

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
G01N 33/53
G01N 33/569



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01813527.7

[43] 公开日 2003 年 9 月 24 日

[11] 公开号 CN 1444732A

[22] 申请日 2001.7.3 [21] 申请号 01813527.7

[30] 优先权

[32] 2000. 7. 3 [33] AU [31] PQ8541

[86] 国际申请 PCT/AU01/00795 2001.7.3

[87] 国际公布 WO02/03065 英 2002.1.10

[85] 进入国家阶段日期 2003.1.28

[71] 申请人 赫利拉德有限公司

地址 澳大利亚西澳大利亚州

[72] 发明人 R·L·克兰西 T·J·博罗迪

G·庞 任志刚

[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

代理人 黄革生 刘金辉

权利要求书 3 页 说明书 13 页 附图 7 页

[54] 发明名称 对螺杆菌感染治疗进行监测及对成功根除的可能性进行预测的方法

[57] 摘要

本发明涉及对螺杆菌感染治疗进行监测的方法，特别是用免疫球蛋白 G2(IgG2)对幽门螺杆菌感染的根除进行监测的方法。本发明还涉及在将接受或正接受感染治疗的患者中对成功根除螺杆菌感染的可能性进行预测的方法，特别是通过测定将接受或正接受感染治疗的患者的白细胞介素-4，干扰素- γ 及 IgG 的水平对成功根除的可能性进行预测的方法。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1、在接受感染治疗的患者中对螺杆菌感染的根除进行监测的方法，包括：

i) 测定唾液样品中的抗幽门螺杆菌 IgG2 抗体水平；

ii) 比较此抗幽门螺杆菌 IgG2 抗体水平与预先确定的对照抗幽门螺杆菌 IgG2 抗体水平，其中与对照比较，唾液样品中抗幽门螺杆菌 IgG2 抗体水平的减少表明螺杆菌被根除。

2、在接受感染治疗的患者中对螺杆菌感染治疗的效果进行监测的方法，包括：

i) 测定唾液样品中的抗幽门螺杆菌 IgG2 抗体水平；

ii) 比较此抗幽门螺杆菌 IgG2 抗体水平与预先确定的对照抗幽门螺杆菌 IgG2 抗体水平，其中与对照比较，唾液样品中抗幽门螺杆菌 IgG2 抗体水平的减少表明螺杆菌得到有效治疗。

3、在接受螺杆菌感染治疗的患者中对螺杆菌的复发或再感染进行监测的方法，包括：

i) 测定唾液样品中的抗幽门螺杆菌 IgG2 抗体水平；

ii) 比较此抗幽门螺杆菌 IgG2 抗体水平与预先确定的对照抗幽门螺杆菌 IgG2 抗体水平，其中与对照比较，唾液样品中抗幽门螺杆菌 IgG2 抗体水平的增加表明螺杆菌复发或再感染。

4、检测患者对螺杆菌感染治疗无应答的方法，包括：

i) 测定唾液样品中的抗幽门螺杆菌 IgG2 抗体水平；

ii) 将此抗幽门螺杆菌 IgG2 抗体水平与预先确定的对照抗幽门螺杆菌 IgG2 抗体水平进行比较，其中与对照比较，唾液样品中抗幽门螺杆菌 IgG2 抗体水平没有改变，表明对治疗缺少应答。

5、权利要求 1 到 4 中任一项的方法，其中通过免疫测定法检测所述抗幽门螺杆菌 IgG2 抗体。

6、权利要求 5 的方法，其中所述测定法是 ELISA。

7、权利要求1到6中任一项的方法，其中在来自未被幽门螺杆菌感染的患者的唾液样品中建立所述对照抗幽门螺杆菌 IgG2 抗体水平。

8、权利要求1到6中任一项的方法，其中在患者自身的唾液样品中确定所述对照抗幽门螺杆菌 IgG2 抗体水平。

9、对螺杆菌感染治疗进行监测的试剂盒，包括：

- i) 螺杆菌抗原；
- ii) 检测 IgG2 亚类抗体的试剂。

10、对将接受或正接受感染治疗的患者成功根除螺杆菌感染的可能性进行预测的方法，包括：

- i) 测定来自患者的样品中的 IL-4 水平；
- ii) 比较此 IL-4 水平与预先确定的对照或标准 IL-4 水平；
- iii) 其中来自患者的样品中的 IL-4 水平高于对照或标准 IL-4 水平是根除可能成功的预示，而此 IL-4 水平低于对照或标准 IL-4 水平是根除可能失败的预示。

11、权利要求10的方法，其中所述样品是血液样品。

12、权利要求10或11的方法，其中通过免疫测定法测定 IL-4。

13、权利要求12的方法，其中所述测定法是 ELISA。

14、权利要求10到13中任一项的方法，其中通过分析来自未被幽门螺杆菌感染的患者和/或已成功根除幽门螺杆菌的患者和/或被幽门螺杆菌感染的患者的样品确立所述对照或标准 IL-4 水平。

15、对将接受或正接受感染治疗的患者成功根除螺杆菌感染的可能性进行预测的方法，包括：

- i) 测定来自患者的样品中的干扰素- γ (IFN- γ) 水平；
- ii) 比较此 IFN- γ 水平与预先确定的对照或标准 IFN- γ 水平；
- iii) 其中来自患者的样品中的 IFN- γ 水平低于对照或标准 IFN- γ 水平是根除可能成功的预示，而 IFN- γ 水平高于对照或标准水平是根除可能失败的预示。

16、权利要求15的方法，其中所述样品是血液样品。

17、权利要求 15 或 16 的方法，其中通过免疫测定法测定 IFN- γ 水平。

18、权利要求 17 的方法，其中所述测定法是 ELISA。

19、权利要求 15 到 18 中任一项的方法，其中通过分析来自未被幽门螺杆菌感染的患者和/或已成功根除幽门螺杆菌的患者和/或被螺杆菌感染的患者的样品确立所述对照或标准 IFN- γ 水平。

20、对将接受或正接受感染治疗的患者成功根除螺杆菌感染的可能性进行预测的方法，包括：

- i) 测定来自患者的样品中的免疫球蛋白 G (IgG) 水平；
- ii) 比较此 IgG 水平与预先确定的对照或标准 IgG 水平；
- iii) 其中来自患者的样品中的 IgG 水平低于对照或标准水平是根除可能成功的预示，而 IgG 水平高于对照或标准水平是根除可能失败的预示。

21、权利要求 20 的方法，其中所述样品是血清样品。

22、权利要求 20 的方法，其中所述样品是唾液样品。

23、权利要求 20 到 22 中任一项的方法，其中通过分析来自未被幽门螺杆菌感染的患者和/或已成功根除幽门螺杆菌的患者和/或被幽门螺杆菌感染的患者的样品确立所述对照或标准 IgG 水平。

24、对将接受或正接受感染治疗的患者成功根除螺杆菌感染的可能性进行预测的方法，包括：

- i) 联合测定来自患者的样品中的 IL-4 和/或 IFN- γ 和/或 IgG 的水平；
- ii) 分别将此 IL-4 和/或 IFN- γ 和/或 IgG 水平与预先确定的对照或标准 IL-4 和/或 IFN- γ 和/或 IgG 水平进行比较，

其中来自患者的样品中的 IL-4 水平高于对照或标准水平是根除可能成功的预示，而 IL-4 水平低于对照或标准水平是根除可能失败的预示，而且其中来自患者的样品中的 IFN- γ 水平低于对照或标准水平是根除可能成功的预示，而 IFN- γ 水平高于对照或标准水平是根除可能失败的预示，而且

其中来自患者的样品中的 IgG 水平低于对照或标准水平是根除可能成功的预示，而 IgG 水平高于对照或标准水平是根除可能失败的预示。

对螺杆菌感染治疗进行监测及对 成功根除的可能性进行预测的方法

发明领域

本发明涉及对螺杆菌(*Helicobacter*)感染治疗进行监测的方法,特别是用免疫球蛋白 G2(IgG2)对幽门螺杆菌感染的根除实施监测的方法。本发明还涉及在将接受或正接受感染治疗的患者中对成功根除螺杆菌感染的可能性进行预测的方法,特别是通过测定将接受或正接受感染治疗的患者的白细胞介素-4,干扰素- γ 及 IgG 的水平,对成功根除的可能性进行预测的方法。

背景技术

说明书中有关现有技术的任何讨论决不应认为是承认这些现有技术在这个领域中是广泛公知的或形成了常识的一部分。

现在认为幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)感染是胃癌形成的必要先决条件。群体中大约 30%的人被这种细菌感染,而且常常表现为慢性胃炎。胃或十二指肠溃疡可使其恶化,或其可以表现为非溃疡性消化不良。相当数量的携带者无症状。然而,在少量携带幽门螺杆菌的患者中,他们的病情逐阶段(包括上皮细胞组织转化及发育异常)演化成癌形成。

幽门螺杆菌感染的目前治疗手段

用抗生素根除感染导致 80 - 90% 的消化道溃疡治愈率。广泛被接受的治疗范例是基于:在未预先进行内窥镜诊断的情况下,用抗体测定进行感染检测,随后实施联合抗生素治疗。在根除治疗前,当“危险”症状(如严重疼痛,出血)出现时,或胃癌发生的风险相当大时,通常接受内窥镜检查。然而,内窥镜检查是有其自身危险的方法,应尽可能避免。

幽门螺杆菌在唾液及血清中引起 IgG 抗体应答。血清 IgG 抗体是非侵

入性诊断的基础。感染根除之后血清抗体水平十分缓慢地下降。已有研究表明,6个月时的IgG抗体水平在评定成功根除方面可能具有价值。然而,唾液IgG抗体水平在根除后以快得多的速度下降,通常,6周时的水平比抗生素治疗前水平的80%还要少。

唾液IgG抗体水平可以预示成功根除的这一想法,虽然吸引人,但因为在一定程度上总IgG抗体水平不稳定,以致于在临床情况下可实施的试验被证明是不可靠的,所以,它被证明不是用于监测螺杆菌治疗或根除进程的可行建议。目前,可成功地对设计以根除螺杆菌感染的治疗实施监测的非侵入性稳定试验尚不存在。

而且,除了在治疗个体中对幽门螺杆菌的根除进行监测外,也期望有用于在治疗前或在治疗期间确定成功根除幽门螺杆菌的可能性的试验。

本发明目的是克服或改进现有技术的至少一个弊端,或提供有用的可选择方案。

发明概述

一方面,本发明提供了在接受感染治疗的患者中对螺杆菌感染的根除实施监测的方法,包括:

- a) 测定唾液样品中的抗幽门螺杆菌IgG2抗体水平;
- b) 比较此抗幽门螺杆菌IgG2抗体水平与预先确定的对照抗幽门螺杆菌IgG2抗体水平,其中与对照比较,唾液样品中抗幽门螺杆菌IgG2抗体水平的减少表明螺杆菌被根除。

第二方面,本发明提供了在接受感染治疗的患者中对螺杆菌感染治疗的效果进行监测的方法,包括:

- a) 测定唾液样品中的抗幽门螺杆菌IgG2抗体水平;
- b) 将此抗幽门螺杆菌IgG2抗体水平与预先确定的对照抗幽门螺杆菌IgG2抗体水平比较,其中与对照比较,唾液样品中抗幽门螺杆菌IgG2抗体水平的减少表明螺杆菌获得有效治疗。

第三个方面,本发明提供了在接受螺杆菌感染治疗的患者中对螺杆菌

的复发或再感染实施监测的方法，包括：

- a) 测定唾液样品中的抗幽门螺杆菌 IgG2 抗体水平；
- b) 比较此抗幽门螺杆菌 IgG2 抗体水平与预先确定的对照抗幽门螺杆菌 IgG2 抗体水平，其中与对照比较，唾液样品中抗幽门螺杆菌 IgG2 抗体水平的增加表明螺杆菌复发或再感染。

第四方面，本发明提供了检测患者对螺杆菌感染治疗无应答的方法，包括：

- a) 测定唾液样品中的抗幽门螺杆菌 IgG2 抗体水平；
- b) 比较此抗幽门螺杆菌 IgG2 抗体水平与预先确定的对照抗幽门螺杆菌 IgG2 抗体水平，其中与对照比较，唾液样品中抗幽门螺杆菌 IgG2 抗体水平没有改变，表明对治疗缺少应答。

第六个方面，本发明提供了对螺杆菌感染治疗进行监测的试剂盒，包括：

- a) 螺杆菌抗原；
- b) 检测 IgG2 亚类抗体的试剂。

优选地，通过直接对象测定法(near-subject assay)检测抗幽门螺杆菌 IgG2 抗体水平。然而这个测定法也可能是基于实验室的试验。尽管也可有效利用其它已知测定方法，这是可以理解的，然而，优选所述测定法是抗体测定法。最优选地，该测定法是免疫测定法，如 ELISA,RIA 或类似的测定方式。

可从获自正常个体(即，未感染幽门螺杆菌的个体)的唾液样品确定对照抗幽门螺杆菌 IgG2 抗体水平。然而，优选在开始治疗感染前，检测患者自身唾液中的 IgG2 水平作为对照，或如果检测复发或再感染，优选成功根除螺杆菌后的唾液 IgG2 水平作为对照。

第七方面，本发明提供了对将接受或正接受感染治疗的患者成功根除螺杆菌感染的可能性进行预测的方法，包括：

- (i) 测定来自患者的样品中的 IL-4 水平，
- (ii) 比较此 IL-4 水平与预先确定的对照或标准 IL-4 水平，

- (iii) 其中患者样品中的 IL-4 水平高于对照或标准 IL-4 水平预示根除可能成功, IL-4 水平低于对照或标准 IL-4 水平预示根除可能失败。

优选地, 样品是血液样品。

优选地, 通过免疫测定法检测 IL-4, 更优选地, 通过 ELISA 进行检测。

本领域技术人员能容易地确定出适宜的对照或标准 IL-4 水平。例如, 可以通过对获自未被幽门螺杆菌感染的患者和/或已成功根除幽门螺杆菌的患者和/或被幽门螺杆菌感染的患者的样品进行分析来确立对照或标准 IL-4 水平。

第八个方面, 本发明提供了对将接受或正接受感染治疗的患者成功根除螺杆菌感染的可能性进行预测的方法, 包括:

- (i) 测定来自患者的样品中的干扰素- γ (IFN- γ) 水平;
- (ii) 比较此 IFN- γ 水平与预先确定的对照或标准干扰素 IFN- γ 水平,
- (iii) 其中来自患者的样品中的 IFN- γ 水平低于对照或标准 IFN- γ 水平是根除可能成功的预示, IFN- γ 水平高于对照或标准 IFN- γ 水平是根除可能失败的预示。

优选地, 在血液样品中检测 IFN- γ 水平。

优选地, 通过免疫测定法检测 IFN- γ 水平, 并优选该测定法是 ELISA。

本领域技术人员能容易地确立适宜的对照或标准。例如, 可以通过对获自未被幽门螺杆菌感染的患者和/或已成功根除幽门螺杆菌的患者和/或被幽门螺杆菌感染的患者的样品进行分析来确立对照或标准 IFN- γ 水平。

第九个方面, 本发明提供了对将接受或正接受感染治疗的患者成功根除螺杆菌感染的可能性进行预测的方法, 包括:

- (i) 测定来自患者的样品中的免疫球蛋白 G (IgG) 水平;
- (ii) 比较此 IgG 水平与预先确定的对照或标准 IgG 水平,
- (iii) 其中来自患者的样品中的 IgG 水平低于对照或标准水平是根除可能成功的预示, IgG 水平高于对照或标准水平是根除可能失败的预

示。

优选在血清样品中检测 IgG 水平，但更优选样品是唾液样品。

本领域技术人员能容易地确立适宜的对照或标准 IgG 水平。例如，可以通过对获自未被幽门螺杆菌感染的患者和/或已成功根除幽门螺杆菌的患者和/或被螺杆菌感染的患者的样品进行分析来确立对照或标准 IgG 水平。

第十个方面，本发明提供了对将接受或正接受感染治疗的患者成功根除螺杆菌感染的可能性进行预测的方法，包括：

- (i) 联合测定来自患者的样品中的 IL-4 和/或 IFN- γ 和/或 IgG 水平，
- (ii) 分别将此 IL-4 和/或 IFN- γ 和/或 IgG 水平与预先确定的对照或标准 IL-4 和/或 IFN- γ 和/或 IgG 水平进行比较，

其中来自患者的样品中的 IL-4 水平高于对照或标准水平是根除可能成功的预示，IL-4 水平低于对照或标准水平是根除可能失败的预示，而且其中来自患者的样品中的 IFN- γ 水平低于对照或标准水平是根除可能成功的预示，IFN- γ 水平高于对照或标准水平是根除可能失败的预示，而且其中来自患者的样品中的 IgG 水平低于对照或标准水平是根除可能成功的预示，IgG 水平高于对照或标准水平是根除可能失败的预示。

附图简要说明

图 1：抗幽门螺杆菌唾液 IgG2 抗体的稳定性。

图 2：幽门螺杆菌根除前后的抗幽门螺杆菌唾液 IgG (A 图) 及 IgG2 抗体 (B 图)。

图 3：在被幽门螺杆菌感染和未被幽门螺杆菌感染的患者中的抗幽门螺杆菌唾液 IgG (A 图) 及 IgG2 (B 图) 抗体。

图 4：全血和胃组织培养物中 IL-4 产生的相关性。

在 37°C 温育全血培养物或胃窦活检组织培养物 24 小时后，用 ELISA 捕获测定法测定 IL-4 水平。结果表明在粘膜与全血的 IL-4 之间有相关性 ($p < 0.001$)。

图 5：用幽门螺杆菌 AGE 抗原刺激的全血培养物中的 IL-4 水平。

从有或无幽门螺杆菌感染的患者，或根除失败的患者中得到外周血，如所示，将外周血加到含有梯度浓度的幽门螺杆菌 AGE 抗原的等体积 AIM-V 培养基中。培养 24 小时后，通过 ELISA 捕获测定法测量 IL-4 的水平。所示结果是平均值±平均值的标准误。*：p<0.05：与根除幽门螺杆菌的患者比较；p<0.01，p<0.05，分别与从根除幽门螺杆菌和幽门螺杆菌阳性的患者得到的数值比较。

图 6：全血中响应幽门螺杆菌酸-甘氨酸提取物刺激的 IFN- γ 产生。收集各个患者的外周血，在梯度浓度的幽门螺杆菌 AGE 抗原存在的情况下培养 24 小时。收集培养物上清液，通过 ELISA 测定 IFN- γ 。所示结果是平均值±平均值的标准误。NS:无显著性。

图 7：血清和唾液中特异性的幽门螺杆菌 IgG 抗体的水平。收集各个患者的血清和唾液样品。用 ELISA 测量特异性幽门螺杆菌 IgG 的水平。所示结果是平均值±平均值的标准误。*：p<0.05，与幽门螺杆菌阳性组的平均值比较；NS:无显著性。

优选实施方式详述

令人惊奇的是发现抗幽门螺杆菌唾液 IgG2 抗体是稳定的，而且其允许开发可靠试验以用于在接受治疗的患者中监测幽门螺杆菌感染的治疗和/或根除进程。

已公知血液和胃粘膜中的抗幽门螺杆菌 IgG 抗体水平可用作幽门螺杆菌状态的指标。人们一直在尝试将唾液中的抗幽门螺杆菌 IgG 抗体用于类似目的，但证明其在这类样品中是不稳定的。从以下实施例可理解，尽管抗幽门螺杆菌 IgG 可用作幽门螺杆菌状态的一般指标，但允许开发稳定的治疗监测试验的是对抗幽门螺杆菌 IgG2 亚类抗体的测定。

还令人惊奇的是发现 IL-4 水平可用作成功根除幽门螺杆菌的预告者。为了对根除的可能性进行预测，可以设想在治疗幽门螺杆菌感染之前或期间利用 IL-4 试验。

用于测量人样品中的抗体及 IL-4 的技术是本领域公知的，而且方法及试剂容易获得。下面给出了所用一些技术的实例作为一些测量如何进行的举例说明。

除非特别指明，可以使用可从标准教科书和实验手册中发现的标准技术。

现在将参考非限制性实施例更详细地描述本发明。

实施例

实施例 1 测定唾液样品中的抗体水平

样品收集

收集 4 名感染幽门螺杆菌的患者的唾液样品，这些患者用由阿莫西林，奥美拉唑，克拉霉素组成的根除三重疗法治疗了七天。治疗前及根除治疗 10 天后采集样品。

幽门螺杆菌抗原制备

根据 Goodwin (#280) 描述的修改方法，用幽门螺杆菌 NCTC 11637 菌株制备幽门螺杆菌抗原。用 bio-rad 试剂盒 (Bio-rad 实验室，澳大利亚) 测定提取物中蛋白质浓度。-70℃ 等份保藏。

用 ELISA 检测抗体

对于抗幽门螺杆菌唾液抗体的检测，在 4℃，用 7 μg/ml 幽门螺杆菌抗原包被 96 孔平底微量滴定 Polysorb 板 (Nunc, 丹麦) 的孔过夜。洗涤并在 PBS-吐温 20 中用 5% 脱脂乳 (Diploma, 澳大利亚) 封闭平板后，用 2% PEG6000 以 1:2 比例稀释唾液样品，加稀释后的唾液样品到各孔中，一式三份。温育后，洗涤这些孔，之后每个孔加 1:2000 稀释的辣根过氧化物酶-绵羊抗 IgG 或抗 IgG2 缀合物 (Silenus, 澳大利亚)。进一步温育后，洗涤平板，然后每个孔加入四甲基联苯胺 (TMB) 底物 (Sigma, 美国)。用 1mol/L H₂SO₄ 终止反应，在 ELISA 平板读数器 (Bio-Rad450, 日本) 上 450nm 读取光吸收值。结果用 ELISA 指数表示，它是给定唾液样品的平均 OD₄₅₀ 除以校准样品的平均 OD₄₅₀。每次操作中均包括阳性和阴性质

量对照样品以控制试验内部或之间的差异。

从5名感染幽门螺杆菌的患者得到唾液样品,用ELISA测定法检测新鲜或贮藏多达12个月后的样品中的抗幽门螺杆菌IgG2抗体及总IgG抗体。结果表明IgG2抗体水平比IgG抗体水平(图1)更稳定。因此,由于IgG2抗体在贮藏及测定中的稳定性,IgG2抗体是感染状况的可靠和灵敏指标。

实施例2 接受根除治疗的患者唾液中的抗幽门螺杆菌抗体水平

用实施例1所述免疫测定法检测来自接受抗生素根除治疗的患者的唾液样品中的抗幽门螺杆菌抗体。

在抗生素治疗前后测定IgG和IgG2抗体。治疗后10天,IgG2抗体水平比总IgG抗体水平下降要快(图2A和2B)。

另一研究表明与未感染的患者比较(图3B),感染幽门螺杆菌的患者的唾液有明显升高的IgG2水平(图3A)。不能最终根除感染的患者在抗幽门螺杆菌IgG2抗体水平方面没有显示显著下降。

实施例3 白细胞介素-4/IFN- γ 及IgG研究

患者

征集经调查有消化不良的患者52名、及接受一个或多个疗程的抗生素后仍持续存在幽门螺杆菌感染的患者11名进行这项研究。在研究的3个月内消化不良的患者没有使用抗生素。澳大利亚悉尼消化疾病中心道德委员会(the Ethics Committee of the Center for Digestive Diseases)批准了这项研究。得到所有患者的知情同意。在上部胃肠内窥镜镜检查期间,得到多个胃窦和胃体的活检样品,这些活检样品用于组织培养,组织学及脲酶试验(CLO试验,Delta West,WA,澳大利亚)。血液样品在收集的2小时内于37℃温育。-70℃贮藏血清以备检测幽门螺杆菌特异性抗体。

唾液样品收集

在内窥镜镜检查前收集唾液样品。4℃,1000×g离心10分钟样品,-70℃等份贮藏。

活检组织培养

称量胃活检组织，以每毫克组织（湿重）50 μ l 无血清 AIM-V 培养基（Life Technology, 澳大利亚）的比例培养 24 小时。收集培养物上清液，离心。在测定前 -70 $^{\circ}$ C 等份贮藏。

幽门螺杆菌抗原制备

根据 Goldwin 等（J IFNect Dis 1987;155:488-94）所述方法通过酸-甘氨酸(AGE)提取，由 NCTC11637 株系制备幽门螺杆菌抗原。幽门螺杆菌 AGE 用于细胞培养和特异性抗体测量。

全血培养物中 IL-4 的 ELISA 捕获测定法

按以前描述的方法（Ren 等,Helicobacter 2000;5:135-41），测量全血培养物中的细胞因子水平。简而言之，加 150 μ L 肝素化的全血到预先用鼠多克隆抗人 IL-4 抗体（Endogen, MA, 美国）包被的 96 孔微量滴定平板孔中，一式三份。孔中还加有等体积含有 0, 1 μ g/mL 或 10 μ g/mL 幽门螺杆菌 AGE 的 AIM-V 培养基。37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ 温育培养物 24 小时，之后，收集上清液进行干扰素- γ （IFN- γ ）测定。按如下所述，用 ELISA 测定“捕获”的 IL-4 量。简而言之，洗涤平板后，孔中加入生物素化的小鼠单克隆抗人 IL-4 抗体（Endogen, MA, 美国）（0.5 μ g/mL），室温温育 90 分钟。然后洗涤平板，与 1: 400 稀释的辣根过氧化物酶-链霉亲和素缀合物（Selinus, 澳大利亚）室温进一步温育 30 分钟。用洗涤缓冲液彻底洗平板，最后与 3,3',-5,5'四甲基联苯胺（TMB, Sigma-Aldrich, 美国）底物室温温育 10 分钟。用 1mol/L H₂SO₄ 终止反应，在 ELISA 平板读数器中（Bio-Rad 450, 日本）测定 450nm 光密度（OD 450 nm）。每个平板均应用标准 IL-4(Endogen, MA, 美国)以控制平板间差异。IL-4 的灵敏度极限是 9.4pg/mL。用 Softmax 程序（2.3FPU 版本，美国）测定样品中的 IL-4 量。

IFN- γ ELISA 测定

用小鼠抗人 IFN- γ 单克隆抗体（Endogen, MA, 美国）2 μ g/mL 包被 96 孔平底微量滴定板（Nunc, 丹麦）的孔，4 $^{\circ}$ C 过夜。洗涤和封闭后，一式两份地加入全血培养物的上清液或 IFN- γ 标准（Endogen, MA, 美国），

温育 90 分钟。洗涤平板，加入生物素化的小鼠单克隆抗人 IFN- γ 抗体 (Endogen, MA, 美国) ($0.25 \mu\text{g/mL}$)。90 分钟温育后，洗孔，应用 1:2000 稀释的辣根过氧化物酶-链霉亲和素缀合物 (Selinus, 澳大利亚)。洗板，每个孔加入四甲基联苯胺生色物 (chromagen) (Sigma-Aldrich, 美国)。在 ELISA 平板读数器中 (Bio-Rad 450, 日本)，450nm 读取光吸收值。IFN- γ 的灵敏度极限是 9.4pg/mL 。用 Softmax 程序 (2.3FPU 版本, 美国) 测定样品中的 IFN- γ 量。

幽门螺杆菌抗体的检测

用 $5 \mu\text{g/mL}$ 幽门螺杆菌 AGE 包被 96 孔平底微量滴定板的孔， 4°C 过夜。洗涤和封闭后，以 1: 3000 比例稀释血清样品，以 1: 4 比例稀释唾液样品，一式三份地向孔中加入稀释后的血清样品和唾液样品。加入 1:2000 稀释的绵羊抗 IgG-辣根过氧化物酶缀合物 (Selinus, 澳大利亚)。用四甲基联苯胺 (TMB) 底物 (Sigma - Aldrich, 美国) 进行显色。在 ELISA 平板读数器 (Bio - Rad, 450, 日本) 上，450nm 读取光吸收值。结果表示为相对于汇集的阳性血清参考标准的 ELISA 单位。试验内部或之间的差异小于 10%。

统计学分析

数据表示为平均值 \pm 标准误 (SE)。用相关性 Z 检验检测粘膜与血液细胞因子产生的相关性。用 ANOVA 分析患者组间的平均值差异。用 StatView 4.5 软件程序 (Abacus Concepts, California, 美国) 进行所有统计分析。当 p 值小于 0.05 时认为有显著差异。

结果

根据幽门螺杆菌感染状况和抗生素治疗结果，将患者分成 4 个组。有 23 名幽门螺杆菌阴性患者；20 名幽门螺杆菌阳性患者；9 名成功根除幽门螺杆菌的患者，在根除治疗后 6 周通过组织学或 C^{14} 呼吸试验确认了根除；11 名抗生素治疗后出现幽门螺杆菌耐药性的患者。根除失败的患者的诊断和治疗方案的详细情况如表 1 所示。

血液和粘膜 IL-4 应答的比较

为了确定是否血液和粘膜细胞因子对幽门螺杆菌感染的应答有相关性,对幽门螺杆菌抗原刺激或未刺激的全血培养物中 IL-4 产生的水平与胃粘膜培养物中的水平进行比较(图 1)(没有显示来自于抗原刺激培养物的数据)。来自于幽门螺杆菌阳性患者($n=6$)、阴性患者($n=11$)及根除失败的患者($n=8$)的结果表明,全血培养物(刺激或未刺激的)中的 IL-4 产生与胃粘膜中的 IL-4 产生相关($r^2=0.549$, $p<0.001$)。

全血培养物中的 IL-4 及 IFN- γ 产生

与成功根除幽门螺杆菌的患者($p<0.05$, 0 和 $1.0 \mu\text{g/mL}$ 幽门螺杆菌 AGE; $p<0.01$, $10 \mu\text{g/mL}$ 幽门螺杆菌 AGE)或未接受过感染治疗的患者($p<0.05$, $10 \mu\text{g/mL}$ 幽门螺杆菌 AGE)中的 IL-4 比较,在来自根除失败患者的(幽门螺杆菌 AGE 刺激或未刺激的)全血中检测到显著低水平的 IL-4(图 2)。未感染和感染的患者中 IL-4 水平相似,与成功根除的患者(尽管根除后有水平增高的趋势)比较无显著差异。尽管在不同组间 IFN- γ 水平无统计学显著差异,但是在成功根除幽门螺杆菌的患者中检测到了较低水平(图 3)。不论治疗疗程次数多少,在正处于耐药性幽门螺杆菌感染的大多数患者中观察到了低水平的 IL-4 分泌。

血清及唾液中的抗幽门螺杆菌 IgG 水平

未感染的患者($p<0.05$)及根除治疗后 6-8 周的患者($p<0.05$)的血清及唾液 IgG 抗体水平显著低于幽门螺杆菌阳性患者的血清及唾液 IgG 抗体水平。在未能根除感染的患者中,对于唾液及血清抗体,观察到有更低水平抗体的趋势,但这缺少统计学显著性(图 4)。

表 1 抗生素治疗失败的患者的临床特征

序号	年龄 (岁)	诊断	所用治疗方案	抗生素 疗程次数	持续时间 (月)
1	40	Hp 诱导的胃炎	甲硝唑/阿莫西林/铋/盐酸雷尼替丁 克拉霉素/甲硝唑/兰索拉唑/阿莫西林	1 2	24
2	58	Hp 诱导的胃炎	Losec HP7	1	12
3	55	食管炎及 Hp 诱导 的胃炎	Klacid HP7 Helidac/盐酸雷尼替丁 兰索拉唑	1 1	>3 年
4	47	Hp 诱导的胃炎	Losec HP7	2	20
5	37	Hp 诱导的胃炎	甲硝唑 Losec HP7	1 3	5
6	45	Hp 诱导的胃炎	Losec HP7/盐酸雷尼替丁	3	28
7	27	Hp 诱导的胃炎	Losec HP7 克拉霉素/四环素/甲硝唑/兰索拉唑	3 1	6
8	33	Hp 诱导的胃炎及 十二指肠溃疡	Helidac	2	>3 年
9	26	Hp 诱导的胃炎	Losec HP7	2	10
10	47	Hp 诱导的胃炎	Losec HP7	3	>3 年
11	73	食管炎, Hp 诱导的 胃炎及十二指肠溃 疡	Losec HP7	3	>3 年

Hp = 幽门螺杆菌; Helidac = 铋/甲硝唑/四环素; Klacid HP7=奥美拉唑/阿莫西林/克拉霉素;

Losec HP7=奥美拉唑/阿莫西林/克拉霉素

表 2 根除失败的患者的 IL-4 及幽门螺杆菌抗体 IgG

失败 次数	患者 序号	IL-4 水平 (pg/mL) *			幽门螺杆菌抗体 IgG*	
		幽门螺杆菌 抗原 (0 μg/mL)	幽门螺杆菌 抗原 (1 μg/mL)	幽门螺杆菌 抗原 (10 μg/mL)	血清 (ELISA 单位)	唾液 (ELISA 单位)
1	1	20.76	28.21	44.20	214	116.3
2	3	40.49 ± 29.36	54.07 ± 43.14	65.22 ± 45.86	224 ± 101.58	1000.2 ± 866.5
3	5	45.16 ± 36.16	53.34 ± 44.34	55.63 ± 44.19	410.95 ± 167.29	418.9 ± 151.96
4	2	18.82 ± 9.82	22.56 ± 13.58	12.60 ± 3.6	1453.6 ± 1244.4	523.7 ± 235.3

*平均值的标准误 (SEM)。

鉴于上述, 本领域技术人员将理解在螺杆菌感染治疗前或期间可以使

用 IL-4,IFN- γ 及 IgG 对成功根除螺杆菌感染的可能性进行预测。由此，明显地所述方法也可用于鉴定对螺杆菌感染治疗不大可能产生反应的患者。

尽管参考具体实施例描述了本发明，但本领域技术人员将理解本发明可以以多种其它方式体现，而不背离本发明的精神和目的。

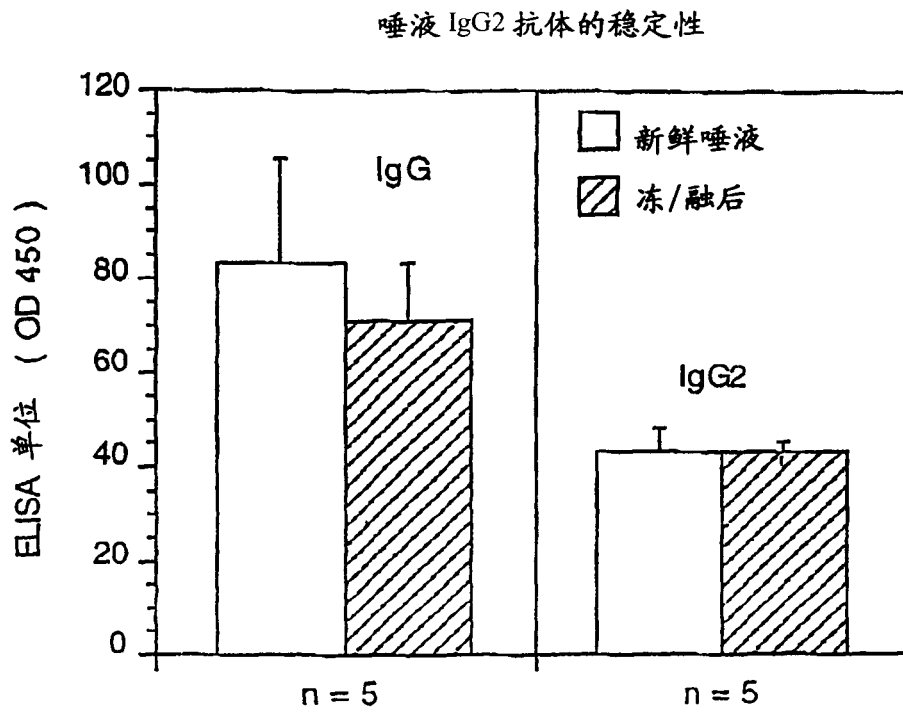


图 1

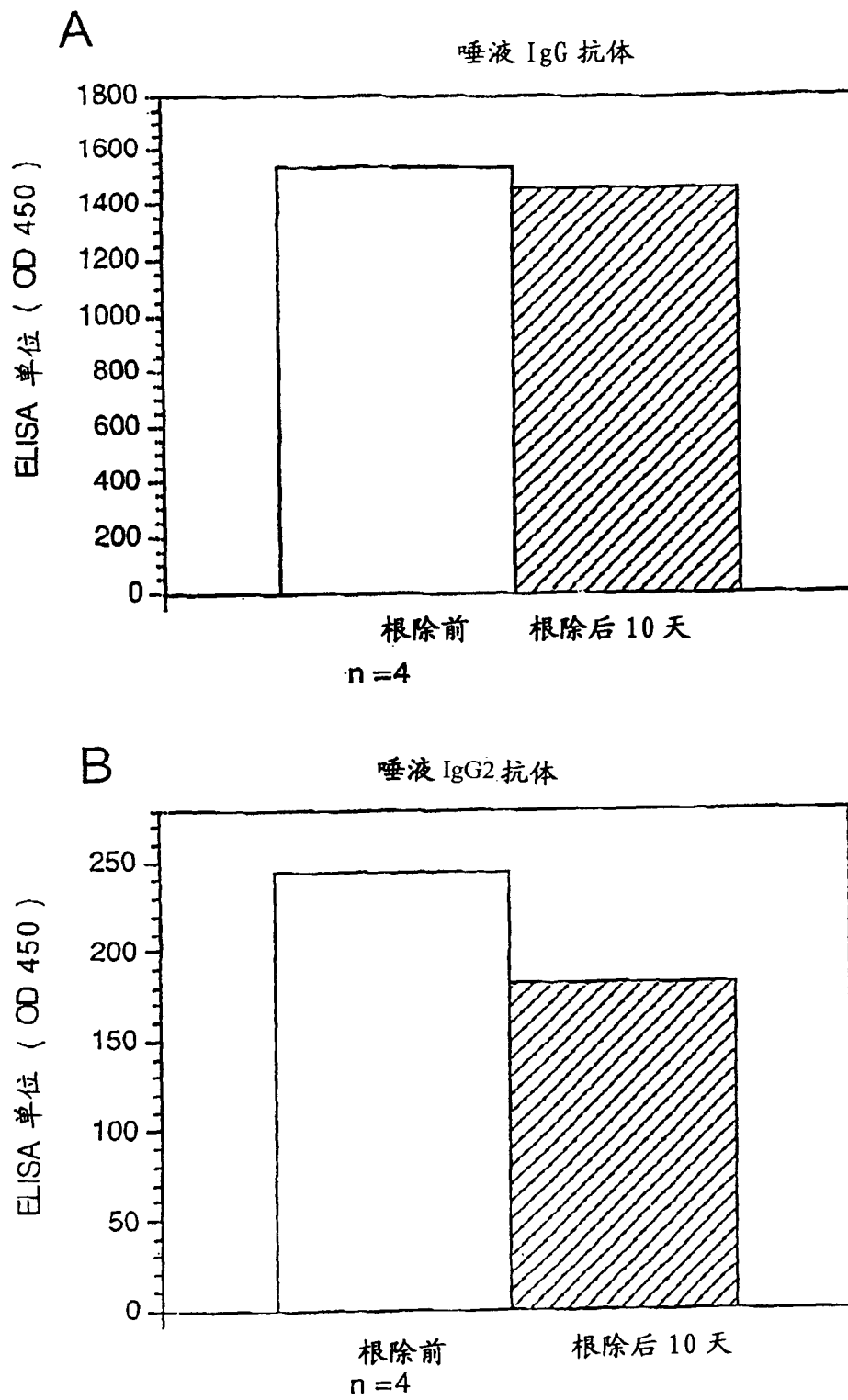


图 2

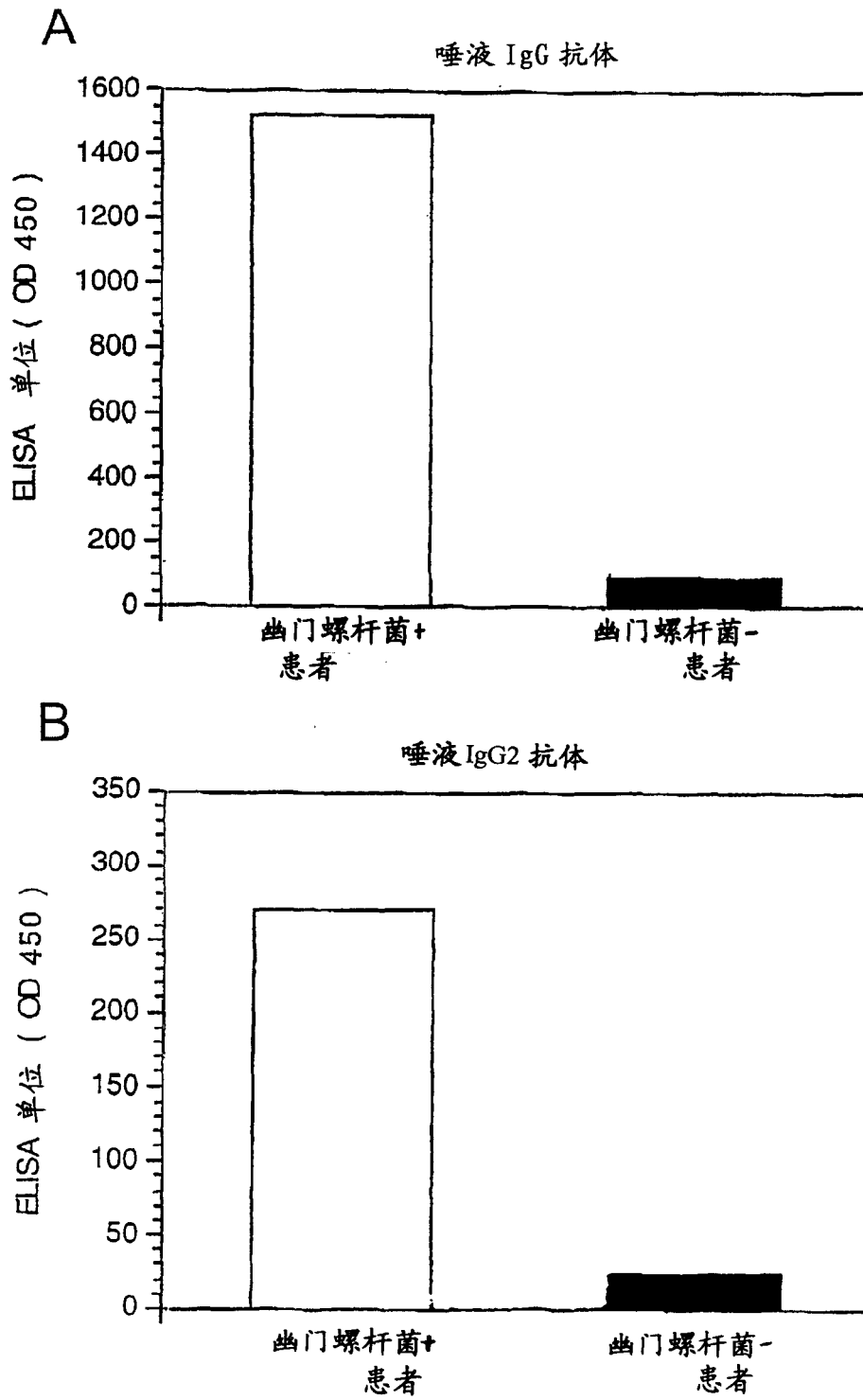


图 3

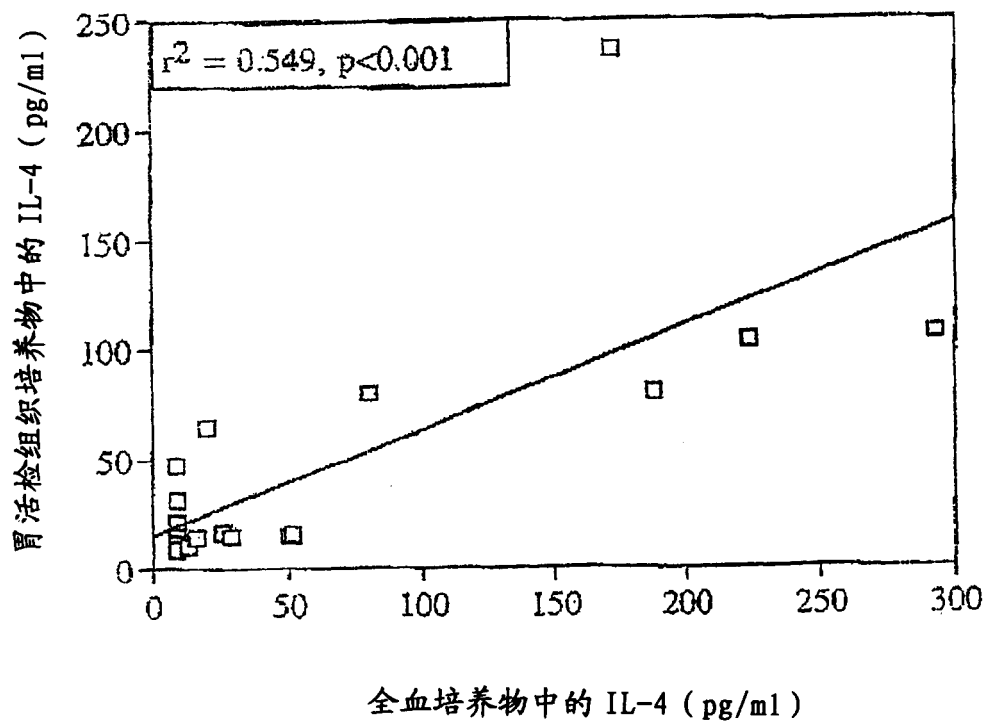


图 4

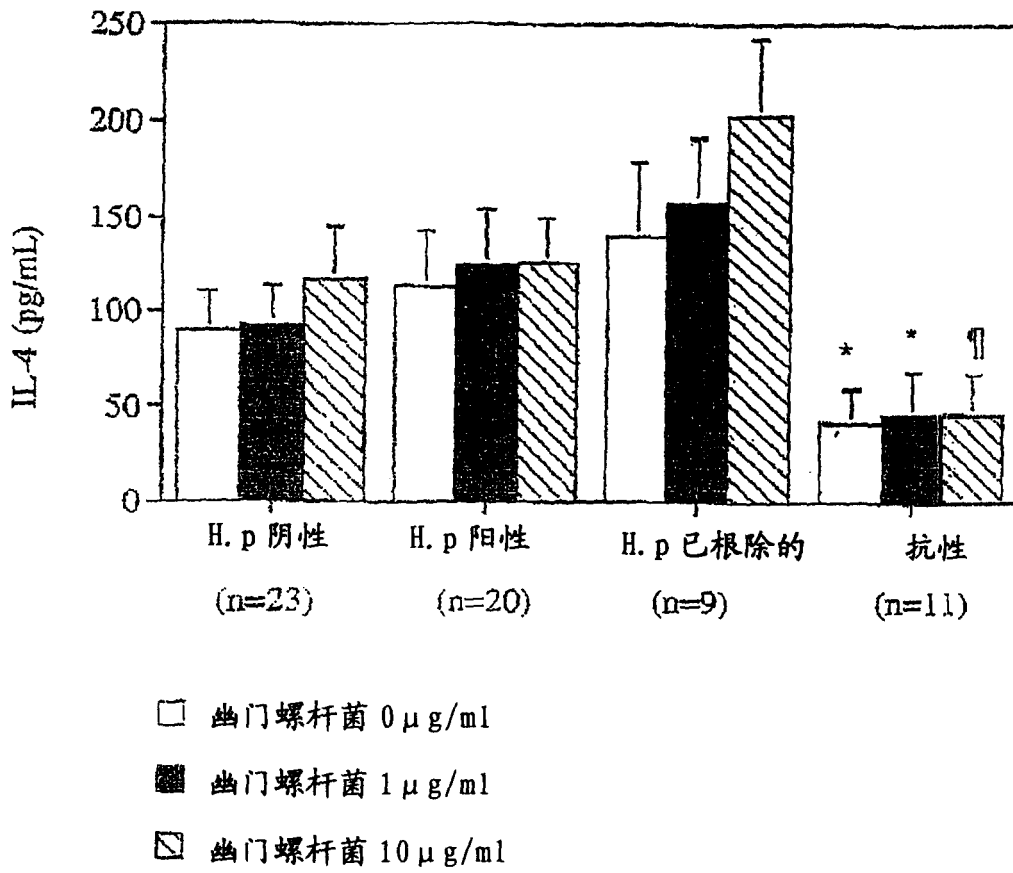


图 5

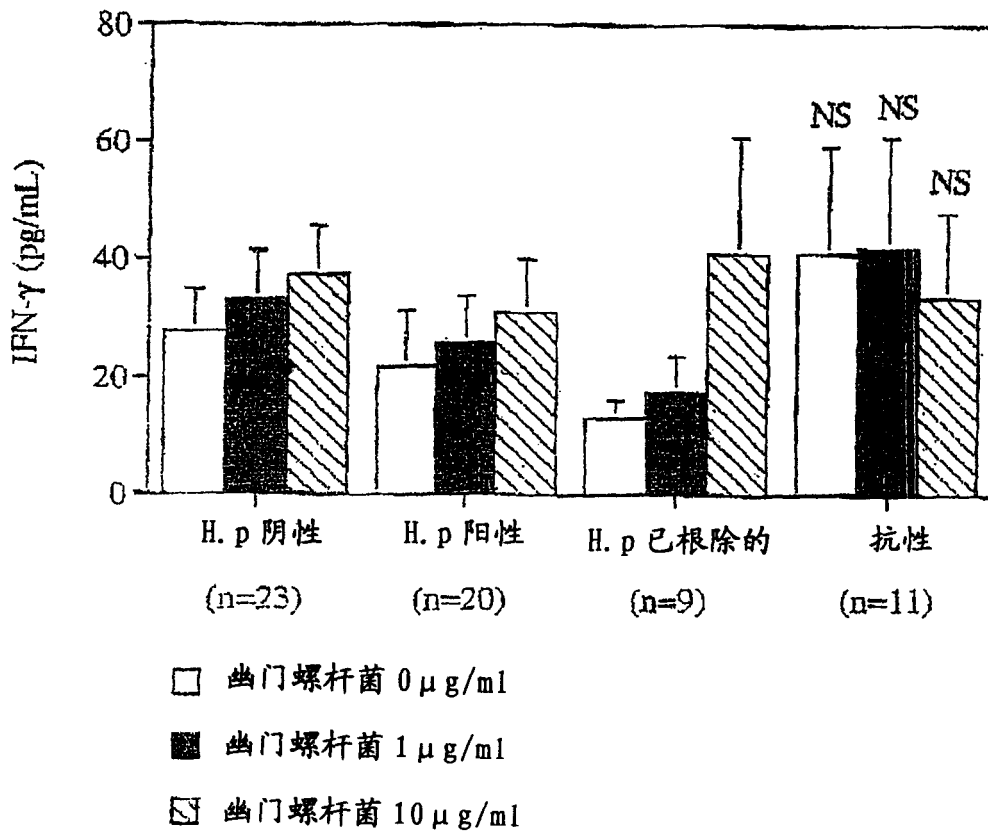


图 6

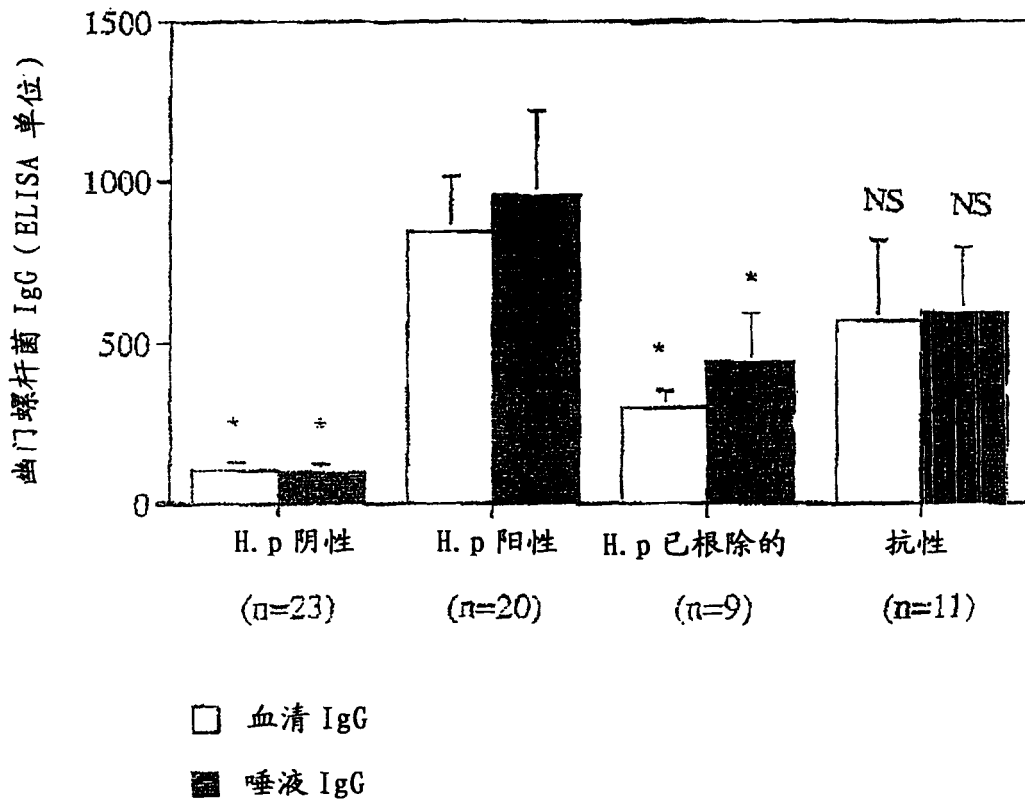


图 7

专利名称(译)	对螺杆菌感染治疗进行监测及对成功根除的可能性进行预测的方法		
公开(公告)号	CN1444732A	公开(公告)日	2003-09-24
申请号	CN01813527.7	申请日	2001-07-03
[标]发明人	RL克兰西 TJ博罗迪 G庞 任志刚		
发明人	R·L·克兰西 T·J·博罗迪 G·庞 任志刚		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/50 G01N33/569		
CPC分类号	G01N33/56922 G01N2333/205 G01N2333/5406 G01N2333/57 G01N2469/20 G01N2800/52		
代理人(译)	刘金辉		
优先权	2000PQ8541 2000-07-03 AU		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及对螺杆菌感染治疗进行监测的方法，特别是用免疫球蛋白G2 (IgG2)对幽门螺杆菌感染的根除进行监测的方法。本发明还涉及在将接受或正接受感染治疗的患者中对成功根除螺杆菌感染的可能性进行预测的方法，特别是通过测定将接受或正接受感染治疗的患者的白细胞介素 - 4，干扰素 - γ 及IgG的水平对成功根除的可能性进行预测的方法。

唾液 IgG2 抗体的稳定性

