口腔的样品以及第一和第二物质如前文所定义。

在某些情况下，本发明的诊断方法进一步包含检测所述样品中如前文所定义的附加物质的存在的步骤。

在本发明所述诊断方法的优选实施方案中，所述第一方法包括使用显示与所述第一物质选择性结合的第一抗体，而所述第二方法包括使用显示与所述第二物质选择性结合的第二抗体，其中所述抗体如前文所定义。

最优选地，所述第一和第二方法中至少一种包括使用免疫色谱方法。

适于与本发明方法一起使用的其它检测方法可以基于几种免疫学

方法之一。所述方法包括，但不限于，免疫色谱法、免疫测定法、免疫凝集法、荧光免疫法、免疫发光法、比浊免疫法、ELISA 和浊度测定法。

优选的实施方案

优选本发明的检验试剂盒，如图 1 中所图解的，包括两个免疫色谱检测试验 1, 2，其被安排在配备有用于接收样品的样品存贮器 4 的支架 3 上。这两个检测试验 1, 2 被安排，直接或通过可移动安排的隔离工具 5 与样品存贮器 4 相接触。

样品存贮器 4 优选用支架材料构成。支架 3 可以用几种不同的材料制造，例如塑料、纸、纸板或者其组合，诸如压有塑料层的纸。检测试验 1, 2 以这种形式安排在支架 3 上使得每个试验的样品接收区域直接或通过可移动安排的隔离工具 5 与样品存贮器 4 相接触。所述隔离工具 5 可以是覆盖试验上样品接收区域的可移动的隔挡、使存贮器与试验隔离的障碍物等。

试剂盒可以进一步包含附加的用于稀释和调节用于所述检测试验的所述样品的缓冲液和至少一个用于获得待分析的样品的取样装置。适用的取样装置的类型可以取决于待分析的样品的类型。例如龈缝液为粘性液体并且能够容易地通过小刷子、牙线、吸水纸尖或一次性吸管进行收集。其它用于获取唾液或漱口水样品的取样装置是本领域技术人员公知的。优选缓冲液与样品存贮器分开保存在缓冲液存贮器中，例如分开的烧瓶、在支架上形成的附加的存贮器或者在位于样品存贮器中的可穿孔的袋子内。

在获得样品之后，优选与缓冲液相混合以获得适合检测试验的 pH，离子强度和粘度。混合之后，样品被转移至样品存贮器，从而，可选通过移去隔离工具，使其与检测试验的接收区域相接触。

通过毛细管流，使得样品沿着纤维素带迁移至另一区域，在该区域通过液体流动获得由特异于将通过检测试验进行分析的蛋白(抗原)的一个抗原决定簇的抗体包被的小颗粒(例如胶态金或者胶乳)。存

在于样品中的抗原附着于结合有抗体的颗粒上并且进一步沿着纤维素带迁移。进一步沿着毛细管流的路径，不可逆地结合至带上，为识别该抗原的另一个抗原决定簇的另一个抗体（单克隆或多克隆的）。已经捕获抗原的颗粒附着于带上第二抗体结合的区域，其中抗原夹在颗粒和结合有相应抗体的带之间。

如果在同一区域捕获足够的颗粒，带上形成可以看到的线（检验线）。没有捕获到抗原的颗粒继续沿着带下行，有些在功能控制线上被捕获。颗粒太小无法用人眼逐个看见。只有当在同一区域捕获足够的颗粒时，才能形成可以看到的线。

上述过程基本上在两条带上同时发生，由此在几分钟之内获得每个被分析的物质一个结果。

上述本发明的优选实施方案以及下面的实验仅旨在举例说明目的，而不应理解为对本发明的限制。本发明的范围由附加的权利要求所限定。

实验

材料与amp;方法

用于下面的研究的样品从已经委托瑞典 Kristianstad 的公共牙科机构，牙周病学学部进行牙周治疗的 16 名志愿者中获得。患者的年龄在 28 至 54 岁之间，平均年龄为 40 岁。所有个体均具有位于不同的牙齿上的至少三个探诊深度大于或等于 6mm 的部位。没有患者在之前的 6 个月中进行了医疗处理或者接受牙周和/或抗生素治疗。

隔一周，一式两份进行取样和临床检查。用于酶分析的样品在微生物取样和临床检查之前被收集。第一次取样和检查在给予任何治疗之前进行（基线，检测 1）。第二次取样和检查发生在第一次治疗结束之后的 6 个月（检测 2），第三次在第二次治疗结束后的再一个 6 个月（检测 3）。

在基线检查之后，所有患者接受口腔卫生保健指导和整个牙列的牙龈上和牙龈下的清创术。在第二次治疗期间，在总厌氧活菌计数中

牙龈卟啉单胞菌 $> 0.5\%$ 或者中间普雷沃氏菌 $> 5\%$, 或者牙龈下样品中存在伴放线放线杆菌的所有部位进行麻醉下的牙周手术或矫正。所有选择用于研究的其它部位均接受牙龈上磨光处理。

从每个患者中, 在初始探诊深度 $> 6\text{ mm}$ 的 3 至 10 个部位收集样品。取样区域被干燥并且用棉卷隔离, 并且, 在牙龈上, 用无菌刮匙和棉棒仔细地移除牙垢。对于酶分析, 三个介质吸水纸尖 (Johnson and Johnson, Windsor, NJ) 被连续插入至牙周沟中约 1 mm 并且保留 15 秒。每个吸水纸尖的潮湿的部分用无菌剪刀剪下并且放入含有 $100\ \mu\text{l}$ 0.85% NaCl 的微细吸收管 (Nunc, Roskilde, Denmark) 中。样品立即在 -20°C 冷冻并且在 -80°C 存放 6 小时, 直至分析。对微生物分析, 3 个吸水纸尖被连续插入到牙周袋中直至遇到阻力并且在该处放置 15 秒。吸水纸尖被放入含有 10 个直径为 3 mm 的玻璃珠以及 3.3 ml 的 VMGA III 运送培养基的管形瓶中, 在有氧条件下制备和贮存。样品在 24 小时内被加工。细菌在富集布氏琼脂平板上生长并且通过合适的方法被鉴别。

为研究诊断检验的合适截断值, 我们用选择性底物研究了来自人噬中性白细胞的弹性蛋白酶以及来自牙龈卟啉单胞菌的 arg-gingipain。

第一组双份样品被用于酶分析。所有的样品在冰上解冻并且在 $13,000\ \times\ g$ 离心 3 分钟。

用于检测来自牙龈卟啉单胞菌的 arg-gingipain 的酶底物为在含有 5% DMSO 的测定缓冲液中具有 1 mM 终浓度的 N-苯甲酰-L-精氨酸-对-硝基苯胺 (BAPNA)。测定缓冲液为含有 5 mM CaCl₂, pH 为 7.5, 含有 50 mM 甘氨酸-甘氨酸以及 5 mM L-半胱氨酸的 0.1 M 的 Tris-HCl (如以前被本发明人在专利 US 5,981,164 中所报道的在 arg-gingipain 存在下甘氨酸-甘氨酸选择性刺激 BAPNA)。在加入 $50\ \mu\text{L}$ 底物前, $10\ \mu\text{L}$ 的样品与 $140\ \mu\text{L}$ 的测定缓冲液在用牛血清白蛋白预涂的 96 孔微量滴定平板的孔中预温育 15 分钟。平板在增湿室中 37°C 温育, 并且从 12 至 36 小时每隔几个小时用微量滴定平板读取器

通过分光光度法以 OD_{405} 读取值监视 pNA 的释放。一个单位的活性等于在一个小时温育中酶解 1 mmol 底物的酶的量。

通过加入 5 μ l 的 CGF 至含有 145 μ l 测定缓冲液 (pH 为 7.5 的 1 M Tris, 0.5 M NaCl) 的 96 孔微量滴定平板的孔中进行弹性蛋白酶测定。15 分钟后, 通过加入 50 μ l 的 2 mM 甲氧琥珀酰-丙氨酸-丙氨酸-脯氨酸-缬氨酸-pNA 在含有 20% DMSO 的测定缓冲液中的溶液开始反应。平板在增湿室中 37°C 温育。释放 pNA 的酶促反应从 12 至 26 小时每隔几小时用微量滴定平板读取器 (Molecular Devices) 在 OD_{405} 读取并且与稀释的纯化酶的标准品相比较。记录的读取值针对时间作图并且从图的线性部分以 $DA_{405}/60$ 分钟计算酶活性。每个位置弹性蛋白酶的量以 ng 表示。

截断 (cut-off) 研究中包括具有牙龈卟啉单胞菌生长或者存在甘氨酸-甘氨酸刺激的 BAPNA 活性但是没有伴放线放线杆菌生长的患者。这个标准从 8 个不同的患者中获得 35 个位置。在这个有限的研究中使用初期治疗一年后的检测。用压力平衡探针从牙周袋底部至根部牙骨质边缘测量的附着丧失被用作牙周病进一步发展的度量。分析弹性蛋白酶和 arg-gingipain 预测进一步的附着丧失的能力。单独地将弹性蛋白酶截断水平设置为每个位置 20ng 而将 arg-gingipain 设置为每个位置 0.27 单位。

结果

弹性蛋白酶	附着丧失	附着增加或零
阳性检验 (弹性蛋白酶 > 20ng)	3	2
阴性检验 (弹性蛋白酶 < 20ng)	3	27

作为进一步附着丧失预测物的弹性蛋白酶产生 50% 的敏感性和 93% 的特异性。用 Fisher's 精密检验计算得到 0.0264* 的 p 值。

Arg-gingipain	附着丧失	附着增加或零
阳性检验 (Arg-gingipain > 0.27U)	6	13
阴性检验 (Arg-gingipain ≤ 0.27U)	0	16

作为进一步附着丧失预测物的 Arg-gingipain 产生了 100% 的敏感性和 55% 的特异性。用 Fisher's 精确检验计算得到 0.0216* 的 p 值。

对单独的弹性蛋白酶和 arg-gingipain 而言，不得不丧失敏感性或者特异性。这促使我们研究这两种酶的组合。我们研究了这两种酶的新截断水平，发现弹性蛋白酶的检测极限应当为每个位置 2ng 而 arg-gingipain 为 0.30 单位。

组合	附着丧失	附着增加或零
阳性测验 (弹性蛋白酶 > 2ng 和 Arg-gingipain > 0.30U)	5	3
阴性测验 (弹性蛋白酶 < 2ng 或者 Arg-gingipain < 0.30U)	1	26

作为进一步附着丧失预测物的弹性蛋白酶和 arg-gingipain 的组合产生了 83% 的敏感性和 90% 的特异性。用 Fisher's 精确检验计算得到小于 0.001*** 的 p 值。该有限的数据显示了作为牙周疾病标志物的弹性蛋白酶和 arg-gingipain 的组合可产生统计学上比任一单个酶更显著的检验。

参考文献

Armitage G. C. (2003) Position paper: Diagnosis of Periodontal Diseases. *Journal of Periodontology* 74, 1237- 1247.

Chapple I. L. C (1997) Periodontal disease diagnosis: current status and future developments. *Journal of Dentistry* 25, 3-15.

Eley B. M. and Cox S. W. (1996) Correlation Between Gingivain/Gingipain and Bacterial Dipeptidyl Peptidase Activity in Gingival Crevicular Fluid and Periodontal Attachment Loss in Chronic Periodontitis Patients. A 2-Year Longitudinal Study. *Journal of Periodontology* 67, 703-716.

Eley B. M. and Cox S.W. (2003) Proteolytic and hydrolytic enzymes from putative periodontal pathogens: characterization, molecular genetics, effects on host defences and tissues and detection in gingival crevice fluid. *Periodontology* 2000, 31, 105-124.

Jin L. J., Söder P-ö., Leung W. K. , Corbet E. F., Samaranayake L. P., Söder B. and Davies W. I. R. (1999) Granulocyte elastase activity and PGE2 levels in gingival crevicular fluid in relation to the presence of subgingival periodontopathogens in subjects with untreated adult periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* 26, 531-540.

Johansson A., Sandström G. , Claesson R., Hänström L. , Kalfas S. (2000) Anaerobic neutrophil-dependent killing of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in relation to the

bacterial leukotoxicity. *European Journal of Oral Sciences* 108, 136-149.

Lamster I. B. , Smith Q. T. , Celenti R. S. , Singer R. E. and Grbic J. T. (1994) Development of a risk profile for periodontal disease: microbial and host response factors. *Journal of Periodontology* 65 (5 Suppl), 511-20.

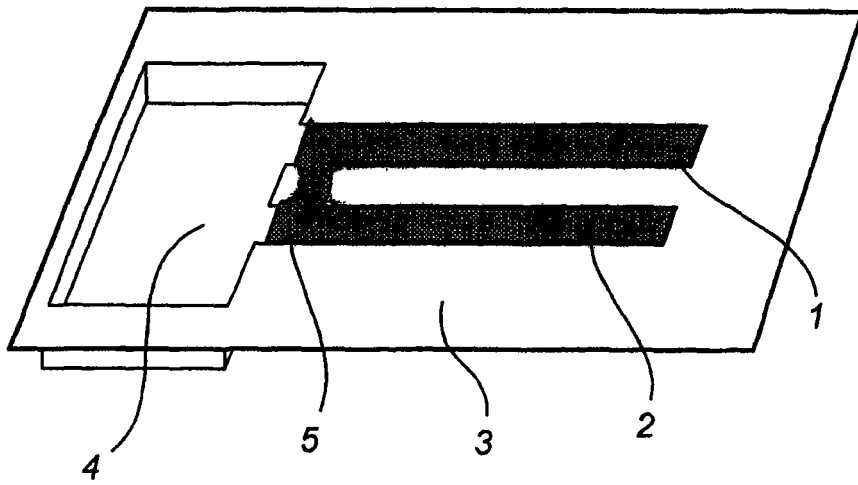
Nakagawa, T. , Sims, T. , Fan, Q. , Potempa, J., Travis, J. , Houston, L. and Page, R. C. (2001) Functional characteristics of antibodies induced by Arg-gingipain (HRgpA) and Lys-gingipain (Kgp) from *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiology and Immunology* 16 (4), 202- 211.

Nisengard R. J. , Mikulski L. , McDuffie D. and Bronson P. (1992) Development of a rapid latex agglutination test for periodontal pathogens. *Journal of Periodontology* 63 (7), 611-617.

Oringer R. J. (2002) Modulation of the Host Response in Periodontal Therapy. *Journal of Periodontology* 73, 460-470.

Socransky S. S. , Smith C. , Martin L. , Paster B. J., Dewhirst F. E. and Levin A. E. (1994) "Checkerboard" DNA-DNA hybridization. *Biotechniques* 17 (4), 788-92.

图1



专利名称(译)	检测牙周病的检验试剂盒		
公开(公告)号	CN1906486A	公开(公告)日	2007-01-31
申请号	CN200480041129.1	申请日	2004-12-16
[标]发明人	T本特松 M维克斯特伦		
发明人	T·本特松 M·维克斯特伦		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/573 G01N33/569 G01N G01N33/68 G01N33/88		
CPC分类号	G01N2333/966 G01N33/88 G01N33/56955 G01N33/6869		
代理人(译)	李瑛		
优先权	0400191 2004-01-30 SE 60/540296 2004-01-30 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

通过分析来自患者口腔的样品诊断患者牙周病的检验试剂盒。检验试剂盒至少包括用于检测来源于细菌的第一物质的第一检测试验和检测来源于患者免疫或炎症系统的第二物质的第二检测试验。最优选地，所述第一物质为诸如来源于牙龈卟啉单胞菌的arg - gingipain的细菌毒性产物，所述第二物质为人中性白细胞弹性蛋白酶。

