



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101014622 B

(45) 授权公告日 2011. 12. 28

(21) 申请号 200580029939. X

(22) 申请日 2005. 07. 20

(30) 优先权数据

60/589, 419 2004. 07. 20 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2007. 03. 07

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2005/025875 2005. 07. 20

(87) PCT申请的公布数据

WO2006/012413 EN 2006. 02. 02

(73) 专利权人 凯默根公司

地址 美国缅因州

(72) 发明人 V·A·库尔钦 E·V·莫洛科娃

J·L·克里克

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任
公司 11021

代理人 王旭

(51) Int. Cl.

C07K 16/12 (2006. 01)

G01N 33/569 (2006. 01)

(56) 对比文件

WO 97/34149 A1, 1997. 09. 18, 说明书 2 页 5
行 -7 页 23 行, 权利要求 1-8.

WO 92/14155 A1, 1992. 08. 20, 摘要, 说明书

4 页 1 行 -5 页 15 行, 6 页 1 行 -17 页 6 行, 实施例
1-6, 权利要求 1-13.

US 2002/0034763

A1, 2002. 03. 21, 0015-0028 段, 实施例, 权利要求
1-11.

WO 01/64237 A1, 2001. 09. 07, 权利要求
1-12, 说明书 6 页 12 行 -7 页 7 行, 12 页 8 行 -22
行, 实施例 1-4.

WO 97/26007 A1, 1997. 07. 24, 全文.

Schwebach J R et al. Expression
of a mycobacterium tuberculosis
arabinomannan antigen in vitro and
in vivo. Infection and Immunity 69
9. 2001, 69(9), 5671-5678.

Britton W J et al. Separate
antigenic determinants on cell
wall associated carbohydrate antigens of
mycobacterium lepra defined with monoclonal
antibodies. International Journal of
Leprosy and Other Mycobacterial Diseases 54
4. 1986, 54(4), 545-555.

审查员 李影

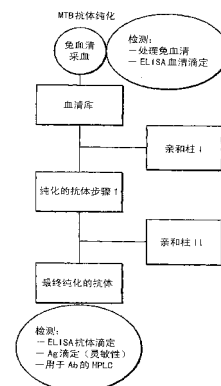
权利要求书 2 页 说明书 20 页 附图 11 页

(54) 发明名称

用于检测分枝杆菌感染的富集抗体, 应用方
法和应用其的诊断检测

(57) 摘要

公开的技术提供了富集抗体群, 对于分枝杆
菌表面多糖抗原高度特异。在相关实施方案中,
所述抗体通过在保持抗原性活性抗原的环境中产
生而富集。这些抗体可以在免疫反应性环境中用
于检测分枝杆菌感染在来自受试者的样品中的存
在。



1. 一种富集的抗体群,其对分枝杆菌的脂阿拉伯甘露聚糖 (LAM) 表面多糖抗原高度特异,所述抗体群的富集特征在于排除识别由 NaIO_4 的氧化修饰的所述抗原的抗体。

2. 按照权利要求 1 的富集的抗体群,其中所述抗体通过在保持抗原性活性抗原的环境中产生而富集。

3. 按照权利要求 1 的富集的抗体群,其中所述抗体通过排除识别相对没有活性的抗原的抗体而富集。

4. 按照权利要求 2 的富集的抗体群,其中所述抗体通过排除识别相对没有活性的抗原的抗体而富集。

5. 按照权利要求 1 的富集的抗体群,其中分枝杆菌是结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)。

6. 一种产生对分枝杆菌脂阿拉伯甘露聚糖 (LAM) 抗原高度特异的富集抗-分枝杆菌抗体群的方法,所述方法包括:

a) 提供分离的抗-分枝杆菌抗体群;并且

b) 从所述群体中去除识别由 NaIO_4 -氧化修饰的抗原的抗体。

7. 一种产生针对分枝杆菌脂阿拉伯甘露聚糖 (LAM) 抗原特异的富集抗体的方法,所述方法包括:

在保持抗原性活性的条件下从分枝杆菌分离抗原;

在保持其抗原性活性时,产生针对所述分离的抗原的抗体;和

去除识别通过 NaIO_4 -氧化修饰的抗原的抗体。

8. 一种产生对分枝杆菌脂阿拉伯甘露聚糖 (LAM) 抗原高度特异的富集抗体群的方法,所述方法包括:

a) 将来自用分枝杆菌接种的哺乳动物的血清上样到用分离的分枝杆菌脂阿拉伯甘露聚糖 (LAM) 表面抗原制备的第一亲和基质上,以致对所述分离的分枝杆菌表面抗原特异的抗体被第一亲和基质保留;

b) 从第一亲和基质分离对所述分离的抗原特异的抗体;

c) 将分离的抗体上样到用修饰的分枝杆菌脂阿拉伯甘露聚糖 (LAM) 表面抗原制备的第二亲和基质上,以致对所述修饰抗原特异的抗体被第二亲和基质保留,其中所述修饰的抗原已经用高碘酸钠处理,而使其相对于分离的抗原失活;和

d) 通过收集第二亲和基质的流出液而分离针对所述分离的抗原特异的富集抗体,从而使得富集抗体比未富集的抗体对分枝杆菌抗原更加高度特异并且表现出更高的灵敏性。

9. 按照权利要求 6-8 任一项的方法,其中所述分枝杆菌是结核分枝杆菌。

10. 按照权利要求 6-8 任一项的方法,其中所述表面抗原从弗氏佐剂分离。

11. 权利要求 1-4 中任一项的富集抗体群用于制备检测受试者样品中的分枝杆菌感染的试剂的应用,所述应用包括:

提供一种免疫反应性环境,这样的环境从权利要求 1-4 任一项的富集抗体发展而来;和

将样品在所述免疫反应性环境中反应,以检测分枝杆菌感染。

12. 按照权利要求 11 的应用,其中所述分枝杆菌感染是结核分枝杆菌 (*M. tuberculosis*)。

13. 按照权利要求 11 的应用,其中所述免疫反应性环境包括 ELISA。
14. 按照权利要求 11 的应用,其中所述分枝杆菌感染是约尼病。
15. 按照权利要求 11 的应用,其中所述分枝杆菌感染是肺部结核分枝杆菌感染。
16. 按照权利要求 11 的应用,其中所述分枝杆菌感染是肺外结核分枝杆菌感染。
17. 按照权利要求 11 的应用,其中所述样品是痰液、血液、尿液、组织或其它适合的样品的任何一种。
18. 按照权利要求 11 的应用,其中所述样品是未处理的未浓缩的尿液。
19. 一种用于检测样品中的分枝杆菌感染的试剂盒,所述试剂盒包括提供免疫反应性环境的检测,其中所述环境包括按照权利要求 1-4 任一项的富集抗体。
20. 按照权利要求 19 的试剂盒,其中所述免疫反应环境包括 ELISA。
21. 按照权利要求 19 的试剂盒,其中所述分枝杆菌感染是结核分枝杆菌。
22. 按照权利要求 19 的试剂盒,其中所述免疫反应性环境被作为条带检测而进行。

用于检测分枝杆菌感染的富集抗体,应用方法和应用其的 诊断检测

技术领域

[0001] 本发明涉及用于检测基于微生物的疾病和病况的诊断检测,并且更具体地,用于检测结核病的诊断检测和方法。

[0002] 背景

[0003] 在最近几十年间,TB 已经从主要的肺部感染发展成为具有增长比例的肺外病例的多面性病理学。直到现在,有效的 TB 预防计划受到缺少快速和领域适用的筛选检测的妨碍。在高收入国家,分枝杆菌培养物一直为诊断的标准物,但是它费时并且相对费钱。理想地,基于 3 种痰液涂片的痰液显微镜方法可以鉴定多达 67% 的培养物阳性病例。尽管一些研究者没有报道 HIV 血清状态 (serostatus) 对 AFB 诊断的任何影响,但是,据报道,HIV 共感染削弱结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 在痰液中的证明。另外,在 HIV 阳性 TB 患者中的更高百分比的肺外 TB 增加了 AFB- 阴性 TB 病例的比例。这使得肺结核成为增加的诊断挑战,并且强调了对于用于其诊断的改善的实验工具的紧急需求。

[0004] 目前用于诊断 TB 的方法是不令人满意的。肺部 TB 的痰液检测不是总是有效,特别地,如果在痰液中不存在可检测的细菌,或者不能获得痰液样品。另外,这种诊断检测需要显微镜检和 / 或细菌培养,来确定所述诊断,两者都不是特别适用于这一领域的诊断。由于,再一次通常需要显微镜检和 / 或细菌的培养和 / 或 ELISA 检测来确定诊断,所以,应用脑脊髓液用于 TB- 脑膜炎的诊断也是有问题的,特别是在本领域中。

[0005] TB 的血液检测也是已知的,但是具有不好的记录,复杂而且不可靠。尿液检测更简单而且更可靠,但是目前的方法需要在进行诊断检测前对尿液进行处理——这样的处理通常包括尿液的浓缩。

[0006] 在最近研发的方法中,已经研发了针对许多分枝杆菌抗原的抗体检测 方法,但是迄今为止,这些检测没有一种达到用于常规诊断目的所需要的特异性。在 HIV 阳性病例中敏感性的下降也是主要的限制。不同的方法用来测定针对结核分枝杆菌特异性抗原如 ESAT-6 的免疫应答,但是到目前为止,潜伏的 TB 感染和 TB 疾病之间的区分仍是不可能的。

[0007] 结核病是一种极端复杂的病理过程,其以多种形式存在,但是总是以空气传播感染起始。肺结核直接发生在所述微生物进入点,并且肺外结核是进一步渗透到患者体内的结果,结核性脑膜炎和骨结核是最广泛传播的实例。病理的复杂性确定在本世纪的现代医学中所尝试的多种不同的方法。并且,HIV 相关的肺结核的临床和 X 射线显示显著地被免疫缺陷而改变。这些因素严重地限制了我们对于 HIV/TB 患者中的结核病的早期症状的识别能力,并且还增加了 TB 传播到这样的患者的亲属和看护者的危险性。

[0008] 分枝杆菌可以潜在地从各种临床样本复苏,包括上呼吸道收集物(痰液、支气管洗液、支气管肺泡灌洗液、支气管活组织切片等);尿液、大便、血液、脑脊液(CSF)、组织活体切片、以及实质上任何组织或器官的深针管抽出液。细菌培养一直为结核诊断中的黄金标准,但是其可能需要 6-8 周才做出最后的诊断。对于分枝杆菌感染的快速(比细菌培养更快)诊断所应用的有 3 种主要的技术:

[0009] ●痰液涂片的直接显微镜检；

[0010] ●基于 PCR 的检测；

[0011] ●免疫诊断方法。

[0012] 痰液涂片的直接显微镜检。早于一个世纪以前, Robert Koch 通过对其染色并且从临床样本培养其而鉴定了结核的病原剂 (ethiologic agent)。现在, 通常应用基本上与 Koch 所用的那些没有不同的染色和培养技术而建立结核的诊断。目前, 痰液直接显微镜检是发展中国家用于诊断结核的标准, 并且其是一种基准, 任何新的检测的功效必须针对其进行评估。它被用于肺结核, 但是对于儿童或者对于处于肺结核的原始期的患者并不是十分有效。

[0013] 基于 PCR 的检测。在 7 个实验室中进行 PCR 检测性能的比较研究已经表明存在高水平的假阳性 PCR 结果, 范围在 3%—20% (在一个实验室中具有 77% 的极值)。这种相对不理想的性能是由于对所述方法的每一步骤缺乏监测而引起, 并且强调在检测的所有阶段对于仔细的质量控制的必要性。

[0014] 免疫诊断方法。

[0015] 结核皮试。这可能是用于结核的最古老的免疫检测。使用小针头, 将叫作 PPD 结核素的少量物质恰好置于前臂上的上层皮肤下。在其被给予后 48-72 小时读取所述检测。一般地, 将 10mm 或更大的肿块视为阳性。许多发展中国家应用 BCG 接种来保护免受 TB。BCG 接种后, PPD 皮试通常变成阳性。取决于 PPD 抗原的质量、免疫系统的反应性以及甚至可能是个体的种族, 皮试结果而不同。这种检测也没有提供关于感染的阶段和位置的明确的指示。

[0016] 用于结核分枝杆菌 (M. tuberculosis) 的血清学检测。这种方法, 基于针对分枝杆菌抗原的抗体免疫应答的检测, 是在研究和临床环境下最广泛应用的方法之一。如果它们应用纯化的抗原, 所有血清学检测具有近似相同的灵敏性。最好的检测的灵敏性, 对于涂片阳性病例在 80% 范围内, 对于涂片阴性病例在 60-70%。报道的特异性通常较高, 并且在 95-100% 范围内。

[0017] 目前现有技术在一些方式上限制它们的性能。

[0018] 最广泛接受的快速显微镜检测需要几个小时才能完成, 需要熟练的技术人员和临床实验环境。与传染病领域的快速 POC (point of care) 检测的现行标准相比, 检测阐释也是很难的。对于美国医院, 每一个患者的一次分析的实际花费在 \$100-150 范围内。所述检测的临床特异性很好, 但是在灵敏性上的任何改善将是非常受欢迎的。

[0019] 皮试具有足够的灵敏性, 但是需要长时间, 并且不能提供关于病理过程阶段的信息, 并且不能充分地地区分被感染的和接种的个体。

[0020] 血清学检测通常没有足够的灵敏性。检测结果随着对 TB 抗原的个体免疫应答的不同而不同。实际上, 这些检测在被结核分枝杆菌感染的 HIV 患者中不起作用。这一因素严重地限制了它们在非洲和许多亚洲国家的适用性。在美国, 这一组患者也构成了大多数的感染 TB 的患者。

[0021] PCR 检测在发达国家广泛地应用, 却是复杂的、耗费大的, 并且不足够的灵敏, 不足以在发展中国家证明它们作为筛选检测的应用。

[0022] 用于传染性疾病的快速诊断的优选方法是基于在患者样品中细菌抗原的检测, 其

提供特异性病原体引起的活性感染过程的明确的证据。在一些出版物中描述了应用直接的抗原检测而检测分枝杆菌感染的观念。

[0023] 例如,在1982年报道了用于结核分枝杆菌的一种最初的直接抗原检测的发展——用于在患有活性肺结核的患者的痰液中检测结核分枝杆菌抗原的放射性免疫检测,其应用对牛分枝杆菌 (*M. bovis*) (BCG 疫苗) 的全细胞特异的兔抗体。将高压灭菌的和超声降解的痰液用作样品。所述检测在来自患有活性结核性肺结核患者的 39 份痰液样品中的 38 份中检测到抗原。

[0024] 后来的研究报道了用于检测患有结核性脑膜炎的患者的脑脊液中的分枝杆菌抗原的 ELISA 系统的发展,其也应用对牛分枝杆菌全细胞特异的抗体。两种系统表现出令人惊讶的高度特异性。除了 LAM 是负责检测的主要抗原外,据报道堪萨斯分枝杆菌 (*M. kansasii*) 表现出 5% 的交叉反应性,以及胞内分枝杆菌 (*M. intracellulare*)、鸟分枝杆菌 (*M. avium*)、偶发分枝杆菌 (*M. fortitum*) 和母牛分枝杆菌 (*M. vaccae*) 只以 2% 进行交叉反应。其他人报道了通过 ELISA 在 12 名患有结核性脑膜炎的患者中的 9 名的 CSF 中检测到分枝杆菌抗原,对应 81.25% 的灵敏性。所述检测的灵敏性等于 95%。

[0025] 实际上,所有先前开发用于结核诊断的检测的尝试都集中在疾病肺部形式的检测上。由于与肺部形式 (from) 相比的低流行率,公认为是难以诊断的肺外形式吸引了相对少的注意。直到 20 世纪 50 年代和 60 年代,肺外 TB 病例仅包括所有结核病例的大约 10%。HIV/AIDS 大流行病的发作已经完全改变了所述状况。这两种疾病最终结合成为一种新的复杂的公共健康问题。现在,足足有 60% 的未治疗的 HIV 患者在他们的一生中发展了活性 TB,并且多达 70% 的 TB 患者是在亚撒哈拉的非洲和亚洲感染的 HIV 患者。HIV 和 TB 的叠加不但改变了结核病的流行病学,而且改变了疾病本身的病程。在最近的十年间,TB 已经从主要的肺部感染发展成为具有肺外形式的不断增长的流行性的多面性病理学。估计,目前肺外 TB 病例包括多达 30% 的所有结核病病例;由于缺乏用于结核病的肺外形式的快速筛选和诊断的工具,这一数字甚至可能是低估的。并且,甚至 HIV 患者中的肺结核经常表现出非典型的症状。例如,这样的患者典型地不产生痰液。这些因素严重地限制了我们对于 HIV/TB 患者中的结核病的早期症状的识别能力,并且还增加了 TB 传播到这样的患者的亲属和看护者的危险性。应用能够检测由于结核分枝杆菌感染引起的广谱病理学的筛选检测的容易性是急需的,包括对于 TB 肺外形式的检测。这样的需求已经讨论了很久,但是没有达到实现目标的进展。现在,所述需求已经成为公共卫生保健的紧急需要。

[0026] 在肺部细菌感染的其它情形中,目前选择的筛选方法是基于在患者尿中分泌的多糖抗原的检测。细菌多糖由不同于人类的单糖组成,并且因此抵抗人类的酶类的分解。这使得它们以免疫化学上完整的形式在尿中分泌,所述免疫化学上完整的形式适于通过多糖特异性免疫检测进行检测。在尿中分泌的极低浓度的细菌多糖需要免疫检测的非常高的灵敏性,以将其用作筛选方法。

[0027] 瑞典和挪威的合作研究小组尝试研发一种 LAM 特异性 ELISA 系统,其检测患者尿中的 LAM 抗原。所述系统将抗原捕获用于从尿液检测结核病,其基于脂阿拉伯甘露聚糖,在结核分枝杆菌表面存在的一种多糖,所述结核分枝杆菌生物体负责在人类中引起结核病,如在 Svenson 的 PCT 申请号 W097/34149 中所公开的那样。所述公开的诊断方法检测到 LAM 以 81.3% 的 AFB- 阳性患者和 57.4% 的 AFB- 阴性患者存在于患者尿中,并且证明了分枝杆

菌 LAM 抗原检测用于诊断分枝杆菌感染的效用。同时,所述系统没能证明所公开的方法用于筛选目的的效用。尽管应用亲和纯化的对 LAM- 抗原特异的兔多克隆抗体,但是,所述方法缺少足够的灵敏性,而不足以用于未处理的非浓缩的尿样。所述诊断方法要求在生化实验室中进行大约 24-48hrs 的熟练操作,集中在对患者尿液的浓缩,并且对其进行制备,用于通过 ELISA 检测进行分析。总的看来, Svenson 检测的灵敏性不足以用于所公开的方法的实际应用。由于证明它在临床设备中的应用太繁琐,在所述临床设备中,应用的速度、容易度和高灵敏性对于用来检测疾病条件的诊断检测都是非常重要的,所以,免疫检测的复杂性和持久性也妨碍其作为用于检测分枝杆菌感染的筛选检测的实际应用。

[0028] 发明概述

[0029] 在本发明的第一个实施方案中,提供来自结核分枝杆菌的脂阿拉伯甘露聚糖的抗原性活性异构体,其通过应用轻度氧化方法,诸如用低浓度的 NaIO_4 处理,将 LAM 氧化而制备。在其它实施方案中,通过轻度氧化方法产生的 LAM 的抗原性活性异构体,被用来制备针对灭活的分枝杆菌,更具体地针对表面多糖诸如 LAM 的高度特异性的、高度纯化的抗体,以用于检测目标患者的尿液、痰液、血液、组织或其它样品中的多糖(例如 LAM)。其它实施方案应用针对 LAM 的抗原性活性形式产生的高度特异性的、高度纯化的抗体来诊断目标患者中的结核病。

[0030] 在另一个具体的实施方案中,提供一种对于分枝杆菌的表面多糖的抗原高度特异的富集抗体群。在这一实施方案中,所述富集的抗体群可以通过在维持抗原性活性抗原的条件下产生而富集。备选地或者此外,所述抗体通过排除识别相对没有活性的抗原的抗体而进行富集。在一些实施方案中,分枝杆菌可以是结核分枝杆菌,类似地,所述表面多糖可以是脂阿拉伯甘露聚糖(LAM)。

[0031] 在另一实施方案中,提供用于产生对分枝杆菌抗原高度特异性的富集抗体的方法。在这一实施方案中,所述方法包括产生并且分离针对分枝杆菌抗原的抗体;并且从所分离的抗体中分离出对相对没有活性的抗原特异的抗体群,以产生分离的富集抗体。

[0032] 在另一实施方案中,提供用于产生对分枝杆菌抗原高度特异性的富集抗体的方法。在这一实施方案中,所述方法包括在维持抗原活性的条件下从分枝杆菌分离抗原;并且在维持其抗原活性时产生针对所分离的抗原的抗体。

[0033] 在另一实施方案中,提供用于产生对分枝杆菌抗原高度特异性的富集抗体的方法。在这一实施方案中,所述方法包括将来自用分枝杆菌接种的哺乳动物的血清上样到用分离的分枝杆菌抗原制备的第一亲和基质上,从而使得针对所分离的抗原特异的抗体保留在第一亲和基质上;从第一亲和基质分离对所分离的抗原特异的抗体;将分离的抗体上样到用修饰的分枝杆菌抗原制备的第二亲和基质上,从而使得对所修饰的抗原特异的抗体保留在第二亲和基质上,其中所述修饰的抗原已用一种试剂处理,而使其相对于分离的抗原失活;通过收集第二亲和基质的流出液,而分离针对分离的抗原特异的富集抗体,从而使得富集抗体比未富集的抗体对分枝杆菌抗原更加高度特异并且表现出更高的灵敏性。

[0034] 在其它相关实施方案中,分枝杆菌可以是结核分枝杆菌,并且所述表面多糖可以是脂阿拉伯甘露聚糖(LAM)。

[0035] 在其它实施方案中,用于修饰分枝杆菌抗原的试剂是高碘酸钠。在其它相关实施方案中,所述表面多糖可以是弗氏佐剂分离的。

[0036] 另一实施方案提供在来自受试者的样品中检测分枝杆菌感染的方法。在这一实施方案中,所述方法包括提供免疫反应性环境,这样的环境从所述富集抗体发展而来,如上文所述;并且将样品在所述免疫反应性环境下反应,从而检测分枝杆菌感染。

[0037] 任选地,分枝杆菌感染可以是结核分枝杆菌或约尼病(Johne's disease)。相似地,所述表面多糖可以是脂阿拉伯甘露聚糖(LAM)。在其它相关实施方案中,所述免疫反应性环境包括ELISA,并且可以作为带状检测(strip test)而实行。在相关实施方案中,分枝杆菌感染可以是肺部结核分枝杆菌感染或肺外结核分枝杆菌感染,并且样品可以是痰液、血液、尿液、组织或其它适合的样品的任何一种。在一个相关的具体实施方案中,所述样品可以是未处理未浓缩的尿液。

[0038] 其它实施方案提供用于检测样品中的分枝杆菌感染的试剂盒,所述试剂盒包括提供免疫反应性环境的检测,其中所述环境包括上文所述的富集抗体。在相关实施方案中,所述免疫反应性环境包括ELISA,并且可以作为带状检测而实行。在其它相关实施方案中,分枝杆菌感染可以是结核分枝杆菌,并且所述表面多糖可以是脂阿拉伯甘露聚糖(LAM)。

[0039] 附图简述

[0040] 通过参考下述详细描述,与参考附图相结合,本发明的前述特征将更加易于理解,所述附图中:

[0041] 图1显示分枝杆菌ManLAM、PILAM和AraLam的结构模型。

[0042] 图2显示LAM实验的血清学(seriological)活性比较。

[0043] 图3显示LAM-特异性Ab制剂在捕获ELISA中的功效。

[0044] 图4A. 对于尿液中不同浓度的LAM的LAM ELISA的灵敏性。实心圆代表应用结核分枝杆菌的LAM的ELISA结果,和空心圆代表对照ELISA结果。截断值是阴性对照的光学密度+0.1,获得0.25ng/ml的最小检测限度。

[0045] 图4B. 对于下列细菌物种,ELISA中LAM-特异性抗体与非分枝杆菌抗原的结合被排除:

[0046] 肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)、无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)、肺炎链球菌14/12F(*Streptococcus pneumoniae* 14/12F)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、金黄色葡萄球菌25923/43300(*Staphylococcus aureus* 25923/43300)、普通变形菌(*Proteus vulgaris*)、大肠杆菌8739(*E. coli* 8739)、脑膜炎奈瑟氏球菌A/B/13102(*Neisseria meningitidis* A/B/13102)、流感嗜血菌(*Haemophilus influenzae* A/B/D)。空心三角形表示LAM-特异性抗体与结核分枝杆菌抗原结合的ELISA结果,而其余的符号表示利用相同的LAM-特异性抗体与上述其它细菌物种得到的ELISA结果。

[0047] 图4C. 对于各种分枝杆菌菌株的LAM ELISA的灵敏性。检测牛分枝杆菌和结核分枝杆菌的LAM是最灵敏的。

[0048] 图5. AFB阳性患者的显微镜检分枝杆菌密度和在未处理的尿液中通过LAM ELISA测定的其抗原浓度之间的关系。AFB+(光学显微镜1000×放大:4-90个抗酸杆菌/100个视野)28个病例。AFB++(1-9/视野)23个病例。AFB+++ (~10/视野)20个病例。框图显示10th, 25th, 50th, 75th, 90th百分数和平均抗原浓度。

[0049] 图6显示按照本发明的具体实施方案的抗原纯化流程的示意图。

[0050] 图7显示按照本发明的具体实施方案制备亲和柱的示意图。

[0051] 图 8 显示按照本发明的具体实施方案的抗体纯化流程的示意图。

[0052] 图 9 显示按照本发明的具体实施方案制备缀合物的示意图。

[0053] 具体实施方案详述

[0054] 定义

[0055] 下述术语应该具有指定的意思,除非上下文另外需要:

[0056] 当用在本文时,“免疫反应性环境”意指,支持免疫检测,免疫反应,免疫化学,以及包括、涉及或依赖免疫反应而获得需要的结果的任何流程、检测方法学或系统的环境。免疫反应性环境的实例是在 Swanson 等的美国专利号 5,073,484;和 Guire 等的美国专利号 5,654,162 和 6,020,147 中详述的那些,其公开了用于定量确定液体中的被分析物的方法和设备,其中具体的实施方案应用这样的免疫化学反应,即,其中被分析物和反应物代表特异的配体(抗原)-抗体(抗-配体)结合对的不同部分。这些专利涉及已经被用作我们在本详述和下述权利要求中称为“带状检测”的技术。

[0057] “弗氏佐剂”来自 Sigma, USA。

[0058] 我们已经开发了一种高灵敏性的方法,用于检测分枝杆菌抗原,特别是结核分枝杆菌抗原,诸如表面多糖脂阿拉伯甘露聚糖(LAM)和其它种类,在体液包括但不限于尿液中的存在。迄今为止,这种性质检测缺少灵敏性,并且不可用于未处理的尿样或用于检测肺外 TB 感染。特别地,我们已经开发了针对分枝杆菌抗原产生的富集抗体,其中所述抗体通过在保持抗原性活性抗原的环境下产生而富集。我们将用于产生这种第一类的富集抗体的方法叫作“直接法”,在下文将对其更详细地描述。

[0059] 我们还开发了通过排除识别相对没有活性的抗原的抗体而富集的抗体。用于产生这一类抗体的所述方法通过在“直接法”之后开始,以获得富集抗体,但是然后通过排除识别相对没有活性的抗原的抗体而进行。我们将用于产生这种第二类富集抗体的方法叫作“富集法”,在下文也将对其更详细地描述。

[0060] 图 8 是显示参与实行富集方法(enhanced method)的实施方案的步骤的示意性描述。由于所述富集方法建立于直接法,所以,如果我们在第一亲和柱之后停止,图 8 还举例说明了直接法。

[0061] 在下文,我们显示这些两类之一或二者的富集抗体可以怎样用于在各种样品中检测肺部和肺外 TB 感染,所述样品包括但不限于未处理的(即,未浓缩的)尿样。(其它潜在的样品来源包括痰液、脑脊液、血液、组织、灌洗液。)在其接着的实例中,在保持其抗原性活性的环境下,针对脂阿拉伯甘露聚糖(LAM)的表位产生富集抗体。

[0062] 已经研究了用于应用不同的体液诸如血清、尿液或痰液而检测表面多糖(LAM)的现有方法,但是证明其是有问题的。在血清中,LAM 的检测似乎受到形成免疫复合体的干扰。由于肺外感染通常不提供含有分枝杆菌抗原的痰液,所以,LAM 在痰液中的检测只在患有肺 TB 的患者的样品中是可能的。关于尿的现有研究需要大量的样品处理和操作,限制了本领域的这样的方法学。对于诊断肺外分枝杆菌感染,诸如在 HIV- 阳性受试者中出现的那些,这些方法没有一种有效。

[0063] 本发明的实施方案通过提供可以用于在受试者的宽范围的样品类型中检测分枝杆菌抗原的富集抗体,从而克服了现有技术的困难。其中,这些样品类型包括血清、血液、痰液、灌洗液、组织、以及未处理的、未浓缩的尿液。

[0064] 脂阿拉伯甘露聚糖 (LAM) 是一种对分枝杆菌属特异性的 17500molwt 脂多糖。脂阿拉伯甘露聚糖是一种由甘露糖和阿拉伯糖残基组成的复合多糖抗原,形成高度分支的和复杂的结构。尽管多于 40 年的分枝杆菌多糖抗原的结构研究,本领域的那些技术人员仍然只讨论所述结构的片段或结构基序和复合模型。最近的 LAM 结构复合模型在下面图 1 中给出。

[0065] 作为分枝杆菌外细胞壁的部分,LAM 从新陈代谢活跃的或退化的细菌细胞释放。假定在活性 TB 感染中, LAM 渗漏到循环中,穿过肾脏,并且因此可以在尿液中检测到,从而反映分枝杆菌负担的水平。由于 LAM 是具有糖苷键的碳水化合物抗原,对于其不存在人类降解糖苷酶,所以,所述抗原以完整形式存在于尿液中。

[0066] 分枝杆菌 LAM 抗原由 3 个主要结构域组成:甘露糖基-磷脂酰(phosphatidyl)-肌醇(MIP) 锚定子,其含有具有可变链长度的可变数目的脂肪酸;甘露聚糖核多糖,甘露糖残基数目可变;和连接到甘露聚糖核上的分支阿拉伯聚糖多糖链。尽管许多尝试,在甘露聚糖(manan) 核上用于阿拉伯聚糖链的附着位点仍然未知。阿拉伯聚糖多糖链被甘露糖寡糖封端(capped),其由长度可变的单-(α 1-2)-双-和(α 1-2)-三-甘露糖基单位(封端基序)组成。封端程度随着链与链而不同,并且可能还取决于生长条件。

[0067] 分枝杆菌 LAM 的极高的结构复杂性和可变性导致抗原表位的非常复杂的谱型。所选择的诊断剂的复杂性迫使我们应用亲和纯化的多克隆抗体作为主要的免疫检测试剂。只有应用多克隆抗体才允许我们涵盖与临床样品中存在的 LAM 潜在相关的全部谱型的抗原特异性。为了获得三明治免疫检测的可能的最高检测灵敏性,在捕获区域我们应用最高浓度的抗原-特异性抗体并且还用作标记的抗体。已知抗原-特异性亲和纯化产生这样的抗体。

[0068] 为了制备基于抗原的亲和柱,我们研发了用于抗原分离并且偶联到固相支持物上的方法。LAM 抗原分离的方法基于文献中所述的和为本领域的那些技术人员公知的,以及在下文所述的其它细菌多糖的分离方法,其具有一些小的改进。

[0069] 文献所述的早先的基于 LAM 的直接抗原免疫检测使用多克隆抗体,所述多克隆抗体是应用 LAM-琼脂糖柱通过抗原-特异性亲和层析而纯化。对于合成亲和基质的现有技术方法是基于 LAM 多糖的部分 NaIO_4 -氧化,随后偶联到 NH_2 -琼脂糖上。令人吃惊地,我们的实验表明, NaIO_4 -氧化降低了 LAM 多糖的抗原活性,如可以从图 2 看出的那样。

[0070] 由于氧化多糖和 NH_2 -固体支持物的偶联效率与氧化程度成比例,所以,我们通过用 50mM NaIO_4 氧化的功能化 BSA-间隔分子 LAM 抗原而偶联到琼脂糖支持物上。在这一氧化水平上, LAM 多糖仍保留一些抗原性活性,如下文所述,但是提供了高的偶联效率。将免疫血清应用到这样的亲和基质上导致了以高的级分产量分离兔抗体。在平板 ELISA 免疫检测形式中作为捕获抗体的这样的抗体的检测表现出一些功能活性,但是没有在足够的水平上,不足以用于对于应用非浓缩尿样进行筛选应用所必需的高灵敏性免疫检测中。这些数据解释了先前在文献中获得的结果,在所述文献中,应用 LAM-特异性亲和纯化的抗体,但是仍然需要浓缩尿样,以检测在样品中存在的 Lam。

[0071] 出乎意料地,基于用溴化氰(CNBr) 激活多糖,通过将 LAM 偶联化学变成更轻微的非破坏性方法,导致了质量好得多的 LAM 特异性抗体的纯化,如可以从图 3 看出。

[0072] 然后,令人惊讶地,在深入地、强 NaIO_4 还原后(见下文),将用完整的 LAM(CNBr-活

化方法) 在柱上纯化的抗体流过具有 LAM 抗原的柱子, 产生相对少的抗体级分, 大约为应用量的 7-10%, 在 LAM- 特异的直接抗原免疫检测中具有非常高的活性。图 3 显示这样的抗体作为捕获抗体的效率。当将这样的抗体用辣根过氧化物酶 (HRP) 标记并且用作标记的抗体时, 它还表现出比所检测的或已知的任何其它抗体更高的活性。基于这样的抗体的 ELISA 系统已经表现出极高的灵敏性, 并且证明有效用于检测非浓缩的尿液样品。这使得我们制成一种具有性能特征的筛选 LAM- 特异性的免疫检测方法, 其适于在本领域或者肺部和肺外 TB 情形中进行快速筛选, 这是以前别人没有获得的技术。因此, 尽管已经在 TB 患者的冷冻尿液中描述了 LAM, 但是对于这样的报告的检测需要大量的样品制备, 并且因此不是领域适用的。

[0073] 流程

[0074] 在本部分, 我们描述了适于实行上文所定义的“直接法”和“富集法”的流程。这一讨论没有严格地按照直接法和富集方法本质而进行分类, 但是具体描述了制备适用于一种或两种方法的柱子的方法, 这依赖于上下文。图 8 显示了直接和富集法的示意图。

[0075] 从弗氏佐剂分离结核分枝杆菌的干细胞

[0076] 首先, 在使用前, 允许细胞和弗氏佐剂在室温静置最少 1 周。打开佐剂瓶的盖子, 并且不搅乱沉降在瓶底的细胞, 倒掉大体积的矿物油。可以将少量的矿物油留在瓶中, 作为避免吸取细胞沉淀的警示。弃掉矿物油, 并且然后混合 6.0L 乙醇和 6.0L 二乙醚, 并且向每个瓶中加入 5mL 乙醇:二乙醚混合物。

[0077] 接着, 关闭瓶子, 涡流振荡, 并且迅速将混悬液转移到 1-L Erlenmeyer 烧瓶中。在本步骤中避免使细胞重新在瓶中沉降。当所述 1-L Erlenmeyer 烧瓶装满到 1-L 线时, 让细胞沉降 1-1.5hr。然后, 轻轻地将 Erlenmeyer 烧瓶中的溶剂倒入一个洁净的 1-L 烧杯中。避免搅乱沉降的细胞并且用溶剂移动它们。如果倒入烧杯中的溶剂是清澈的, 那么弃之。如果有显著量的细胞随着溶剂倒出, 那么将所倒出的溶剂倒回 Erlenmeyer 烧瓶并且重复沉降步骤。使用 20-30ml 整分的乙醇:二乙醚混合物, 将细胞转移倒玻璃熔制的滤器上。

[0078] 用 500ml 乙醇-二乙醚混合物洗涤细胞, 然后用 200ml 二乙醚洗涤。接着, 使用 100mmHg $\pm$ 10 (低真空) 的真空器, 在滤器上将细胞空气干燥。时不时地搅拌, 并且将细胞质体匀浆, 然后用多孔材料 (诸如 Kim-wipe) 将滤器盖上, 并且置于通风橱中直到晾干 (大约 15 小时, 即, 过夜)。

[0079] 称重并且记录总重量, 并且计算细胞的干重。然后用橡胶线纹盖密封, 并且保存在 15-30°C。

[0080] 粗 LAM 抗原的酚提取

[0081] 将结核分枝杆菌的干细胞置于 250-mL Pyrex 培养瓶中, 并且将温和的去离子水添加到细胞中。在超声波水浴中, 将混悬液涡流振荡, 并且用脉冲超声 (~ 20 秒脉冲) 处理, 直至混悬液成为均匀的。

[0082] 用酚提取细胞, 然后用乙醇沉淀, 并且将沉淀的细胞在冰箱 (2-8°C) 中放置过夜 (~ 16 小时), 以允许沉淀物沉降下来。十分小心不要搅动沉淀, 轻轻地倒出上层清液, 直到留下大约 100mL 上层清液覆盖所述沉淀物。轻轻振动以混合, 然后将余下的混悬液转移到 teflon 离心管中, 并且在 12,000rpm 离心 20 分钟。尽可能多的从所有的管子中倒掉上层清液, 不要搅动沉淀块, 向每个管中加入 5ml 去离子水, 并且使用涡流振荡和脉冲超声, 将沉

淀块溶解在水中。将所有的级分与溶解的沉淀组合在一起并且置于 500-mL 烧瓶中（注意：不要超过烧瓶容量 / 体积的 1/10）。旋转蒸发，以使得体积最小化，但是避免使得样品熔焦化。用大约 50mL 水将膜再次溶解，并且重复干燥和再溶解，直到样品被干燥 3 次。再溶解在 50mL 水中并且冻干。

[0083] 通过葡聚糖 G-25 层析纯化 LAM 抗原

[0084] 将 800mg 粗 LAM Ag 溶解在 15mL 0.25% 的乙酸溶液中。在超声波水浴中振荡并且超声，以获得完全的溶解。在微量离心机中以 5000rpm 离心 5min。将上层清液收集到 20-mL 玻璃瓶中，将所述上清分成 3 等份，以用于独立的层析运行，然后轻轻地将上面收集到的 1/3 的 LAM Ag 上清上样到层析柱上。在 100mL 体积流过柱子后，开始收集级分。继续收集级分，直到从层析开始流过 350mL 的移动相。盖上所有的级分，并且保存在 2-8℃。在 250-mL 蒸发烧瓶中旋转蒸发（体积不大于 25mL）。蒸发以使得体积最小化，但是避免使得样品熔焦化。在 20mL 水中稀释所蒸发的物质，超声，振荡，直到完全溶解并且然后冻干（大约 8 小时）。用刮刀将干燥的物质刮到配衡玻璃小瓶中并且称重。

[0085] 上述步骤在图 6 中示例性地描述。

[0086] 用 CNBr 活化将 LAM 抗原与 BSA- 间隔偶联

[0087] 首先，制备 0.5M 碳酸氢钠和 1M 碳酸钾溶液。然后将 30.0mg 纯化的 LAM Ag 溶解在 1.5mL 去离子水中。应用脉冲超声（10-20sec 脉冲）和振荡以完全溶解 LAM Ag。

[0088] 将 300mg BSA- 胍配体溶解在 15mL 去离子水中。脉冲超声（10-20sec 脉冲）和振荡以完全溶解，然后置于微量离心管中，并且在微量离心机中以 10,000rpm 离心 10 分钟。使用巴斯德移液器从每个管中小心收集清澈的上层清液并且汇集在一起，并且转移到 20-mL 的小瓶中。避免搅动可能形成的任何沉淀。向小瓶中加入 1.0mL 0.5M 的碳酸氢钠，并且通过摇动充分混合。向 LAM 溶液中加入 150 μ L 冷冻的 1M 碳酸钾，并且通过简短的振荡充分混合。将获得的溶液置于冰 / 水浴中。

[0089] 在乙腈中制备 5mg/mL CNBr，立即使用，并且向 LAM 溶液中加入 180 μ L 的溴化氰溶液。振荡混合并且置于冰上大约 15 分钟。用巴斯德移液器将这一溶液添加到 BSA- 胍配体溶液（上述）中。充分混合并且在紧密密封的小瓶中在 2-8℃ 温育过夜（16-24 小时）。

[0090] 用 NaIO₄ 活化将 LAM 抗原与 BSA- 间隔偶联

[0091] 3-4-mL 小瓶中，将 LAM 抗原溶于 1.25mL 去离子水中。脉冲超声并振荡以完全溶解。制备 0.1M 的高碘酸钠溶液：（在 NaOAc 缓冲液中，pH4.0）。将 1.25mL 0.1M NaIO₄ 溶液添加到 1.25mL LAM 溶液中。振荡以混合。用铝箔将小瓶盖上；将其置于摇动平台上，并且在环境温度下混合 1 小时 +/-5 分钟。

[0092] 在 25-40mL 玻璃血清小瓶中，将 250mg BSA- 胍配体溶解在 12.5mL 去离子水中。应用脉冲超声并且振荡以完全溶解，然后以 10,000rpm 离心大约 10 分钟。使用巴斯德移液器从每个管收集上层清液，并且汇集到 25-40mL 玻璃小瓶中。避免搅动沉淀。向小瓶中添加 12.5mL 0.1M 磷酸钠（pH 6.8），并且通过简单振荡充分混合。

[0093] 偶联方法：

[0094] 向 BSA- 胍溶液中加入氧化的 LAM 溶液，并且振荡。加入 100mg 氰基硼氢钠并且密封。取样 10 μ L 最终溶液，并且用 90 μ L 1×PBS 缓冲液（QC 溶液）稀释，并且留作进一步的分析（LAM 浓度为约 0.75mg/mL）。

[0095] 用 NaIO₄ 活化琼脂糖

[0096] 测定与 80ml 沉积的凝胶相对应的琼脂糖 4B-CL 的等分混悬液,并且转移到烧结的玻璃滤器上。用 500mL 水洗涤,并且用低真空(大约 300mmHg)抽吸,直到凝胶表面的粒状结构可见。避免在凝胶层形成空气裂缝。制备 0.1M 醋酸钠缓冲液,pH 4.0 的溶液,并且用于制备在 0.1MNaOAc 中的 30mM NaIO₄ 溶液。

[0097] 向所述凝胶中加入 250mL 的 30mM NaIO₄,并且充分混合。用铝箔将瓶子中的混和物盖上,并且以 45℃角置于摇动平台上,在环境温度以中等速度摇动 1.5 小时 ±10 分钟。转移到烧结的玻璃滤器中,并使用低真空(大约 300mmHg)用 1L 水洗涤。活化的凝胶必须在使用的最多 4 小时内制备。

[0098] 将 BSA-LAM 配体与活化的琼脂糖偶联(用于合成第一和第二亲和柱)

[0099] 制备基质

[0100] 在 1×PBS(磷酸盐缓冲液)中制备 0.1%叠氮钠溶液。测量与 60ml 沉积凝胶(或其它适宜的基质)对应的活化的琼脂糖混悬液,并且将其转移到烧结的玻璃滤器上。使用低真空(300mm Hg)抽吸凝胶,直到凝胶压实,并且粒状结构可见,但避免在凝胶表面形成裂缝。

[0101] BSA-LAM 配体溶液:

[0102] 在 250-mL 培养瓶中,用磷酸钠缓冲液(pH6.8)将 17—20mLBSA-LAM 配体溶液稀释到 90mL。将 90mg 结晶氰基硼氢钠加入所述溶液。使用提供的塑料盖,将瓶子紧密关闭。通过简单振荡而充分混合。所述溶液可以呈现出乳白色的,但是不应该有沉淀。可以看到由氰基硼氢钠形成的显微气泡。

[0103] 偶联步骤:

[0104] 向上述制备的 LAM 溶液中加入抽吸的活化琼脂糖凝胶。紧密关闭,并且使用轻轻振荡充分混合所述混悬液。在 37℃ +/−2℃温育大约 4 小时,每小时混合反应混合物(通过倒置)。加入 4.5mL1.5MTris 缓冲液,并且再次紧密盖上盖子。继续在 37℃ +/−2℃温育大约 16 小时(过夜)。

[0105] 将反应混合物转移到烧结的玻璃滤器上,并且通过使用低真空(300mm Hg)将液相收集到干净的 100-200mL Bunzen 烧瓶中。用 400ml 去离子水洗涤在滤器上的 LAM—琼脂糖凝胶,并且继续用 600mL1×PBS 洗涤。

[0106] 柱的包装和保存:

[0107] 在 250mL 烧杯中,向制备的凝胶中加入 100mL1×PBS。人工搅动成浆状。按照标准方法,使用 1×PBS 装柱。用 1×PBS 加 0.1%叠氮钠平衡柱子。

[0108] -LAM 配体与活化琼脂糖的通用偶联(用于制备亲和柱 I 和 II)

[0109] 测定与 100ml 沉积胶对应的活化琼脂糖混悬液,并且转移到烧结玻璃滤器上。使用低真空(300mm Hg)抽吸凝胶,直到所述凝胶压实并且粒状结构可见,但是避免在凝胶表面形成裂缝。保持抽吸的凝胶以备后用。

[0110] BSA-LAM 配体溶液:

[0111] 在 250mL Pyrex 培养瓶中,用磷酸钠缓冲液(pH6.8),将大约 27.5mLBSA-LAM 配体溶液稀释到 100mL。向溶液中加入 100mg 结晶氰基硼氢钠。应用提供的塑料盖紧密关闭瓶子。通过简单振荡而充分混合。所述溶液可以呈现出乳白色,但是不应该有沉淀。可以看

到由氰基硼氢钠形成的显微气泡。

[0112] 偶联步骤:

[0113] 向上述制备的 LAM 溶液中加入抽吸的活化琼脂糖凝胶。用提供的塑料盖紧密关闭。使用轻轻振荡(中等速度)充分混合所述混悬液,并且在 37°C +/-2°C 温育大约 4 小时,每小时混合反应混合物(通过倒置)。加入 7.5mL 1.5M Tris 缓冲液,并且紧密关闭。继续在 37°C +/-2°C 温育大约 16 小时(过夜)。

[0114] 将反应混合物转移到烧结的玻璃滤器上,并且通过使用低真空(300mm Hg)将液相收集到干净的 100-200mL Bunzen 烧瓶中。用约 800ml 去离子水洗涤在滤器上的 LAM-琼脂糖凝胶。继续用大约 1.2L 1×PBS 洗涤。

[0115] 柱的包装和保存:

[0116] 在 250-mL 烧杯中,向上述凝胶中加入约 160mL 1×PBS。人工搅动(用刮刀/玻璃棒)成浆状。按照标准方法,使用 1×PBS 装柱。用带有 0.1%叠氮钠的 1×PBS 平衡柱子。

[0117] 图 7 示例性地描述了包括纯化的 LAM 的应用和亲和柱 I 和 II 的制备的上述步骤。

[0118] 用亲和层析-I 分离抗体(“直接法”)

[0119] 制备下列储液:

[0120] 1 升 0.1M 甘氨酸缓冲液,并且用 1M HCl 调节 pH 到 2.5。

[0121] 1 升 3×PBS 溶液(用去离子水稀释 10×PBS 储液)并且检查 pH,如果

[0122] 需要,用 1M HCl 或 1M NaOH 重新调节到 7.2-7.4。

[0123] 200mL 1×PBS 加 0.1%叠氮钠溶液。

[0124] 100mL 0.5M 磷酸氢二钠 (Na_2HPO_4) 溶液。

[0125] 血清制备

[0126] 将冷冻的血清在冰箱中缓慢解冻(大约 16 小时/过夜)直到完全解冻。测定血清体积,并且对于每 100mL 血清称重 2.9g 氯化钠,并加入到血清中。轻轻旋振直到完全溶解;终浓度为 0.5M NaCl。

[0127] 以~8000g 离心(4-8°C)20 分钟。用巴斯德移液器从所有离心管中吸走上层清液。不要搅动沉淀。通过棉花塞紧的漏斗过滤上清,并且收集滤过液。收集的滤过液应该是微乳白色的,但是不应该含有任何微粒物质。将滤过的血清置于冰箱中直到应用。

[0128] 血清应用:

[0129] 通过用 1×PBS 平衡,准备柱 I(未修饰的 LAM 偶联到柱材料上)用于血清应用。调节流速为 2.0mL/min,并且继续应用 1×PBS 直到基线保持至少 1 小时的稳定。当需要时,将记录器和检测器调零。一旦基线稳定,调节流速到 0.5-0.6mL/min,然后以 0.5-0.6mL/min 流速将上文制备的血清上样到 LAM 亲和柱 I 上。收集无用的(void)体积洗脱液(其约为柱体积的 30%)。通过 260-280nm 的 UV 检测而监测级分,并且当信号增加发生时,开始收集 500-1000mL 血清中流过柱子的血清。当全部体积的血清都上样到柱子上时,暂时停止柱子流动,上样 3×PBS 缓冲液,然后重新开始液体流动。继续用 3×PBS 洗涤柱子,直到信号下降到基线的大约 50%。在这一点,停止收集血清,并且保存所有收集到的级分。改变流速到 2.0mL/min,并且继续用 3×PBS 洗涤柱子,直到基线约为 10-15%。弃掉穿透液。用 1×PBS 缓冲液代替 3×PBS 缓冲液,并且以 2.0mL/min 的流速用大约 2-2.5 柱体积洗涤。弃掉穿透液。

[0130] 抗体洗脱步骤:

[0131] 将流速调节到 1.0mL/min。用上文制备的冰冷的 0.1M Gly-HCl 缓冲液代替 1×PBS, 并且开始洗脱吸附的抗体。当信号迅速增加并且增加到全刻度的约 10-15% 时, 开始收集洗脱液系列 (eluent column), 收集到置于冰-水浴 (0℃) 上的 15ml 圆锥形管子中。收集 5-ml 级分。

[0132] 继续收集在 Gly-HCl 缓冲液中的抗体, 直到信号开始迅速减小。当信号下降到开始收集时的信号水平 (全刻度的 10-15%) 时, 停止级分收集。通过向每 5-ml 级分中以 0.1-ml 的增加量加入 0.5mL 0.5M Na₂HPO₄, 而中和收集的抗体。加入的总体积应该等于中和前级分体积的 10%。

[0133] 在加入 Na₂HPO₄ 缓冲液过程中轻轻混合溶液, 并且汇集所中和的级分。针对只含有 0.1M Gly-HCl 缓冲液的空白测定抗体在 280nm 的 O.D., 并且计算抗体浓度。将收集的抗体置于 2-8℃ 最少 3 天, 以允许碰撞 (crashing) 和释放 (shedding)。

[0134] 柱的维护:

[0135] 用 1×PBS 平衡柱子直到中性 (pH7)。不用时, 用 1×PBS 加 0.1% 叠氮钠溶液平衡柱子, 并且将柱子保存在 4-8℃ 以备将来应用。

[0136] 透析

[0137] 将制备的抗体以 10,000G 离心最少 5 分钟。将上清转移到 12-14mol. wt. 截留透析管中, 并且针对 1×PBS 透析 2-3 天, 最少更换 4 次缓冲液, Ab 溶液与总体积的比例 ≥ 1:20。从透析中移出抗体。使用玻璃量筒, 测定抗体溶液的体积。如果存在一些多余的碰撞/释放 (以沉淀物的形式), 那么将抗体溶液再以 10,000G 离心最少 5 分钟。用 1×PBS 缓冲液将分光光度计调整空白后, 在 280nm 测定抗体的 O.D.。计算浓度, 单位 mg/mL, 并且置于 4-8℃ 保存。

[0138] 用亲和层析 -II 分离抗体 (“富集法”)

[0139] 纯化高度特异性的抗体

[0140] 以 2.0mL/min 的流速上样 1×PBS 到上文制备的 LAM 亲和柱 2, (LAM 通过使用 NaIO₄ 强氧化修饰、偶联到柱材料上), 直到基线保持至少 15 分钟的稳定。当需要时, 将记录器和检测器调节到零。接下来的 30 分钟内, 继续监测基线, 并且一旦稳定, 将抗体上样到柱上。调节流速到 0.5-0.6mL/min, 并且使用 Econo 泵或相似的装置, 上样上文制备的一定量抗体到 LAM 亲和柱 2 上, 所述一定量的抗体对应 ~ 100-150mg Ab。在 280nm 收集无用的体积洗脱液 (其约为柱体积的 30%)。当信号增加到高于基线约 10-15% 时, 开始将抗体收集到干净的血清瓶中。当全部抗体体积都被上样时, 暂时停止液体流动, 上样 1×PBS 缓冲液, 并且以 0.5-0.6mL/min 继续开始液体流动。继续在 280nm 收集流过柱子的物质。当信号下降到高于开始收集时信号的 10-15% 时 (高于基线 30-50%), 停止收集溶液。

[0141] 后来测定高度特异性抗体在 280nm 处的 O.D., 并且计算抗体浓度。立即将抗体溶液置于 4-8℃ 用于暂时的保存。

[0142] 柱洗涤

[0143] 继续用 1×PBS 以 2.0-2.5mL/min 的流速洗涤柱子。流过最少 3 柱体积的 1×PBS。用上文制备的冰冷的 0.1M Gly-HCl 缓冲液洗脱吸附在柱子上的物质。将洗脱的物质收集到玻璃小瓶中。当监测器/信号下降到基线的 ~ 10-15% 时, 停止收集。通过以 0.5mL 的增

加量,加入总体积的 10%的上文制备的 0.5M 磷酸钠,而中和收集的抗体溶液。测定抗体在 280 处的 O.D.,并且计算抗体浓度。立即将收集的抗体溶液置于 4-8°C,并且保存到完成对在上述步骤收集的抗体的分析。如果上述抗体浓度低于 0.3mg/mL,那么进行浓缩。

[0144] 用最少 3 柱体积的 1×PBS 以 2.0-2.5mL/min 流速洗涤柱子。再用 1 柱体积的 1×PBS 加 0.1%叠氮钠洗涤柱子,并且保存在 4-8°C 以备将来应用。

[0145] 图 8 示例性地描述了上述步骤,所述步骤表现了使用直接和富集法从亲和柱 I 和 II 分离富集的抗体。

[0146] ELISA 平板包被过程。

[0147] 建立 Moduline 300 系统。

[0148] Ab 包被必须在包被溶液 M815 制备后最多 8 小时内完成。在包被过程中,抗体包被溶液必须保持在冰上 (0°C)。

[0149] 步骤 1

[0150] 预先称重并且检查空平板,并且丢弃任何坏掉的平板。使用 Moduline300 系统,向每个条形平板的每个孔中分配 100 μ l MTB-LAM 特异性 Ab 包被溶液。在包被过程中,视觉上检验每个平板的所有 96 个孔充分充满的均一性。保存未用的 Ab 溶液,并且保存在 (2-8°C) 直到全套平板都被处理并且投入使用。将分配了 Ab 的平板以每摞 10 个平板叠放在一起,并且用空平板作为盖而覆盖最上面的平板。将每摞盖板标记为 1 到 18。在 2-8°C 冷藏叠放的平板,并且温育过夜 (14-18hrs)。

[0151] 步骤 2

[0152] 建立 Moduline 300 系统,以进行 3 次洗涤循环,其后紧接着进行 312 μ l 封闭溶液的分配循环。封闭溶液必须在制备期后最多 24 小时内应用。

[0153] 从冰箱中取出平板,并且当将它们放置在 Moduline 上时,从每摞上取走覆盖的平板,并且并排放置它们。定时 6 小时。将从传送带上下来所封闭平板摆放到连续编号的托盘上,并且在环境温度 (20-28°C) 下封闭 5-6 小时。

[0154] 将在托盘上的平板置于烘箱中,并且在 20-23°C 和 20-22% 相对湿度下温育 24-72hr。从烘箱取出干燥的平板。

[0155] 制备用于偶联 HRP 的 MTB-Ab

[0156] (制备 MTB-Ab 溶液应该在偶联步骤前至少 7 天进行。)

[0157] 透析:

[0158] 在 2-8°C,针对 1×PBS,透析需要用量的 MTB-LAM-Ab 溶液最少 48h,最少更换 4 次。使用具有 MWCO 12-14,000 的透析管。透析后,以 12,000rpm 离心 Ab 溶液 10min,并且小心地将上清吸到 15ml 刻度离心管中。

[0159] 透析后,测定 Ab 溶液在 280nm 处的光学密度,并且计算透析后的 Ab 浓度。如果透析后 Ab 溶液具有 $OD_{280nm} > 2.8$,那么在 1×PBS 中进行 1 : 7 的 Ab 溶液稀释。

[0160] 浓缩:

[0161] 用 1×PBS 预先洗涤 Amicon Ultrafree-15 离心过滤装置。将大约 15ml 1×PBS 溶液放入装置中,并且以 3500rpm 离心大约 5min。从装置部件中倒掉所有的溶液。通过在长工作台上的离心机 (斗式转子) 上以 3500rpm 离心大约 5min×3,用 Ultrafree-15 离心过滤装置将上述透析后的 Ab 溶液浓缩到 4.5-5.5mg/ml。小心将浓缩的 Ab 溶液从 Amicon 装

置的过滤部件中吸出,放入 15mL 管中。为了最大化的回收,离心后立即取出浓缩的样品,并且用移液器将浓缩体积重新悬浮几次,以确保在吸取 Ab 前正确混合。

[0162] 10000rpm 将浓缩的 Ab 溶液离心大约 15min,并且将 Ab 上层清液吸取到 15mL 管中。在 $1\times\text{PBS}$ 中以 1:20 稀释,测定 Ab 溶液的 OD_{280} ,并且计算 Ab 的浓度。

[0163] 取样 0.1ml Ab 溶液用于 ELISA 分析。保存在 $2-8^{\circ}\text{C}$ 。

[0164] 制备 MTB-LAM-Ab-HRP 缀合物

[0165] 洗涤用于偶联步骤的所有的玻璃小瓶和搅拌棒以及用于用 H_2SO_4 溶液保存缀合物的玻璃小瓶,并且用自来水和去离子水彻底润洗它们。

[0166] 制备用于层析的葡聚糖 G-25 柱:

[0167] 获得装有葡聚糖 G-25 (Fine) 的大约 $V = 50\text{ml}$ 的柱子 ($1.5\times 30\text{cm}$)。按上文所述进行装柱。设定下述层析条件,以用 1mM 钠盐平衡柱子

[0168] ●醋酸缓冲液, pH4.4

[0169] ●280nm UV 监测波长

[0170] ●监测器灵敏度:0.20D

[0171] ●图表记录器速度:2mm/min

[0172] ●用于柱洗涤的泵流速:60ml/h。

[0173] 用大约 100-150ml 1mM 醋酸钠 pH4.4 洗涤柱子,并且将 UV 监测器的基线调整到 0 位置。确保建立的基线稳定大约 30min。计算偶联所需的 MTB-LAM-Ab 溶液的用量,并且以 12,000rpm 离心 Ab 大约 10min。小心将 Ab 上清吸到干净的玻璃小瓶中。在 $1\times\text{PBS}$ 中以 1:20 稀释,测定 Ab 溶液的 $\text{OD}_{280\text{nm}}$,并且计算未稀释的 Ab 溶液的浓度。将 Ab 溶液在使用前保存在 $2-8^{\circ}\text{C}$ 。

[0174] 用 NaIO_4 氧化 HRP (辣根过氧化物酶)

[0175] 在 V 型玻璃小瓶中称重 8mg HRP。加入 2.0ml 去离子 H_2O 。轻轻搅动所述溶液大约 2-3min,直到所有的 HRP 都溶解。确保在玻璃小瓶壁上没有留下未溶解的 HRP 颗粒。

[0176] 制备 0.1M NaIO_4 , pH 4.4 的新鲜溶液,并且在最多 5 分钟内使用,避光保存。一边搅拌,一边向上述制备的 HRP 溶液中加入 0.4ml 0.1M NaIO_4 。用铝箔覆盖小瓶,以便避光保存所述混合物。在环境温度下一边搅拌一边将所述混合物温育 20min。向反应混合物中加入 4 滴乙二醇,并且搅拌大约 2min。

[0177] 氧化 HRP 的层析和浓缩:

[0178] 完成上述步骤后,立即通过在葡聚糖 G-25 (Fine) 柱上的凝胶过滤而纯化氧化的 HRP。将用于样品洗脱的泵流速设定为大约 50ml/h。小心将上述制备的全部体积的氧化 HRP 上样到干凝胶床上,但是小心不要搅动所述凝胶床。不要超过干凝胶。将所有氧化的 HRP (带颜色的溶液) 收集到 15ml 管中。在层析图表上的第一个峰 ($\text{OD}_{280\text{nm}} > 0.05$)。在层析完成后,倒空葡聚糖 G-25 柱,并且弃掉凝胶,并且记录层析后的 HRP 溶液体积。

[0179] 浓缩氧化的 HRP

[0180] 用 1mM 醋酸钠 pH 4.4 预先洗涤 Ultrafree-15 离心过滤装置,使用大约 15mL 的 1mM 醋酸钠 pH 4.4,并且使用长工作台上的离心机 (斗式转子) 以 3500rpm 将过滤部件离心大约 5min。然后从过滤部件弃掉所有的溶液。层析后,立即用 Ultrafree-15 离心过滤部件 (生物最大 -10K 膜),通过以 3500rpm 离心大约 5min,而将氧化的 HRP 溶液 (上文) 浓

缩到约 2 ± 0.2 ml。小心将浓缩的 HRP 溶液从装置的过滤部件吸到干净的玻璃小瓶中,测定并记录体积,并且保存在 $2-8^{\circ}\text{C}$ 。

[0181] 偶联 HRP 与 MTB-LAM-Ab:

[0182] 计算与 HRP 偶联所需的 MTB-LAM-Ab 溶液的用量。使用三角形的搅拌棒将 MTB-LAM-Ab (上文) 置于 V 型玻璃小瓶中,不要在瓶壁上留下 Ab 溶液的液滴。向所述 MTB-LAM-Ab 溶液中加入 $1/2$ 体积的氧化 HRP 溶液 (上文),用铝箔覆盖小瓶,以便避光保存反应混合物,并且在室温下将玻璃瓶中的反应混合物搅拌 30 分钟。避免起泡。

[0183] 加入 1M 碳酸盐-HCl,至 pH 9.5,并且在室温下搅拌 2hr。避光保存,并且避免起泡。

[0184] 在使用前立即制备 4mg/ml 的硼氢化钠 (NaBH_4),并且用铝箔避光保存。立即加入对于上文制备的 MTB-LAM-Ab 溶液所需要的计算用量的 NaBH_4 ,并且将反应混合物在约 $2-8^{\circ}\text{C}$ 温育 2hr。在 $2-8^{\circ}\text{C}$,将反应混合物针对 $1 \times \text{PBS}$ 透析 48h,以 8-16 小时的时间间隔最少更换 4 次缓冲液。使用 12-14kDa 截留的透析管透析。

[0185] 缀合物保存和分析:

[0186] 透析后,将缀合物溶液以 4000rpm 离心大约 4min。小心倒出上层清液并且将缀合物溶液置于干净的 6ml 玻璃小瓶中。量取 18ml Gardian 过氧化物酶缀合物稳定剂 / 稀释物到具有磁力搅拌的 50ml 玻璃瓶中。加入 2ml MTB-LAM-Ab-HRP 缀合物,并且将所述混合物搅拌大约 10min。在 $2-8^{\circ}\text{C}$ 保存,并且避光。

[0187] 图 9 示例性地描述了关于制备 MTB 缀合物的上述步骤。

[0188] 结果

[0189] 下面我们列出直接抗原 ELISA 评估的数据,对于富集抗体生产,其使用“直接法”检测未处理的、未浓缩的尿液中的 LAM。(相信通过使用上述“富集法”产生的富集抗体将形成甚至更好的数据。)通过 Regional TB 和 Leprosy Programme 和 Mbeya Medical Research Project (MMRP) 的合作,产生这些数据的研究在 Mbeya 地区进行,所述 Mbeya 地区位于坦桑尼亚的西南丘陵地带。在 Mbeya 地区,每年大约有 3,500 例新的 TB 病例被诊断出来,并且按照国家 DOTS 方法进行治疗。每次治疗的开始在 Mbeya Referral Hospital 的中心机构开始。2002 年, TB 治愈率为 72.3%。研究的目的是评估商业可获得的 LAM- 捕获 ELISA 在临床应用中的性能,并且将所述结果与用于 TB 诊断的黄金标准相比较:痰液显微镜检、TB 培养、胸腔射线照相法和临床研究。

[0190] 材料和方法

[0191] LAM-ELISA 描述

[0192] MTB-ELISA 直接抗原三明治免疫检测 (MTB-ELISA, Chemogen, So. Portland, ME, USA) 是一种与他人研发的检测相似的 LAM-ELISA。免疫血清从新西兰白兔收集,所述新西兰白兔用灭活的结核分枝杆菌 H37Rv 的全细胞进行免疫。通过使用固定的 LAM 作为配体的亲和层析而分离多克隆 LAM- 特异性抗体。检测试剂盒由下列各项组成:96 孔 ELISA 平板,其用 LAM- 特异性抗体预先包被,封闭并且密封在具有干燥剂的塑料袋中;具有 LAM- 特异性 HRP- 缀合的 LAM- 特异性多克隆抗体的小瓶;具有 TMB (3,3',5,5'-四甲基联苯胺) 单一成分发色底物的小瓶;具有阴性对照溶液的小瓶,和具有对应尿样中的 0.5ng/ml 、 1.5ng/ml 和 4.5ng/ml LAM 的校准器的 3 个小瓶。当在 450nm 获得的光学密度高于阴性对照的至少

0.1 ($> 2SD$) 时,认为尿样在 ELISA 中是阳性的。

[0193] 将 0.1ml 的患者尿样一式两份置于 ELISA 平板上,温育 1 小时,并且用 0.05% 吐温-20/PBS(PBST) 溶液洗涤。加入 0.1ml LAM-特异性 HRP-缀合物。温育 1 小时后,将平板用 PBST 溶液洗涤,并且加入 0.1ml TMB 底物。10 分钟的温育时间后,通过加入 0.1ml 1M H_2SO_4 而使底物反应终止,并且在 450nm 读取颜色发生。

[0194] 在其它实施方案中,确定含有抗原性活性的脂阿拉伯甘露聚糖 (LAM) 具体异构体被用于产生高度特异性的、高度纯的多克隆抗体,以便应用与上文所述相似的流程,用于检测要筛选活性结核菌的患者尿液中的分枝杆菌脂阿拉伯甘露聚糖。使用 LAM 的选择性氧化,而鉴定 LAM 的抗原性活性异构体,其中两种异构体容易确认并且是可区别的(数据未显示)。一种异构体含有对高浓度的高碘酸钠 ($NaIO_4$) 敏感的部分,以致在高浓度的高碘酸钠下,LAM 的血清活性被破坏。另一种异构体保留血清活性,甚至在经受高浓度的高碘酸钠时仍保留血清活性。两种 LAM 氧化方法的比较,使用轻微的氧化剂或低浓度的 $NaIO_4$ 保持了 LAM 的抗原性活性。然而,用高浓度的 $NaIO_4$ 氧化,导致 LAM 失去了抗原性活性。

[0195] 因此,只有用 CNBr 活化、或者用轻微氧化剂或低浓度的 $NaIO_4$ 氧化的 LAM 被用来产生高度抗原型的 LAM,以用于制备高度特异性的、高度纯的多克隆抗体,从而用于检测尿样中的 LAM 而诊断目的患者中的 TB。

[0196] 与 Svenson 等公开的检测方法(参见,例如 W097/34149) 相比,这些结果完全是出乎意料的,Svenson 等公开的检测方法只使用高浓度的 $NaIO_4$ 氧化分枝杆菌 LAM,因而破坏了用来产生抗体的 LAM 的抗原性活性。由于不知道存在多于一种异构形式的 LAM 可被检测,在先前的公开内容中不可能制备针对抗原性活性形式的 LAM 的高度特异性的抗体,因为在这些研究之前,甚至没有人知道存在一种独立的异构体,所述异构体含有抗原性活性,或者在标准氧化方法中,即,用高浓度的 $NaIO_4$ 处理过程中,失去这样的活性。

[0197] 临床地点描述。

[0198] 在 8 周内,在坦桑尼亚 Mbeya 的 5 个临床中心的门诊部召集到 242 名 TB 怀疑患者。研究的标准流程包括临床评估、胸腔射线照相、ESR、白血细胞 $\times$ 计数和 HIV 检测、在第 1、2 和 3 天的痰液 $3 \times AFB$ 染色 (Ziehl-Neelson)、在 Loewenstein-Jenssen 培养基上的 2 痰液培养和在尿液和血清中的 LAM-ELISA。

[0199] 所有的患者都有 TB 的临床症状(咳嗽 > 4 周,盗汗、体重减轻、没有食欲)。这些患者中的 137 名患有实验室确定的肺部 TB (PTB), 9 名患有高度放射性学上疑似的 PTB (胸膜渗出或扩大的肺门淋巴结),以及 8 名表现出军事 TB (military TB) 的临床和放射线学症状。对同意的患者检测他们的 HIV 状态,70% 被确定为 HIV- 阳性。将数据机密地进行处理。本研究得到坦桑尼亚共和国的当地制度评议委员会和国家伦理委员会的核准。

[0200] 所有的实验流程都在 Mbeya Medical Research Project 的实验室机构进行。

[0201] 痰液样品的显微镜检和培养

[0202] Ziehl-Neelson 染色和显微镜检由有经验的和非常有资格的实验室技术人员进行。净化后,将痰液样品在 Loewenstein-Jenssen 培养基中一式两份培养。每周检查培养物的生长,持续 8 周。

[0203] 尿样

[0204] 对于每名患者,在无菌塑料容器中收集 30ml 尿液,将其用各自患者的数据形式的

编码数字进行标记。将 100 μ l 新鲜的和未处理的尿液一式两份地添加到 ELISA 平板的孔中。还将阴性对照、低的、中等的和高的阳性对照一式两份地添加到每个平板中。将样品在 24h 内处理,并且然后保存在 -20°C ,以备将来在德国检测。

[0205] 来自坦桑尼亚和美国的对照组

[0206] 在 LAM-ELISA 中检测下列尿样: Mbeya Referral Hospital 23 名职员尿样, Chemogen, Inc. 20 名职员尿样, 和纽约 2 个门诊部的 200 名患者的尿样。所有这些尿样都在临床检验中表现为健康的,没有任何呼吸传染病的症状。

[0207] 结果

[0208] ELISA 系统的预先临床评估。

[0209] 图 4A 显示在尿液中使用不同浓度的 LAM 的应答曲线,其中实心圆代表应用结核分枝杆菌的 LAM 的 ELISA 结果,和空心圆代表对照 ELISA 结果。按照这一曲线,将最佳截断值定义为产生超过阴性对照的 OD 0.10D 的光学密度 (OD) 的 LAM 浓度,其与大于阴性对照样品信号的多于 2 的标准偏差相对应。将具有大于这一截断值的光学密度的所有样品都视为 ELISA 阳性的。在未处理的新鲜尿液中,所述截断值等于大约 0.25ng/ml 的 LAM。

[0210] 评估 MTB-ELISA 与其它种属的各种革兰氏-阳性和革兰氏-阴性细菌的交叉反应性,所述细菌种属是尿道感染和细菌性肺炎的典型。即使在最高的检测浓度,所检测的物种没有一种在评估的 LAM-ELISA 系统中表现出任何反应性,这可以通过比较图 4B 中描述的结核分枝杆菌的 ELISA 结果(空心三角形)与检测的其它细菌物种的 ELISA 结果(实心三角形、空心和实心菱形、空心和实心圆)而看出来。然而,在 LAM-ELISA 系统中,各种物种的分枝杆菌的全细胞分析表现出与所有检测的分枝杆菌(M.)物种的交叉反应性(图 4C),检测出结核分枝杆菌 H37Rv 和牛分枝杆菌是最敏感的。从免疫化学观点看来,这两种物种是非常接近的,但是牛分枝杆菌极少在人类中引起分枝杆菌的感染。

[0211] 研究参与者数据

[0212] 按照表 1,将 242 名 TB 疑似患者分成 3 大类:(1) 具有确定的显微镜检和/或培养物诊断的肺部 TB 患者,(2) 具有典型的临床和放射线学症状的患者和(3) 具有 TB 临床症状的患者,由于所有可用的诊断工具(放射线照相、痰液显微镜检和培养)都是阴性的,它们不被认为是 TB 患者。

[0213] 组 1 包括 137 名患有实验室确定的肺部 TB 的患者。132 名通过 Loewenstein-Jenssen 培养而确定,和 5 名具有阴性培养物但是阳性的 AFB-染色。132 份培养物阳性病例中有 62.12% 为 AFB 阳性。

[0214] 组 2 包括参与基于放射线学和临床发现的 DOTS 治疗项目的其他 17 名患者(表 1)。组 3 的 88 名患者是痰液阴性的,并且没有表现出特异的肺部 TB 放射线学症状,因此没有参加 DOTS 项目。

[0215] 参与者的平均年龄为 34 岁。女性和男性比例为 41 : 59。在同意进行 HIV 检测的 223 名患者中的总体 HIV 流行率是 69.1% (参见表 2)。HIV 流行率在患有证实的 TB 的患者中为 73.2%,在没有证实的 TB 的患者中为 60.8%。

[0216] ELISA 的临床评估

[0217] 在患有证实的肺部 TB(培养物或 AFB 阳性)的 137 名患者中,有 111 名对于预先确定的截断值(阴性对照的光学密度 (OD)+0.1) 是 LAM-ELISA 阳性的(灵敏度 81.02%)。对

于涂片和培养物阳性组 (82) 的平均 OD 增加量 (=绝对平均 OD- 阴性对照的 OD) 是 0.604。对于涂片阴性和培养物阳性病例 (50), 平均 OD 增加量是 0.293, 并且对于涂片阳性而培养物阴性病例 (5) 为 0.249。

[0218] 在组 2 的 17 名患者中, 其培养物和 AFB 为阴性, 但是具有典型的放射线学和临床 TB 症状, 13 名 (76.47%) 具有阳性 LAM-ELISA 检测结果, 具有 0.183 的平均 OD 增加量。他们中的 13 名 (76.47%) 是 HIV 阳性的。

[0219] 其余 88 名患者, 他们来到特殊的 TB 门诊部, 具有暗示肺部 TB 的临床症状, 培养物和 AFB 是阴性的, 并且没有 TB 的特异性放射线学发现。在这些患者中, 13 名患者 (14.77%) 具有阳性 LAM-ELISA 检测 (平均 OD 增加量 0.184)。

[0220] 基于在每个平板上所包含的低的、中等的和高阳性对照的已知浓度, 可以基于 ELISA 的 OD 值而确定每份尿液中的大概 LAM 浓度。在 AFB 阳性患者中, 评估 LAM 浓度是否与个体的结核细菌负担相关。尽管在显微镜检下具有低密度结核细菌 (AFB+) 的患者在尿液中具有 0.93ng/ml 的平均 LAM 抗原浓度, 但是具有中等密度的抗酸杆菌 (AFB++) 的患者在他们的尿液中具有 1.74ng/ml 的平均抗原浓度, 并且 AFB+++ 患者具有 2.02ng/ml 的平均抗原浓度 (图 5)。由于坦桑尼亚实验室所用的 ELISA 读数仪不能读出高于 2 的信号, 高于 2 的信号对应大约 4ng/ml, 所以, 后者值低于 AFB+++ 患者尿液中真正的 LAM 浓度。

[0221] 在确定的肺部 TB 患者中, HIV 血清状态没有影响 LAM-ELISA 的灵敏性。与 35 名未感染的个体中有 26 名 (74.3%) 相比, 在 124 名具有已知的 HIV 血清状态和阳性 TB 培养和 / 或 AFB 染色的患者中, 89 名感染 HIV 的患者中有 73 名 (82.0%) 在 LAM-ELISA 中是阳性的。类似地, AFB 的灵敏性没有受到 HIV 血清状态的破坏 (comprised)。在感染 HIV 的和阴性个体中, 灵敏度分别为 61.2% 和 58.8%。

[0222] 使用健康的坦桑尼亚人和美国志愿者的尿液, 来评估所述检测的特异性。分析了 23 名健康的坦桑尼亚血统的医院职工的尿液。在 LAM-ELISA 中, 没有一份样品被检测出是阳性的 (-0.047 平均相对 OD, 特异性 100%)。收集并分析了 220 名健康的美国志愿者的尿样。除了 4 份外其余的都具有低于截断值 0.1 的光学密度 (特异性 98.18%)。

[0223] 讨论

[0224] 用于 TB 诊断的经典工具, 痰液培养和涂片显微镜检具有明显的局限性。这两种方法只检测开发性肺部 TB 的病例。这显著地削弱了不管器官显示与否而检测所有的活性 TB 病例的可能性。因此, 在过去已经评估了多种新方法, 所述新方法可能补充所述经典的工具, 特别是在资源匮乏的设置方面。对于这样的新检测所设定的标准为 a) 比显微镜检更高的灵敏性, b) 相当的特异性, c) 有限的额外工作量, d) 诊断痰液 - 阴性 TB 的可能性和 e) 不会被 HIV 共感染削弱的灵敏性。

[0225] 在这种第一评估中, LAM-ELISA 的灵敏性 (81% 的培养物阳性) 优于 AFB- 染色 (69%)。灵敏性可以通过将新鲜尿液浓缩而进一步的提高, 然而, 其将导致实验室技术人员额外的努力。尽管病例数字不是足够地高, 不足以允许做出最终的结论, 但是, 对于具有放射线学确定的军事 TB 的病例 (87.5%) 以及对于具有典型的肺部 TB 放射线学症状的痰液阴性病例 (61%) 的 LAM-ELISA 检测率是令人鼓舞的。对于健康的个体, ELISA 的特异性较高 (在美国为 98.18% 和在坦桑尼亚为 100%)。阳性 TB 病例培养物中的 HIV 共感染没有影响 LAM-ELISA 的灵敏性。

[0226] 与先前公布的 LAM-ELISA 结果相比,新的检测在比先前的检测更低的浓度 (0.2ng/ml) 检测到 LAM。与使用处理的和冷冻的尿液的先前检测 81.3% 的灵敏度相比,对于未浓缩的和新鲜尿液,新检测的灵敏度为 82.9% (AFB+)。与先前研究中的 86.9% 相比,在本研究中检测的特异性为 98.36%。

[0227] 这种交叉组合的 TB 研究的局限性是这样的事实,即,一定比例的 TB 疑似患者在他们的 TB 状态方面尚不能确定 (组 2 和 3)。为了确认这一问题,我们建立了用于分析的 3 大类:组 1:实验室确定的 TB,组 2:临床上和放射线学上诊断的 TB,组 3:没有 TB 的实验室或放射线学证据。尽管我们确信第 1 类的参与者是真正的 TB 病例,但是我们不能排除第 2 和第 3 类含有一些错误归类的患者。因此,我们将他们从我们的灵敏性和特异性计算中排除。TB 的诊断通常需要对患者的一段时间的随访。特别地,具有异常放射线学特征的痰液阴性患者将需要几次随访会诊,以重新检查他们的 TB 状态。在一段时间的研究中,临床的以及诊断重估和 TB 治疗结果将对把组 2 和 3 分类为 TB 和非 TB 患者给出重要的其它信息。

[0228] 在结核分枝杆菌的细菌负担和在尿液中检测到的 LAM 的量之间是否存在数量上的相关性,这一问题主要的兴趣所在。在交叉组合研究形式中阐述这一问题的唯一方法是使得 AFB 痰液染色得分与尿液中 LAM 的浓度相关。如在图 5 中所示,尿液中抗原浓度和痰液中结核细菌密度存在明显的正相关性。这样的相关性揭示了 LAM 检测的一些其它应用。治疗成功的监测和完成治疗后对复发的早期识别是直接应用相关的。灵敏的尿液检测与检测肺外和 AFB- 阴性 TB 的能力的组合使得 LAM 检测成为在具有增加流行率的肺外形式的 TB 和具有异常临床症状的肺部形式的环境中的潜在的工具。

[0229] LAM-ELISA 不仅可以用于具有临床症状的患者的诊断,而且用于筛选 HIV 阳性患者和其它高危组。活性 TB 的早期病例检测和有效治疗是成功抗争 TB 中的两大支柱。为了进一步研究 LAM 检测在这一抗争中的作用,我们目前计划一些有希望的和多通道的研究。

[0230] 总而言之,LAM-ELISA 可以容易地被结合在发达和发展中国家的实验室常规诊断流程中。它可以容易地应用并且强有力地检测。完成 ELISA 只需要 21/2hr,并且许多样品可以同时进行分析。由于抗原脂阿拉伯甘露聚糖是稳定的,所以可以将尿液冷冻保藏 3 天而没有显著降低光学密度。最近开发的用于检测未处理尿液中的 LAM 的 MTB-ELISA 具有还可以在发展中国家野外条件下应用的筛选检测的潜力。

[0231]

研究组	TB 诊断	参与者	LAM+	LAM—
1:	LJ+和/或 AFB	137	111 (81.02%)	26
实验室确诊的 TB				
	LJ+和 AFB+	82	68 (82.9%)	14 (17.1%)
	只有 LJ+	50	38 (76%)	12 (24%)
	只有 AFB+	5	5 (100%)	0 (0%)
2:	军事 TB	8	7	1
临床上和放射线学诊断的 TB			(87.5%)	(12.5%)
	胸膜渗出或扩大的肺门淋巴	9	6	3
			(67%)	(33%)
3:				
没有 TB 的实验室或放射线学证据	只有 TB 临床症状	88	13	75
	没有参与		(14.77%)	(85.23%)
	DOTS			
4:	没有 TB 临床症状	243	4	239
阴性对照组			(1.64%)	(98.36%)

[0233] 表 1。在来到 OPD 具有 TB 临床怀疑的 242 名患者中和 243 名临床上健康对照者中的尿液 LAM 分泌的分析。对于 LAM-ELISA 阳性 (positively) 的截断值比平板上阴性对照的平均光学密度高出 0.1。+ = 阳性。

[0234]

	HIV+
所有 TB 疑似	69.1%
培养物+(119)	71. %
AFB+(77)	72.7%
EXPTB(17)	76.47%

[0235] 表 2。在不同组中 HIV 患者的比例。242 名患者中有 223 名同意进行 HIV 检测。

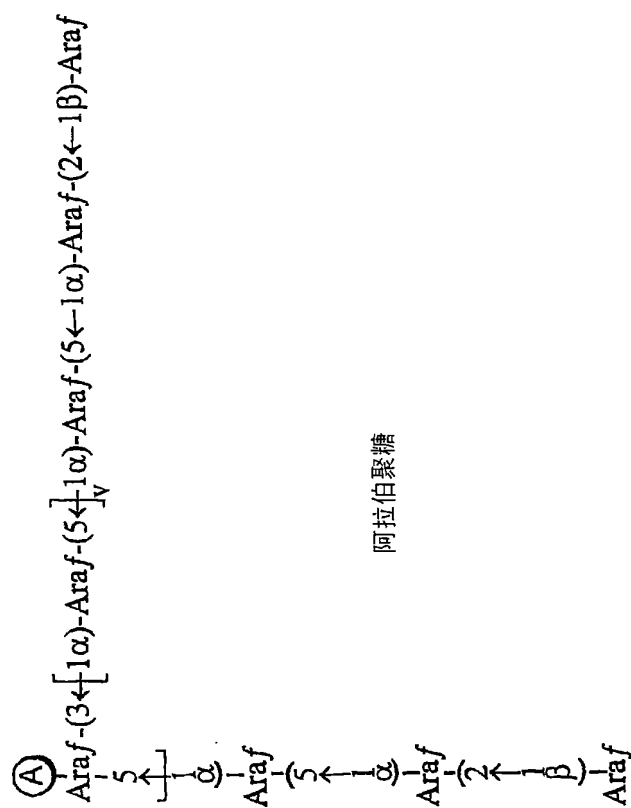


图 1B

分枝杆菌 ManLAM、PiLAM 和 AraLAM 的结构模型。MTP 对应 5-甲基硫代戊糖, 到目前为止 (*) 其在结核分枝杆菌菌株 H37R_x、H37Ra、CSU20 [63] 和 MT K3 [64] 中描述。5' 对应位于牛分枝杆菌 BCG ManLAM 的阿拉伯聚糖结构域的琥珀酰残基 [65]。取決于牛分枝杆菌 BCG 菌株的 1-4 个琥珀酰基, 表现出在位置 0-2 酯化 3,5- α -Araf 单位 [65]。MPL, 甘露糖基-磷脂酰-肌醇; Manp, 吡喃甘露糖, Araf, 阿拉伯吡喃糖; Ins, 肌醇; Rn, 脂肪酰基。ManLAM 含有大约 60 个 Araf 和 50 个 Manp 单元。Manp 单元分布在甘露糖帽 (表 2) 和甘露聚糖核 (30-35) 之间 [66]。

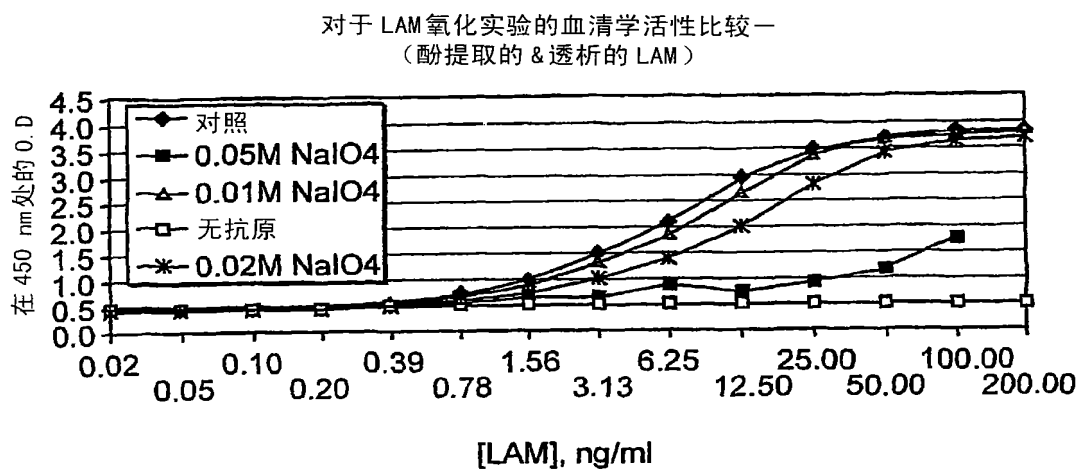


图 2

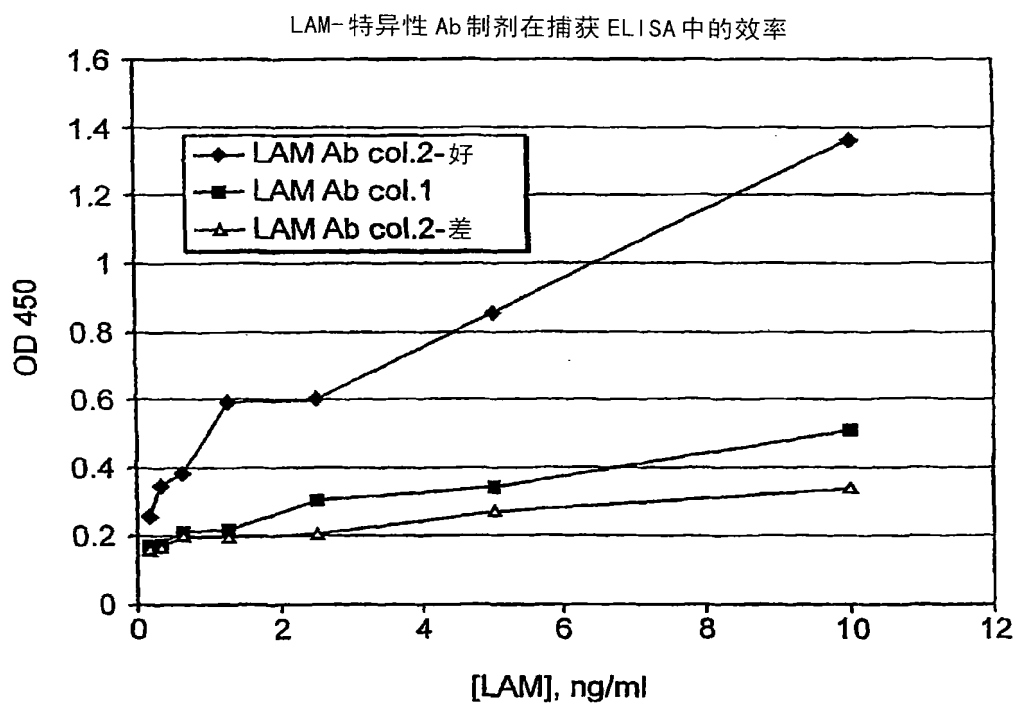


图 3

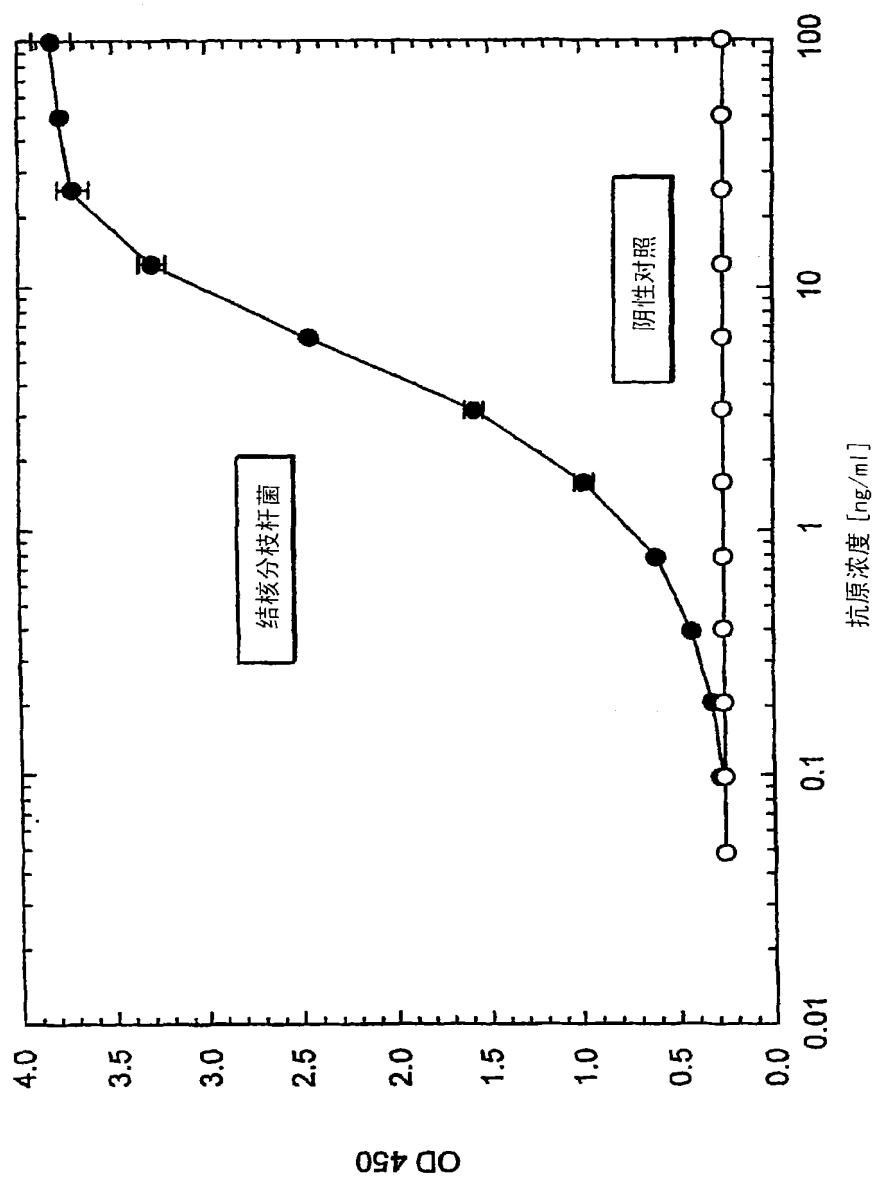


图 4A

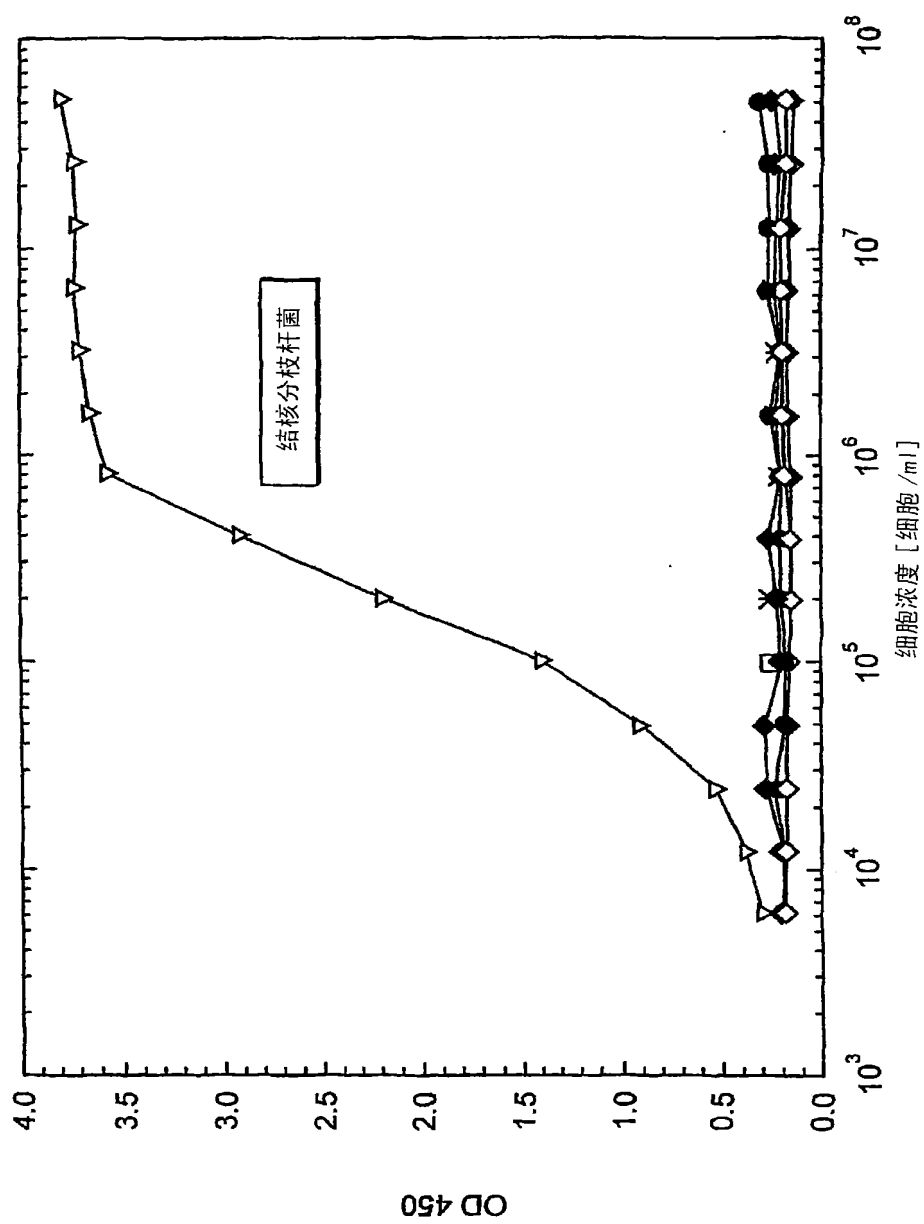


图 4B

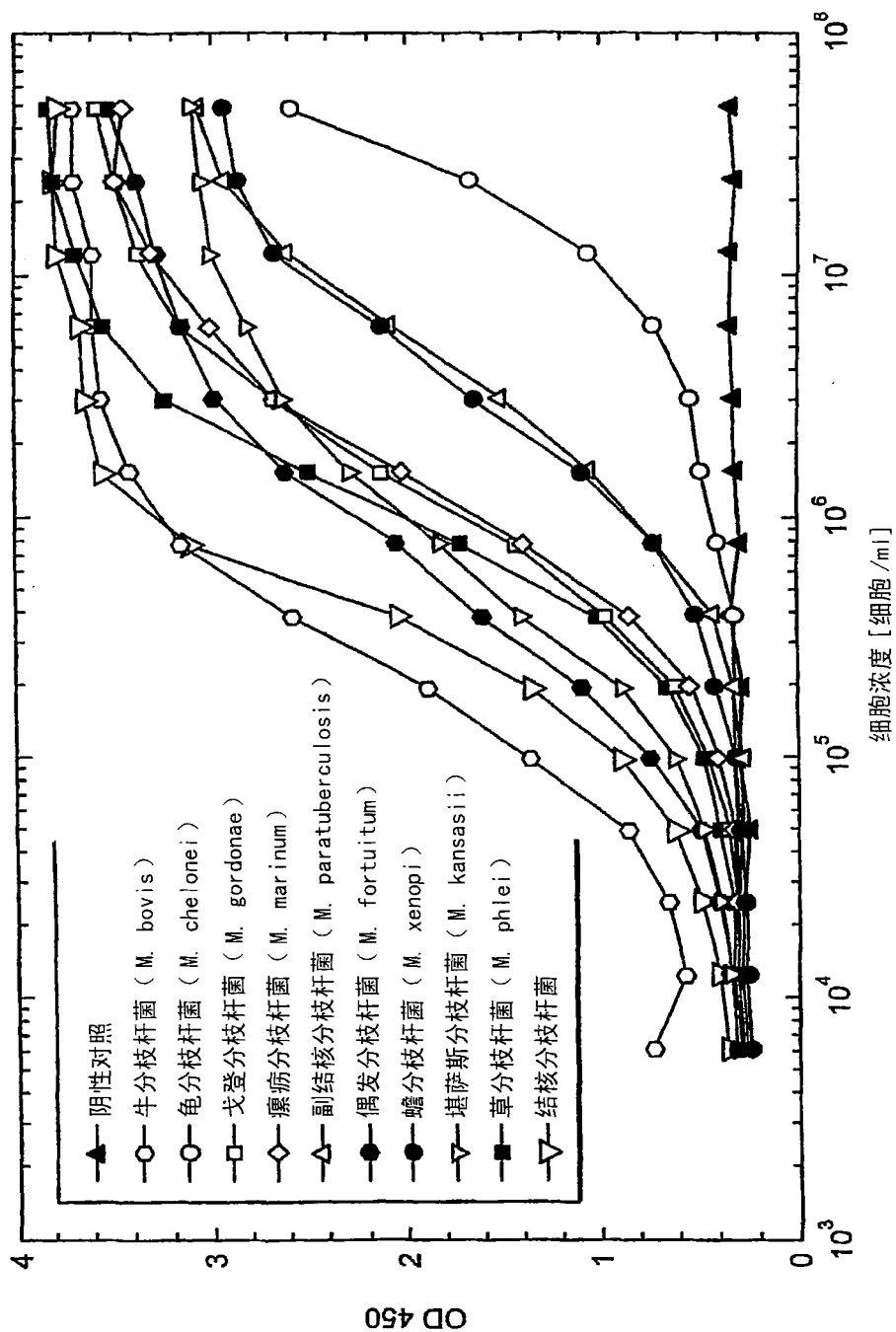


图 4C

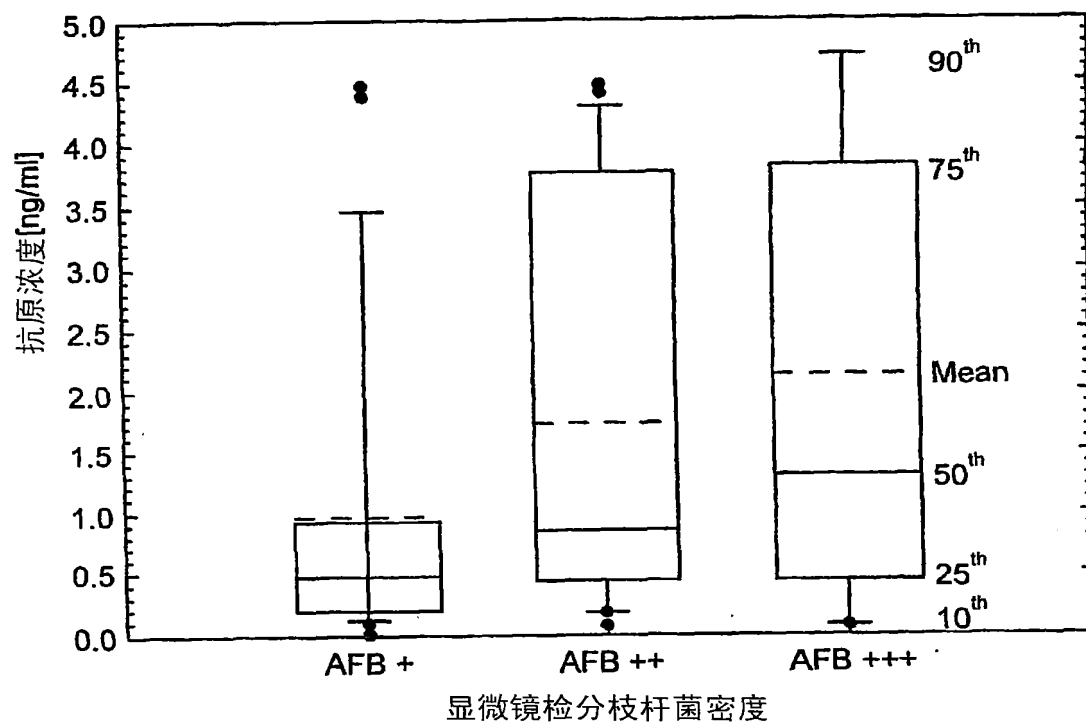


图 5

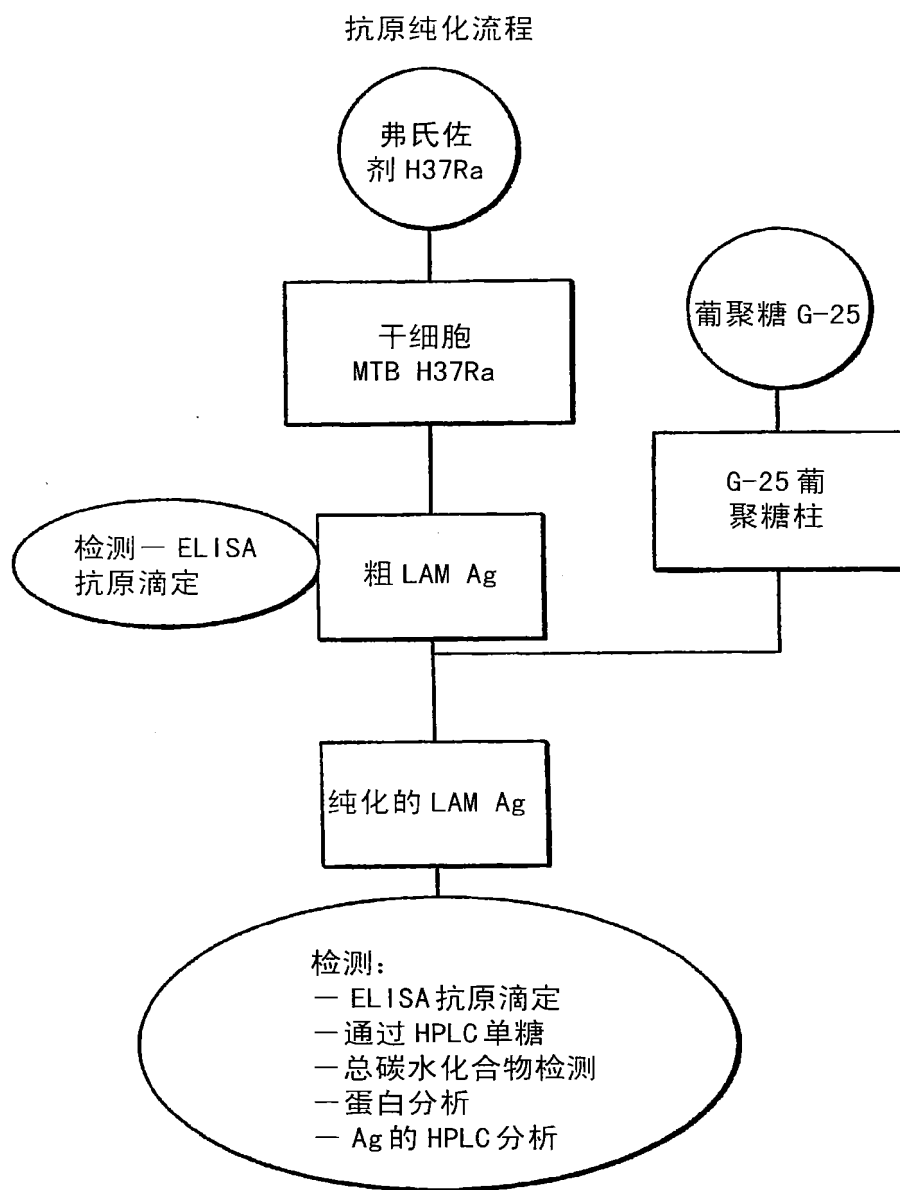


图 6

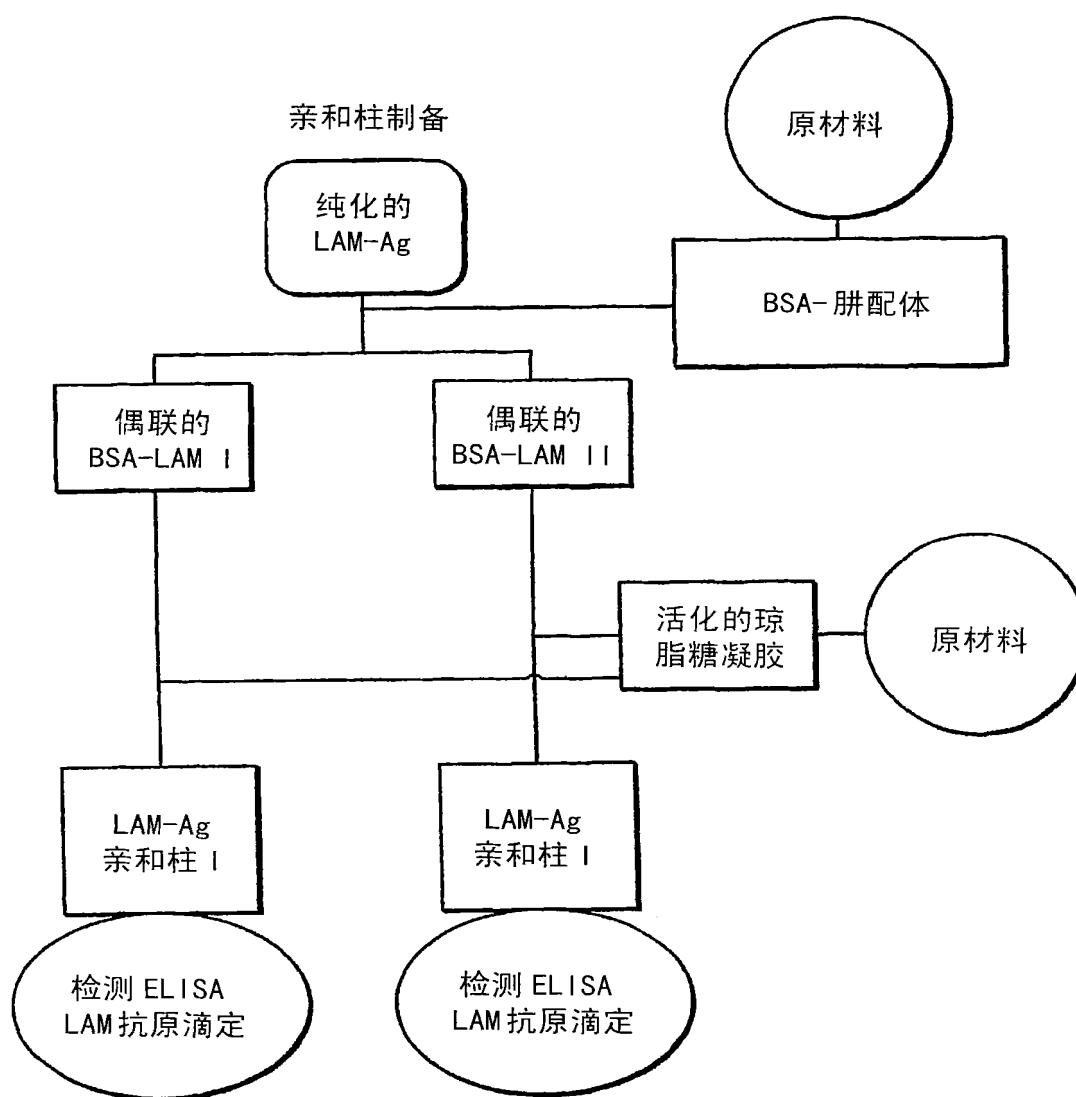


图 7

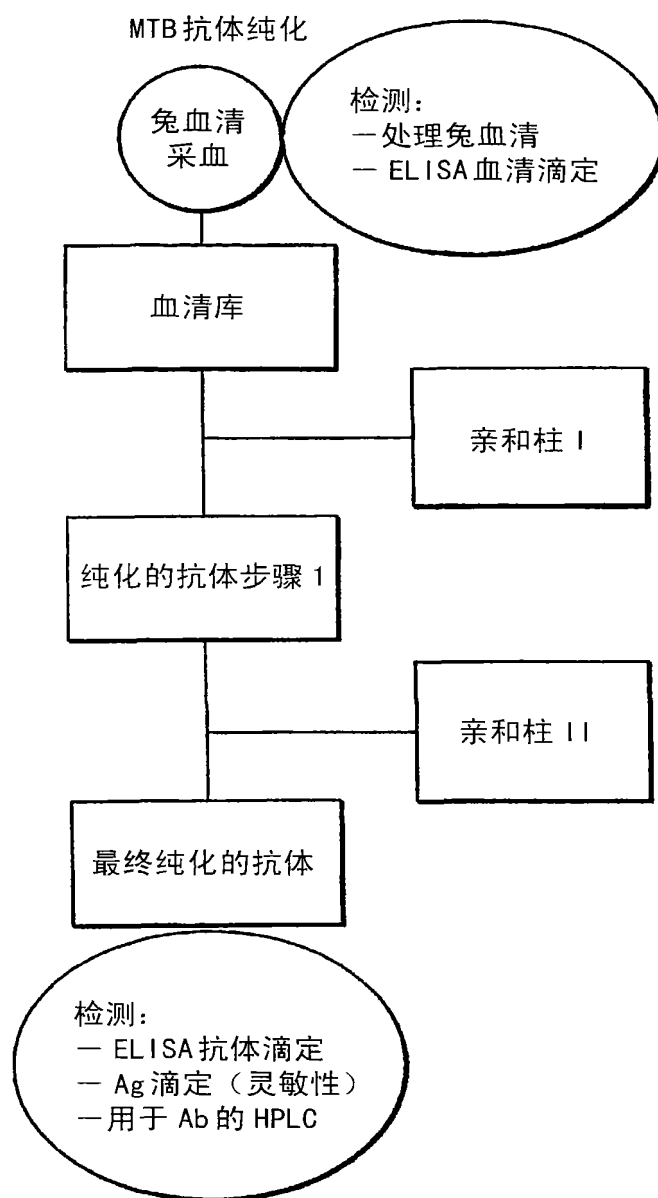


图 8

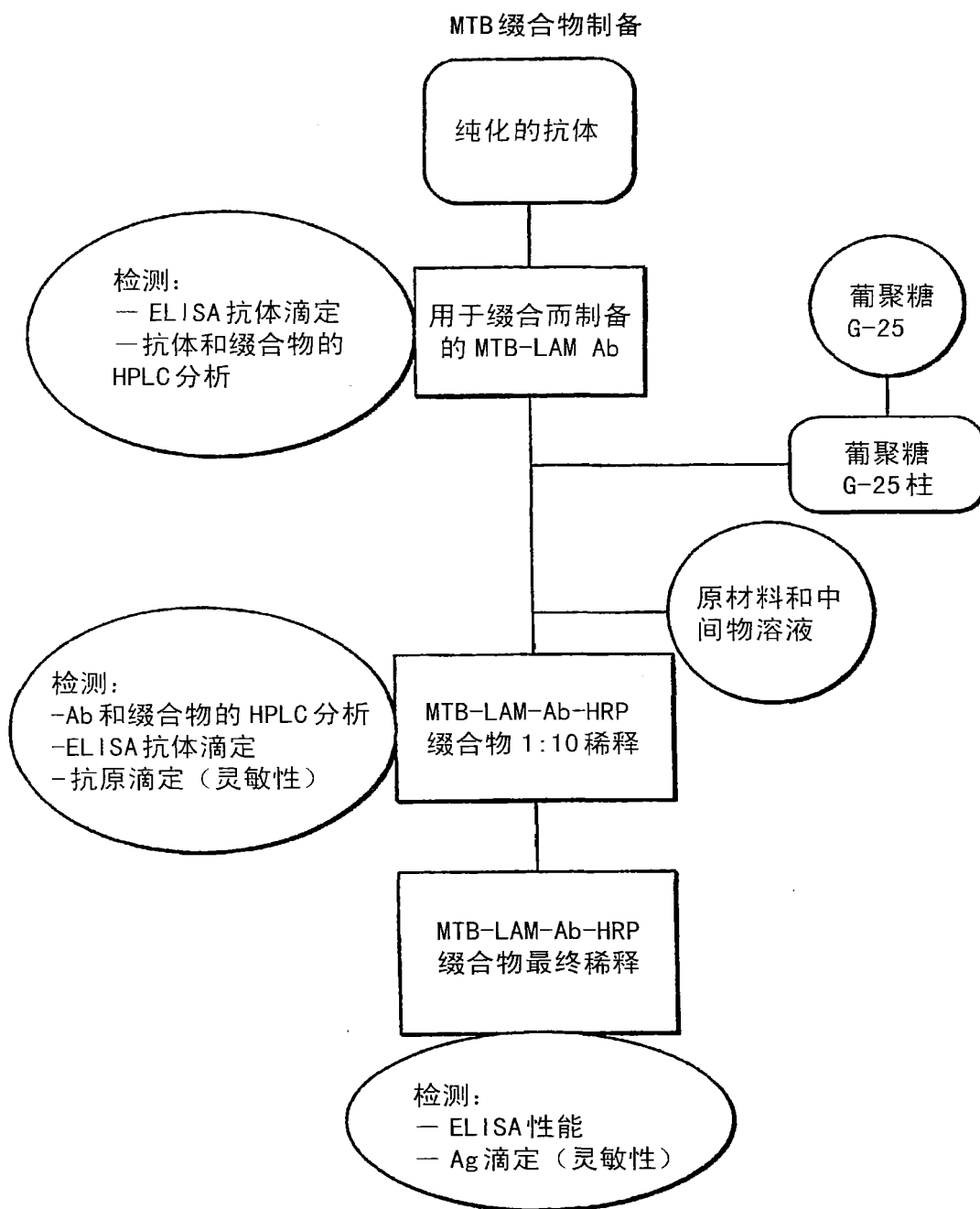


图 9