

《助推计划》高校转化项目登记表

日期：2012.05.04

编号：YY1205JD

项目名称	基于 VirB5 蛋白构建汉赛巴尔通氏体 ELISA 检测试剂盒	所属领域	<input type="checkbox"/> 先进重大装备 <input type="checkbox"/> 新材料 <input type="checkbox"/> 新能源 <input checked="" type="checkbox"/> 生物医药 <input type="checkbox"/> 电子信息制造 <input type="checkbox"/> 新能源汽车 <input type="checkbox"/> 海洋工程装备 <input type="checkbox"/> 软件和信息服务 <input type="checkbox"/> 民用航空制造 <input type="checkbox"/> 其它	
院校名称	上海交通大学 (盖章)			
项目成熟度	<input type="checkbox"/> 已实现产业化，产品供不应求 <input type="checkbox"/> 已实现小批量生产，产品有市场需求 <input type="checkbox"/> 已通过中试鉴定 <input checked="" type="checkbox"/> 处在中试阶段			
技术水平	<input type="checkbox"/> 国际领先 <input checked="" type="checkbox"/> 国际先进 <input type="checkbox"/> 国内先进 <input type="checkbox"/> 一般水平			
推广范围	<input type="checkbox"/> 国际推广 <input checked="" type="checkbox"/> 国内推广 <input type="checkbox"/> 区域推广 <input type="checkbox"/> 特定地区推广			
知识产权状态	<input type="checkbox"/> 授权国外有效发明专利 <input checked="" type="checkbox"/> 授权国内有效发明专利 <input type="checkbox"/> 国内有效实用新型专利 <input type="checkbox"/> 其它知识产权			
项目获奖情况	暂无	各类基金 资助情况	暂无	
是否具有以下资料	<input checked="" type="checkbox"/> 项目可行性报告 <input checked="" type="checkbox"/> 查新报告 <input checked="" type="checkbox"/> 鉴定证书 <input type="checkbox"/> 检测报告 <input type="checkbox"/> 认定证书 <input type="checkbox"/> 用户意见			
课题组简介：(概述研发优势和成功案例等。) <p>合作申请人所长的人兽共患病与比较医学团队成立于 1991 年，1991 年获批“上海市兽医生物技术重点实验室”。近 20 年来，本团队秉承“厚德博学，思源致远；厚积薄发，共济同舟”的队训，立足上海，服务全国，放眼世界，以培养一流人才，服务全国各地经济为动力，提高科研自主创新力为核心。在人才培养、科学研究和服务社会三个方面取得了较好成绩：</p> <p>本团队在长期的科研实践中，逐渐形成了自己的研究特色，即应用比较医学理论构建小型猪动物模型（疾病动物模型为主）平台；在此基础上应用系统生物学理论和宏基因组学、蛋白组学、代谢组学、生物信息学等现代生物技术，从基因、分子、细胞、组织、个体、群体不同层面研究人兽共患病的发生、发展和转归的规律。在巴尔通氏体病、戊型肝炎、附红细胞体病、新发肠道病毒病(沙波病毒、爱知病毒、埃可病毒、星状病毒、细小病毒等)、猪链球菌病、空肠弯曲杆菌的病原学、流行病学、免疫学、致病机理、动物模型、防治技术等方面进行了大量的研究，取得了一系列的成果。</p> <p>近三年共主持和参加 863 重点项目、支撑计划、国家奶业专项、国家自然科学基金、国家重大成果转化、农业部行业专项、及省部级重点项目 20 余项，总科研经费 1000 余万元。</p>				

荣获国家科技进步二等奖一项，教育部科技进步二等奖 1 项，上海科技进步二等奖三项、三等奖二项，农业部农牧渔丰收三等奖一项。特别是近三年来，本团队在新发人兽共患病如附红细胞体、戊型肝炎病毒沙波病毒和小型猪动物模型等方面研究已达国际领先水平。在 BLOOD、EID、JV、PLOS NTD、JCV、ISME 等国际权威期刊发表新发人兽共患病方面 SCI 论文 60 篇，累计影响因子 IF 180 分。

本团队在 04 年国家遭受禽流感、05 年猪链球菌，06 年蓝耳病，08 年甲流感等重大疫病灾害时作出了关键贡献。2004 年我国爆发禽流感期间，本团队就禽流感问题向国家提出建议，得到温家宝、华建敏、回良玉等国家领导人的亲自批示表扬。团队的教授作为专家组组长审定的两个禽流感国家标准已颁布实施。2005 年我国四川省爆发国内外震惊的猪链球菌感染疫情，390 余人住院，38 人死亡，本团队通过自己培育的 SPF 小型猪动物回归实验，为确诊这次疫情做出了关键性贡献。其成果获 2007 年国家科技进步二等奖。2008 年我国爆发甲流感，我们团队积极响应上海市政府和农委的号召，投入到防控该病的研究中。目前已研制出检测该病原的抗原捕捉 ELISA 方法，为最终防控该病提供了重要的技术保障。

项目背景：

巴尔通体 (*Bartonella*) 是一类革兰氏染色阴性、氧化酶阴性、营养条件要求苛刻兼性细胞内寄生的需氧杆菌。是一新发现的古老病原体，最早是在 1907 年由秘鲁科学家 Alberto Barton 首次在患病者红细胞内发现。然而直到 1919 年，Battistini、Naguchi 等人才将该病原体分离出来，为了纪念 Barton 便将其命名为杆菌状巴尔通体 (*Bartonella bacilliformis*)^[1]。长期以来，杆菌状巴尔通体被认为是巴尔通体属中唯一的一种病原体。20 世纪 90 年代，随着分子生物学分类方法的应用，更多的病原体被划分到巴尔通体属，目前已包括 19 个种及 3 个亚种。其中先后有 8 个种被确认与人类感染关系密切相关^[2]。汉赛巴尔通体 (*Bartonella henselae*) 就是巴尔通体属中重要的致病菌之一。

汉赛巴尔通体 (*Bartonella henselae*) 于 1990 年从北美一名长期发热的 HIV 感染病人的血液中分离培养出一种营养条件苛刻、生长缓慢、革兰氏染色为红色的微弯曲的杆状小体，被认为是一种罗莎利马体(现称巴尔通体)，该菌株被命名为 Houston - 1 分离株^[4]。1992 年，Regnery 等^[4]根据 16S rRNA 基因序列种系发育分析及柠檬酸合成酶基因作 PCR/RFLP

分析证明,此分离株与巴尔通体属成员关系密切,但基因型与属内其他种有差异。为纪念分离和鉴定该种作出重要贡献的临床微生物学家 Diane M. Hensel,将这种巴尔通体命名为汉赛巴尔通体。汉赛巴尔通体是猫抓病 (Cat-scratch disease CSD)^[5]的病原体。猫抓病最早于 1898 年有过相关报道,主要表现为肉芽肿性结膜炎、耳前淋巴结肿大且有动物接触史。然而直到 1990 年才被首次分离并于 1992 年证实是猫抓病的病原体^[6]。一般猫群感染汉赛巴尔通氏体并不表现任何临床症状,且可以长期健康带菌,但通过抓伤或咬伤将其传染给人,成为传染源。一般在抓咬 3-7 天后,该病人在抓咬处局部出现皮肤非化脓性炎症,如红斑或丘疹,之后出现头面部肉芽肿性或化脓性淋巴结病变^[7,8]。全身表现一般有低热、头痛、乏力、厌食、呕吐等。猫抓病属于一种自限性疾病,所以多数患者不需要临床治疗。但是对于一些特殊体质的人群,如 HIV 患者或其它免疫功能低下者,有可能引发骨髓炎、心内膜炎、脑膜炎等疾病,严重者将危及生命。

巴尔通体在自然界分布广泛,种类较多。其自然宿主主要是哺乳动物,从猫、狗、啮齿类动物(鼠、兔)、反刍类动物都可以分离出来巴尔通体,通常不同种巴尔通体具有宿主特异性。猫抓病易感人群为儿童和青年人,高发年龄为 2-14 岁^[8]。猫蚤被认为是传播媒介,Chomel 等^[9]将取自自然菌血症猫身上的跳蚤,转移至无特异病原 (SPF) 小猫身上,饲养于无节肢动物的实验室,结果发现跳蚤可以将汉赛巴尔通体传播给 SPF 小猫;而对照组的 SPF 小猫与有严重菌血症但无跳蚤的猫虽亲密接触但不发生感染。这个实验说明在猫与猫之间猫蚤起到了传播汉赛巴尔通体的作用。随着研究的深入,猫蚤在猫与人之间的传播作用也已被证实,目前可以肯定的传播途径为人体受到蚤类的叮咬和被猫直接抓咬后经血液感染^[10]。而且就目前的研究调查表明猫抓病呈季节性发病,而大部分病例发生在秋冬季,可能由于此季节人与猫接触更加频发有关,病例呈家庭集中爆发,而且全球分布。在美国,每年确诊的人类汉赛巴尔通氏体病约为 22000 多例。在中国 1983 年就报道了该病,且每年呈几何倍数增长。申请人通过资料整理,概括了中国地区人兽共患巴尔通氏体病的流行情况(图 1),证明该病在中国存在爆发流行的风险。同时本项目组在 2010 年开展了中国部分地区猫群中汉赛巴尔通氏体流行病学调查研究,证实 12.7%猫感染阳性,老年猫及流浪猫是易感群体(图 2)。但是巴尔通氏体病尚未引起足够重视,尤其是临床检测医师缺乏对该病的认识,导致大量漏诊及误诊。同时该病在中国尚无具有自主知识产权的检测方法,一般科研检测都采购国外的 IFA 检测试剂盒,价格十分昂贵。

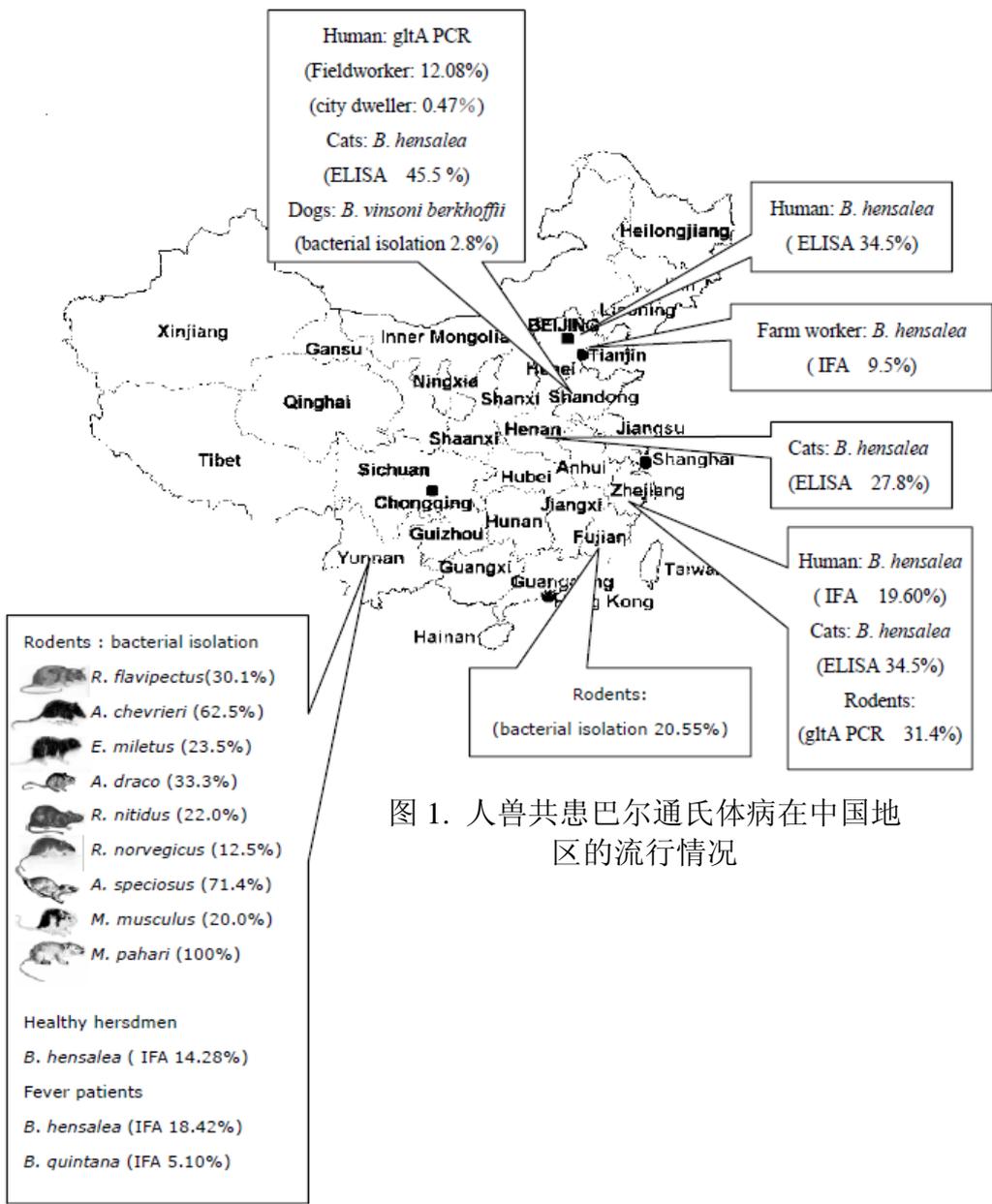


图 1. 人兽共患巴尔通氏体病在中国地区的流行情况



实验室常用胰酶大豆琼脂培养基加入 5% 体积比的新鲜脱纤维羊血，在 37℃，5%CO₂ 潮湿环境中培养。初次分离培养一般需要 3-5 周时间才能看到菌落生长，多为黏稠状圆形凸起，呈灰白色，略透明，边缘光滑或粗糙。培养时间延长后可以看到菌落中间凹陷，菌落表面开始变粗糙。用接种环刮起后在培养基上留下圆形小坑，这是由于巴尔通体菌落向培养基中下陷生长造成，个别菌落呈蜡状不易挑取。革兰氏染色阴性，在高倍显微镜下可以观察到小而弯曲状的 G⁻ 杆菌，长度为 0.6~1.0 μm，菌体无鞭毛却可以自由移动。这种长时间的培养鉴定方法不适用于临床检测，通常造成了假阴性结果，严重影响患者治疗。

随着分子生物学的发展，越来越多的核酸检测方法应用于巴尔通体的检测，其中聚合酶链反应 (PCR) 技术由于其简单、快速、敏感且能够特异扩增目的基因，已广泛的运用于病原的鉴定。常用于巴尔通体诊断的基因有 16SrRNA 及枸橼酸合酶基因 (gltA) 等。Relman^[11] 等氏设计了第一份检测巴尔通体 DNA 的引物，对 16SrRNA 基因的 296bp 片段进行扩增。Regnery 等首先对枸橼酸合酶基因 (gltA) 进行扩增以诊断 *B.henselae* 的感染。实验证明对 gltA 基因的扩增为巴尔通体诊断的特异性很高。Avidor 等^[12] 对 CSD 患者的标本进行 16SrRNA 基因及 gltA 基因双扩增，发现后者的敏感性仅稍次于 16SrRNA 基因，因

此提出对 CSD 诊断采取两步法，即对 gltA 阴性的 CSD 可疑病人再行 16SrRNA 基因的扩增。但 PCR 方法需一定的昂贵设备，且需要经验丰富的操作者，也并不适合临床快速检测。

血清学方法既不象菌株分离那样需花费很长时间，也无需什么特殊装备(DNA 序列分析需气相色谱仪)或技术(DNA 杂交)等。间接免疫荧光抗体分析法(IFA)为目前实验室评估汉塞巴尔通体感染最常用的方法。IFA 敏感性达 67% ~ 95%，特异性为 96% ~ 97%。但其缺陷是对人体缺乏种类特有抗体,抗原抗体反应不是很特异，因此导致了一些种间的交叉反应。且不同实验室对 IFA 的操作及技术存有差异，因此可能会导致一些误诊或漏诊。目前 IFA 检测试剂盒在国外已经商品化(Focus 等公司)，而这些公司的产品在中国地区的销售价格十分昂贵(14000 元/96 人份)，每检测一个样品需 146 元。我国人类巴尔通氏体病(猫抓病)的感染率很高，但临床医师一般仍通过淋巴结肿大结合猫抓咬史来确诊，该方法存在很大的主观性，准确性及特异性较差。本项目拟以细菌 T4SS 系统中 VirB5 蛋白为切入点开展汉赛巴尔通氏体病检测试剂盒研发工作(图 3)，VirB5 已被证实是汉赛巴尔通氏体感染的一种主要免疫分子，是感染诊断的重要靶位点，目前尚未有针对该位点的诊断试剂盒研发工作。迄今为止，我国还没有建立该病的成熟检测方法，因此本项目的顺利实施，对该病的诊断、流行情况监控及公共卫生安全都具有重要意义。

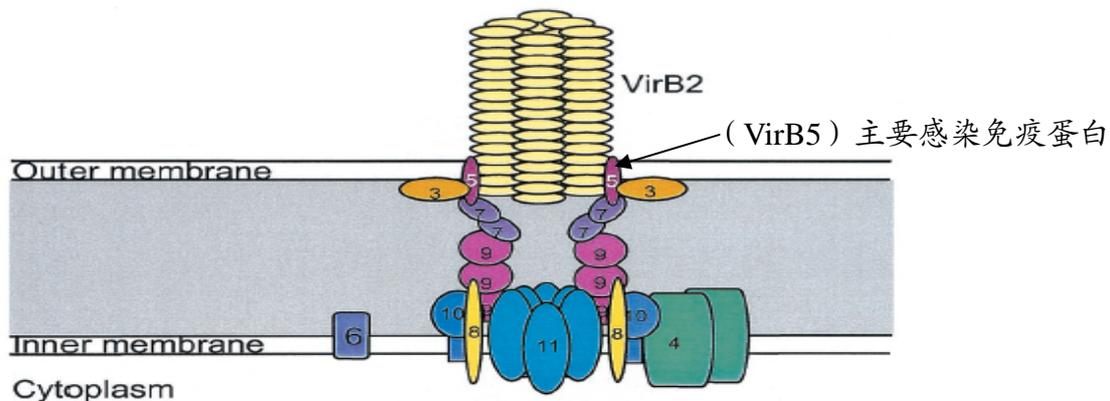


图 3、汉赛巴尔通氏体 4 型分泌系统结构图

政策导向、应用领域和服务对象

巴尔通氏体被世界卫生组织定义为被忽视传染病范畴，每年因巴尔通氏体感染(尤其是汉赛巴尔通体、杆菌样巴尔通体及五日热巴尔通体)导致的死亡病例超过 1 万人，多半由于误诊漏诊而导致病情延误。申请人在我国部分地区进行巴尔通氏体感染调查证实我国人群及动物中巴尔通氏体血清阳性率呈高流行趋势。然而 1980-2010 年期间我国文献记录确诊的猫抓病患者只有 31 例，且集中在我国医疗条件较好地区。这说明我国存在大量漏诊和误诊的巴尔通氏体病病例，使巴尔通氏体病在我国成为严重被忽视的人兽共患病之一，

加重了病患疾病及治疗负担。我国十二五规划中对于公共卫生安全建设列为重点对象，尤其是新发传染病的早期检测及相关预警机制研究具有重要公共卫生意义。

本项目构建血清学检测试剂盒先期主要应用于科研单位（非临床检测使用）进行我国人群及动物中巴尔通体流行病学调查研究，系统探索我国巴尔通体病感染情况及疾病负担，并为我国相关新发传染病防治建设提供后备技术及产品。同时在使用过程中优化修改优化检测参数及方法，为进入临床使用奠定基础。

成熟度、产业化周期、项目鉴定或产品检测报告的结论性表述

目前基于 VirB5 蛋白的汉赛巴尔通体 ELISA 检测试剂盒已经完成所有检测参数及步骤设计，并在实验室完成小试产品模型。小试产品已成功运用于我国部分地区人及动物中巴尔通氏体感染流行病学调查研究，并发表 SCI 论文 4 篇，授权专利一项。

1. **Yuan CL**, et al., Staining of *Bartonella henselae* with carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester for tracking infection in erythrocytes and epithelial cells. *Journal of Microbiological Methods*. 2012.doi:10.1016/j.mimet.2012.02.009
2. **Yuan CL**, et al., Bacteriological and Molecular Identification of *Bartonella* Species in Cats from Different Regions of China. *PloS Neglected Tropical Disease*. 2011, 26:157-161.
3. **Yuan CL**, et al., *Bartonella henselae* infection and its effects on human health. *Reviews in Medical Microbiology*. 2011, 22:425-429.
4. **Yuan CL**, et al., A review of the prevalence of emerging Bartonellosis in humans and animals in China . *African Journal of Microbiology Research*. 2011,5:4248-4252.
5. **袁聪俐**.巴尔通氏体固液双向斜面培养基及制备方法及应用方法. 授权号:CN101838626

预计完成中试生产、用户评测、产品定型需 1.5 年时间。教育部科技查新单位鉴定“基于 VirB5 蛋白构建汉赛巴尔通氏体 ELISA 检测试剂盒研究”项目通过国内外联机数据库系统检索证明该项目具有新颖性。

该检测试剂盒尚未取得临床批文或药证。

参考文献:

- [1] Maguina C , Gotuzzo E . Bartonellosis : new and old [J] . *Infect Dis Clin North Am* ,2000 ,14 :1222.
- [2] Zeaiter Z ,Liang Z ,Raouh D ,et al . Genetic classification and differentiation of *Bartonella* species based on comparison of partialfts Z gene sequences[J] . *J Clin Microbiol* ,2002 ,40 :3641-3647.

- [3] Maruyama S , Kasten RW, Boulouis HJ , et al . Genomic diversity of *Bartonella henselae* isolates from domestic cats from Japan , the USA and France by pulsed-field gel electrophoresis [J] . Vet Microbiol ,2001 , 79 :337-349.
- [4] Regnery RL, Anderson BE, Jill E, et al. Characterization of a Novel *Rochalimaea* Species, *R. henselae* sp. nov., Isolated from Blood of a Febrile , human Immunodeficiency Virus - Positive Patient [J]. J Clin Microbiol ,1992 ,30: 265 - 274.
- [5] Wong YF, Chung TK, Cheung TH, et al. p16INK4 and p152NK4B alteration in primary gynecologic malignancy. Gynecol, 1997,65:319-324
- [6] 刘德忠, 金由辛。乳头瘤病毒 E₁ 蛋白研究进展。《国外医学》流行病传染病分册, 2000, 27 (3): 97-100
- [7] 杨发莲,白鹤鸣,杨慧,等.巴尔通体分离培养特性观察[J].微生物学杂志,2006 ,26 (1) :6 - 9.
- [8] Carithers HA. Cat-scratch disease: an overview based on a study of 1200 patients[J]. Am J Dis Child, 1985, 139:1124- 1133.
- [9] Chomel BB , Kasten RW, Floyd - Hawkins KA. Experimental transmission of *Bartonella henselae* by the cat flea [J] . J Clin Microbiol ,1996 ,34 : 1952.
- [10] Higgins JA , Radulovic S, Jaworski DC, et al . Acquisition of the cat scratch disease agent *Bartonella henselae* by cat fleas (Siphonaptera: Pulicidae) [J]. Med Entomol, 1996,33: 490-495.
- [11] Relman DA , Loutit JS, Schmidt TM , et al . The agent of bacillary angiomatosis: An approach to the identification of uncultured pathogens [J]. N Engl J Med, 1990,323: 1573.
- [12] Oaz Avidor, Yehudith Kletter, Suzi Abulafia, et al .Molecular diagnosis of cat scratch disease: a two-step approach [J]. J Clinical Microbiology, 1997, 35: 1924-1930.
- [13] MJ Dalton, Robinson L E, Cooper J , et al . Use of *Bartonella* antigens for serologic diagnosis of cat-scratch disease at a national reference center [J]. Arch Intern Med, 1995, 155: 1670- 1676.
- [14] Ormerod LD, Skolnick KA, Menosky MM, et al. Retinal and choroidal manifestations of cat-scratch disease [J] . Ophthalmology. 1998, 105:1024-1031.
- [15] Margileth AM. Sorting out the causes of lymphadenopathy [J] .Contemp Pediatr ,1995 ,12 :23-40.
- [16] Ives TJ , Manzewitsch P , Regnery RL , et al . In vitro susceptibilities of *Bartonella*

henselae , *B . quintana* , *B . elizabethae* , *Rickettsia rickettsii* , *R. conorii* , *R. akari* , and *R.prowazekii* to macrolide antibiotics as determined by immunofluorescent-antibody analysis of infected Vero cell monolayers [J] . *Antimicrob Agents Chemother* , 1997 ,41 :578 582.

[17]Wong MT , Dolan MJ , Lattuada CP , et al . Neuroretinitis , aseptic meningitis , and lymphadenitis associated with *Bartonella (Rochalimaea) henselae* infection in immunocompetent patients and patients infected with human immunodeficiency virus type 1 [J] . *Clin Infect Dis* , 1995 ,21 :352 360.

技术特点：（项目的技术特征和优势，可与国内或国际现有技术进行比较。）

本项目研制检测试剂盒具有高通量及低成本优势，通过前期研究证实试剂盒检测准确性高于国外 IFA（免疫荧光检测法）15%（阳性对照），交叉反应低（常见血液寄生微生物，弓形体、巴贝斯虫、无形体、大肠杆菌、链球菌等血清对照）。目前 IFA 检测试剂盒在国外已经商品化（Focus 等公司），不同 IFA 检测试剂盒敏感性不同（67% ~ 95%），特异性较好（96% ~ 97%）。但 IFA 需检测人员在荧光显微镜下观察荧出具检测结果，因此受人为主观因素影响较大，导致误诊或漏诊。同时 IFA 产品在中国地区的销售途径不畅，价格十分昂贵（14000 元/96 人份）。每检测一个样品需 146 元的情况不适合高通量科研检测及临床检验。

市场前景：（市场规模、市场占有率、市场进入壁垒、市场竞争等状况。）

随着越来越多的食源性人畜共患病病例的发生与传播,有关巴尔通氏体病对公共卫生安全的危害与环境风险的控制已经引起政府与全社会的高度重视。巴尔通氏体病给人类健康造成巨大危害，带来潜在的公共卫生问题，已成为一种新发人兽共患病，对都市生活带来严重影响。国际热带病顶尖杂志（PloS NTD）将该病列为关注重点。国外该病检测的配套试剂盒已商品化。但迄今为止，我国尚缺乏巴尔通氏体病快速检测试剂盒，直接影响了有关上海、华东地区乃至全国巴尔通氏体病防控。

本项目研制的诊断试剂盒可用于食品、卫生、检疫、科研院校等部门单位开展该病流行病学调查研究及样品检疫；可规范和提高我国对该病的诊断标准及准确率，为我国公共卫生安全建设发挥积极作用，同时为我国新发传染病防治提供技术及物资储备。市场分析表明，新发传染病诊断试剂盒有着广阔的市场前景。产品投放市场后，可为医疗机构、科研院所、相关检测机构提供快速的检测方法，可用于巴尔通氏体病大范围的流行病学调查研究，有助于制定有效防控措施，挽回经济损失。随着产品销售规模的扩大，其经济效益将随之增加，预示本项目具有良好的投资回报效果 and 经济效益。

目前市售的巴尔通氏体检测试剂盒只有国外公司生产的间接免疫荧光检测试剂盒（IFA bartonella, Focus），且在国内销售需要代理公司购买，平均耗时4个月，价格高昂，给大规模高通量流行病学调查研究带来巨大的经济负担。同时IFA检测需要荧光显微镜等昂贵仪器，且结果受检测人员主动性影响较大。而ELISA检测试剂盒具有价格低廉操作方便等优势，检测结果以数字化形式展示而较准确。迄今为止我国尚未有具有自主知识产权的巴尔通氏体检测试剂盒产品，市场及利润空间巨大。

经济和社会性效益：

1.该项目产业化最低投资金额，包括研发投资，生产资料投资，流动资金等；

本项目完成中试产品预计投资金额 100 万元，其中用于成果技术转让相关研发投资 30 万元，生产资料（抗原抗体大量制备及其它相关试剂耗材）40 万元，流动紫荆 30 万元

2.对环保和能源要求，土地或厂房面积要求，所需职工人数；

本试剂盒属于环境友好型产品，无特定环保及能源要求，原厂原建即满足中试生产需求，需要研发、生产及质检员工 20 名。

3.根据最低投资，预期投产后三年内能达到的年产值、年销售值、年利润；

正式投产 3 年内达到产量 3000 套/年、年销售值预计 90 万元、年利润 20 万元。

4.投资回收期限（年）。

5 年

合作要求：1.合作方式、对合作方及合作价格的要求。

技术转让

生物制剂生产企业，具有一定研发优势。