(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 103430025 A
(43)申请公布日 2013.12.04

(21)申请号 201280014219.6
(22)申请日 2012.01.19
(30)优先权数据
61/434,501 2011.01.20 US
(85)PCT申请进入国家阶段日
2013.09.18
(86)PCT申请的申请数据
PCT/US2012/021892 2012.01.19
(87)PCT申请的公布数据
WO2012/100070 EN 2012.07.26
(71)申请人 免疫科学实验室公司
地址 美国加利福尼亚州
(72)发明人 A·沃佳达尼
(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245
代理人 赵蓉民
(51)Int.Cl.
G01N 33/53(2006.01)
G01N 33/68(2006.01)

权利要求书3页 说明书14页 附图13页

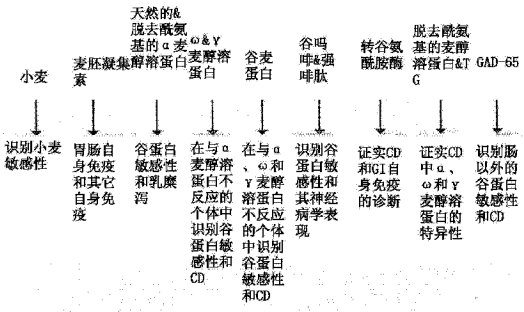
(54)发明名称

检测谷蛋白敏感性和其区分于乳糜泻的方法和装置

(57)摘要

抗体被用作生物标记来辅助区分谷蛋白免疫反应性和敏感性、无症状乳糜泻、克罗恩氏病和其它肠相关的病理与典型的乳糜泻。在一类实施方式中，测试来自人类或其它动物的血清、唾液或其它样品的针对以下的抗体：(a)小麦抗原；(b)麦醇溶蛋白抗原；和(c)麦胚凝集素、谷吗啡、麦谷蛋白、脱去酰氨基的麦谷蛋白、强啡肽原和强啡肽中的一个或多个。测试结果被认为特别有意思，其中小麦抗原和麦醇溶蛋白抗原均选自α-麦醇溶蛋白33聚体、α-麦醇溶蛋白17聚体、γ-麦醇溶蛋白15聚体、ω-麦醇溶蛋白17聚体和麦谷蛋白21聚体。测试板和试剂盒可有利地测试α-麦醇溶蛋白、γ-麦醇溶蛋白、ω-麦醇溶蛋白、麦谷蛋白、麦胚凝集素、谷吗啡、强啡肽原、转谷氨酰胺酶-2、转谷氨酰胺酶-3、转谷氨酰胺酶-6、和结合麦醇溶蛋白的转谷氨酰胺酶中至少三、五、七个或所有的抗原。

针对乳糜泻和谷蛋白免疫反应性/敏感性/自身免疫的抗体测试方案，所提出的方案



CN 103430025 A

1. 测试来自动物的样品的方法，包括：

测量源自所述样品的第一部分与小麦抗原结合的第一信号；

测量源自所述样品的第二部分与麦醇溶蛋白抗原结合的第二信号；和

测量源自所述样品的第三部分与选自以下的抗原结合的第三信号：(1) 麦胚凝集素；(2) 谷吗啡；(3) 麦谷蛋白；(4) 脱去酰氨基的麦谷蛋白；(5) 强啡肽原；和 (6) 强啡肽。

2. 权利要求 1 所述的方法，其中所述样品包括血清。

3. 权利要求 1 所述的方法，其中所述样品包括唾液。

4. 权利要求 1 所述的方法，其中所述小麦抗原选自 α－麦醇溶蛋白 33 聚体、α－麦醇溶蛋白 17 聚体、γ－麦醇溶蛋白 15 聚体、ω－麦醇溶蛋白 17 聚体和麦谷蛋白 21 聚体。

5. 权利要求 4 所述的方法，其中所述小麦抗原中的至少一种是脱去酰氨基的。

6. 权利要求 1 所述的方法，其中所述动物是人。

7. 利用从分析获自人的样品获得的试验结果，进行辅助区分乳糜泻与 (a) 谷蛋白免疫反应性和敏感性和 (b) 与谷蛋白免疫反应性／敏感性和自身免疫相关的诊断的确定的方法，包括：

测试或得到所测试样品的抗脱去酰氨基的 α－麦醇溶蛋白 33 聚体或转谷氨酰胺酶 -2 的 IgA；和

测试或得到所测试样品的抗脱去酰氨基的麦谷蛋白 21 聚体的 IgA。

8. 权利要求 7 所述的方法，进一步包括测试或得到所测试样品指示无症状乳糜泻的血清学模式，其中：

抗 α－麦醇溶蛋白 33 聚体、脱去酰氨基的 α－麦醇溶蛋白 33 聚体、α－麦醇溶蛋白 25 聚体、α－麦醇溶蛋白 18 聚体、α－麦醇溶蛋白 17 聚体、γ－麦醇溶蛋白 15 聚体、ω－麦醇溶蛋白 17 聚体、麦谷蛋白、脱去酰氨基的麦谷蛋白、谷吗啡、强啡肽原和麦胚凝集素的至少一种阳性的 IgA 和 IgG 试验至少之一；和

抗转谷氨酰胺酶 -2 阴性的 IgA 和 IgG 试验，和抗转谷氨酰胺酶 -3 和转谷氨酰胺酶 -6 的至少一种阳性的 IgA 和 IgG 试验至少之一。

9. 权利要求 7 所述的方法，进一步包括测试或获得所测试样品指示谷蛋白免疫反应性和敏感性的血清学模式，其中：

抗 α－麦醇溶蛋白、γ－麦醇溶蛋白、ω－麦醇溶蛋白、麦谷蛋白、脱去酰氨基的麦谷蛋白、谷吗啡和麦胚凝集素至少一种阳性的 IgA 和 IgG 试验至少之一；和

抗脱去酰氨基的 α－麦醇溶蛋白、脱去酰氨基的麦谷蛋白或转谷氨酰胺酶 -2 阴性的 IgA 和 IgG 试验。

10. 权利要求 7 所述的方法，进一步包括测试或获得所测试样品指示与谷蛋白免疫反应性／敏感性和自身免疫相关的诊断的血清学模式，其中：

抗天然 α－麦醇溶蛋白、γ－麦醇溶蛋白、ω－麦醇溶蛋白、麦谷蛋白、脱去酰氨基的麦谷蛋白、谷吗啡和麦胚凝集素的至少一种阳性的 IgA 和 IgG 试验至少之一；

对谷氨酸脱羧酶和小脑组织的至少一种阳性的 IgG、IgA 和 IgM 试验至少之一；和

抗脱去酰氨基的 α－麦醇溶蛋白、脱去酰氨基的麦谷蛋白或转谷氨酰胺酶阴性的 IgA 试验。

11. 筛选患者中 IgG 和 IgA 抗体的至少一种存在的方法，包括：

获得来自测量第一、第二和第三信号的试验结果，其中所述第一信号来自所述样品的第一部分与小麦抗原的结合，所述第二信号来自所述样品的第二部分与麦醇溶蛋白抗原的结合；和所述第三信号来自所述样品的第三部分与选自以下的抗原的结合：(1) 麦胚凝集素；(2) 谷吗啡；(3) 麦谷蛋白；(4) 脱去酰氨基的麦谷蛋白；(5) 强啡肽原；和 (6) 强啡肽；和

利用权利要求 1 所述的试验结果来查明所述患者是否具有所述抗体。

12. 权利要求 11 所述的方法，其中所述抗体结合小麦和麦醇溶蛋白肽。

13. 权利要求 11 所述的方法，其中所述抗体结合小麦的醇溶性和 / 或水溶性组分，和所述麦醇溶蛋白抗原选自 α - 麦醇溶蛋白 33 聚体、α - 麦醇溶蛋白 17 聚体、γ - 麦醇溶蛋白 15 聚体、ω- 麦醇溶蛋白 17 聚体、和麦谷蛋白 21 聚体。

14. 权利要求 11 所述的方法，进一步包括利用所述试验结果辅助查明是否所述患者是否具有乳糜泻。

15. 权利要求 14 所述的方法，进一步包括从测试所述样品针对 α - 麦醇溶蛋白、γ - 麦醇溶蛋白、ω - 麦醇溶蛋白、麦谷蛋白、麦胚凝集素、谷吗啡、强啡肽原、转谷氨酰胺酶和结合麦醇溶蛋白的转谷氨酰胺酶的至少五种抗体获得结果。

16. 权利要求 11 所述的方法，进一步包括利用所述试验结果来辅助区分所述患者是否具有与明显症状的乳糜泻相反的无症状或非典型的乳糜泻。

17. 权利要求 16 所述的方法，进一步包括从测试所述样品针对 α - 麦醇溶蛋白、γ - 麦醇溶蛋白、ω - 麦醇溶蛋白、麦谷蛋白、麦胚凝集素、谷吗啡、强啡肽原、转谷氨酰胺酶、和结合麦醇溶蛋白的转谷氨酰胺酶的至少五种抗体获得结果。

18. 权利要求 1 所述的方法，进一步包括利用所述试验结果来辅助查明所述患者是否具有谷蛋白免疫反应性和敏感性和自身免疫的至少一种。

19. 权利要求 18 所述的方法，进一步包括从测试所述样品针对 α - 麦醇溶蛋白、γ - 麦醇溶蛋白、ω - 麦醇溶蛋白、麦谷蛋白、麦胚凝集素、谷吗啡、强啡肽原、转谷氨酰胺酶、和结合麦醇溶蛋白的转谷氨酰胺酶的至少五种抗体获得结果。

20. 权利要求 1 所述的方法，进一步包括利用所述结果来辅助查明所述患者是否具有克罗恩氏病和慢性免疫激活的至少一种。

21. 权利要求 20 所述的方法，进一步包括从测试所述样品针对 α - 麦醇溶蛋白、γ - 麦醇溶蛋白、ω - 麦醇溶蛋白、麦谷蛋白、麦胚凝集素、谷吗啡、强啡肽原、转谷氨酰胺酶、和结合麦醇溶蛋白的转谷氨酰胺酶的至少五种抗体获得结果。

22. 筛选患者中 IgG 和 / 或 IgA 抗体存在的方法，包括提供或获得来自测量信号的试验结果，所述信号来自患者的抗体与以下的结合：(a) α - 麦醇溶蛋白和转谷氨酰胺酶的至少一种，和 (b) 小麦的水溶性和醇溶性组分、麦胚凝集素、ω - 麦醇溶蛋白和 γ - 麦醇溶蛋白、麦谷蛋白、谷吗啡、和结合麦醇溶蛋白的转谷氨酰胺酶的至少一种；和利用权利要求 1 所述的试验结果来查明所述患者是否具有所述抗体。

23. 测试板，其含有至少三种结合的测试物质，所述测试物质选自由小麦的水溶性和醇溶性组分、α - 麦醇溶蛋白 33 聚体、α - 麦醇溶蛋白 17 聚体、γ - 麦醇溶蛋白 15 聚体、ω - 麦醇溶蛋白 17 聚体、麦谷蛋白 21 聚体、谷吗啡 16 聚体、强啡肽原、结合麦醇溶蛋白的转谷氨酰胺酶、和麦胚凝集素组成的清单。

24. 权利要求 23 所述的测试板，其含有所述结合的测试物质的至少五种。

25. 权利要求 23 所述的测试板，其含有所述结合的测试物质的至少七种。

26. 权利要求 23 所述的测试板，其含有所述结合的测试物质的每一种。

27. 测试试剂盒，其包括权利要求 23 所述的测试板，和利用所述测试板来测量 IgG 和 / 或 IgA 抗体的说明书。

检测谷蛋白敏感性和其区分于乳糜泻的方法和装置

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2011年1月20日提交的美国临时申请号61/434,501的权益，其以其全部通过引用被并入本文。

发明领域

[0003] 本发明涉及帮助诊断肠相关疾病和病理——包括至少谷蛋白免疫反应性和敏感性、无症状乳糜泻(silent celiac disease)和克罗恩氏病——的方法和试剂盒。

[0004] 发明背景

[0005] 小麦过敏、乳糜泻和谷蛋白敏感性是由摄入小麦醇溶蛋白而触发的三种不同的状况(1、2)。在这些状况中，对谷蛋白的反应是由细胞和体液免疫应答介导的，导致呈现不同的疾病复合症状。例如，在小麦过敏中，麦醇溶蛋白肽的特定序列在肥大细胞和嗜碱粒细胞表面上交联两个IgE分子，触发释放介质，如组胺和白三烯类(3)。

[0006] 本文讨论的这些和所有其它外源性材料以其全部通过引用被并入。当并入的参考文献中术语的定义或使用与本文提供的该术语的定义不一致或相反时，应用本文提供的该术语的定义，而不应用参考文献中该术语的定义。

[0007] 乳糜泻(celiac disease，CD)是这样的自身免疫状况，其具有已知的遗传组成和环境触发物，如麦醇溶蛋白肽。CD影响1-2%的一般人群。遍及本申请，除非上下文指示相反，本文列出的所有范围应该被解释为包含他们的端点，开放式范围应该被解释包括商业上实用的值。类似地，值的所有列表应该被认为包括中间的值，除非上下文指示相反。

[0008] 用于确定诊断这种病症的标记是抗天然的、脱去酰氨基的麦醇溶蛋白肽的IgA和IgA抗组织转谷胺酰氨酶(tTg)自身抗体。与CD相比，谷蛋白敏感性(GS)影响多达30％的人口(4)。根据Sapone et al(5、6)2010和2011年发表的两篇文章，GS中的症状可类似与CD或小麦过敏相关的一些胃肠症状，但是强调的是对谷蛋白敏感性的客观诊断试验目前缺失(5、6)。虽然正在研究与GS相比CD中的固有免疫应答，但是研究人员发现与固有免疫相关的TLR1、TLR2和TLR4在粘膜的GS而不是在CD中升高，而获得性免疫的生物标记如IFN-g、IL-21和IL-17A在CD而不是GS中的粘膜组织中表达。他们认为用高侵袭性和将需要活组织检查的方法测量的toll样受体和IFN-γ、IL-21和IL-17A的结果将能够使他们区分CD和GS(5、6)。对谷蛋白的速发型超敏感性是IgE介导的，而对谷蛋白的迟发型超敏感性是抗体——(IgG、IgA)和T细胞介导的反应，其被称作乳糜泻或具有肠病的谷蛋白敏感性(7)。在缺乏抗tTg的IgG和IgA的情况下，升高的抗各种小麦抗原和肽的IgG和IgA指示抗小麦肽的粘膜免疫耐受的缺失和谷蛋白敏感性的发展(7)。由于小麦抗原和人组织之间的抗原性相似性，CD和GS均可以导致多种自身免疫状况，包括1型糖尿病、关节炎、甲状腺炎，和甚至神经自身免疫状况如谷蛋白共济失调和多发性硬化(8-10)。

[0009] 应当理解，术语“患者”指在专业的卫生保健护理下的人。然而，更广义地，本文公开的新的试验方案和分析可以应用于非患者的人，和可遭受乳糜泻、谷蛋白敏感性和肠相关的自身免疫的任何其它动物。

[0010] 虽然GS患者，与CD患者相似，不能耐受谷蛋白并可发展相同或相似的胃肠症状，但是在GS中，这种免疫反应没有引起小肠损害(5、6)。GS中诱导肠损害的这种缺乏和CD与遗传标记HLA DQ2/DQ8加小肠损害的关联使CD的诊断比GS容易得多。GS中不太严重的临床现象(picture)、tTg自身抗体的缺少，和许多临床医生对升高的抗各种小麦蛋白和肽的IgG和IgA自身抗体的重要性的不考虑使GS成为非常危险的病症。这是因为血液中IgG和/或IgA抗体长时间存留，连同炎症级联的诱导物可导致成熟(全面的，full-blown)的自身免疫。如果是这种情况，那么由于产生的组织损害的严重性，即使执行无谷蛋白的饮食也不能帮助逆转由抗不同的小麦抗原和肽的IgG和IgA抗体诱导的自身免疫反应过程。

[0011] 乳糜泻和谷蛋白免疫反应性/敏感性之间的比较显示在图1中。根据该模型，如果两名儿童——一名具有阴性遗传组成(HLA DQ2/DQ8$^-$)，另一名具有阳性遗传组成(HLA DQ2/DQ8$^+$)——都暴露于环境因素，如轮状病毒、细菌内毒素，和一些药物或它们的协同效应，那么结果可以是两名儿童的粘膜免疫耐受都破坏。针对麦醇溶蛋白的粘膜免疫耐受性的诱导导致抗天然的小麦蛋白和肽的IgA和/或IgG的产生，这是在两个为HLA DQ2/DQ8$^-$和HLA DQ2/DQ8$^+$的个体中谷蛋白敏感性启动的下一个步骤。

[0012] 然而，在具有阳性遗传组成的个体中，抗麦醇溶蛋白的IgG和IgA抗体连同炎症的生物标记可以激活tTg，诱导对绒毛的损伤，和导致绒毛萎缩。特定麦醇溶蛋白肽的脱酰氨导致在它和tTg之间形成复合物；抗原递呈细胞将该复合物呈现给T细胞和B细胞导致抗tTg、脱去酰氨基的麦醇溶蛋白和麦醇溶蛋白-tTg复合物的IgA或IgG的产生。这些抗体的形成和它们在血液中的检测是CD的标志，其是在1-2%的人群中检测到的这种遗传状况。如果CD未被处理，那么结果将是自身免疫和癌症。

[0013] 相比较，在HLA DQ2/DQ8阴性的个体中，免疫耐受的这种破坏和伴随的抗天然小麦蛋白和肽的IgA和/或IgG的产生可以激活炎性级联。然而，在缺乏tTg激活的情况下，绒毛萎缩不发生。而且，麦醇溶蛋白肽没有经历脱酰氨，因此产生只针对天然小麦和麦醇溶蛋白肽的IgG和IgA抗体。

[0014] 通过连续暴露于小麦抗原和连续的粘膜免疫耐受，小麦抗原和反应抗体形成可怕的免疫复合物联合，导致严重的谷蛋白免疫反应性和敏感性。这种免疫反应性和敏感性是在多达30%的人群中检测到非遗传状况。如果这种病症未被检查到，那么延长暴露于抗小麦抗原、肽的IgG和IgA和它们与不同组织抗原的交叉反应可导致多种自身免疫疾病。因此，即使在缺少CD的情况下，GS可仍然为攻击不同器官的其它谷蛋白相关的自身抗体提供生产性环境。

[0015] 而且，不含谷蛋白的饮食通常只推荐给符合CD诊断标准，而不是谷蛋白免疫反应性和敏感性诊断标准的那些人。不幸的是，其使许多谷蛋白敏感的人们不必要地遭受置他们于并发症的危险中的非常严重的症状、可用无谷蛋白饮食解决的状况，如果他们才知道的话。

[0016] 因此，需要新的范例用于在各种肠相关的疾病——包括谷蛋白反应性和敏感性、无症状乳糜泻、乳糜泻和肠相关的自身免疫——之间辅助诊断和区分。

[0017] 发明简述

[0018] 本发明的发明主题提供仪器、系统和方法，其中抗体用作生物标记来辅助诊断谷蛋白免疫反应性和敏感性、无症状乳糜泻、克罗恩氏病和其它肠相关病理。

[0019] 在本发明的某些方面中，检测来自人或其它动物的全血、血清、唾液或其它样品中针对以下抗原的抗体：(a) 小麦抗原；(b) 麦醇溶蛋白抗原；和 (c) 麦胚凝集素、谷吗啡(gluteomorphin)、麦谷蛋白、脱去酰氨基的麦谷蛋白、强啡肽原和强啡肽中的一种或多种。

[0020] 检测结果可以有利地用来帮助区分来自乳糜泻的谷蛋白免疫反应性或敏感性，特别是小麦抗原被脱酰氨，麦醇溶蛋白抗原选自 α－麦醇溶蛋白 33 聚体、α－麦醇溶蛋白 -17 聚体、γ－麦醇溶蛋白 15 聚体、ω－麦醇溶蛋白 17 聚体和麦谷蛋白 21 聚体。

[0021] 本发明的某些方面，检测来自人或其它动物的全血、血清、唾液或其它样品中针对以下抗原的一个或多个的抗体：γ－麦醇溶蛋白或其肽如 γ－麦醇溶蛋白 15 聚体、ω－麦醇溶蛋白或其肽如 ω－麦醇溶蛋白 -17 聚体、麦胚凝集素、谷吗啡、麦谷蛋白或其肽如麦谷蛋白 21 聚体、脱去酰氨基的麦谷蛋白或其肽、强啡肽原和强啡肽。

[0022] 本发明的某些方面，针对抗体进行检测和 / 或分析检测结果，该抗体辅助区分相对于显著症状的（典型的）乳糜泻、克罗恩氏病和慢性免疫激活的谷蛋白免疫反应性和 / 或敏感性、无症状或非典型乳糜泻。特定目的测试的测试板和试剂盒检测针对以下抗原中至少对 3、5、7 个或所有的抗体：α－麦醇溶蛋白、γ－麦醇溶蛋白、ω－麦醇溶蛋白、麦谷蛋白、麦胚凝集素、谷吗啡、强啡肽原、转谷胺酰氨酶和结合麦醇溶蛋白的转谷胺酰氨酶（麦醇溶蛋白－转谷胺酰氨酶复合物）。

[0023] 本发明的某些方面，特定目的的试验和试验试剂盒允许检测针对以下抗原中的 IgA 和 / 或 IgG 抗体：一种或多种小麦抗原、α－麦醇溶蛋白或一个或多个其肽如 α－麦醇溶蛋白 33 聚体和 / 或 α－麦醇溶蛋白 17 聚体、γ－麦醇溶蛋白或一个或多个其肽如 γ－麦醇溶蛋白 15 聚体、ω－麦醇溶蛋白或一个或多个其肽如 ω－麦醇溶蛋白 17 聚体、麦胚凝集素、阿片样肽如谷吗啡、强啡肽原和 / 或强啡肽中的一个或多个、麦谷蛋白或一个或多个其肽如麦谷蛋白 21 聚体、脱去酰氨基的麦谷蛋白或一个或多个其肽、麦醇溶蛋白－转谷胺酰氨酶复合物、或其组合。

[0024] 本发明的某些方面，抗体的检测可以用免疫测定完成，包括但不限于，ELISA 测定、RIA 测定、胶乳凝集反应、珠测定、蛋白质组学测定和本领域普通技术人员已知的其它免疫测定。

[0025] 本发明的发明主题的各种目的、特征、方面和优点从以下优选实施方式连同附图——其中同样的数字表示同样的组分——的详细描述将变的更明显。

[0026] 附图简述

[0027] 图 1 是显示乳糜泻(右手列出)和谷蛋白免疫反应性 / 敏感性(左手列出)之间区别的示意图，如本文所考虑的。

[0028] 图 2 是显示具有 12 种不同抗原和肽的 12 个不同排的样品微孔板布局的图示。

[0029] 图 3 是显示样品排微孔板布局的图示，通过该微孔板测量针对来自小麦和相关组织抗原的 12 种不同抗原或肽(抗原或肽段是透明的)的 IgG 和 IgA。

[0030] 图 4 是显示样品排微孔板布局的图示，通过该微孔板利用用于质量控制目的的每周一次的阴性和阳性对照(抗原或肽段是透明的)测量 IgG 和 IgA。

[0031] 图 5 是根据现有技术(17)使用 tTg 和各种抗原针对乳糜泻的抗体检测方案的图示。

[0032] 图 6 是根据现有技术(17)使用脱去酰氨基的麦醇溶蛋白肽针对对乳糜泻的检测

方案的图示。

[0033] 图 7 是根据本发明某些方面使用小麦抗原和肽的所有组成部分针对乳糜泻、谷蛋白免疫反应性 / 敏感性和自身免疫的建议检测方案的图示。

[0034] 发明详述

[0035] 根据本发明的某些方面，抗体用作生物标记来辅助诊断和区分如与抵抗许多小麦抗原和肽的典型乳糜泻相反的谷蛋白免疫反应性和敏感性、无症状乳糜泻、克罗恩氏病和其它肠相关的病理。

[0036] 在本发明的某些方面，检测体液的针对以下抗原中的一种或多种的免疫球蛋白 G（IgG）和 / 或免疫球蛋白 A（IgA）抗体：全麦抗原；α - 麦醇溶蛋白或一个或多个其肽；γ - 麦醇溶蛋白蛋白或一个或多个其肽；ω - 麦醇溶蛋白或一个或多个其肽；麦谷蛋白或一个或多个其肽；一个或多个阿片样肽；麦醇溶蛋白 - 转谷氨酰胺酶复合物（麦醇溶蛋白结合到转谷氨酰胺酶）；转谷氨酰胺酶；麦胚凝集素；和其组合。

[0037] 在本发明的某些方面，全麦抗原是脱去酰氨基的和可通过组合水溶性和醇溶性全麦蛋白来制备。α - 麦醇溶蛋白或一个或多个其肽包括 α - 麦醇溶蛋白 33 聚体和 / 或 α - 麦醇溶蛋白 -17 聚体，考虑其它的 α - 麦醇溶蛋白肽。γ - 麦醇溶蛋白或一个或多个其肽包括 γ - 麦醇溶蛋白 15 聚体，考虑其它的 γ - 麦醇溶蛋白肽。ω - 麦醇溶蛋白或一个或多个其肽包括 ω - 麦醇溶蛋白 17 聚体，考虑其它的 ω - 麦醇溶蛋白肽。麦谷蛋白或一个或多个其肽包括麦谷蛋白 21 聚体，考虑其它的麦谷蛋白肽。一个或多个阿片样肽包括外啡肽（exorphin）——包括谷吗啡、强啡肽原和 / 或强啡肽，考虑其它的外啡肽。

[0038] 在本发明的某些方面，检测来自人或其它动物的全血、血清、唾液或其它体液样品的针对以下抗原的抗体：a）小麦抗原；b）麦醇溶蛋白抗原；和（c）麦胚凝集素、谷吗啡、麦谷蛋白、脱去酰氨基的麦谷蛋白、强啡肽原和强啡肽中的一个或多个。检测结果被认为特别有趣，其中小麦抗原被脱去酰氨基，麦醇溶蛋白抗原选自 α - 麦醇溶蛋白 33 聚体、α - 麦醇溶蛋白 17 聚体、γ - 麦醇溶蛋白 15 聚体、ω - 麦醇溶蛋白 17 聚体和麦谷蛋白 21 聚体。测试板和试剂盒可有利地检测 α - 麦醇溶蛋白、γ - 麦醇溶蛋白、ω - 麦醇溶蛋白、麦谷蛋白、麦胚凝集素、谷吗啡、强啡肽原、转谷氨酰胺酶、和结合麦醇溶蛋白的转谷氨酰胺酶中的至少 3、5、7 种或所有抗原。

[0039] 在本发明的某些方面，特定目的的测定和测定试剂盒允许检测针对以下抗原的 IgA 和 / 或 IgG 抗体：一种或多种小麦抗原、α - 麦醇溶蛋白或一个或多个其肽例如 α - 麦醇溶蛋白 33 聚体和 / 或 α - 麦醇溶蛋白 17 聚体、γ - 麦醇溶蛋白或一个或多个其肽例如 γ - 麦醇溶蛋白 15 聚体、ω - 麦醇溶蛋白或一个或多个其肽如 ω - 麦醇溶蛋白 17 聚体、麦胚凝集素、阿片样肽如以下的一个或多个：谷吗啡，强啡肽原和 / 或强啡肽、麦谷蛋白或一个或多个其肽如麦谷蛋白 21 聚体、脱去酰氨基的麦谷蛋白或一个或多个其肽、麦醇溶蛋白 - 转谷氨酰胺酶复合物、或其组合。

[0040] 本发明的某些方面，抗体的检测可以用免疫测定完成，包括但不限于，ELISA 测定、RIA 测定、胶乳凝集反应、珠测定、蛋白质组学测定和本领域普通技术人员已知的其它免疫测定。

[0041] 下面是测定、它们的应用和关于一些测试患者的分析的示例性描述。虽然与本文描述的那些相似或相等的其它材料和方法可用于本发明的实施或测试，但是现在在测定的

示例性描述中描述优选的方法和材料以进一步说明本发明。

[0042] 实施例 1

[0043] ELISA 测定(酶联免疫吸附测定)

[0044] A. 材料和方法——板和样品制备 :

[0045] 小麦抗原和肽。全麦抗原通过混合水溶性和醇溶性蛋白来制备。不同的麦醇溶蛋白肽——包括 α - 麦醇溶蛋白 33 聚体、17 聚体、γ - 麦醇溶蛋白 15 聚体、ω - 麦醇溶蛋白 17 聚体、谷吗啡、强啡肽原、转谷氨酰胺酶、和结合到转谷氨酰胺酶的麦醇溶蛋白、谷氨酸脱羧酶 (GAD-65) 高压液相色谱级,通过 Bio-Synthesis Inc(Lewisville,TX) 来合成。麦胚凝集素 (WGA) 购自 Sigma/Aldrich(Saint Louis,MO)。

[0046] 将抗原和肽以 1.0mg/mL 的浓度溶解于甲醇,然后在 0.1M 碳酸盐 - 碳酸氢盐缓冲液 pH9.5 中 1:100 稀释,向聚苯乙烯平底 ELISA 板的每孔中加入 50μl。

[0047] 将 ELISA 板于 4℃温育过夜,然后用 200μl 含有 0.05% 吐温 20(pH7.4)的三羟甲基氨基甲烷缓冲盐水(Tris-buffered saline,TBS)洗三次。通过加入 200mL2% 牛血清蛋白(BSA)的 TBS 防止免疫球蛋白的非特异性结合,并于 4℃温育过夜。洗平板并在质量控制后保存在 4℃直到使用。

[0048] 酶结合物包括 :亲和纯化的抗体磷酸酶标记的羊抗人 IgG(JacksonImmunoResearch,Cat#109-055-008)、亲和纯化的抗体磷酸酶标记的羊抗人 IgA(Jackson ImmunoResearch,Cat#109-055-011)。

[0049] 如本文进一步描述的包括在方法中的其它另外的试剂和材料包括 :磷酸盐缓冲盐水粉末(Sigma,Cat#P3813-10PAK)、牛血清白蛋白(Biocell,Cat#3203-00)、叠氮化钠(Sigma,Cat#S-2002)、吐温 20(Sigma,Cat#P1379-1000ML)、甘油(Sigma,Cat#G5516-500ML)、氢氧化钠(Sigma,Cat#S-5881)、氯化镁(Sigma,Cat#8266)、二乙醇胺(Sigma,Cat#D-8885)、1.0N 盐酸溶液 (Sigma,Cat#H3162)、5mg 底物片剂 :p-NPP(对硝基苯磷酸盐)(Sigma,Cat#S-0942)和蒸馏水(D.H_2O)。

[0050] 制备微孔板并用期望数目的小麦相关抗原和 / 或肽包被。在下面的实例中,将 12 种不同的小麦相关抗原和肽包被在微孔板上。将校准物、阳性对照和稀释的患者样本加入到孔中,并且识别不同的小麦抗原的自身抗体在第一温育期间结合。清洗孔以去除所有未结合的蛋白质之后,纯化的碱性磷酸酶标记的兔抗人 IgG/IgA 未结合的结合物通过进一步的清洗步骤而去除。

[0051] 用对硝基苯磷酸盐(PNPP)底物使结合的结合物可见,该底物产生黄色反应产物,其强度与样品中自身抗体浓度成比例。每孔加入氢氧化钠来终止反应。在 405nm 读取颜色强度。

[0052] 纯红色盖(plain red top)或红黄盖(red tiger top)(SST 管)用于样品采集,虽然在某些方面,考虑针对该测定的其它样品采集装置。

[0053] 利用无菌静脉穿刺技术采集血液样品,并且利用标准程序获得血清。在某些方面,优选最少约 50μl 血清用于测定,其因此对应约 0.5ml 或更多血液。

[0054] B. 试验测定程序

[0055] 现在讨论辅助诊断和检测谷蛋白免疫反应性和敏感性、无症状乳糜泻、克罗恩氏病和其它肠相关的病理的 IgG 和 / 或 IgA 抗体阵列的分析程序。在一些方面,允许所有

试剂在试验测定开始前达到室温。试验测定程序包括用预望数目和类型的小麦相关抗原和 / 或肽制备期望数目的包被的孔或板。一旦微量滴定孔制备好，就利用多道移液器将约 100μl1:100 稀释的对照校准物加入到如图 3 所示的 A 排和 B 排微孔板中。将约 100μl1:100 稀释的患者测试样品，在这里是血清，加到针对临床样本 1 的 C 排和 D 排、针对临床样品 2 的 E 排和 F 排、针对临床样品 3 的 G 排和 H 排的复孔中。

[0056] 在单独的板上，以双份进行与临床样本相似定期的阴性和阳性对照，如图 4 所示。

[0057] 然后将平板在室温温育 60 分钟。温育后，将孔排空并利用 ELISA 清洗器用 PBS 洗 4 次。将约 100μl 最佳稀释的碱性磷酸酶标记的羊抗人 IgA 加入到 IgA 板或以最佳稀释将约 100μl 酶标记的 IgG 加入到 IgG 板中。

[0058] 然后将各自平板于室温温育 30-60 分钟。结合温育结束前约 10 分钟，通过用 5ml 底物缓冲液混合 5mg 对硝基苯基磷酸盐片剂，充分混合直到片剂完全溶解而制备底物溶液。重复利用 ELISA 清洗器用 PBS 洗 4 次。然后，将约 100μl 底物溶液加到每孔中。然后将平板于室温温育 30 分钟，避免任何的直接阳光暴露。通过加入约 50μl 的 3N NaOH 来终止反应。使用微孔板读数器以空白孔为背景，在 405nm 读取孔的颜色强度，记录校准物、对照和未知样品的吸光度。

[0059] C. 结果的计算

[0060] 板在 405nm 读数获得光密度值（OD405）之后，将阴性对照的平均 OD、阳性对照的平均 OD 和每个临床样本的平均 OD 除以 A 排和 B 排上校准物的平均 OD 以获得各自的指数值（IV）。

[0061] 通过将每个双份样品的平均 OD 除以校准物对照值的平均 OD（例如，将孔 C1 和 D1 的平均 OD 除以孔 A1 和 B1 的平均 OD，将孔 C2 和 D2 的平均 OD 除以孔 A2 和 B2 的平均 OD，将孔 C3 和 D3 的平均 OD 除以孔 A3 和 B3 的平均 OD 等等）来计算针对 12 种不同抗原的每种抗体的指数值 (IV)。

[0062] 然后将结果与建立的参考范围进行比较。

[0063]

$$\text{指数} = \frac{\text{患者的平均 OD}}{\text{校准物的平均 OD}}$$

[0064]

小麦抗原的指数计算	
校准物 1 (OD)	0.41
校准物 2 (OD)	0.44
样品 3A (OD)	3.77
样品 3B (OD)	3.79
指数	8.93

[0065] D. 结果的解释

[0066] 患有乳糜泻的 3 名患者、具有谷蛋白免疫反应性和敏感性的 3 名患者和患有克罗恩氏病重叠谷蛋白敏感性的 3 名患者的 IgG 和 IgA 抗体样式的实例显示在表 2-7 中。克罗恩氏病，也称作局限性肠炎，是一类具有强的遗传组分的炎性肠病。它常常被描述为自体免疫性疾病，但是其它人认为它是免疫缺陷疾病。

[0067] 乳糜泻和谷蛋白免疫反应性 / 敏感性 / 自身免疫之间的数据解释和实验室区分显示在表 8 中。特别地，现在考虑乳糜泻可如下区别于无症状乳糜泻、谷蛋白免疫反应性 / 敏感性和 / 或谷蛋白相关的自身免疫 ：

[0068] a. 无症状乳糜泻的血清学模式表明测试结果包括抗以下抗原的任何一个或组合的 IgA 和 / 或 IgG 的阳性结果 ：小麦蛋白、α - 麦醇溶蛋白 33 聚体、脱去酰氨基的 α - 麦醇溶蛋白 33 聚体、α - 麦醇溶蛋白 25 聚体、α - 麦醇溶蛋白 18 聚体、α - 麦醇溶蛋白 17 聚体、γ - 麦醇溶蛋白 15 聚体、ω - 麦醇溶蛋白 17 聚体、麦谷蛋白、脱去酰氨基的麦谷蛋白、谷吗啡、强啡肽原和麦胚凝集素，和抗转谷氨酰胺酶 -2 的阴性结果，和抗转谷氨酰胺酶 -3 和转谷氨酰胺酶 -6 至少之一阳性的 IgA 和 IgG 测试的至少之一。

[0069] b. 谷蛋白免疫反应性和敏感性的血清学模式表明测试结果包括抗小麦抗原，特别是天然的 α - 麦醇溶蛋白、γ - 麦醇溶蛋白、ω - 麦醇溶蛋白、麦谷蛋白、脱去酰氨基的麦谷蛋白、谷吗啡和麦胚凝集素，而不是脱去酰氨基的 α - 麦醇溶蛋白和不是转谷氨酰胺酶 -2 的 IgG 和 / 或 IgA 的阳性结果。

[0070] c. 与谷蛋白免疫反应性 / 敏感性和自身免疫相关的诊断表明测试结果包括抗小麦抗原，特别是天然的 α - 麦醇溶蛋白、γ - 麦醇溶蛋白、ω - 麦醇溶蛋白、麦谷蛋白、脱去酰氨基的麦谷蛋白、谷吗啡和麦胚凝集素的 IgG 和 / 或 IgA 的阳性结果，和对谷氨酸脱羧酶、小脑组织抗原或肽或其它组织抗原的任何 IgG、IgA 或 IgM 的阳性结果，以及对脱去酰氨基的 α - 麦醇溶蛋白、脱去酰氨基的麦谷蛋白或抗转谷氨酰胺酶 -2 的 IgA 的阴性结果，但是抗转谷氨酰胺酶 -3 和 / 或转谷氨酰胺酶 -6 的阳性 IgA 或 IgG。

[0071] 可报告的范围和参考范围显示在表 1 中，其可不时地被更新。读者将注意与在高于平均值的 2 标准建立的参考范围相比，虽然抗 tTg 和麦醇溶蛋白 -tTg 复合物的 IgA 抗体

是高度阳性的（证实 CD 的诊断），但是 IgG 和 IgA 抗体的样式和强度随抗原而变化。例如，虽然在具有乳糜泻的所有 3 名患者中的抗小麦抗原的 IgG 和 IgA 较参考范围高 4-6 倍，但是当测量针对 α－麦醇溶蛋白 33 聚体的 IgG 和 IgA 时，IgG 抗体水平在一名患者中显著升高，IgA 水平在三名患者中的二名中显著升高（表 2、3）。

[0072] 当与具有乳糜泻的患者相比时，在具有谷蛋白免疫反应性和敏感性的患者中，三名患者中一个也没有显示显著的抗 tTg 和麦醇溶蛋白 -tTg 复合物的 IgA 反应性，而抗小麦抗原并结合一个或多个小麦肽（α－麦醇溶蛋白、γ－麦醇溶蛋白、ω－麦醇溶蛋白、麦谷蛋白、谷吗啡、强啡肽原和麦胚凝集素）的 IgG 和 IgA 抗体显著升高。针对结合 tTg 和麦醇溶蛋白 -tTg 复合物的小麦抗原和肽的 IgA 免疫反应在乳糜泻和谷蛋白免疫反应性 / 敏感性之间清楚地区分，其中 IgG 和 / 或 IgA 抗体针对各种抗小麦抗原和肽但不针对 tTg 和麦醇溶蛋白 -tTg 复合物起反应（表 4、5）。

[0073] 表 6 和 7 呈现具有克罗恩氏病的三名患者的结果。抗 tTg 和麦醇溶蛋白 -tTg 复合物的 IgG 和 IgA 抗体的样式清楚地显示这些患者，除了克罗恩氏病之外，也遭受谷蛋白免疫反应性 / 敏感性，并可能也遭受乳糜泻（表 6、7）。

[0074] 病例研究实例

[0075] 四个不同的病例报告——第一个关于具有乳糜泻的患者，第二个关于具有谷蛋白敏感性的患者，第三个关于具有谷蛋白敏感性和自身免疫的患者，第四个关于具有谷蛋白敏感性重叠克罗恩氏病的患者——显示在下面。

[0076] A. 病例报告 #1 ：通过利用抗麦醇溶蛋白和组织转谷氨酰胺酶的 IgA 和不含谷蛋白的饮食的改进进行的老年人中乳糜泻的诊断

[0077] 提到对一名具有长期消化不良、疲劳和迅速体重减轻的 76 岁男性进行胃肠评价。血液试验显示具有低浓度叶酸和维生素 B-12 的大细胞性贫血。患者的血红蛋白浓度是 79g/L，白蛋白 32g/L，转谷氨酰胺酶 212μg/mL（正常范围 =0-10μg/mL）。进行紧急的结肠镜检查术和十二指肠活组织检查，其产生肉眼可见的正常结果。在该水平，利用 FDA－批准的试剂盒来检查他的抗麦醇溶蛋白和转谷氨酰胺酶的 IgG 和 IgA 浓度。抗 α－麦醇溶蛋白的 IgG 和 IgA 均非常高 ；抗转谷氨酰胺酶，IgA 而不是 IgG 高于参考范围 3.8 倍。鉴于抗麦醇溶蛋白和转谷氨酰胺酶的 IgA 阳性和乳糜泻的诊断，给他输入 2 单位的压紧细胞（packed cells）并且开始不含谷蛋白的饮食和每天 20mg 泼尼松。六个月之后，他已增加约 12 磅和几乎不显示 GI 症状。由于该改进，患者坚持不含谷蛋白的饮食。在第一次完成抗麦醇溶蛋白和转谷氨酰胺酶的 IgG 和 IgA 抗体测试一年之后，针对这些抗体的重复测试是阴性的，其是在该具有无症状乳糜泻的老年患者的治疗中疾病管理加上不含谷蛋白的饮食起作用的进一步指示。

[0078] 讨论 ：依照 Catassi et al.（1、11），乳糜泻 (CD) 是西方国家中最常见的终生疾病之一。然而，主要由于对关于该重要痛苦的初级护理医师的差的知晓，大多数 CD 病例未被诊断 (Catassi C, et al., Am JGastroenterol, 102:1454-1460, 2007)。察觉乳糜泻呈现吸收不良伴随的 GI 症状。但是许多具有乳糜泻的患者没有呈现 GI 症状。这些个体可具有无症状或非典型的乳糜泻，并且状况可与铁缺乏、贫血、增加的肝脏酶、骨质疏松或神经学症状一起呈现 (12)。如本文所用，术语 " 非典型的乳糜泻 " 指只具有轻微症状的患者中的乳糜泻，术语 " 无症状乳糜泻 " 指无症状的患者中的乳糜泻。

[0079] 对乳糜泻的日益增加的认识归因于使用具有更高灵敏度和特异性的新的血清学测定。直到最近，乳糜泻被错误地认为是不寻常的并且主要在幼儿期或儿童期期间检测到。然而，现在认识到大多数 CD 病例发生在 40-60 岁的成人。该年龄组中的患者可以以非典型的方式呈现他们的症状、实验室检验结果和其它检查指征。实际上，根据最近的出版物，七名患者中少于一名被正确地诊断为 CD(13)。

[0080] 因此，如该病例所显示的，如果成人患者呈现提示吸收不良的症状和指征，应考虑抗麦醇溶蛋白和转谷氨酰胺酶的 IgA 抗体测试。如果测试结果是阳性的，那么应该然后使乳糜泻成为鉴别诊断的部分，基于此，应建议不含谷蛋白的饮食。如果不含谷蛋白的饮食产生症状的改进，那么患者应不论年龄地坚持该饮食。

[0081] B. 病例报告 #2 ：由麻醉药、抗生素和疼痛药物的结合引起的谷蛋白免疫反应性和敏感性

[0082] 一名 46 岁的女性得到她的内科医师给出的年度健康检查。基于她的医学检查和正常的 CBC、包括肝脏酶在内的化学检查以及自身免疫状况，她被分类为健康人。那时没有测量谷蛋白抗体。几个月之后她为了根管、骨移植物和制备牙种植而去她的牙科医生那里。十天里五次不同的访问期间，她被用麻醉物质（甲哌卡因）、抗生素和止痛药治疗。四个月之后，在用利多卡因进行局部麻醉之后完成牙植入程序，随后开了抗生素（阿莫西林）和止痛药的处方。四个小时之后她发展了具有局部水肿的严重变态反应，特别是嘴唇和眼眶周围区域肿胀。患者变得焦动不安和显示全身瘙痒，特别是她的脸、手和脚。具有喘鸣的胸部发紧和呼吸困难是对使用的一种或多种药物的变态反应的指征。她被立即用每公斤体重 0.01mL 肾上腺素治疗，肌肉内补充抗组胺治疗。然而，虽然控制住了变态反应，但是患者发展了严重呕吐和腹泻并伴有严重腹痛，这持续了 8 天。两周之后，虽然腹泻已改善，但是患者连续抱怨气胀和具有激惹性肠样综合征的腹部不适。有人向她提到 GI 专科医生，他在彻底检查之后没有检测到值得注意的事。然后考虑谷蛋白敏感性的可能性，检查患者的 HLA 分型和 IgG 和 IgA 抗麦醇溶蛋白和抗转谷氨酰胺酶抗体。免疫试验显示这些结果 ：IgG 抗麦醇溶蛋白 6.8U/mL（正常范围 <20U/mL）；IgA 抗麦醇溶蛋白 4.1U/mL（正常范围 <20U/mL）；IgG 抗 tTg2.1U/mL（正常范围 <6U/mL）；IgA 抗 tTg1.2U/mL（正常范围 <4U/mL）；对 HLA DQ2 和 DQ8 是阴性的。基于这些发现，谷蛋白敏感性和乳糜泻被排除，结论是患者正遭受与对麻醉剂和其与抗生素的协同效应的反应相关的精神性的或特异质反应。她随访后的九十天之后，患者仍然抱怨气胀和腹痛，特别是每餐之后 1-3 小时。安排重复测试，并安排针对抗麦醇溶蛋白和抗 -tTg IgG 和 IgA 连同 ASCA 和 p-ANCA IgG 的基本检测和全面检测，这些是针对可疑的克罗恩氏病和溃疡性结肠炎的建议的检测。有意思的是，第一次 GI 不适之后几乎 100 天，虽然 ASCA 和 p-ANCA 完全处于正常范围内，但是抗麦醇溶蛋白的 IgG 和 IgA 超过参考范围 4 至 9 倍（麦醇溶蛋白 IgG=79U/mL ；IgA=54U/mL）。然而，抗 tTg 的 IgG 和 IgA 抗体处于正常范围内。此外，IgG 和 IgA 抗体检测针对以下许多抗原进行 ：小麦、麦醇溶蛋白、麦谷蛋白、麦胚凝集素、麦醇溶蛋白 -tTg 复合物和 tTg 抗原。检测到以高于确定的参考范围 2-7 倍的抗 12 种测试抗原中的 8 种的 IgG 和抗 12 种测试抗原中的 6 种的 IgA。抗 tTg 和麦醇溶蛋白 -tTg 复合物的 IgG 和 IgA 是阴性的（参见表 4 和 5，样品 #1）。这些结果连同抗麦醇溶蛋白但不抗转谷氨酰胺酶的基本 IgG 和 IgA 试验阳性显示由于对环境因素的变态反应，患者已丧失对小麦抗原的耐受并已发展了谷蛋白敏感性但不是乳糜泻。虽然缺少

抗 tTg 的 IgG 和 IgA 水平的升高，但是由于连续的 GI 不适和升高的抗麦醇溶蛋白的 IgG 和 IgA，建议不含谷蛋白的饮食，并且营养学家劝告患者摄入有益菌种和继续不含谷蛋白和也不含外源凝集素的限制膳食，因为 WGA 水平对于 IgG 和 IgA 也升高。该饮食和有益菌种引入之后六个月，患者的 GI 不适已减退并且她回到正常的健康。

[0083] 讨论：术语谷蛋白敏感性指对谷蛋白的提高的免疫应答性的状态，如 IgG、IgA 或抗麦醇溶蛋白但不是抗转谷氨酰胺酶的二者的升高所指示的 (14)。谷蛋白敏感性开始于由于影响粘膜免疫稳态的环境因素而对小麦抗原和肽的粘膜免疫耐受的丧失。

[0084] 在该病例中，谷蛋白敏感性在引发因子已影响她对小麦和相关抗原的免疫耐受状态之后几乎 100 天，基于 GI 症状和免疫测试，特别是抗麦醇溶蛋白和其相关蛋白和肽的 IgG 和 IgA 而被证实。在该患者中似乎麻醉剂、抗生素和止痛药的协同效应导致她的粘膜免疫系统失调，之后是对小麦和其它膳食蛋白质和肽的免疫耐受的破坏。这可能结合环境因素对消化酶类的活性影响，导致诱导紧密连接打开的和未消化的小麦蛋白和肽进入到粘膜下层、淋巴结和循环。这些抗原随后由抗原递呈细胞递呈给 T 细胞和 B 细胞。在该过程期间，麦醇溶蛋白特异的 B 细胞由麦醇溶蛋白特异的 T 细胞辅助，导致 B 细胞克隆扩增和针对麦醇溶蛋白和相关蛋白和肽的 IgG 和 IgA 抗体的释放，在该病例中这在最初的创伤体验之后约 100 天被检测到。

[0085] 本文得出结论，筛查具有与麻醉剂和抗生素的使用相关的 GI 不适的患者中谷蛋白敏感性可通过测量抗麦醇溶蛋白和相关蛋白和肽的循环 IgG 和 IgA 而容易地和具有成本效益地进行。没有这样做不但可使患者丧失准确诊断和执行不含谷蛋白的饮食的适当治疗，而且还可导致具有相关副作用的不必要的医学介入。

[0086] C. 病例报告 #3：谷蛋白免疫反应性、敏感性和自身免疫

[0087] 这里，表述一个病例报告，其中最初的表现导致肠激惹综合征的错误诊断，导致错误的医学介入。谷蛋白免疫反应性和敏感性的正确诊断在多年误治之后进行。

[0088] 内科医师检查了一名具有腹痛、便秘、酸返流和头痛的 49 岁女性。研究显示具有 10.8g/dl 血红蛋白的正常 CBC 和包括肝脏酶在内的正常化学分布。在几次就诊中，进行了详细的生物化学和免疫学分布——包括 ANA、类风湿因子、T3、T4 和 TSH 水平，所有测试都处于正常范围内。重复抱怨 GI 不适之后，指示患者进行 GI 评价。内窥镜检查和幽门螺杆菌测试结果是正常的。患者被诊断为肠激惹综合征并使用 β 阻断剂和耐信，其适度地改进了她的症状。然而，四年之后，除了旧的 GI 症状和头痛，她呈现不舒服、视力模糊和面部皮疹的症状。她间歇性的嗜睡和易怒，和经历呼吸问题。进一步的实验室检测显示她的血红蛋白是 9.7g/dl，具有 72fL 的 MCV、升高的红细胞沉降率 (46mm/1st 小时)、1:80 的 ANA(正常范围<40)，IgA 平滑肌抗体轻度升高，双链 DNA 和可提取的核抗体阴性。基于可用的证据，风湿病学家做出了系统性红斑狼疮 (SLE) 的诊断，并开始用类固醇治疗。她的总体状态有一些改善，但是她的血红蛋白水平继续变低，而她的 ESR 波动。两年之后她发展了排尿困难伴随她的躯干和腿的麻刺感和感觉障碍，这导致她去看神经学家。密切的询问显示躯干的带状感觉和视力敏锐度减退 (右眼 8/46，左眼 8/23) 具有极微的眼痛，但具有正常的眼运动。实验室研究得出低血红蛋白、异常的 MCV 和 14μg/L 的低血清铁蛋白 (正常范围 10-150μg/L)，这证实铁缺乏。脑的 MRI 扫描显示不是典型的多发性硬化的广泛的白质异常，但是在 CSF 检查中没有检测到异常。虽然血液和 CSF 检查没有显示包括梅毒、分支杆菌、疏螺旋体、

EBV、CMV、HTLV 和 6 型疱疹在内的细菌和病毒感染的证据，但是视觉诱发电位显示视神经延迟。鉴于这些异常，和由于早期调查中谷蛋白敏感性试验还未进行，考虑谷蛋白敏感性的可能性。安排了针对小麦蛋白和肽的所有组成成分以及抗 tTg 和多种组织抗原的综合的 IgG 和 IgA 检查。该综合的谷蛋白敏感性和免疫反应性筛查显示了抗小麦抗原、α－麦醇溶蛋白 33 聚体和 17 聚体、γ－和 ω－麦醇溶蛋白、麦谷蛋白、谷吗啡、强啡肽原、麦醇溶蛋白 -tTg 复合物、麦胚凝集素和谷氨酸脱羧酶 65(GAD-65) 的 IgG。检测了针对小麦抗原和麦胚凝集素的 IgA 抗体（参见表 4 和 5，样品 #3）。有意思的是，针对 tTg 测试的 IgA 和 IgG 均在正常范围内。

[0089] 而且，检测了抗神经节苷脂、小脑、突触蛋白、髓磷脂碱蛋白、胶原、甲状腺球蛋白和甲状腺过氧化物酶的抗体，所有的都高于参考范围 2-4 倍。上部的 GI 内窥镜检查和活组织检查显示正常的组织学和上皮内淋巴细胞。总体上，患者被诊断为具有谷蛋白敏感性和预期相关的自身免疫，包括谷蛋白共济失调、头痛、白质异常和视神经脊髓炎。执行静脉内甲基强的松龙的五天疗程，感觉、运动和视觉症状逐渐地改善。此外，基于抗小麦抗原和肽的所有组成成分的非常高水平的 IgG 和一些 IgA 抗体，引入不含谷蛋白的饮食，12 周之后，在患者的临床症状学中观察到显著的改进。她在营养学家的观察下继续 100% 不含谷蛋白的饮食，并停止类固醇治疗。重复引入抗小麦抗原、肽和人组织的饮食抗体测试之后六个月，观察到抗体水平超过 60% 的下降，并且患者变得几乎无症状。

[0090] 讨论：从该数据已得出结论，患者可能遭受谷蛋白免疫反应性和敏感性而不具有异常的组织组织学或完全的糜烂性胃炎和抗 tTg 抗体——通常基于此做出乳糜泻的诊断。如果具有谷蛋白敏感性和免疫反应性的患者没有基于适当的实验室检测，特别是抗小麦蛋白和肽的所有组成成分的 IgG 和 IgA 抗体而及时检测，那么患者的症状可误导许多临床医生针对狼疮、MS 样综合征、视神经脊髓炎和许多其它自体免疫疾病治疗他们的患者。因此，对具有自身免疫的征兆和症状的患者推荐抗小麦抗原和肽的所有组成成分的 IgG 和 IgA 抗体的测量，以便用不含谷蛋白的饮食的介入在逆转与谷蛋白免疫反应性和敏感性相关的自身免疫状况中将是起作用的。否则，未治疗和 / 或错误治疗，患者将发展多种自体免疫疾病。

[0091] D. 病例报告 #4：与克罗恩氏病重叠的谷蛋白免疫反应性和敏感性

[0092] 克罗恩氏病是炎性病症，其常常在生命的第二或第三个十年期间出现，在超过三分之二的患者中影响末端回肠 (15)。据认为遗传和环境因素的结合——包括肠菌群改变和针对它们的功能失调的反应——导致失调的免疫、改变的肠屏障功能，和可能的自身免疫 (16)。

[0093] 这里，一名 32 岁男性呈现胃肠不适和每个月 2-3 次腹泻。包括化学检查、CBC、铁、铁蛋白、转铁蛋白、维生素 B-12、甲状腺功能和尿分析在内的实验室结果都处于正常范围的中间水平内。第二次就诊和持续 GI 症状之后，他被提示去了 GI 专科医生，其安排另外的实验室检查。这些测试是针对抗幽门螺旋杆菌、酵母菌属和麦醇溶蛋白的抗体的粪便和血液测试的微生物学评价。关于沙门菌属、志贺菌属、耶尔森菌属、弯曲杆菌属、肠致病性大肠杆菌和肠出血性大肠杆菌或难辨梭菌的检测的粪便测试出现阴性。关于血液中的抗体检查，抗幽门螺旋杆菌的 IgG 和抗酵母菌属和麦醇溶蛋白的 IgA 是阴性的，但是抗麦醇溶蛋白的 IgG 中度升高，在 59U/mL（正常值 =<20U/mL）。认为 IgG 抗体升高是非特异的或保护性

的，并让患者使用止痛药和回家，而没有任何具体病症的诊断。三年之后，在看到水泻频率增加到每天 3-5 次和他的体重在最后两个月里减少 12 磅之后，患者去另一个 GI 专科医生那里寻求第二意见。进行了胃和十二指肠的活组织检查和内窥镜检查。虽然上部 GI 道的内窥镜检查显示窦的胃炎，但是组织学上，胃和十二指肠的活组织检查结果是阴性。进行了 D- 木糖吸收试验，尿中得到的值为 1.89g/5h，暗示吸收不良。免疫血清学 ANA 滴度低于 1:40，p-ANCA 和 c-ANCA 是阴性，但是抗酵母菌属抗原 (ASCA) 的 IgA 是阳性，在 85U/mL(正常 =<10U/mL)。基于增加频率的水泻、异常的 D- 木糖吸收和抗 ASCA 的 IgA 阳性，做出克罗恩氏病的诊断。利用考来烯胺(cholestyramine)的治疗试验开始，但是腹泻的频率保持不变。此外，给患者用 230mg 甲泼尼龙(甲强的松龙，methyprednisolone)和 2×1000mg 美沙拉嗪治疗。该治疗之后两年，患者发展了末端回肠的肠 - 肠瘘(entero-enteric fistulae)，伴有乙状结肠感染。收入院之后，进行了回肠结肠切除术，切除了 22cm 回肠。在他排气之后，执行 3×500mg 美沙拉嗪的维持缓解。

[0094] 在该治疗之后的八年里，患者持续遭受渐增频率的水泻和另外减轻 14 磅。该期间，利用阿司匹林、洛哌丁胺和布地奈德做了几次另外的治疗尝试，不幸的是没有显著的临床改善。而且，患者正在以每月的基础上减轻更多的重量。病史的完全回顾显示这样的事实，几乎早在十三年前，已发现麦醇溶蛋白 IgG 抗体升高，这在那时被认为正常。由于针对克罗恩氏病的所有经典治疗在所有这些年里都没有改善临床现象，所以安排了针对谷蛋白免疫反应性和敏感性评价的综合试验。这包括抗小麦、天然的和脱去酰氨基的 α - 麦醇溶蛋白肽、γ - 麦醇溶蛋白、ω - 麦醇溶蛋白、麦谷蛋白、谷吗啡、强啡肽原、麦醇溶蛋白 -tTg 复合物、转谷氨酰胺酶、麦胚凝集素和 GAD-65 的 IgG 和 IgA。

[0095] 表 6 和 7、样品 #3 中描述的结果显示患者的抗 12 种测试的抗原中 11 个的 IgG 抗体显著升高和抗小麦、α - 麦醇溶蛋白 33 聚体、ω - 麦醇溶蛋白、强啡肽原、麦胚凝集素和 GAD-65 的 IgA 抗体超过正常范围 2-5 倍。基于这些结果，除了克罗恩氏病，还做出谷蛋白敏感性的诊断。立即开始由米、马铃薯和其它不含谷蛋白 / 不含酵母的食物组成的饮食，这在六周之后导致腹泻完全停止。继续不含谷蛋白的饮食之后，不但粪便稠度变得正常，而且患者还开始增加重量。在一年之后的随访，患者回到正常状态和复得他丧失重量的 80% 以上。

[0096] 讨论：该病例报道克罗恩氏病与谷蛋白敏感性但不是与乳糜泻的结合。基于对不含谷蛋白的饮食的给人深刻印象的临床响应加上抗多种小麦抗原的 IgG 和 IgA 抗体的检测，和在重新评价 14 年前检测的 IgG 抗体水平之后，最终确立具有继发性吸收不良和谷蛋白敏感性的克罗恩氏病的诊断。由于检测到抗麦醇溶蛋白但不是转谷氨酰胺酶的 IgG 抗体，所以可以争辩在该患者中疾病开始于谷蛋白敏感性而不是克罗恩氏病。不顾持续暴露于谷蛋白和自体免疫疾病危险的实证的发表于 1999 年的事实 (Ventura A et al.,Gastroenterol,117 :303-310,1999) 做出克罗恩氏病的最初诊断；不幸的是，这被忽略了。

[0097] 本文考虑连续暴露于环境因素如小麦抗原引起的炎症持续延长的时期导致炎性肠病或克罗恩氏病。

[0098] 关于病例报告的结论

[0099] 前述的病例研究显示用于证实乳糜泻、谷蛋白免疫反应性 / 敏感性和自身免疫诊断的适当的实验室测试的重要性。它们显示多年的错误测试和误诊可导致多年受苦。得

到最准确的信息和最准确的诊断是重要的，以在一种状况和另一种状况之间进行区分。图5和6显示测试的当前状态以及如Volta et al.(17)所提出的针对乳糜泻的诊断中更多准确性所建议的未来方向的概要。图7概述根据本发明的某些方面的发明方案，并且提议针对小麦抗原和肽的所有组成成分的测试以提供乳糜泻、克罗恩氏病、谷蛋白免疫反应性/敏感性和自身免疫的最准确信息和确认。

[0100] 对本领域技术人员来说应该明显的是，除了那些已经描述之外的多种更多改变是可能的，而不背离本文的发明构思。因此，发明的主题除了在所附权利要求的范围里而不受限制。而且，在解释说明书和权利要求书中，所有术语应以与上下文一致的最宽的可能方式来解释。特别地，术语"包括(comprises)"和"包括(comprising)"应被解释为指以非排他的方式的元件、组分或步骤，表明提到的元件、组分或步骤可以与未清楚提到的其它元件、组分或步骤一起存在或利用或组合。当说明书权利要求书提及选自A、B、C……和N的至少一个事物时，文本应被解释为只需要来自该组的一个元件，不是A加N，或B加N等等。

[0101] 参考文献

[0102] 1.Catassi C,Fasano A.Celiac disease.Curr Opin Gastroenterol,24:687-691,2008.

[0103] 2.Anderson LA,McMillan SA,Watson RG,et al.Malignancy and mortality in a population-based cohort of patients with coeliac disease or 'gluten sensitivity.'World J Gastroenterol,13:146-151,2007.

[0104] 3.Tanabe S.Analysis of food allergen structures and development of foods for allergic patients.Biosci Biotechnol Biochem,72:649-659,2008.

[0105] 4.Chin RL,Latov N,Green PHR,et al.Neurological complications of celiac disease.J Clin Neuromusc Dis,5:129-137,2004.

[0106] 5.Sapone A,Lammers KM,Mazzarella G,et al.Differential mucosal IL-17expression in two gliadin-induced disorders:gluten sensitivity and the autoimmune enteropathy celiac disease.Int Arch Allergy Immunol.152:75-80,2010.

[0107] 6.Sapone A,Lammers KM,Casolaro V,et al.Divergence of gut permeability and mucosal immune gene expression in two gluten-associated conditions:celiac disease and gluten sensitivity.BMCMed.9:23,2011.

[0108] 7.Vojdani A,O'Bryan T,Kellermann GH.The immunology of immediate and delayed hypersensitivity reaction to gluten.Eur J Inflamm.6(1):1-10,2008.

[0109] 8.Shor DB,Barzilai O,Ram M,et al.Gluten sensitivity in multiple sclerosis:experimental myth or clinical truth?Ann NYAcad Sci,1173:343-349,2009.

[0110] 9.Vojdani A,O'Bryan T,Green JA,et al.Immune response to dietary proteins,gliadin and cerebellar peptides in children with autism.Nutr Neurosci.7(3):151-161,2004.

[0111] 10.Hadjivassiliou M,Grunewald RA,Lawden M,et al.Headache and CNS white matter abnormalities associated with gluten sensitivity.Neurol,56:385-388,2001.

[0112] 11. Catassi C, et al. Detection of Celiac disease in primary care: a multicenter case-finding study in North America. Am J Gastroenterol, 102: 1454-1460, 2007.

[0113] 12. Sanders DS, et al. Antibody negative coeliac disease presenting in elderly people—an easily missed diagnosis. BMJ, 330: 775-776, 2005.

[0114] 13. Matthias T, Neidhofer S, Pfeiffer S, et al. Novel trends in celiac disease. Cell. Mol. Immunol. 8: 121-125, 2011.

[0115] 14. Jacob S et al. Gluten sensitivity and neuromyelitis optica: Two case reports. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 76: 1028-1030, 2005.

[0116] 15. Egan CE, et al. Synergy between intraepithelial lymphocytes and lamina propria T cells drives intestinal inflammation during infection. Mucosal Immunol, 4: 658-670, 2011.

[0117] 16. Kaser A et al. Inflammatory Bowel Disease. Annu Rev Immunol, 28: 573-621, 2010.

[0118] 17. Volta U and Villanaci V. Celiac disease: diagnostic criteria in progress. Cell Mol Immunol, 8: 96-102, 2011.

[0119] 18. Vojdani A. 2011. The characterization of the repertoire of wheat antigens and peptides involved in the humoral immune responses in patients with gluten sensitivity and Crohn's disease. ISRN Allergy. Article ID950104, 1-12.

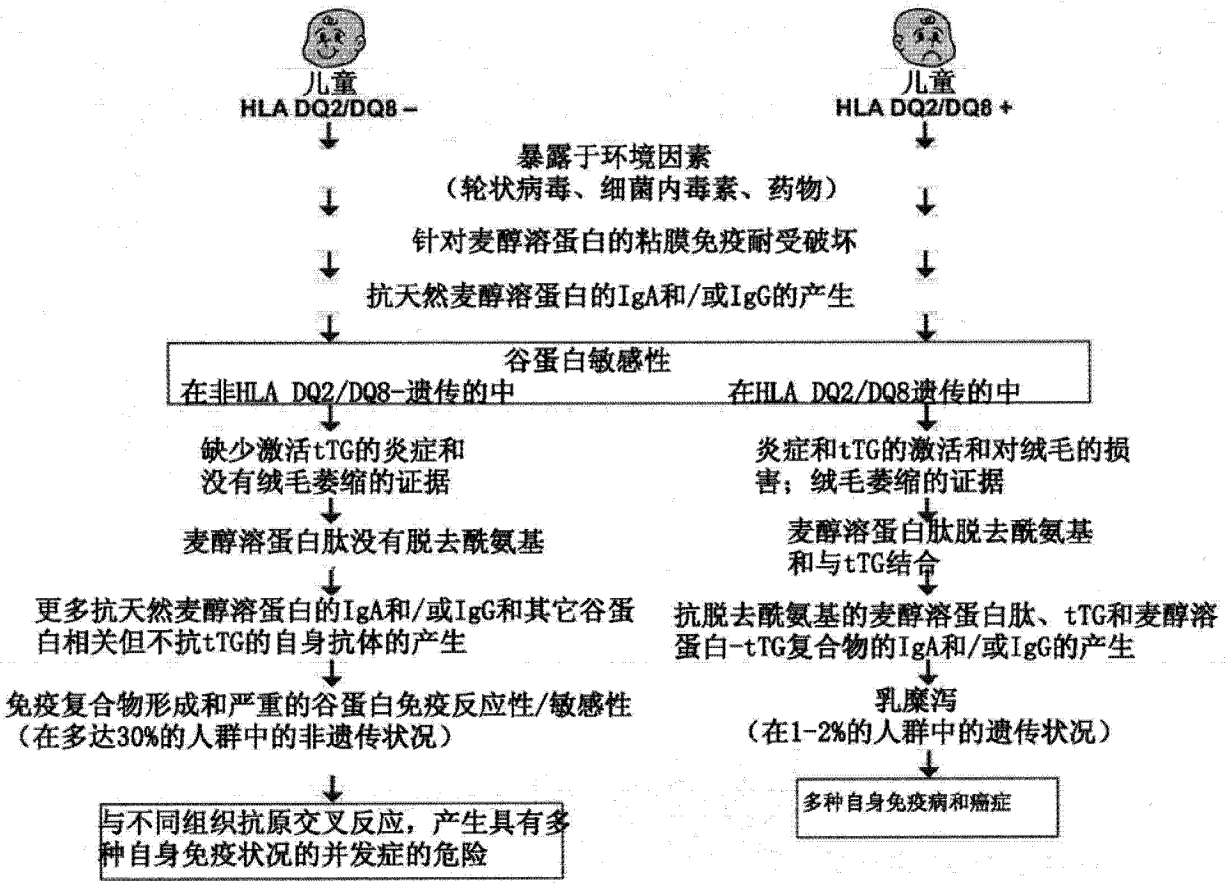

儿童
HLA DQ2/DQ8 –
儿童
HLA DQ2/DQ8 +
暴露于环境因素
（轮状病毒、细菌内毒素、药物）
针对麦醇溶蛋白的粘膜免疫耐受破坏
抗天然麦醇溶蛋白的IgA和/或IgG的产生
谷蛋白敏感性
在非HLA DQ2/DQ8-遗传的中
在HLA DQ2/DQ8遗传的中
缺少激活tTG的炎症和
没有绒毛萎缩的证据
麦醇溶蛋白肽没有脱去酰氨基
更多抗天然麦醇溶蛋白的IgA和/或IgG和其它谷蛋白相关但不抗tTG的自身抗体的产生
免疫复合物形成和严重的谷蛋白免疫反应性/敏感性
（在多达30%的人群中的非遗传状况）
与不同组织抗原交叉反应，产生具有多种自身免疫状况的并发症的危险
炎症和tTG的激活和对绒毛的损害；绒毛萎缩的证据
麦醇溶蛋白肽脱去酰氨基和与tTG结合
抗脱去酰氨基的麦醇溶蛋白肽、tTG和麦醇溶蛋白-tTG复合物的IgA和/或IgG的产生
乳糜泻
（在1-2%的人群中的遗传状况）
多种自身免疫病和癌症
谷蛋白敏感性与乳糜泻的区分

图 1

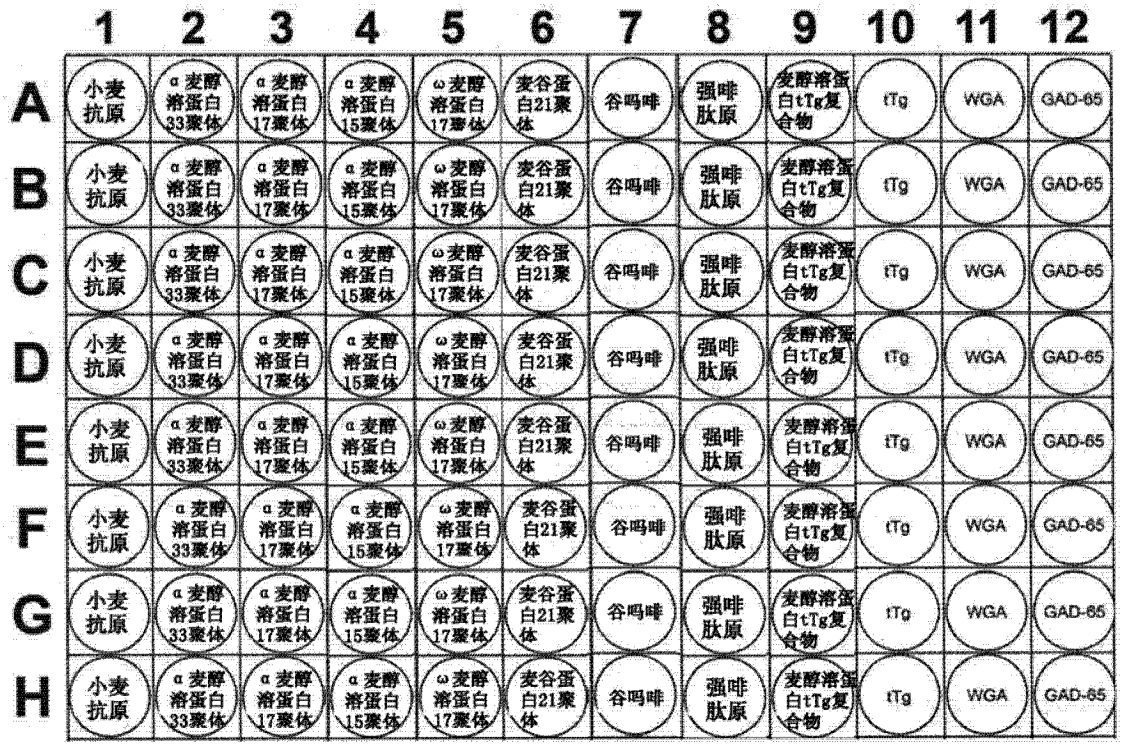

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
A 小麦抗原 α麦醇溶蛋白33聚体 α麦醇溶蛋白17聚体 α麦醇溶蛋白15聚体 ω麦醇溶蛋白17聚体 麦谷蛋白21聚体 谷吗啡 强啡肽原 麦醇溶蛋白tTg复合物 tTg WGA GAD-65
B 小麦抗原 α麦醇溶蛋白33聚体 α麦醇溶蛋白17聚体 α麦醇溶蛋白15聚体 ω麦醇溶蛋白17聚体 麦谷蛋白21聚体 谷吗啡 强啡肽原 麦醇溶蛋白tTg复合物 tTg WGA GAD-65
C 小麦抗原 α麦醇溶蛋白33聚体 α麦醇溶蛋白17聚体 α麦醇溶蛋白15聚体 ω麦醇溶蛋白17聚体 麦谷蛋白21聚体 谷吗啡 强啡肽原 麦醇溶蛋白tTg复合物 tTg WGA GAD-65
D 小麦抗原 α麦醇溶蛋白33聚体 α麦醇溶蛋白17聚体 α麦醇溶蛋白15聚体 ω麦醇溶蛋白17聚体 麦谷蛋白21聚体 谷吗啡 强啡肽原 麦醇溶蛋白tTg复合物 tTg WGA GAD-65
E 小麦抗原 α麦醇溶蛋白33聚体 α麦醇溶蛋白17聚体 α麦醇溶蛋白15聚体 ω麦醇溶蛋白17聚体 麦谷蛋白21聚体 谷吗啡 强啡肽原 麦醇溶蛋白tTg复合物 tTg WGA GAD-65
F 小麦抗原 α麦醇溶蛋白33聚体 α麦醇溶蛋白17聚体 α麦醇溶蛋白15聚体 ω麦醇溶蛋白17聚体 麦谷蛋白21聚体 谷吗啡 强啡肽原 麦醇溶蛋白tTg复合物 tTg WGA GAD-65
G 小麦抗原 α麦醇溶蛋白33聚体 α麦醇溶蛋白17聚体 α麦醇溶蛋白15聚体 ω麦醇溶蛋白17聚体 麦谷蛋白21聚体 谷吗啡 强啡肽原 麦醇溶蛋白tTg复合物 tTg WGA GAD-65
H 小麦抗原 α麦醇溶蛋白33聚体 α麦醇溶蛋白17聚体 α麦醇溶蛋白15聚体 ω麦醇溶蛋白17聚体 麦谷蛋白21聚体 谷吗啡 强啡肽原 麦醇溶蛋白tTg复合物 tTg WGA GAD-65

图 2

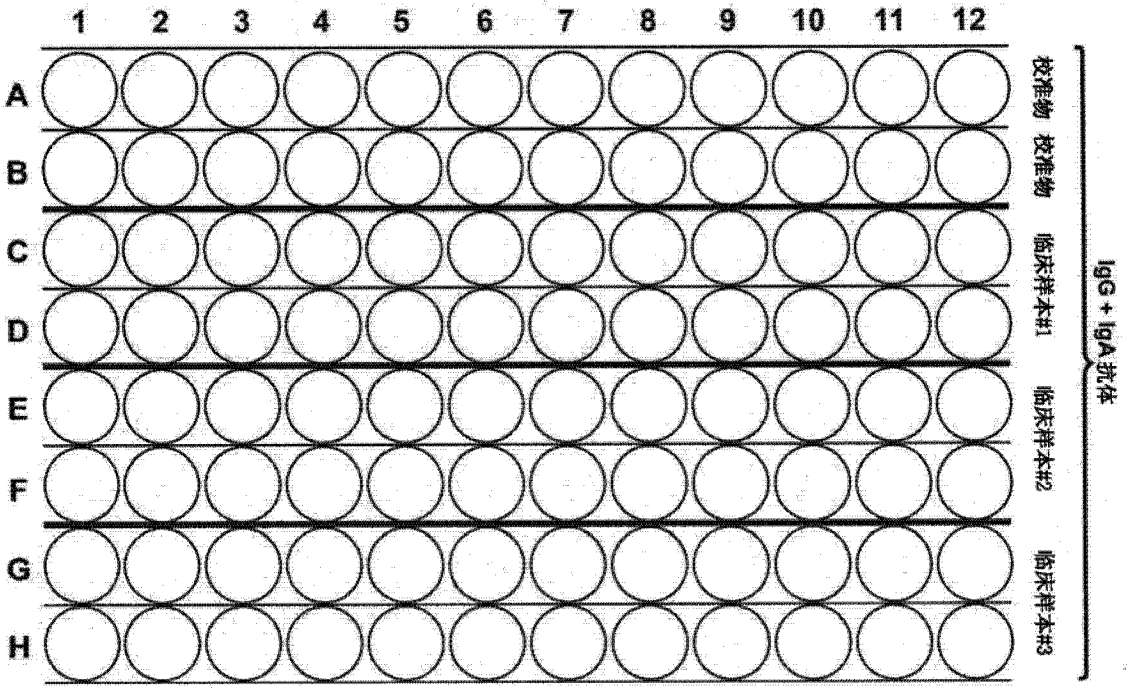

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
A
B
C
D
E
F
G
H
校准物
校准物
临床样本#1
临床样本#2
临床样本#3
IgG + IgA 抗体

图 3

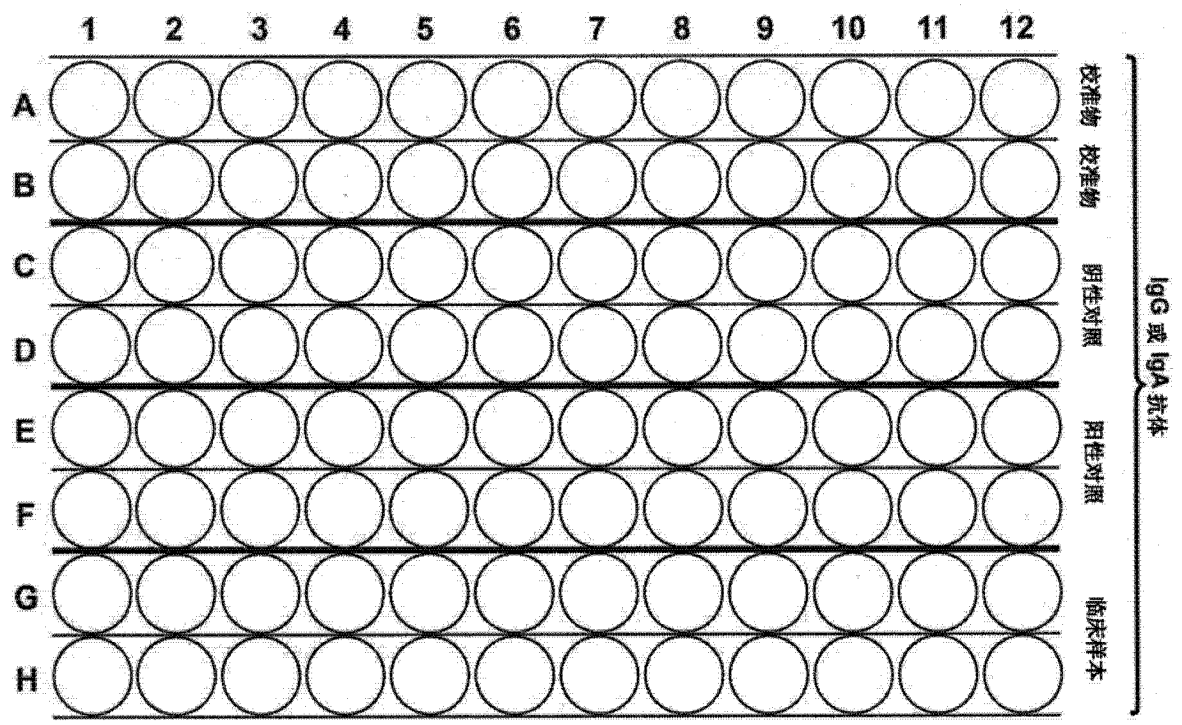

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
A
B
C
D
E
F
G
H
校准物
校准物
阴性对照
阳性对照
临床样本
IgG 或 IgA 抗体

图 4

表1-可报道的范围&参考范围（ELISA指标）

抗原	可报道的范围	在范围里（阴性）	模棱两可的	在范围外（阳性）	参考范围
小麦IgG	0.3-6.4	0.24-1.0	1.01-1.3	>1.3	0.24-1.3
小麦IgA	0.4-9.7	0.0-1.9	1.91-2.4	>2.4	0.0-2.4
α-麦醇溶蛋白-33IgG	0.3-10.0	0.16-1.1	1.11-1.4	>1.4	0.16-1.4
α-麦醇溶蛋白-33IgA	0.6-16.0	0.6-1.5	1.51-1.8	>1.8	0.6-1.8
α-麦醇溶蛋白-17IgG	0.3-5.0	0.0-1.1	1.11-1.5	>1.5	0.0-1.5
α-麦醇溶蛋白-17IgA	0.6-14.8	0.4-1.6	1.61-2.0	>2.0	0.4-2.0
α-麦醇溶蛋白-15IgG	0.4-12.0	0.14-1.3	1.31-1.7	>1.7	0.14-1.7
α-麦醇溶蛋白-15IgA	0.5-16.0	0.7-1.6	1.61-1.9	>1.9	0.7-1.9
ω-麦醇溶蛋白IgG	0.5-1.0	0.24-1.3	1.31-1.6	>1.6	0.24-1.6
ω-麦醇溶蛋白IgA	0.6-15.4	0.6-1.5	1.51-1.8	>1.8	0.6-1.8
麦谷蛋白IgG	0.2-6.0	0.0-1.1	1.11-1.5	>1.5	0.0-1.5
麦谷蛋白IgA	0.5-15.9	0.5-1.4	1.41-1.7	>1.7	0.5-1.7
谷吗啡IgG	0.3-8.0	0.12-1.2	1.21-1.5	>1.5	0.12-1.5
谷吗啡IgA	0.5-15.1	0.6-1.5	1.51-1.8	>1.8	0.6-1.8
强啡肽原IgG	0.4-13.0	0.13-1.7	0.131-1.7	>1.7	0.13-1.7
强啡肽原IgA	0.6-16.0	0.6-1.5	1.51-1.8	>1.8	0.6-1.8
麦醇溶蛋白tTg复合物IgG	0.4-13.0	0.12-1.2	1.21-1.6	>1.6	0.12-1.6
麦醇溶蛋白tTg复合物IgA	0.6-15.5	0.5-1.3	1.31-1.6	>1.6	0.5-1.6
转谷氨酰胺酶IgG	0.5-12.0	0.21-1.1	1.11-1.4	>1.4	0.21-1.4
转谷氨酰胺酶IgA	0.5-10.9	0.6-1.3	0.31-1.5	>1.5	0.6-1.5
麦胚凝集素IgG	0.5-10.0	0.17-1.1	1.1-1.5	>1.5	0.17-1.5
麦胚凝集素IgA	0.6-16.9	00.9-1.6	1.61-1.9	>1.9	0.9-1.9
谷氨酸脱羧酶IgG	0.4-12.0	0.29-1.1	1.11-1.3	>1.3	0.29-1.3
谷氨酸脱羧酶IgA	0.8-12.9	0.6-1.3	1.31-1.5	>1.5	0.6-1.5

表2-具有针对多种小麦抗原、肽和组织抗原反应的乳糜泻的3名患者的IgG抗体模式
——表示为光密度和指数计算

	小麦抗原	*α麦醇溶蛋白33聚体	α麦醇溶蛋白17聚体	γ麦醇溶蛋白15聚体	ω麦醇溶蛋白17聚体	麦谷蛋白21聚体	谷吗啡	强啡肽原	麦醇溶蛋白-tTg复合物	**tTg	麦胚凝集素	***GAD-65
校准物1	0.41	0.33	0.35	0.32	0.51	0.40	0.50	0.38	0.39	0.46	0.37	0.38
校准物2	0.44	0.35	0.35	0.32	0.25	0.43	0.49	0.37	0.40	0.44	0.36	0.42
样品1	3.77	1.04	3.86	1.02	3.84	1.34	1.44	3.84	1.76	3.83	1.15	3.81
（OD）	3.78	1.08	3.85	1.06	3.85	1.28	1.45	3.84	1.73	3.85	1.20	3.81
指数	8.93	3.11	11.02	3.26	10.14	3.19	2.92	10.32	4.43	8.59	3.24	9.52
样品2	3.85	3.87	1.13	1.10	3.86	1.08	3.84	1.26	1.37	3.84	1.45	0.98
（OD）	3.85	3.86	1.11	1.17	3.84	1.09	3.84	1.31	1.36	3.84	1.33	1.04
指数	9.09	11.32	3.21	3.55	10.15	2.63	7.76	3.44	3.46	8.55	3.83	2.53
样品3	3.77	0.89	1.11	3.53	1.23	3.37	1.31	1.15	3.84	1.37	3.84	3.54
（OD）	3.79	0.80	1.00	3.51	1.15	3.39	1.21	1.09	3.85	1.28	3.83	3.54
指数	8.93	2.46	3.03	11.05	3.14	8.23	2.55	2.99	9.74	2.95	10.56	8.85

*天然的+脱去酰氨基的麦醇溶蛋白33聚体　　**转谷氨酰胺酶　　***谷氨酸脱羧酶

$$\text{指数} = \frac{\text{患者的平均OD}}{\text{校准物的平均OD}}$$

表3-具有针对多种小麦抗原、肽和组织抗原反应的乳糜泻的3名患者的IgA抗体模式
——表示为光密度和指数计算

	小麦抗原	*α 麦醇溶蛋白33聚体	α 麦醇溶蛋白17聚体	γ 麦醇溶蛋白15聚体	ω麦醇溶蛋白17聚体	麦谷蛋白21聚体	谷吗啡	强啡肽原	麦醇溶蛋白-tTg复合物	**tTg	麦胚凝集素	***GAD-65
校准物1	0.36	0.37	0.36	0.36	0.31	0.41	0.43	0.39	0.39	0.37	0.41	0.48
校准物2	0.39	0.37	0.36	0.36	0.39	0.41	0.43	0.41	0.39	0.38	0.39	0.39
样品1	3.00	3.64	1.23	3.82	0.47	3.82	3.83	3.39	3.83	3.84	3.87	0.83
（OD）	3.03	3.56	1.22	3.81	0.45	3.81	3.82	3.40	3.81	3.86	3.86	0.84
指数	7.97	9.69	3.43	10.67	1.31	9.42	8.69	8.51	9.84	10.29	9.69	1.93
样品2	3.55	0.96	3.83	0.95	3.82	1.75	1.31	3.82	3.87	3.85	1.65	3.80
（OD）	3.53	1.01	3.82	0.99	3.83	1.97	1.40	3.83	3.87	3.86	1.77	3.83
指数	9.34	2.65	10.69	2.71	10.96	8.59	3.14	9.60	9.98	10.30	4.28	9.83
样品3	3.81	3.84	2.99	3.83	0.99	0.40	1.85	1.33	3.83	3.85	3.81	3.48
（OD）	3.80	3.85	2.92	3.81	0.94	0.35	1.74	1.15	3.82	3.84	3.82	3.43
指数	10.05	10.36	8.27	10.66	2.76	0.92	4.16	3.11	9.86	10.26	9.56	7.99

*天然的+脱去酰氨基的麦醇溶蛋白33聚体　　**转谷氨酰胺酶　　***谷氨酸脱羧酶

$$\text{指数} = \frac{\text{患者的平均OD}}{\text{校准物的平均OD}}$$

表4-具有针对多种小麦抗原、肽和组织抗原反应的谷蛋白反应性/敏感性/自身免疫性的3名患者的IgG抗体模式——表示为光密度和指数计算

	小麦抗原	*α麦醇溶蛋白33聚体	α麦醇溶蛋白17聚体	γ麦醇溶蛋白15聚体	ω麦醇溶蛋白17聚体	麦谷蛋白21聚体	谷吗啡	强啡肽原	麦醇溶蛋白-tTg复合物	**tTg	麦胚凝集素	***GAD-65
校准物1	0.33	0.42	0.34	0.33	0.38	0.38	0.36	0.35	0.33	0.35	0.35	0.36
校准物2	0.36	0.48	0.36	0.38	0.42	0.44	0.39	0.40	0.45	0.38	0.38	0.43
样品1 (OD)	3.86	0.95	3.22	1.22	0.41	1.29	1.54	3.81	0.67	0.44	1.28	1.25
	3.87	0.88	3.26	1.26	0.33	1.34	1.36	3.84	0.64	0.41	1.31	1.20
指数	11.14	2.03	9.37	3.46	0.93	3.21	3.84	10.31	1.66	1.17	3.55	3.09
样品2 (OD)	3.88	3.87	2.71	2.05	3.86	1.98	1.97	1.95	0.41	0.40	1.95	2.14
	3.88	3.87	2.65	2.10	3.85	2.28	2.20	2.19	0.37	0.41	2.18	2.21
指数	11.18	8.58	7.75	5.80	9.72	5.21	5.52	5.58	1.00	1.12	5.66	5.50
样品3 (OD)	3.85	2.44	2.38	3.86	2.41	2.50	3.86	2.49	1.49	1.00	3.86	3.88
	3.85	2.36	2.33	3.86	2.40	2.40	3.86	2.40	1.58	0.96	3.86	3.87
指数	11.10	5.33	6.81	10.79	6.05	5.99	10.23	6.60	3.91	2.69	10.59	9.79

*天然的+脱去酰氨基的麦醇溶蛋白33聚体 **转谷氨酰胺酶 ***谷氨酸脱羧酶

$$\text{指数} = \frac{\text{患者的平均OD}}{\text{校准物的平均OD}}$$

表5-具有针对多种小麦抗原、肽和组织抗原反应的谷蛋白反应性/敏感性/自身免疫性的3名患者的IgA抗体模式——表示为光密度和指数计算

	小麦抗原	*α麦醇溶蛋白33聚体	α麦醇溶蛋白17聚体	γ麦醇溶蛋白15聚体	ω麦醇溶蛋白17聚体	麦谷蛋白21聚体	谷鸣啡	强啡肽原	麦醇溶蛋白-tTg复合物	**tTg	麦胚凝集素	***GAD-65
校准物1	0.392	0.462	0.401	0.368	0.400	0.449	0.467	0.445	0.400	0.430	0.485	0.397
校准物2	0.421	0.462	0.414	0.379	0.418	0.453	0.479	0.481	0.392	0.402	0.455	0.404
样品1	2.176	0.371	0.995	3.098	0.346	2.240	2.141	2.452	0.271	0.254	2.470	0.664
（OD）	2.248	0.424	0.827	3.123	0.407	2.402	2.297	2.531	0.329	0.245	2.354	0.724
指数	5.442	0.860	2.236	8.328	0.921	5.146	4.691	5.381	0.758	0.600	5.132	1.733
样品2	1.763	1.442	0.260	1.332	0.377	1.073	1.007	0.994	0.195	0.343	1.101	0.743
（OD）	1.664	1.573	0.252	1.483	0.342	1.063	1.058	1.089	0.205	0.351	1.144	0.764
指数	4.215	3.263	0.628	3.768	0.879	2.368	2.183	2.249	0.505	0.834	2.388	1.881
样品3	3.862	0.429	0.350	0.208	0.364	0.269	0.401	0.336	0.335	0.438	3.868	0.359
（OD）	3.828	0.426	0.397	0.245	0.325	0.290	0.546	0.372	0.360	0.473	3.833	0.438
指数	9.459	0.925	0.917	0.606	0.842	0.620	1.001	0.765	0.878	1.095	8.193	0.995

*天然的+脱去酰氨基的麦醇溶蛋白33聚体　　**转谷氨酰胺酶　　***谷氨酸脱羧酶

$$\text{指数} = \frac{\text{患者的平均OD}}{\text{校准物的平均OD}}$$

表6-具有针对多种小麦抗原、肽和组织抗原反应患有克罗恩氏病的3名患者的IgG抗体模式——表示为光密度和指数计算

	小麦抗原	*α麦醇溶蛋白33聚体	α麦醇溶蛋白17聚体	γ麦醇溶蛋白15聚体	ω麦醇溶蛋白17聚体	麦谷蛋白21聚体	谷吗啡	强啡肽原	麦醇溶蛋白-tTg复合物	**tTg	麦胚凝集素	***GAD-65
校准物1	0.45	0.41	0.38	0.39	0.36	0.39	0.55	0.47	0.71	0.49	0.41	0.55
校准物2	0.38	0.33	0.44	0.44	0.37	0.40	0.54	0.56	0.60	0.49	0.48	0.46
样品1（OD）	3.74	1.56	0.65	2.29	0.56	2.10	0.54	0.69	3.81	0.81	1.23	1.83
	3.68	1.59	0.56	2.15	0.57	2.01	0.51	0.55	3.54	0.75	1.25	1.80
指数	8.97	4.26	1.47	5.30	1.54	5.22	0.96	1.19	5.59	1.59	2.79	3.59
样品2（OD）	3.87	0.47	0.72	0.55	0.59	0.49	0.52	0.44	1.04	0.76	3.83	3.87
	3.84	0.43	0.61	0.53	0.46	0.48	0.51	0.37	1.11	0.70	3.80	3.86
指数	9.31	1.22	1.62	1.29	1.43	1.23	0.94	0.78	1.63	1.49	8.62	7.63
样品3（OD）	3.86	3.79	3.86	3.67	3.85	3.24	3.84	3.86	1.71	3.80	3.82	3.84
	3.84	3.79	3.84	3.59	3.85	3.25	3.83	3.83	1.73	3.74	3.80	3.59
指数	9.31	10.23	9.33	8.67	10.51	8.22	7.03	7.43	2.62	7.71	8.60	7.34

*天然的+脱去酰氨基的麦醇溶蛋白33聚体　　**转谷氨酰胺酶　　***谷氨酸脱羧酶

$$\text{指数} = \frac{\text{患者的平均OD}}{\text{校准物的平均OD}}$$

表7-具有针对多种小麦抗原、肽和组织抗原反应患有克罗恩氏病的3名患者的IgA抗体模式——表示为光密度和指数计算

	小麦抗原	*α麦醇溶蛋白33聚体	α麦醇溶蛋白17聚体	γ麦醇溶蛋白15聚体	ω麦醇溶蛋白17聚体	麦谷蛋白21聚体	谷吗啡	强啡肽原	麦醇溶蛋白-tTg复合物	**tTg	麦胚凝集素	***GAD-65
校准物1	0.37	0.39	0.40	0.39	0.43	0.43	0.46	0.47	0.41	0.42	0.48	0.42
校准物2	0.45	0.44	0.46	0.42	0.47	0.51	0.54	0.50	0.48	0.48	0.49	0.47
样品1（OD）	3.81	3.80	0.22	3.68	0.26	3.13	2.55	2.70	0.97	0.93	3.81	1.03
	3.82	3.79	0.20	3.17	0.27	3.18	2.50	2.58	1.00	0.97	3.80	1.02
指数	9.30	9.08	0.49	8.50	0.59	6.68	5.06	5.44	2.23	2.13	7.85	2.32
样品2（OD）	3.00	0.87	0.67	0.74	0.33	0.66	1.43	1.12	0.98	0.29	1.00	1.07
	3.43	0.85	0.64	0.70	0.32	0.66	1.12	1.03	1.00	0.31	1.02	1.10
指数	7.85	2.05	1.52	1.79	0.72	1.40	2.56	2.21	2.23	0.67	2.08	2.43
样品3（OD）	3.89	3.56	0.99	0.99	2.25	1.05	1.12	3.85	1.00	1.18	3.73	3.87
	3.89	3.48	0.99	0.99	2.25	1.03	1.10	3.82	0.99	1.20	3.83	3.85
指数	9.48	8.43	2.27	2.45	4.98	2.20	2.23	7.90	2.25	2.65	7.79	8.69

*天然的+脱去酰氨基的麦醇溶蛋白33聚体 **转谷氨酰胺酶 ***谷氨酸脱羧酶

$$\text{指数} = \frac{\text{患者的平均OD}}{\text{校准物的平均OD}}$$

表8-用于检测谷蛋白免疫反应性的IgG和IgA反应性，和其与乳糜泻的区分

		指示				
抗原和肽	抗体同种型	当前针对乳糜泻的测试	提出的针对乳糜泻的测试	在本专利申请中提出的针对乳糜泻的测试	在本专利申请中提出的针对谷蛋白免疫反应性和敏感性的测试	在本专利申请中提出的针对谷蛋白免疫反应性、敏感性和自身免疫性的测试
α麦醇溶蛋白33聚体	IgG IgA	+或－ +	+或－ +	+或－ +	+ +或－	+ +或－
脱去酰氨基的α麦醇溶蛋白33聚体	IgG IgA	+或－ +	+或－ +	+或－ +	－ －	－ －
转谷氨酰胺酶	IgG IgA	+或－ +	+或－ +	+或－ +	+或－ －	+或－ －
麦醇溶蛋白转谷氨酰胺酶复合物	IgG IgA	未检测	+或－ +	+或－ +	+或－ －	+或－ －
α麦醇溶蛋白17聚体	IgG IgA	未检测	未检测	+或－ +	+ +或－	+ +或－
γ麦醇溶蛋白15聚体	IgG IgA	未检测	未检测	+或－ +	+ +或－	+ +或－
ω麦醇溶蛋白17聚体	IgG IgA	未检测	未检测	+或－ +	+ +或－	+ +或－
麦谷蛋白21聚体	IgG IgA	未检测	未检测	+或－ +	+ +或－	+ +或－
脱去酰氨基的麦谷蛋白21聚体	IgG IgA	未检测	未检测	+或－ +	－ －	－ －
谷吗啡	IgG IgA	未检测	未检测	+或－ +	+ +或－	+ +或－
强啡肽原	IgG IgA	未检测	未检测	+或－ +	+ +或－	+ +或－
麦胚凝集素	IgG IgA	未检测	未检测	+或－ +	+ +或－	+ +或－
谷氨酸脱羧酶	IgG	检测到	未检测	+或－	+或－	+
小脑肽	IgG	未检测	未检测	+或－	+或－	+
其它组织抗原	IgG	未检测	未检测	+或－	+或－	+

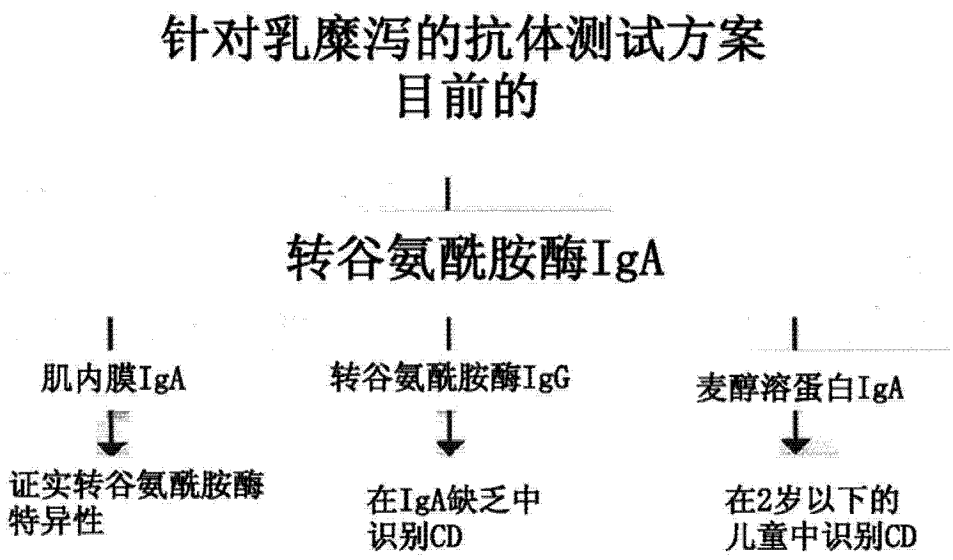


图5（现有技术）

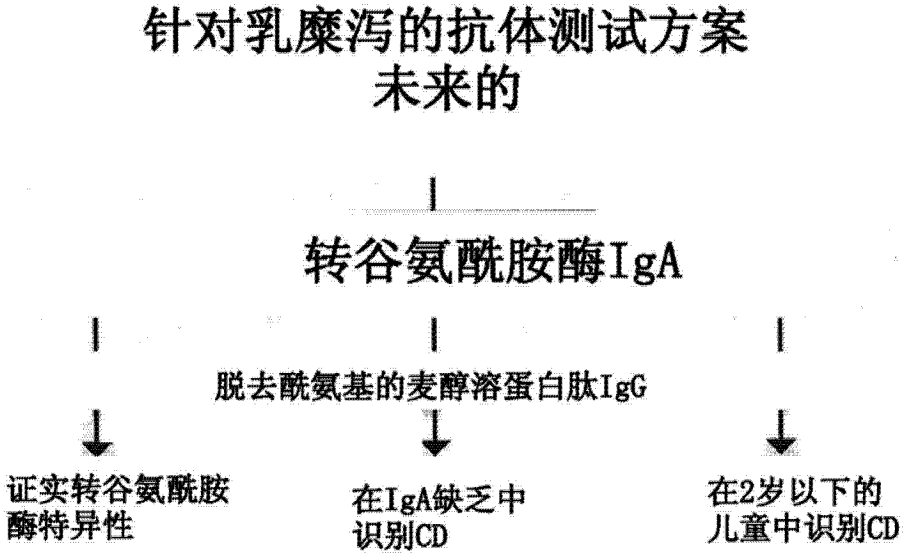


图 6（现有技术）

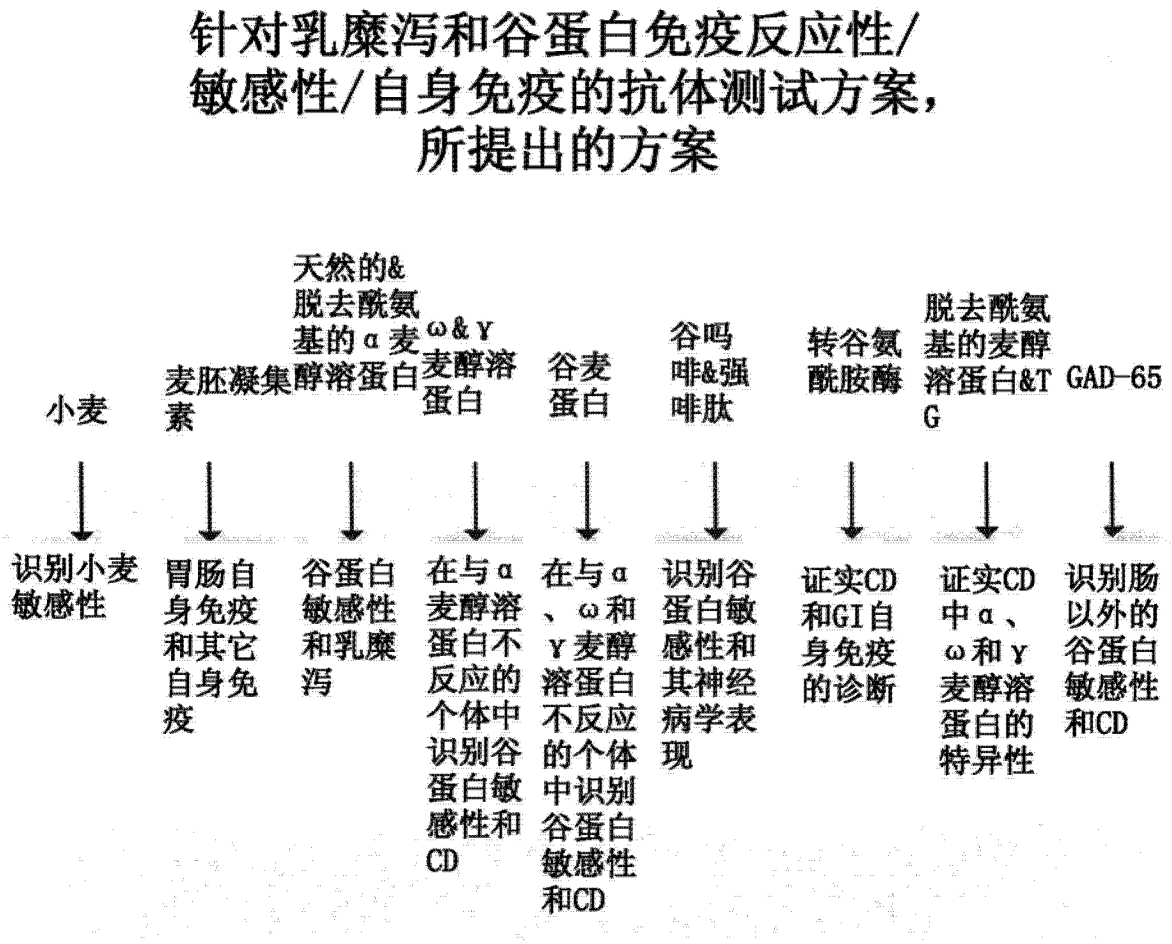
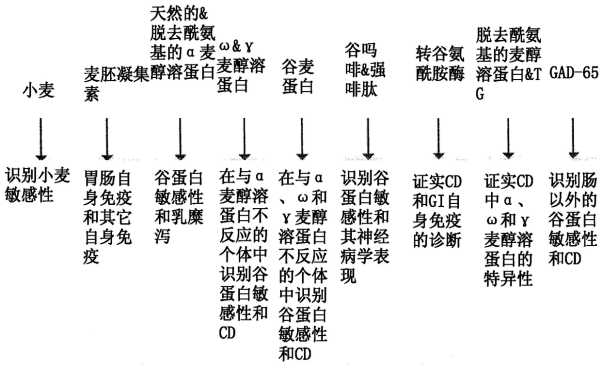

针对乳糜泻和谷蛋白免疫反应性/
敏感性/自身免疫的抗体测试方案，
所提出的方案
小麦
识别小麦敏感性
麦胚凝集素
胃肠自身免疫和其它自身免疫
天然的&脱去酰氨基的α麦醇溶蛋白
谷蛋白敏感性和乳糜泻
ω&γ麦醇溶蛋白
在与α麦醇溶蛋白反应不的中个体识别谷蛋白敏感性和CD
谷麦蛋白
在与α、ω和γ麦醇溶蛋白反应不的个体中识别谷蛋白敏感性和CD
谷吗啡&强啡肽
识别谷蛋白敏感性和其神经病学表现
转谷氨酰胺酶
证实CD和GI自身免疫的诊断
脱去酰氨基的麦醇溶蛋白&TG
证实CD中α、ω和γ麦醇溶蛋白的特异性
GAD-65
识别肠以外的谷蛋白敏感性和CD

图 7

专利名称(译)	检测谷蛋白敏感性和其区分于乳糜泻的方法和装置		
公开(公告)号	CN103430025A	公开(公告)日	2013-12-04
申请号	CN201280014219.6	申请日	2012-01-19
[标]申请(专利权)人(译)	免疫科学实验室公司		
申请(专利权)人(译)	免疫科学实验室公司		
当前申请(专利权)人(译)	免疫科学实验室公司		
[标]发明人	A沃佳达尼		
发明人	A·沃佳达尼		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/68		
CPC分类号	G01N2800/24 G01N33/6854 G01N2800/065 G01N33/53		
优先权	61/434501 2011-01-20 US		
其他公开文献	CN103430025B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

抗体被用作生物标记来辅助区分谷蛋白免疫反应性和敏感性、无症状乳糜泻、克罗恩氏病和其它肠相关的病理与典型的乳糜泻。在一类实施方式中，测试来自人类或其它动物的血清、唾液或其它样品的针对以下的抗体：(a)小麦抗原；(b)麦醇溶蛋白抗原；和(c)麦胚凝集素、谷吗啡、麦谷蛋白、脱去酰氨基的麦谷蛋白、强啡肽原和强啡肽中的一个或多个。测试结果被认为特别有意思，其中小麦抗原和麦醇溶蛋白抗原均选自α-麦醇溶蛋白33聚体、α-麦醇溶蛋白17聚体、γ-麦醇溶蛋白15聚体、ω-麦醇溶蛋白17聚体和麦谷蛋白21聚体。测试板和试剂盒可有利地测试α-麦醇溶蛋白、γ-麦醇溶蛋白、ω-麦醇溶蛋白、麦谷蛋白、麦胚凝集素、谷吗啡、强啡肽原、转谷氨酰胺酶-2、转谷氨酰胺酶-3、转谷氨酰胺酶-6、和结合麦醇溶蛋白的转谷氨酰胺酶中至少三、五、七个或所有的抗原。

针对乳糜泻和谷蛋白免疫反应性/敏感性/自身免疫的抗体测试方案，所提出的方案