[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/569 (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)
G01N 33/558 (2006.01)

[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810129481.0

[43] 公开日 2009 年 2 月 4 日

[11] 公开号 CN 101358971A

[22] 申请日 2003.3.27
[21] 申请号 200810129481.0
分案原申请号 03812303.7
[30] 优先权
[32] 2002. 3.30 [33] US [31] 10/112410
[71] 申请人 埃克森诺托普诊断公司
地址 美国德克萨斯州
[72] 发明人 J·P·阿尔德雷特
P·C·卡斯特拉
[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 程 淼 刘 玥
权利要求书 2 页 说明书 29 页 附图 2 页

[54] 发明名称

检测人类受试者中的毛滴虫感染的试剂盒

[57] 摘要

披露了一种检测受试者阴道毛滴虫感染的方法和试剂盒。 在该方法中，从受试者中获得体液样本，比如阴道拭子样品或尿液，使之与特异性针对毛滴虫粘附素多肽的抗体接触，如果受试者受到毛滴虫感染，则形成抗体粘附素多肽复合体。 复合体存在或不存分别证实了受试者毛滴虫感染的存在、缺乏存在或缺乏，如果是阴道拭子样品，可靠性至少为 80%，如果是尿液样品，可靠性至少是 40%。优选的测试试剂盒使用了干燥条、夹心测定法、模式。

1、一种用于检测人类受试者的尿液样品中的毛滴虫感染的试剂盒，其包含:

(a)特异性抗毛滴虫粘附素蛋白表位的抗体；和

(b)用于检测包含(a)的抗体的抗原/抗体复合体的形成的抗体。

2、权利要求 1 的试剂盒，其中(a)的抗体对选自由下列成员构成的组的粘附素蛋白的表位具有特异性：AP65 粘附素蛋白，AP51 粘附素蛋白，AP33 粘附素蛋白,AP23 粘附素蛋白及其免疫反应片段。

3、权利要求 1 的试剂盒，其中(a)的抗体是抗 AP65 抗体。

4、权利要求 1 的试剂盒，其中所述毛滴虫粘附素蛋白是 AP65 粘附素蛋白。

5、权利要求 1 的试剂盒，其中:

(a)该尿液样品与特异性抗毛滴虫粘附素蛋白表位的标记抗体相接触，其条件是如果该受试者感染了毛滴虫的话，抗原/抗体复合体将由此形成；和

(b)通过将(a)中形成的复合体与捕捉抗体相接触来检测所述抗原/抗体复合体的存在。

6、权利要求 1 的试剂盒，其中:

(a)该尿液样品与特异性抗毛滴虫粘附素蛋白表位的捕捉抗体相接触，其条件是如果该受试者感染了毛滴虫的话，抗原/抗体复合体将由此形成；和

(b)通过将(a)中形成的复合体与标记抗体相接触来检测所述抗原/抗体复合体的存在。

7、权利要求 5 或 6 的试剂盒，其中所述标记抗体和捕捉抗体选自由 DM116 和 C55 构成的组。

8、权利要求 1 的试剂盒，其中(a)中的抗体是多克隆抗体，(b)中的抗体是单克隆抗体。

9、权利要求 1 的试剂盒，其中(a)中的抗体是单克隆抗体，(b)中的抗体是多克隆抗体。

10、权利要求 1 的试剂盒，其中(a)中的抗体是多克隆抗体，(b)中的抗体是多克隆抗体。

11、权利要求 1 的试剂盒，其中(a)中的抗体是单克隆抗体，(b)

中的抗体是单克隆抗体。

12、权利要求 5 的试剂盒，其中所述捕捉抗体是对所述标记抗体具有免疫反应性的抗体。

13、权利要求 5 的试剂盒，其中所述捕捉抗体是特异性抗粘附素蛋白表位的抗体，并且该表位不同于所述标记抗体特异性针对的表位。

14、权利要求 6 的试剂盒，其中所述标记抗体是对所述捕捉抗体具有免疫反应性的抗体。

15、权利要求 6 的试剂盒，其中所述标记抗体是特异性抗粘附素蛋白表位的抗体，并且该表位不同于所述捕捉抗体特异性针对的表位。

16、一种用于检测人类受试者的毛滴虫感染的试剂盒，其包含：

(a)毛滴虫粘附素蛋白或其免疫反应片段；和

(b)用于检测包含(a)的毛滴虫粘附素蛋白或其免疫反应片段的抗原/抗体复合体的形成的抗体。

17、权利要求 16 的试剂盒，其中所述毛滴虫粘附素蛋白或其免疫反应片段选自由下列成员构成的组：AP65 粘附素蛋白，AP51 粘附素蛋白，AP33 粘附素蛋白,AP23 粘附素蛋白及其免疫反应片段。

18、权利要求 16 的试剂盒，其中所述毛滴虫粘附素蛋白是 AP65 粘附素蛋白或其免疫反应片段。

19、权利要求 16 的试剂盒，其中：

(a)来自所述受试者的样品与所述毛滴虫粘附素蛋白或其免疫反应片段相接触，其条件是如果该受试者感染了毛滴虫的话，抗原/抗体复合体将由此形成；和

(b)通过将(a)中形成的复合体与抗人抗体的捕捉抗体相接触来检测所述抗原/抗体复合体的存在。

20、权利要求 16 的试剂盒，其中(a)中的所述毛滴虫粘附素蛋白或其免疫反应片段被标记。

21、权利要求 16 的试剂盒，其中(b)中的抗体被标记。

检测人类受试者中的毛滴虫感染的试剂盒

本申请是申请号为 03812303.7(国际申请号为 PCT/US03/09474)、申请日为 2003 年 3 月 27 日、发明名称为“毛滴虫检测的方法和装置”(后变更为“检测人类受试者中的毛滴虫感染的试剂盒”)的中国专利申请的分案申请。

发明领域

本发明涉及一种检测毛滴虫感染的免疫测定方法和试剂盒。

参考文献

Alderete et al., *Infect. Immun.*, 40:284-291, 1983

Alderete et al., *Infect. Immun.*, 49:463-468, 1985.

Alderete et al., *Infect. Immun.*, 52:70-75, 1986.

Alderete et al., *Infect. Immun.*, 53:285-293, 1986.

Alderete et al., *Infect. Immun.*, 53:697-699, 1986.

Alderete et al., *Infect. Immun.*, 55:1037-1041, 1987.

Alderete and Garza, *Infection and Immunity*, 56(1):28-33, 1988.

Alderete and Garza, *Infection and Immunity*, 56(10):2256-2562, 1988.

Alonzo and Pepe, *Statistics in Medicine*, 18:2987-3000, 1999.

Arroyo et al., *Molecular Microbiology*, 6(7):853-862, 1992.

Arroyo et al., Arch Med Res 26(4):36—369, 1995.

Arroyo et al., *Molecular Microbiology*, 7(2):299-309, 1993.

Cuatrecasas, *J. Biol. Chem.*, 245:3059, 1970.

Lehker et al., *Journal of Exp. Med.*, 174:311-318, 1991.

van Der Schee C., et al. J. Clin Microbiol. 1999 Dec: 37 (12) 4127-30

Wasserheit, *J. N., Sex. Trans. Dis.*, 19:61-77, 1992.

Yap et al., *Genitouria. Med.*, 71:402-404, 1995.

Zhang et al., *Ann. Epidemoil.*, 5:325-332, 1995.

发明背景

毛滴虫是感染人和动物的原生动物寄生虫。存在 15 种以上的毛滴虫。阴道毛滴虫(T.vaginalis)是能引起男性和女性滴虫病病症(或”trichomonosis”或”trich”)的毛滴虫的一种。该寄生虫通过性传播并且是目前世界上最普遍的非病毒性性传播疾病(STD)动因。据估计,在美国每年有 5 至 8 百万妇女患滴虫病,有 25%的性活跃期妇女可以在任何特定的时间被感染。

在男性中,据估计滴虫病占非衣原体、非淋球菌尿道炎的 17%。

在妇女中，临床症状多种多样，从无症状携带到症状明显的阴道炎；并且感染能够不确定地持续。严重的症状包括带有恶臭排泄物的腹痛并伴随有疼痛和不适感，类似于阴道酵母菌感染。男性则多倾向于平均 4 个月持续无症状状态，而在受感染的男子中有文献记载的疾病包括尿道炎、前列腺炎、阴茎头包皮炎以及其他疾病。

人受到毛滴虫感染会导致严重的健康后果。毛滴虫分泌一种能降解阴道抗体、保护性细胞层和免疫应答细胞的蛋白酶，因而增加了受感染妇女对其他性传播疾病的易感性。研究显示，感染阴道毛滴虫的女性患 HIV 的危险是原来的 2-10 倍，男性精子中 HIV 和毛滴虫均为阳性的比例是 HIV 为阳性的 6 倍，因此增加了感染同伴的可能性（Wasserheit,1992）。并且，毛滴虫感染增加了患子宫颈癌的危险，并且能反过来影响受精和怀孕（Yap et al.,1995;Zhang et al.1995）。幸运的是，如果寄生虫感染能够被成功的检测的话，则在多数病人能够得到治疗。

目前，毛滴虫病的诊断依赖于对从女性阴道腔或男子尿道中提取的活体组织进行的检测和形态学识别。识别通过显微检测盐水湿涂片（Mount）标本，直接目测活生物体而完成。尽管当阳性时高度特异，在无症状或轻微症状患者中或之前的 24 小时内进行过冲洗的妇女中，湿涂片法检测常常为阴性。湿涂片显微镜法的整体灵敏性或可靠性为 58％（Weise et al.），并且可低至 30％。湿涂片显微镜法也可以尝试使用尿液样品，然后用离心方式浓缩沉淀中的所有毛滴虫，然后重悬收集的毛滴虫并检测。当用湿涂片显微镜法对尿液样品进行检测时，效率极低，灵敏性低至 7％（与培养法的 40%相比较）（van der schee c.,et al.j.clin microbial.1999 dec;37(12)4127-30）。此外，对于任何描述过的样品类型，使用湿涂片显微镜法的检测是主观的、烦琐的、费时的，并且需要经过专门训练的人员参与。

通过泌尿生殖器样品的培养可以提高被检测的数量。遗憾的是，该步骤需要几天才能完成（典型的为 2-5 天）并且必须在专门的实验室和由受过培训的人员进行操作。此外，这两种方法都要求样品中的寄生虫在被检测之前是活体，因此限制了某些样品类型的适宜性。比如，尿液对于以培养为基础的毛滴虫诊断就是不适当的样品培养基，尽管比起湿涂片法具有更高的敏感度（Mohamed et

al.Sex.Transmitted Infect.,2001.77(1)78-9）。利用 PCR，人们进行了诸多尝试来改进对尿液以及其它样品类型中毛滴虫的诊断技术。尽管 PCR 比起湿涂片或培养法具有更具潜力的灵敏性（根据上述文献为 87％），但在什么样的引物序列是毛滴虫特异方面仍然缺乏科学的一致性（PCR 不是 FDA 允许的诊断方法）。并且，在差异样本和临床污染样本中的假阳性问题也阻碍了该技术的应用。高度扩增的样本可以提供阳性结果但并非指示了实际的感染，而是当作代表了先前感染的痕量。此外，PCR 是具有许多操作和程序控制的高技术工序，需要昂贵的设备，并且不能进行即时（point of care）诊断；所有这些因素妨碍其作为一种对毛滴虫进行实际诊断方法的适宜性。

一种通过溶解样品中的微生物并且释放出其中的核苷酸的毛滴虫感染检测方法已经被披露。毛滴虫的存在通过将释放的核苷酸同探针杂交而得以确定。该方法涉及大量操作和贵重的仪器设备，其灵敏度低于湿涂片显微镜法。

毛滴虫的高频感染与不能及时处理导致不利后果的可能性相结合，解释了对于快速、灵敏和精确诊断测试毛滴虫感染以及评价治疗效果能力的需求。诊断测试方法应该适用于各种被估计包含毛滴虫样品，无论该样品是否包含活体，尤其是，应该允许对尿液（取样自男子和女性）和阴道拭子（Swab）样品进行检测。此外，该方法应该具有高度可靠性，如对感染个体产生阳性结果。

发明概述:

一方面，本发明包括一种检测受试者阴道毛滴虫感染的方法。在实践该方法的过程中，获得受试体的体液样品，如尿液或阴道拭子样品，使之与针对毛滴虫粘附素多肽的特异性抗体接触，如果该受试体感染了毛滴虫，则会形成抗体－粘附素多肽复合体。当临床样品是阴道拭子样品，则以复合体存在或不存进行的检测具有至少 80％的可靠性，有代表性的可靠性可达 90％，当临床样品是尿液的可靠性大于 40％。

更广泛地讲，本发明可用于检测哺乳动物的毛滴虫感染，如母牛或其他家养动物。例如，母牛中的 Tt .foetus 感染，使用抗阴道毛滴虫粘附素蛋白的抗体或抗来自感染种类，比如 Tt.foetus 的同源粘附素蛋白的抗体作为抗体试剂。

用于检测人类阴道毛滴虫感染的典型粘附素蛋白是阴道毛滴虫AP65,AP51,AP33,AP23 粘附素蛋白，及其免疫学反应的片段，尤其是AP65 和 AP33 粘附素蛋白。同样的，示例性的抗体是抗 AP65 抗体，例如，由细胞系 DM116 和 C55 细胞系产生的抗体，用于非人测定的典型多肽是衍生自感染的毛滴虫动物的同源粘附素多肽。

在一个优选的测定模式中，接触步骤包括：将样品放置在干燥条的样品应用带上，所述干燥条沿上游到下游的方向具有样品应用区、反应带和检测带，所述反应带中含有特异性抗毛滴虫粘附素多肽的非固相化标记抗体，所述检测带含有特异性抗所述复合体中毛滴虫粘附素多肽的固相化抗体，其中 (i) 样品在所述的干燥条上沿下游方向朝反应带移动，(ii) 样品中的粘附素多肽分析物与反应带的非固相化标记抗体反应而形成移动的标记的粘附素多肽—抗体复合体，和(iii)复合体向检测带移动，(iv) 所述的复合体与检测带的固相化抗体反应而在检测带形成固相化标记复合体，以及(v)非复合体的固相化标记抗体移动到检测带的下游。检测步骤包括检测检测带的固相化的标记复合体的存在或缺失。

在另一个测定模式中，所获样品是阴道抹片，该样品被固定（例如使用乙醇或甲醇）。该阴道抹片可以是常规的阴道抹片或者流质试样，示例性的是通过 Cytyc 制备的 thin-prep 阴道抹片。该样品在检测粘附素蛋白的被标记抗体存在下制备，所述粘附素蛋白受到了固定程序的变性条件的影响。一个示例性的抗体是 AP33 抗体。该方法可以包括对 thin prep 的处理从而移走未结合标记抗体。

另一方面，本发明包括检测人类受试体阴道毛滴虫感染的试剂盒。该试剂盒包括具有使被应用液体通过毛细作用而流动的干燥条，在该干燥条内，通过毛细作用从上游的样品应用带，经过反应带，到下游检测带。反应带包含特异性针对毛滴虫粘附素多肽的非固相化的被标记抗体，能有效形成一个移动的粘附素蛋白－抗体复合体，检测带包含特异性针对复合体中毛滴虫粘附素多肽的固相化抗体。体液样品置于样品应用带之后（i）样品在干燥条上向下游方向的反应带移动，（ii）样品中的粘附素多肽分析物与反应带的非固相化捕捉抗体反应而形成移动的、标记的粘附素多肽－抗体复合体，(iii)复合体向检测带移动，（iv）该复合体与检测带固相化抗体反应而在检测带形成固

相化标记复合体，以及（v）非复合的固相化标记抗体移动到检测带的下游。受试体毛滴虫感染的存在或缺乏通过检测带可检测标记的存在或缺乏而得以确定。

试剂盒中的示例性的非固相化抗体是免疫特异性抗 AP65、AP51、AP33 和 AP23 粘附素蛋白，及其免疫学反应片段，其中优选的是 AP65。试剂盒中的示例性抗体是由 DM116 细胞系制备的抗体。

另一方面，检测受试人体毛滴虫感染的方法包括：从受试体中获得体液样品，例如唾液或者血液；将样品与毛滴虫粘附素多肽接触，如果受试体受到毛滴虫的感染则会形成抗体－粘附素多肽复合体；检测复合体的存在或缺失可以确定受试体存在或缺乏毛滴虫感染。

示例性的粘附素多肽是 AP65、AP51、AP33、AP23 粘附素蛋白，及其免疫学反应的片段。

在一个测定模式中，将样品放置在干燥条的样品应用带上，所述干燥条沿上游到下游的方向具有样品应用区、反应带和检测带，反应带包括标记的非固相化毛滴虫粘附素多肽，其可有效地与存在于毛滴虫感染个体中的抗毛滴虫抗体反应以形成移动的抗体-粘附素多肽复合体，检测带包括特异性针对人体抗体的固相化捕捉抗体。样品加入之后，(i) 样品在所述的干燥条上沿下游方向朝反应带移动，(ii) 样品中的粘附素多肽分析物与反应带的非固相化标记抗体反应而形成移动的标记的粘附素多肽一抗体复合体，和(iii)复合体向检测带移动，(iv) 所述的复合体与检测带的固相化抗体反应而在检测带形成固相化标记复合体，以及(v)非复合体的固相化标记抗体移动到检测带的下游。试剂盒中的示例性固相化抗体是由 C55 细胞系制备的抗体。通过检测带上标记复合体的存在或缺失确定固相化标记复合体的存在或缺乏。

当阅读了下面的本发明的详细说明以及所附附图，将会对本发明的这些以及其他目的和特点有更全面的理解。

附图简述

附图 1 显示根据本发明的毛滴虫测定试剂盒的测试条俯视图；

附图 2 显示附图 1 测试条的侧视图。

附图 3 是根据本发明的测定试剂盒的平面图；

附图 4 是附图 3 的试剂盒的侧视剖面图；

发明详述

1.定义

下面的术语具有下面所述的含义，除非在本说明书中另有说明。

这里所用的术语“毛滴虫”包括，但不限于毛滴虫目，Ditrichomonas属，毛滴虫，Tritrichomonas,以及五鞭毛滴虫的原生动物寄生虫，包括感染人和动物的多个种。“毛滴虫”涉及任何毛滴虫种，举例来说，涉及Tritrichomonas foetus(也称作Trichomonas foetus,Tt.fetus)，Tt.enteris,以及感染牛的T.pavlovi，Tt.suis,Tt.rotunda,以及感染猪的T.buttreyi,感染羊的Dt.ovis,感染马的Tt.equi以及T.equibuccalis，感染鸟的T.anatis,Tt.eberthi，T.gallinae,以及T.gallinarum,感染啮齿动物的Tt.caviae,Ttmuris,Tt.wenoni,Tt.minuta,以及T.microti,感染狗和猫的T.canistomae和T.felistomae,以及感染生物样品中的灵长类动物（包括人的）T.tenax,T.vaginalsi,Pt.Hominis,以及T.macacovaginae。在人类疾病中，“毛滴虫”涉及但不限于阴道毛滴虫(T.vaginalis)。“阴道毛滴虫”涉及任何能够感染人类的阴道毛滴虫种。

这里所用的术语“抗体”包括但不限于能特异结合和识别被分析物（抗原或抗体）的基本上是由免疫球蛋白基因编码的多肽或免疫球蛋白基因或其片段。“抗体”还包括但不限于能特异结合和识别抗体的抗原特异性识别区（独特型），所述抗体由暴露于毛滴虫抗原的宿主产生。例子包括多克隆的、单克隆的，嵌合的，人源化和单链抗体等等 。免疫球蛋白的片段包括Fab片段和通过表达文库产生的片段，包括噬菌体展示。参见，举例来说.,Paul,Fundamental Immunology,3rdEd.,1993,Raven Press,New York,for antibody structure and terminology.

术语“表位”指能够特异结合抗体的抗原决定簇。表位通常由一组表面分子，如氨基酸或糖侧链，以及通常具有特异三维结构特征和具有特异带电荷特征的分子构成。

术语“特异结合于”和“与之特异免疫反应”指在蛋白异源群体和其他生物制剂存在下，决定于存在的目标分析物的结合反应。因此，在指定的测定条件下，特异结合部分优先地与特别的目标分析物结合，

而并非大量地结合存在于测试样品中的其他成分。在那种条件下与目标分析物进行特异结合就需要有对特异目标分析物具有特异性的结合部分。各种免疫测定模式可以用于选择与特异抗原特异免疫反应的抗体。例如，固相 ELASA 免疫测定被常规的用于选择与被分析物特异免疫反应的单克隆抗体。参见 Harlow 和 Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Publications New York, (1988) 描述了能够用于确定特异免疫反应的免疫测定模式和条件。典型的特异或选择性反应将至少具有两倍的信噪比，更典型的是具有超过 10-100 倍的信噪比。

“蛋白”指氨基酸或氨基酸类似物组成的生物高分子聚合物，一些典型的或所有 20 种常见 L-氨基酸在生物蛋白中被发现。尽管“蛋白”通常是指相对较大的多肽，如包括 100 或更多的氨基酸，而“肽”是指相对较小的多肽，此处这些术语可以彼此交换使用。这就是说，术语蛋白可以指较大的多肽以及较小的肽，反之亦然。

蛋白的“免疫反应片段”是指与结合伴侣（partner）免疫反应的蛋白部分，如抗体，其与蛋白自身发生免疫反应。

当涉及本发明的测定方法时，“特异性”是指特异性检测毛滴虫感染的测定能力。

当涉及本发明的测定方法时，“可靠性”是指被检测到的真阳性群体的百分比。例如，至少 80％的可靠性是指该测定将检测出根据例如通过培养或 PCR 确定的实际上受到毛滴虫感染的受试体的至少 80％为毛滴虫感染。该术语也可以与“灵敏度”交换使用。

II. 本发明的测定

借助在毛滴虫粘附素蛋白或其免疫反应片段与对该蛋白具有免疫特异性的抗体之间形成复合体，然后检测该复合体的方法，毛滴虫感染尤其是阴道毛滴虫在人类的感染能够被轻易地以高灵敏度检测到，本发明正是建立在这一发现的基础上。在一个概括的实施方式中，毛滴虫感染可以通过机体样品如尿液或阴道拭子样品中的粘附素蛋白或其免疫反应片段的存在得以检测。在该实施方式中，测定试剂是可标记的能够与样品中存在的粘附素蛋白形成可以检测到的复合体的抗粘附素抗体。该测定的一个重要优点是那些粘附素蛋白被发现以可检测到的量存在于阴道拭子样品中，即来自于阴道管或子宫颈或子宫颈管

的刮取或抹取的阴道分泌物中，或者实际上是通过本测定法检测毛滴虫感染的所有毛滴虫感染妇女的阴道抹片中。类似的，粘附素蛋白被发现以可检测的量存在于经本发明测定法测试毛滴虫呈阳性男子和女性的尿液中。因此，该测定是高度灵敏的并且能够很容易的借助男子尿液样品予以实施，同样地，女性可以借助尿液或阴道或宫颈涂片予以实施。

在另一个概括的实施方式中，毛滴虫感染可以通过机体样品抗体的存在而得以检测，该机体样品抗体与被标记的毛滴虫粘附素蛋白测定试剂免疫反应。在该实施方式中，被标记的测定试剂是被标记的毛滴虫粘附素蛋白，该粘附素蛋白能够与存在于被感染个体中的抗粘附素抗体形成可被检测到的复合体。

本发明的测定试验建立在免疫结合反应的基础上。免疫测定的一般程序的综述，参见 Basic and Clinical Immunology, 7th版, D. Stites and Terr, ed., 1991，该文献据此引入作为参考。在一个本发明的实施方式中，该测定试验检测毛滴虫免疫原的存在。在本发明的另一个实施方式中，测定试验检测产生了抗毛滴虫抗体的宿主。生物样品中毛滴虫免疫原或宿主产生的抗毛滴虫抗体的存在指示了毛滴虫感染的发生。

本发明的测定是高度特异和灵敏的。如上所述，显示出本发明对阴道毛滴虫的特异性测定具有超过 80％的灵敏度，湿涂片法测定的阴性病人的 21％（28／131）被检测为阴道毛滴虫测试阳性（使用培养方法作为确认或分析方法）。该增加的灵敏度水平允许识别另外 37％的毛滴虫感染病人（103／75）。本发明的测定方法的整体特异性达到大约 98％。

实施时，首先从受试者获得体液样品。如在优选实施方式中，受试者是人，适合的体液样本是阴道拭子样品，即刮取或者抹取女性阴道管或子宫颈或子宫颈管的阴道分泌物或者是女性的宫颈涂片，或者是女性或男性的尿液样品。其他适合的体液，特别是当检测抗毛滴虫抗体时，包括血清、血液以及唾液。当受试者是兽类或家畜类动物时，可以选择比如尿液和粘膜涂片作为其适合的体液。

可以选择的，样品可以由来自病人的细胞例如，或任何感染部位的细胞，包括但不限于子宫颈管，子宫，输卵管，睾丸、肛门、咽喉、

肺、皮肤、眼睛、胃消化管道或体腔。这些样品能够新鲜使用、或者经保存（冷冻、干燥、冷藏，作为可供专用的）以备后用。样品能够以它们的天然形式（尿液），或者经加工、提取、溶解或经过处理加以使用。样品中的毛滴虫可以是活体或死体，完整细胞或已破碎的，加工的或未加工的。

检测毛滴虫的免疫测定方法的研究进展不顺利的很大原因是由于缺少稳定的，种依赖性抗原。本发明的成功在于部分地依赖于毛滴虫粘附素蛋白的稳定性。毛滴虫具有所展示出的惊人的抗原异源性（Alderete et al.,1985b;19862,1987a）。为了建立和维持感染，寄生虫应具有抵挡泌尿生殖管的不利环境以及躲避免疫监控机制的能力，比如抵抗宿主的溶胞抗体和补体。寄生虫进化了其进行表型变化的能力（alderte et al.,1986;Alderete et al.,1985），表型变化是一个被许多寄生虫用来逃避检测的策略。已经观察到在两个不同时间从同一病人中提取的分离物展示出不同的表型（Alderete et al.,1987）。还观察到寄生虫进行表型变化以适应其周围环境。比如，在体内环境中明显的支持或选择缺少特异表面免疫原（P270）表达的阴道毛滴虫有机体，而在体外培养环境中，该寄生虫回复为产生 P270 的相反的表型蛋白。在另一个实施例中，粘附素蛋白 AP65 在典型的培养环境中以低水平表达，而在宿主或类似体内环境中却以较高水平表达。因此，在抗体外条件下培养的有机体的抗体可能对于与体内样品含有的毛滴虫结合并不有效。以通过典型的培养环境中生长的毛滴虫表达水平为基础，粘附素 AP65 蛋白并不能很好的适于用作诊断测定用的有力的分析物。此外，寄生虫具有蛋白水解作用，也就是，具有分泌降解表面抗原和抗体的分泌蛋白酶的能力。作为上述防御机制的结果，还没有已知的在环境中稳定的免疫原用于发展抗毛滴虫抗体。

毛滴虫粘附素蛋白是典型的表面表达蛋白，与寄生虫对排列于宿主动物泌尿生殖管道的上皮细胞的细胞粘附相关联（Alderete and Garza,1988,Arroyo et al.,1992;Lehker et al.,1991）。此外，粘附素是功能性活性酶。

基于其是代谢酶并且在通常的培养环境中不表达的事实，粘附素蛋白并不是现有技术中被人们用来作为诊断使用的明显的候选者。代谢酶在所有有机体中起着重要的作用，因而与普遍存在的宿主蛋白（例

如其他代谢酶）具有高度的同源性。与通常发现的蛋白具有同源性的抗原一般并不适用于抗体产生以及在诊断测试中使用。它们通常是非免疫反应的，或者具有非常低的诱导强免疫反应的可能性。因此，那些抗原不太可能诱导有效地用于检测的感染反应抗体，也不太可能产生用于抗原自身检测的适宜的多克隆和单克隆抗体。也有报道称粘附素看起来是免疫隐性的，这由在实验动物中产生高滴度抗血清和单克隆抗体（mAbs）的困难性所证实（Alderete and Garza, 1988; Arroyo et al., 1992, 1993; Lehker et al., 1991）。此外，由于与来自宿主和其他共同病原体相似蛋白的反应，针对那些抗原的抗体有可能是低特异性的。事实上，粘附素与宿主蛋白的相似性（拟态）可以作为解释病原体逃避防御机制和免疫攻击的原因。发明者确定某些粘附素蛋白在动物宿主中高度表达并且在特异体内环境像培养环境一样具有免疫反应性；该粘附素也能够以允许引起抗体产生的数量来表达。因此，该粘附素蛋白的选择在抗原选择方面代表了一种新的以免疫学为基础的诊断测定策略。

关于人类寄生虫阴道毛滴虫的粘附素蛋白及其编码序列在U.S .Patent No5922563 中披露，该内容被引入作为参考。四个粘附素蛋白家族（AP65、AP51、AP33、AP23）被鉴别为特异性介导附着阴道上皮细胞的受体的粘附素。四个阴道毛滴虫粘附素家族在其相对分子量（M_r）基础上被分成组，AP65（65-KDa）, AP51（51-KDa）, AP33（33-KDa）和 AP23（23-KDa）。至少有三个粘附素家族包括具有与众不同的核酸参照的成员，该核酸参照可能是紧密相关的。因此，每个各自的粘附素是多基因家族的一个成员，如这里所用到的，术语 AP65、AP51、AP33、AP23 将指明所有相关的 M_r 阴道毛滴虫粘附素蛋白家族成员。此外，粘附素存在于以多拷贝形式存在于阴道毛滴虫基因组中。

在本发明的一个具体实施方式中，AP65 粘附素蛋白家族被选作诊断测定的免疫原。尽管优选 AP65，其它稳定的，粘附素蛋白也可以被选作免疫原用于诊断测定。编码 AP65 的基因大约 1.8Kb 长。AP65 粘附素蛋白家族包括六个已知成员，其中三个（AP65-1、AP65-2、AP65-3）在比如 Alderete US. Patent No5922563 中详细描述，该专利作为参考被引入。每一个成员由不同的 AP65 基因编码。AP65-1、AP65-2 的 N 末端序列非常相似，12 个中有 9 个氨基酸是相同的。AP65-1、AP65-2、

AP65-3 的亲水图（Kyte and Doolittle）非常相似，只有很少的不同。AP65 粘附素蛋白是只有阴道毛滴虫才有的。以 cDNA 插入作为阴道毛滴虫，T. suis（猪毛滴虫）和 Tt. foetus（牛毛滴虫）的探针，通过杂交与同时进行的配体测定显示由阴道毛滴虫粘附素产生的血清不表现出与其他种类的杂交反应。

测定模式

本发明可以是直接的或竞争性的，在竞争性结合测定中，目标分析物例如阴道毛滴虫粘附素蛋白与标记的分析物类似物竞争优选的固相化结合试剂中的特异结合位点，其中固相化结合试剂，例如，特异性结合粘附素蛋白的抗体被结合在适宜的固体表面，例如硝化纤维、尼龙、PVC 或聚苯乙烯表面。结合于捕捉试剂的标记分析物的浓度同样品中存在的游离分析物的量成反比关系，能够以液体或结合形式进行定性分析或通过如对溶液中标记粘附素蛋白进行分光光度测定而进行定量检测。

典型的直接测定法是夹心测定法，其中，目标分析物如阴道毛滴虫粘附素蛋白既与标记结合试剂如标记抗体结合，又与固定捕捉抗体结合，从而形成一个能够被检测到的固定标记夹心复合体。测定的准确模式通常取决于所希望测定的灵敏度或特异性。在一些测定中，尤其是对于那些采用不稳定试剂的测定来说，可以增加对照试剂来确定标记或者捕捉试剂的有效性。

在另外一个直接结合测定模式中，特别是用于宫颈涂片的分析，来自女性受体的宫颈涂片被处理以去除干扰物质，然后放置于固体上，涂片成分如阴道毛滴虫粘附素蛋白通过如与处理过的玻璃固体表面结合的方式被固定下来。一种被标记的结合试剂例如荧光标记的抗粘附素抗体被应用到载玻片上，该试剂允许与免疫特异目标结合，接下来通过清洗移走未结合的抗体。于是涂片样品中被分析物的存在或缺失可以通过玻片的荧光显微检测加以确定。例如，US. Patent Nos. 6174742 和 5741662 描述了收集和处理阴道拭子样品材料以及检测染色材料的方法。一个适宜的宫颈涂片测试模式是由 Cytyc（参见 http://www.cytyc.com）支持的 Thin-Prep®宫颈测试。

一个优选的直接测定模式的具体实施方式，干燥条测定试剂盒将在第 III 部分详细说明。在这一测定模式中，考虑到毛细作用，测试

条是多孔的或含纤维的，包括从上游到下游方向的样品应用带、反应带和检测带。样品应用带可以是条带上的简单区域，在该处加入样品。反应带包含具有结合样品分析物例如粘附素蛋白的非固相化被标记试剂，从而形成标记的可移动复合体，也就是具有在测试条上移动能力的复合体，典型的是具有在毛细作用下沿下游方向朝检测带方向流动能力的复合体。被分析物是粘附素蛋白，则标记试剂是典型的被标记抗粘附素抗体，具体如下面所述。分析物是抗毛滴虫抗体，则标记试剂是标记粘附素蛋白。典型的，试剂以溶液形式被加到条带上，使其干燥，以便在变湿时，即将样品加到干燥条时，干燥的试剂能够进入液相并且经过条介质移动。下面给出详细描述，包括实施例 3。

检测带包含固相化的捕捉试剂，该试剂具有与可移动的复合体的分析物部分结合的能力，从而将标记的复合体固定在干燥条上，而被标记但不是复合体的试剂和移动的样品液体介质一起通过条带。固定结合试剂可以与条带基质共价结合或通过非共价连接紧密结合，例如静电力或分散力。无论如何，当样品液体流经检测带时，固定过程都应该足以保证结合试剂捕捉和固定标记复合体。分析物是粘附素蛋白，则优选的固定结合试剂是具有特异性结合粘附素表位能力的抗粘附素抗体，该表位在复合体形式分析物中是可以接近到的。也就是说，被标记的抗体和被固定捕捉抗体优先地识别粘附素蛋白中分离的和不同的表位。分析物是人类抗毛滴虫抗体，优选的结合试剂是具有一般人体抗体免疫反应活性的非人源抗人抗体。

条带可进一步包括第二捕捉带，非复合的被标记试剂可以在此被捕捉，作为一个对照用以确定被标记试剂正在从反应带释放并沿条带移动，并且被标记试剂正在被固定的捕捉试剂所捕捉。被标记试剂是被标记的抗粘附素抗体，则优选的对照捕捉试剂是与被标记的抗体起免疫反应的抗体。因此，例如，如果被标记的抗体是小鼠单克隆抗体，该对照捕捉试剂可以是兔抗小鼠抗体。

正如上面所见到的，通过使用被标记的试剂和捕捉试剂不同的组合，本发明的测定适用于毛滴虫的免疫原或宿主产生的抗毛滴虫抗体的检测。其在动物的生物样品中的存在表明了受到毛滴虫感染。例如，针对毛滴虫免疫原如阴道毛滴虫的 AP65 粘附素蛋白的测定，被标记的结合部分和捕捉试剂是针对阴道毛滴虫 AP65 产生的抗体，并且对被标

记试剂不变区域（非表位）特异的抗体或抗原被用作对照试剂。针对于产生抗体如抗 AP65 抗体的宿主检测的测定，被标记和捕捉试剂的结合部分是 AP65 粘附素蛋白。该粘附素蛋白可以是天然的、嵌合的、片段或 AP65 粘附素蛋白的重组形式。

类似的，本发明的测定是可以调整、改变的，可以通过使用针对不同毛滴虫变体的标记和捕捉试剂而检测不同的毛滴虫变体。例如，当使用针对被 dsRNA 病毒感染的阴道毛滴虫抗体时，该测定可以区分病毒感染的阴道毛滴虫和非病毒感染的阴道毛滴虫分离物。在另一个实施例中，诊断分析可以使用抗体以检测分析物的存在或缺乏，该分析物赋予或者指示对毛滴虫的药物抗性或药物敏感性。这样的测定可以指导作出关于适合某一具体感染的特效剂量或药物类型的决定。

有很多标记可以用于与结合部分（抗体或抗原）结合以形成被标记的试剂。标记的选择取决于所需要的敏感性，与结合部分结合容易、稳定的要求，可得的使用仪器以及可用于支配的设备装置。本发明的标记可以是可溶性的或粒子状的，金属性的，有机或无机的，也包括光谱标记比如绿色荧光蛋白，荧光染料（比如，荧光素及其衍生物，若丹明和及其衍生物，生物素，抗生物素蛋白和抗生物素蛋白链霉素），化学发光化合物（例如虫荧光素和发光氨）；和酶（例如辣根过氧(化)物酶，碱性磷酸酶等）；光谱比色标记比如胶体金或碳粒子，或着色玻璃或塑胶（比如聚苯乙烯、聚丙烯、乳胶等）珠。

根据现有技术已知的方法，标记能够直接或间接偶联到结合部分的成分中，比如 US.patent Nos 4863875 和 4373932 中所描述的相关内容被引入作为参考。非放射性标记通常以间接方式得以附着上。一般地，配体分子（比如，生物素）以共价形式结合于结合部位。配体另外结合到抗配体（例如抗生物素蛋白链菌素）分子上，该抗配体分子可以被天然的检测到或者以共价形式结合到信号系统比如可检测酶，荧光化合物或化学发光化合物上。标记可以通过化学接头附加到结合部位。典型的接头区是多肽序列，比如，大约 5 到 200 个氨基酸之间的多聚甘氨酸序列。优选的接头常常是柔性氨基酸亚序列。那些柔性接头是本领域技术人员已知的。例如，多聚（乙二醇）是商业上可以得到的（Shearwater Polymers,Inc.Huntsville,Ala）。检测部分可以通过与酶或萤光团结合而直接连接到产生信号的化合物上。

标记的存在可以通过视觉观察或监测特定探针或探针结合物的检测器而得以检测到。典型的检测器包括分光光度计，光电器、光电二极管，显微镜，闪烁计数器，照相机，胶片等等及其结合。适宜的检测器实例可以广泛地从本领域技术人员已知的各种商业渠道获得。

为了本发明的目的，优选的标记是非放射性标记和不需使用复杂的仪器就能够轻易检测得到的标记。优选的是，该标记能在视觉观察的基础上或通过荧光检测产生可以立即识别的可见信号。优选的标记包括那些可以被观察到的1）化学发光（使用辣根过氧化物酶和／或带有以产生光子作为分解产物的底物的碱性磷酸酶）；2）颜色改变（伴随免疫反应过程产生带色沉淀物的胶体金），和3）荧光（比如，使用荧光素和其他荧光标签）。在本发明的一个优选实施方式中，胶体金被用作标记，并且该标记可直接与结合部分结合（抗体或抗原）。当胶体金被用作标记时，被标记的试剂分析物复合体与捕捉试剂反应导致出现红色沉淀物。如本领域的技术人员所理解的那样，在复合体与固定在捕捉带上的捕捉试剂反应的基础上显现出的颜色将取决于所使用的标记。

在本发明的一个优选测定模式中，捕捉和对照捕捉试剂被固定在固相底物上。现有技术中已知有各种固相支持物适合于本发明的使用。例如，固相支持物可以是珠子、膜（比如，硝酸纤维素膜），微量滴定孔（例如，PVC或聚苯乙烯），带、塑胶、条或任何抗体可以在其上固定或沉淀的固体表面。此外，多种有机或无机聚合体，天然的或合成的也可以用作固体表面材料使用。例证性的聚合体包括聚乙烯、聚丙烯，聚（4丁烯甲酯），聚苯乙烯，聚甲基丙烯酸酯、聚（乙烯对苯二酸酯），人造纤维，尼龙，聚（乙烯丁酸盐），聚偏二乙烯二氟化物（PVDF），硅树脂，聚甲醛、纤维素，醋酸纤维素，硝酸纤维素等等。其他可以使用的材料包括纸，玻璃，陶器，金属，非金属，半导体材料，接合剂等。此外，形成凝胶的基质比如蛋白质（例如明胶），脂多糖，硅酸盐，琼脂糖和聚丙烯酰胺能够被使用。形成几种水相的聚合物比如右旋糖酐和聚烷二醇或表面活性剂，比如磷脂或长链（12－24碳原子）烷基铵盐等等也适于使用。

将各种化合物和各种表面进行连接的方式是已知的，并且在文献中有详细描述。参见，例如，Immobilized Enzymes,Ichiro

Chibate, Halsted Press , New York, 1978, 以及 Cuatrecasas, 1970. 其中的披露被引入本发明作为参考。捕捉和对照试剂可以共价连接或通过非特异性连接而非共价附着。如果希望在组合物和表面之间的连接为共价连接，则表面通常是多功能或能够被多功能化的。可以存在于该表面并且用于连接的功能基团包括羧基酸，乙醛，氨基，氰基，烯基，羟基，巯基等等。除了共价连接，各种非共价连接测定成分的方法也可以使用。典型的非共价连接是组合物对表面的非特异性吸附。有代表性的是，该表面被用第二种组合物封闭以防止非特异性结合被标记的测定成分。

在本发明的一个优选实施方式中，如实施例 3 所描述的，捕捉和对照试剂被非特异性吸附在硝酸纤维素膜上并由封闭缓冲液（0.5%BSA; PBS 中 4%蔗糖）封闭。

在一个优选的实施方式中，该试验检测了毛滴虫特异免疫原，例如阴道毛滴虫的 AP65 粘附素蛋白。标记和捕捉试剂的结合部分是针对或基本上直接针对免疫原表位的抗体。该试验进一步包括了能够内对照和外对照的对照试剂。内对照由抗-抗体组成，所述抗-抗体来自与产生捕捉或标记试剂的抗体的种不同的种，也就是，如果标记试剂和捕捉试剂获自兔子，那么沉淀于对照区域的抗体可以是山羊抗小鼠 lgG，绵羊抗小鼠 lgG，猪抗小鼠 lgG 等等。那些抗体的产生在下面进行讨论。外对照由来自毛滴虫的细胞纯化物或粗提物的抗原，或者是被标记试剂和捕捉试剂将与之结合的重组蛋白组成。

抗体可以是单克隆抗体或多克隆抗体，优选的是单克隆抗体。单链抗体和抗体片段作为结合部分也是有用的。因此，用于此处的术语“抗体”包括由整个抗体修饰产生的或使用重组 DNA 方法学重新合成的单链抗体和抗体片段。

用于本发明测定的抗体可以通过常规的抗体培育技术获得。例如，参见 Harlow and lane, eds Antibodies; A Laboratory Manual, Coldspring Habor Laboratory, Coldspring, N.Y. 用于制备抗体的适宜的接种体包括但不限于天然蛋白，重组蛋白，寄生虫的未加工膜制备物或未加工制备物。适宜的抗体应该在水和离子和非离子洗涤缓冲液条件下是免疫反应性的。

多克隆抗体可以如 Harbor and lngild, Scand. J. Immun. 2

(Suppl,1),p.161-164,(1973)所描述的进行制备。更具体的说，多克隆抗体能够通过接种任何宿主动物，包括但不限于兔子、小鼠、大鼠、绵羊、山羊等等，并在适宜的佐剂中，比如弗氏不完全或完全佐剂，结合上面描述的接种体而获得。接种可以在适当的时间间隔伴随着一次或多次辅佐剂注射（例如一或两周至一个月的间隔）。动物被有规律的放血，例如一周一次，并且将抗体与血清分离。

优选的，单克隆抗体通过使用杂交瘤细胞系制备(例如 Kohler and Milstein,Nature 256,1975,p.495 or U.S. Patent No4707442 to Alderete 所描述的)。一些骨髓瘤细胞系可以用于制备融合细胞杂种，包括 P3/X63-Ag8，P3/NSI / 1-Ag4-1，Sp2/10-Ag14 和 S194/5.XXO.BUT.1。在一个典型的融合程序中，来自被免疫动物的抗选择抗原的脾淋巴细胞被与骨髓瘤细胞融合。得到的杂交瘤细胞然后在一系列分离培养试管中或微滴定平板孔中被分散，对产生所需要的抗体的培养物进行筛选。阳性培养物被进一步稀释以获得产生自单个细胞（克隆）的克隆。克隆再被筛选以产生所需的抗体。用于制备单克隆抗体的杂交瘤细胞可以生长在体外或动物体腔中。单克隆抗体可以分离或纯化自培养的杂交瘤细胞的上清液或使用比如离心过滤、沉淀、层析或与其结合的常规程序从腹水中获得。

在本发明的一个优选实施方式中，结合抗体由阴道毛滴虫的 AP65 粘附素蛋白产生并且通过 DM116 和 C55 细胞系制备。这些以及其他抗粘附素 Mab 被保存于 University of Texas Health Science Center,San Antonio,TX. 的杂交瘤保存库。使用上面引述过的文献所披露的两种方法中的任一种，那些抗体可以以很大的可能性和预见性而得到制备，所引述文献被引入这里作为参考。

在第一个概括的方法中，动物，比如小鼠被用来自阴道毛滴虫的完整细胞或膜蛋白进行注射（参见，例如 Alderete,1986）。来自小鼠的抗体产生细胞被永生化，永生化细胞产生的 Mabs 被用于与比如培养物中的阴道毛滴虫反应的筛选。Mabs 然后被进一步用于抗一种或多种粘附素蛋白的筛选。要识别与同一种粘附素蛋白的不同表位反应的两种 Mabs，该蛋白要能够分为比如有 10-25 个氨基酸残基的分离的重叠片段，这些片段进一步被用于免疫反应性的筛选以挑出两种或多种与不同个体粘附素片段具有免疫反应性的上述被识别的两种或多种

Mabs。可以选择的是，标准竞争性结合研究能够被用于检测与同一粘附素的不同表位结合的Mabs对。

在另一个概括的方法中，粘附素蛋白或蛋白片段，通过例如上面引述的U.S Patent No5922563所披露的阴道毛滴虫粘附素编码序列重组表达而制备。分离的粘附素蛋白或蛋白片段然后被直接用作免疫原，例如在小鼠中，用于产生杂交瘤细胞系。细胞系产生的Mabs然后被用于抗粘附素蛋白免疫反应的抗体的筛选。使用上面所披露的方法之一鉴别一种或多种与该粘附素蛋白不同表位发生免疫反应的Mabs。

使用各种不同的方法在多种场合制备粘附素抗体。例如，分泌抗AP65抗体的杂交瘤细胞系通过对小鼠接种完整毛滴虫有机体,毛滴虫膜制备物、纯化的天然AP65，重组AP65和甲醛化和pgluteraldehyde固相化的完整毛滴虫有机体，以及佐剂包括弗氏佐剂，丙烯酰胺（在使用胶纯化蛋白的情况下）以及融合至AP65的嵌合蛋白的非AP65部分而产生。产生免疫反应抗体的细胞系代表性产量是产生自杂交瘤融合体的总细胞系的5－10%，该比率与产生其他非粘附素抗体细胞系的代表性比率相一致。

标记和捕捉试剂的结合部分是毛滴虫粘附素蛋白，例如阴道毛滴虫粘附素蛋白，如阴道毛滴虫AP65，AP51，AP33，AP23粘附素蛋白以及其免疫原性反应片段，尤其是AP65粘附素蛋白以及其免疫原性反应片段。为在本发明的测定中使用，毛滴虫粘附素蛋白可以是天然的，化学合成的或重组产生的整个分子或片段。在一个实施方式中，粘附素蛋白通过重组方式制备。制备至少包括一个免疫反应表位的重组免疫原的方法是本领域技术人员已知的；U.S.Patent.No5876985和No5922563中披露的内容被引入作为参考。简要的说，重组免疫原能够通过使用包含抗原编码基因的表达载体而制备。该编码基因可以通过用由目的抗原的粗制备物产生的多克隆抗体来筛选目标毛滴虫的cDNA表达文库来获得。来自那些表达目的抗原的表达质粒的cDNA插入片段然后被亚克隆和测序。编码不同免疫原家族成员或一些非相关免疫原的抗原编码插入片段被集中然后克隆到表达载体并被用于转化大肠杆菌或者其他适宜的宿主细胞。各种阴道毛滴虫粘附素蛋白的典型的编码序列在上面引述的美国专利中给出。在本发明的一个实施方式中，免疫原是阴道毛滴虫粘附素蛋白家族AP65，重组抗原从六个几乎同样

的具有保守表位的 AP65 粘附素基因表达盒中表达。获得的重组抗原是高度保守的并且对抗体的产生是稳定的。但是，可以理解的是，不同基因或基因片段可以包含在产生重组抗原混合物的表达盒中，适宜的基因和基因片段的选择在本领域技术人员掌握的知识范围内。

为选择具有所希望的亲本或天然粘附素蛋白的免疫反应性的免疫片段，可以通过例如蛋白水解消化而对蛋白进行片段化并检测结合到针对天然蛋白的抗体的片段。有限的结合片段的 N 末端或 C 末端氨基酸分析能够用于鉴别感兴趣的结合片段。可以选择的是，在重组表达装置中，粘附素编码序列能够通过常规的方式片断化以形成能够具有编码在 25-300 氨基酸长度之间的粘附素片段能力的片段。通过针对被标记的抗粘附素抗体的选择，如此编码的片段能够在标准表达系统，例如 gt10 或 gt11 表达系统中用于常规分析。

III. 干燥条测定试剂盒

本发明的试剂盒，上面被称作干燥条水平流动测定试剂盒，提供了一种对生物样品中存在的毛滴虫分析物（粘附素蛋白或抗毛滴虫抗体）进行检测的一步水平流动测定法。如上面所述，该试剂盒通常包括由材料组成的基质，所述材料允许样品溶液在毛细作用下沿流动路径进行的流动，该基质界定出一条样品应用带，一条反应带，一条检测带和可选择的一条对照捕捉带。

典型的测定装置的基质是具有非吸水水平流动能力的多孔渗水材料。“非吸水水平流动”意味着所有液体中的溶解或分散的成分以基本上相同的速率被运输，并且以相对并未受到削弱的流程水平流经膜，与优先滞留一种或多种成分成对比，比如，与发生在具有吸附或吸收一种或多种成分能力的材料中的情形成对比。

典型的非吸水材料是玻璃纤维滤纸。其它的非吸水膜比如聚砜多微孔膜，硝酸纤维素，醋酸纤维素膜，聚氯乙烯，多乙酸乙烯酯，乙酸乙烯和氯乙烯的共聚物，聚酰胺，聚碳酸酯，尼龙，晴纶，聚酯，聚苯乙烯等等，或它们的混合物也可以使用。具有所希望材料特性和流动速率的基质材料的选择通常在本领域技术人员掌握的知识范围内。

基质的规格大小和形状并不是关键的并且可以变化多样。通常，基质是矩形的并且流动路径沿轴向进行。多孔渗水的基质通常由水密

封支持物支持。该基质也可以被包含在或部分包含在典型的是由塑料或类似水抗性材料制成的室或容器中。

吸附带通常被包含在本发明的装置中。吸附带位于捕捉带的下游。为了保持吸附作用下的流动沿着所希望的路径进行，吸附带作为从装置的基质中移走多余的样品和未结合标记的手段。通常的，吸附带包括吸附材料，比如滤纸，玻璃纤维过滤器等等。

流体样品，典型的是被提取的子宫颈内或阴道内涂片，尿液或唾液，被加入到基质的样品接收带上。当制备的样品流经检测带时，如果分析物存在于样品中，则被标记的试剂结合目标分析物形成被标记试剂分析物复合体。当样品流入捕捉带，被标记的目标分析物将通过被固定的免疫球蛋白固定保留在捕捉带。当样品流入对照带，携带样品流体的被运载的多余的被标记试剂将通过被对照试剂结合将非复合体标记保留在对照带。

可视的标记积累可以通过视觉或通过光学检测仪器确定。捕捉带上标记的保留指示样品中目标分析物的存在。对照带中的标记保留指示足够的液体流过标记的捕捉带并且被标记试剂没有由于保存、缓冲液成分以及样品成分等变性或降解，以及指示该测定是有效的。

此外，积累的标记的可视强度与病人样品中的分析物浓度和滴度（稀释）相关。积累的标记可视强度与分析物浓度之间的相关性可以通过比较可视强度相对于标准参考值获得。因此，分析物水平可以由本发明的装置所决定。

附图 1 和 2 显示测试条 10，作为本发明装置的具体实施方式对完成本发明的测定方法是非常有用的。测试条 10 包括由固相支持物 13 支持的伸长的多孔渗水的基质 12，并具有上游和下游末端 14，15。多孔渗水的材料垫 16 被安置在基质 12 的上游部分。该垫包括样品装载或样品接收带或区域 17，将包含粘附素多肽的样品通过该区域置于干燥条上，还包括样品装载带下游的包含移动的报告－标记的抗粘附素抗体的反应区或带 20 。

如附图 2 所示，垫 16 附着于基质 12 的上表面，并通过液体流动的毛细作用与之相通。因此，加到样品应用垫上的样品液体流入垫 16，经过垫 16 进入反应区域。此时，样品液体引起移动的抗体向溶液中释放，并在其中与样品粘附素反应，形成粘附素复合体，该复合体可以

通过垫与邻近基质的毛细作用，从垫转移到基质 12。

基质 12 依次包括安有捕捉试剂条的检测带 22 和安有对照试剂条的对照带 24。在这一具体的实施方式中，该捕捉试剂和对照试剂被置于横穿基质 12 宽度的条带上。但是，可以理解的是，捕捉和对照试剂可以被安排在任一适合的模式中。

在它的下游末端覆盖基质 12 的是一个吸收垫 28。铺在该吸收垫 28 上的带提供了一个引人注目的用于测试条的表面或柄。垫 28 的目的是用作吸收池，继续吸引样品液体从应用带通过检测和对照带。

基质 12 由玻璃纤维滤纸构成，该滤纸允许在样品接收带 17 接收的样品在毛细作用下沿测试条 10 的纵轴流动。其他多孔渗水的材料，比如上面描述的非吸水基质材料可以被使用。固相支持物 13 由硝酸纤维素膜形成。其他适宜的材料，比如纸，尼龙膜，玻璃、塑料、金属等等也可以使用。

在一个特别的实施方式中，测试条 10 被设计用于检测阴道毛滴虫粘附素蛋白 AP65（分析物），检测带有胶体金偶联兔抗-AP65 的 IgG 条和捕捉带有抗-AP65 的 IgG 条。制备测试条 10 的典型的程序在实施例 1 至 6 中描述。

测试条 10 可以被安放在小室内从而使处理该测试条更便利。图 3 和图 4 详细说明测试条盒子 50，它包括了在室 52 内装入的测试条 10。室 52 的设计更便于操作者控制该测定的进行。室 52 包括各自的顶部部分 54 和底部部分 56。底部部分 56 包括用于接收测试条 10 的槽 58。顶部部分 56 包括两个窗 60 和 62。窗 60 适合于接收液体样品。窗 62 用于观察测定结果，在顶部部分 54 提供了一个销子 64，它在槽 58 上定位用于将测试条锚定在槽里。这两个部分用角钉保持在一起呈直线，比如在部分 56 的钉 66 被钉入相应的孔，比如在部分 56 的孔 68。

室 52 可以用任何有足够强度的防水材料制成，例如任何塑料材料，比如聚乙烯，聚苯乙烯等等。如果使用塑料材料，小室 52 可以通过任意常规的制模技术制备。

盒子 50 能够容易地进行安装，先将测试条 10 放入底部部分 56 的槽 58 而得，然后将顶部部分 54 置于底部部分上，窗 60 和样品装载带 17 被定位，窗 62 和检测（捕捉）和对照带 22，24 被定位，销子 64 与吸收垫 28 接触。通过将钉子旋入孔，两部分能够被扣在一起

本发明的试剂盒可以包括如上描述的单个测定条，或多个测试条。多个测试条可以被设计用于复测试或用于测试不同毛滴虫种，分离物或药物抗性标记的存在，或被设计用于检测一组另外的疾病剂比如其他 STDs（例如 Chlamydia），或者其他阴道致病剂（例如 Candida yeast and Gaardenerella bacteria），或者能够检测多种动物毛滴虫种的设计装置。该试剂盒可以包括取样工具，比如用于获得子宫颈内样品的消毒棉签以及样品过滤和浓缩装置。该试剂盒也可以包括样品制备溶液，比如中和样品或提取／溶解毛滴虫抗原至溶液中的缓冲液。其他完成本测定的有用的材料也能够包括在该试剂盒中，包括测试试管，移液管等等。这些装置和试剂多种多样取决于所进行的测试的类型并且通常在本领域技术人员的知识范围内。

在一个优选的实施方式中，该试剂盒用于检测阴道毛滴虫。该装置包括包含在检测带内的一个针对粘附素蛋白家族 AP65 的胶体金偶联抗体 DM116，还包括 C55 抗体或其片段，它们固定在捕捉带内能特异的结合到与 DM116 结合截然不同的 AP65 表位。在另一个优选的实施方式中，该试剂盒包括具有 pH 值大约为 4.0-9.0 的缓冲溶液。优选的，该缓冲液是样品溶解缓冲液，在双蒸馏水中包含大约 0.5%Triton X-100; 0.1%BSA。该装置、溶液试剂、容器和取样工具通常包含在一起并且对于免疫测定试剂盒的包装类型是常规的，比如盒子，袋子，圆筒，收缩性薄膜包装卡等等。可选择的，该试剂盒可以进一步包括阐明本发明方法步骤的书面说明。任何标准缓冲水溶液，比如磷酸盐，Tris，或包含 Triton X-100，BSA 和蒸馏水的缓冲液，在大约 4.0-9.0 之间的 pH 值都能够被用于制备用于分析的生物样品。适宜的缓冲液选择在本领域技术人员的知识范围内。

尿液是生物样品，该样品可以是天然尿液，被分馏的天然尿液或者其他被处理形式，比如过滤或浓缩或稀释的形式。一个用于最佳的，单一步骤过滤和尿液测试样品测试的代表性装置包括用作检测和对照抗体的支持媒介的过滤底物。当液体流经过滤底物时抗原或抗原／被标记抗体复合体与之接触。流经诊断装置的那些介质是现有技术中已知的并且其方法与本发明的方法一致。任何缓冲溶液可以用于稀释天然尿液，大约 4.0-9.0 之间的 pH 值， Triton X-100 或磷酸盐缓冲液是优选的。天然尿液的液体部分和微粒部分可以被分别进行分析。天

然尿液的两部分可以通过任何现有技术已知的固-液分离方法，比如沉淀，离心或过滤，液体和粒子被分别收集。微粒然后可以被重悬于缓冲液比如 Triton X-100 缓冲液以溶解或提取感兴趣的分析蛋白。悬浮液然后用于分析物存在的分析。分离的尿液的液体部分可以用于同样的分析或分析前的预处理。预处理可以包括浓缩，稀释或中和。

在另一个实施方式中，阴道拭子样品是生物样品，该包含在涂片中的生物流体首先被溶解，然后提取到缓冲溶液中。典型的提取程序在实施例 4 中记载。优选的缓冲液包括 0.5%Triton X-100; 0.1%BSA 和双蒸水的缓冲液。任何其他缓冲溶液，例如具有大约 4-9 之间的 pH 值的磷酸盐缓冲液可以被使用。

被制备的流体样品（尿液或阴道拭子样品）然后被用于本发明装置之一，例如测试条 10 或检测盒 50（附图 1 和 3）。如果一个测试条被使用，该测试条可以被用作吸取样品流体的量液器。如果测试盒 50 被使用，可以使用移液管转移流体样品，然后样品被置于样品接收窗 60。该被接收的流体在毛细作用下沿多孔渗水的基质向检测带、捕捉带、对照带方向流动。测试结果能够从捕捉带和对照带上被捕捉的标记直接读出。在捕捉带和对照带上的带色（如果该标记是胶体金，则红色）线指示毛滴虫感染检测的阳性结果。在对照带上的带色线仅仅指示阴性结果和测试无效。无带色线则指示测试无效。

根据前述，将认识到本发明满足了多种目的和特征。该测定简单，快速和易于依医生的工作室或家庭装置作调整。根据本发明的一个重要的特征，该测定高度灵敏，能够挑出受试者中实际上所有的感染阴道毛滴虫的阳性个体（参见下面的实施例 4 和 5）。用于检测阴道毛滴虫感染的本发明的测定方式的特征从一组复合的标准参考样品（CRS）中得到确定。该组样品是表现有阴道病症的 206 个病人阴道样品的集合。这些样品通过湿涂片显微法和本发明的设计被用于测试阴道毛滴虫的存在。两种测定间的差别通过培养方法获得解释（In-pouch-Tv™ culture, BioMed, Inc., San Jose, CA）。

可以显示出，本发明测试装置体现出的测定方式，鉴定出所有湿涂片法测试为阳性的病人（75）和湿涂片法鉴定出的阴性病人的 21%（28／131，通过培养方法确定）是阴道毛滴虫阳性。该测定法的灵敏度被报道在大约 100%。该测定的整体特异性据报道在 98%。利用该

检测原理获得如此高灵敏度和特异性的能力在本应用报道之前的工作中是不能够被预见的。该结果详细记载在实施例 5。

此外，该测定优势的特征可见于通过使用尿液作为体液样品，允许方便的和私人的样品收集，以及测定男性和女性的样品。类似的，该测定方法的免疫反应试剂可被方便地应用于阴道抹片测试或来自于阴道抹片残留流体的测试，允许该测定包含在一种或多种其它测定中，这些测定通常作为阴道抹片的一部分而进行。此外，该测定的免疫反应试剂可以方便的应用于其他快速测定模式，比如流动类型的测试，其间样品流经膜或过滤底物。

下面的实施例描述了本发明的几个特别的方面，以详细说明本发明并且也提供一种方法的说明，该方法能够用于鉴别和测试样品中的毛滴虫存在，帮助本领域技术人员理解和实践本发明。这些实施例不应该被用于以任何方式限制本发明。

实施例 1

单克隆抗体的提纯

单克隆抗毛滴虫抗体（Mabs）如 U.S.Patent No.4707442 to Alderete 所描述的进行制备。Mabs 可以从培养物上清液或腹水中经提纯获得或通过蛋白 A 型琼脂糖凝胶色谱提纯获得（Coding,J Immunol Meth(1976)42:17）(Pharmacia LKB)。大约 2 到 6mL 来自于适宜的杂交瘤的腹水液体与结合缓冲液一起稀释到 1: 1，结合缓冲液包含 1.5M 氨基乙酸、pH 调整到 8.9 的 3M Nacl。DM116Mab 腹水于室温透析过夜。用结合缓冲液以 0.5mL/分钟的速率，将透析的 Mab 腹水从蛋白 A 型琼脂糖 CL-4B 亲和胶层析柱上洗脱。洗脱通过确定每个样品在 280nm 处的吸收值而进行监控，直至吸收值低于 0.001 O.D。然后，用 pH 调至大约 4.0 的 0.1M 柠檬酸缓冲液将 IgG 从柱中洗脱，通过确定每个样品在 280nm 处的吸收值对免疫球蛋白的洗脱进行监控。

实施例 2

单克隆抗体胶体金偶联物的制备

含有 100mL 超纯水的细颈瓶被加热到大约 80-85℃。然后，伴随着轻微搅拌，将 1mL 的 1%AuCl(2*0.5mL)和 1.75mL 的 1%柠檬酸钠（2*0.5，然后 0.75mL 等分试样）连续的加入到热水中。溶液进一步被加热到 80-85℃直至颜色从淡黄色变到亮黑色到樱桃酒色。

在玻璃试管中，200μl新鲜制备的100mM的碳酸盐（100mM）加入到如上制备的10mL的1:1.75胶体金溶液中。该溶液涡旋振荡3秒钟。然后加入300μl的DM116 IgG（1m/mL），该溶液再振荡3秒钟。将该试管温浴30分钟，在室温下，伴随着3秒钟的振荡100μl偶联封闭溶液被加入，接着以8000rpm离心30分钟。离心在没有使用阻断系统情况下达到完全停止。偶联封闭溶液由大约25mM的磷酸钾(pH7.4-7.6),大约5%牛血清白蛋白和大约0.10%蔗糖组成。上清液被吸走留下剩余的大约300μl体积。浓缩的偶联物然后被转移到新的容器中，并确定它的体积。浓缩的偶联物通过加入偶联重悬溶液而稀释10倍。偶联重悬溶液包括25mM磷酸钾(pH7.4-7.6)，1%牛血清白蛋白和大约0.10%蔗糖。被加入的偶联重悬溶液的量通过 总的胶体金溶液被（10－转移到新容器的浓缩偶联物的体积）除而得以确定。单克隆抗体胶体金偶联物可以保存在冰箱中，优选的在大约2-8℃条件下直至使用。

实施例3

A.制备测定干燥条

添加固相化抗体到干燥条

1mg/ml兔抗阴道毛滴虫IgGs制备物在由pH值为9.6的50mM碳酸盐-重碳酸盐缓冲液组成的包被缓冲液中于室温下透析过夜。IgGs然后被上样于X－Y－Z Dispensing Platform（BIO.DOT INC）上，仪器由程序控制以1μl/cm递送液体至硝酸纤维膜上。该膜然后在室温至37℃下干燥大约3小时。封闭缓冲液（0.5%BSA; PBS中4%蔗糖）然后被喷洒在膜上，然后该膜在室温下干燥过夜。随后该膜保存在大约2-8℃且没有潮气的条件下。

B.反应带上的胶体金偶联物DM116抗体的应用

将玻璃纤维滤纸浸到胶体金垫预处理缓冲液中（0.5%(w/v)多醇；0.71%(w/v)磷酸氢二钠；0.1%(v/v);Triton X-100;0.5%BSA(w/v);DDW;pH7.4）。该玻璃纤维滤纸在40-50℃的温箱中干燥大约3小时，或在空气中干燥过夜。胶体金偶联物DM116抗体被应用到处理过的玻璃纤维滤纸上，接下来或者在空气中室温条件下干燥过夜或者在37℃的温箱中干燥直至该垫干燥。随后该垫保存在大约2-8℃且没有潮气的条件下。

C.测试条装配

A 部分制备的抗体包被的硝酸纤维素膜以顶部有 1mm 重叠的方式放置于 Whatman/Gelman 滤纸（2.5cm*30.0cm）条上。B 部分制备的胶体金偶联物垫以底部有 1mm 被重叠的方式放置，胶体金偶联物垫底部 1mm 用第二条 Whatman/Gelman 滤纸覆盖。该装配通过一层胶粘塑料带保持适当的位置。该装配然后被剪成大约 2mm 宽的小条，并保存在大约 2-8℃且没有潮气的条件下。

实施例 4

测试程序和结果

使用本发明测试条的测试程序如下：

1. 用消毒棉签从病人阴道管中收集测试样品。收集样品后尽可能快的对棉签进行处理。但是，由于本发明并不要求用活组织进行，样品拭子可以以干燥形式加以保存和传送。在提取和测试之前，该拭子样品也可以保存在 2-8℃至 24 小时。另外一种选择是，拭子样品被提取，提取的样品保存在 2-8℃至 24 小时。

2. 蘸取样品溶于大约 1mL 样品溶解缓冲液（0.5%Triton X-100; 0.1%BSA; DDW）中。通过贴着容器侧面用力旋转棉签对溶液进行强力混合至少 10 次（浸没时）。当样品被从溶液中充分提取时可以获得测试结果。再次混合之前使棉签在样品缓冲液中浸透 1 分钟。当棉签收回时，贴着在试管一侧挤压和搅拌棉签以尽可能多的挤出液体。然后丢弃棉签。

3. 插入实施例 7 制备的 dipstick 测试条至装有混合样品溶液的小瓶中。

4. 10 分钟时读结果（一些阳性结果可能更早显示）。如果十分钟后测试显示阴性，在确定测试结果之前，再等十分钟直到所有背景颜色都消失。

5. 一条红线，即使带有不均匀的阴影，被认为是有效的结果。如果是中度或高度阳性的样品，在测试线的后面也可以看到某些红色。只要测试线和对照线可见，结果就有效。结果解释如下：

. 两条线 - 阳性。一条红色测试线和一条红色对照线对于检测毛滴虫抗原来说是阳性结果。注意红色线可以含有任何颜色的阴影。

. 一条线 - 阴性。一条红色对照线但没有红色测试线是判定的阴性结果。

.无线条－测试无效。如果没有红色对照线可见或背景颜色导致不可能读出红色对照线，该结果无效。

本发明的测定性能特征从一组复合的标准参考样品（CRS）中得到确定。该组样品是由 206 个显示有阴道症状的病人的阴道样品中收集的。该样品通过湿涂片显微法和本发明的测定方法进行毛滴虫测试。两种方法间的差异通过培养法进行解释（In-pouch-Tv™culture, BioMed, Inc., San Jose, CA）参见 Alonzo and Pepe(1999)。

对于在集合的标准参考样品中的总共 206 个样品来说，通过湿涂片显微法鉴定出 75 个阳性和 131 个阴性。本发明设计鉴定出所有湿涂片显微法的阳性样品（75）和 101 个阴性样品。并且，该装置还鉴别出湿涂片法中剩余阴性样品中的呈现阴道毛滴虫阳性的样品。

通过培养法对 131 个湿涂片阴性样品作进一步分析以解释湿涂片法和本发明设计之间的差异。认为湿涂片法判断为阴性而本发明测定为阳性的 30 个样品中，经培养法测定 28 个被认为是阳性，另外 2 个是阴性。此外，还发现用湿涂片法和本发明测定方法都鉴定为阴性的 101 个样品用培养法测定也是阴性。该结果列于下面表 1。

表 1

XENOSTRIP-Tv 与湿涂片显微法比较以及通过培养法分析

N = 206	湿涂片法 (WM)	
	(+)	(-)
XenoStrip-*Tv*™ (+)	75	30
XenoStrip-*Tv*™ (-)	0	101

分析 WM (-) 样品 (n=131)	
培养法 (c) (+)	培养法 (c) (-)
28	2
0	101

本发明测定性能与湿涂片显微法比较并且通过培养分析如下：

XenoStrip-*Tv*™ 灵敏度 = X(+)WM(+)+X(+)WM(-)C(+)/X(+)WM(+)+X(+)WM(-)C(+)+

X(-)WM(+)+X(-)WM(-)C(+)

= 75 + 28/75 + 28 + 0 + 0

= 103/103

= **100.0%** (C1 100% - 100%)

XenoStrip-*Tv*™ 特异性 = X(-)WM(-)C(-) / X(-)WM(-)C(-) + X(+)WM(-)C(-)

= 101 / 101 + 2

= 101 / 103

= **98.1%** (C1 95.4% - 100%)

NPV XenoStrip-*Tv*™ = X(-)WM(-)C(-) / X(-)WM(-)C(-) + X(-)WM(+)+X(-)WM(-)C(+)

101/101 + 0 + 0

= 101/101

= **1.000** (C1 1.000 – 1.000)

PPV XenoStrip-*Tv*™ = X(+)WM(+)+X(+)WM(-)C(+) / X(+)WM(+)+X(+)WM(-)C(+)+

X(+)WM(-)C(-)

= 75 + 28 / 75 + 28 + 2

= 103/105

= **0.981** (C1 0.955 – 1.000)

用于本发明测定的抗体试剂已经显示出并不与普通的阴道菌群、其他性传播剂（包括 Gardenerella vaginalis 和 Candid species）、以及来自普通非感染个体的泌尿生殖器样品进行反应。

本发明的抗体装置检测存在于阴道拭子样品中的来源于 10-1000 个有机体的溶解抗原，其浓度低于所认为的病人排泄物的浓度。

湿涂片显微法的分析结果与培养法以及本发明的性能相比较，培养法相对于湿涂片法以及湿涂片显微法相对于培养法分别列表于表 2 和表 3。

表 2

湿涂片显微法与培养法的比较

N = 206	培养	
	(+)	(-)
湿涂片 (WM)(+)	66	28
湿涂片 (WM) (-)	28	103

湿涂片法相对于培养法的性能
灵敏度 = **70.2%**
特异性 = **95.4%**

表 3

培养法与湿涂片显微法的比较

N = 206	培养	
	(+)	(-)
培养 (C)(+)	66	28
湿涂片 (WM) (-)	28	103

培养法相对于湿涂片法的性能
灵敏度 = **88.0%**
特异性 = **78.6%**

表 4

XenoStrip-Tv™与培养法和湿涂片显微法的比较

N = 206	灵敏度	特异性	PPV	NPV	精确度
培养	88.0%	78.6%	0.702	0.920	82.0%
湿涂片法	70.2%	92.0%	0.880	0.786	82.0%
XenoStrip-Tv™	**100.0%**	**98.1%**	**0.981**	**1.000**	**99.0%**
‡ 值是 XenoStrip-Tv™ 的 CRS 。培养法相对于湿涂片法，和湿涂片法相对于培养法。					

实施例 5

附加测试

本发明的测定和装置的评价在三个医生工作室进行。每个试点的测试由具有不同教育背景的工作人员进行。每个测试点测试随机编号的一组样品，阴性（3），弱阳性（3），中度阳性（3）和高度阳性（3）。获得的测试结果与所希望的结果具有 100％的一致性。

尽管本发明的优选的实施方式已经被说明和加以描述，还应意识

到在不脱离本发明范围和精神意图的情况下，可以进行各种变化。

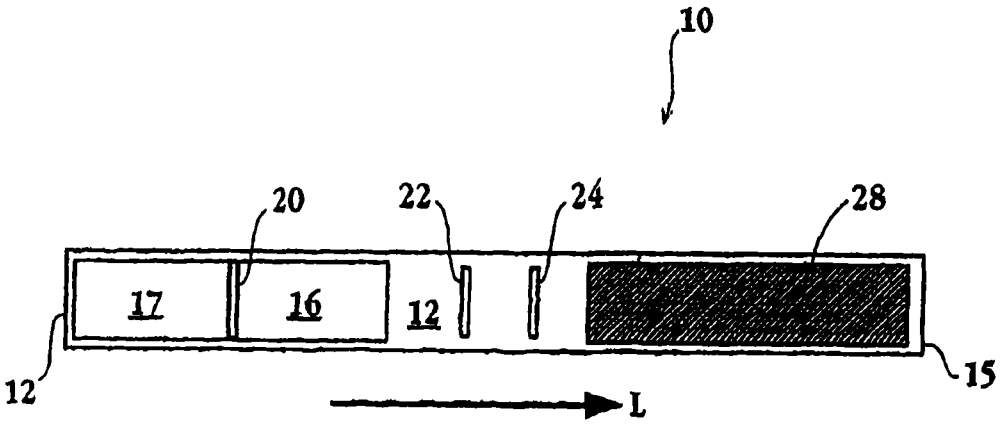

图 1

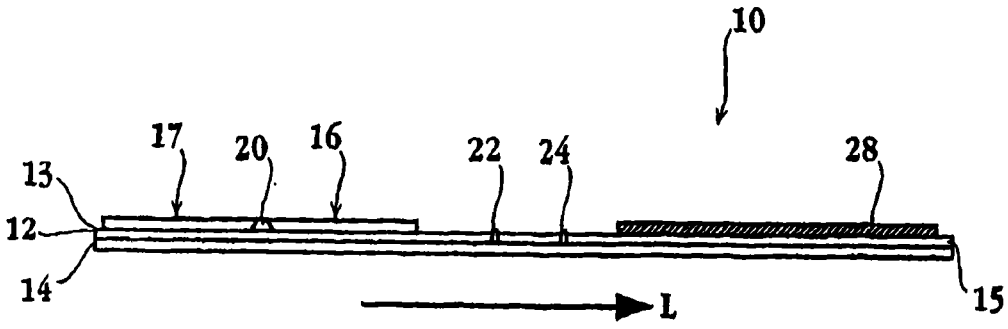

图 2

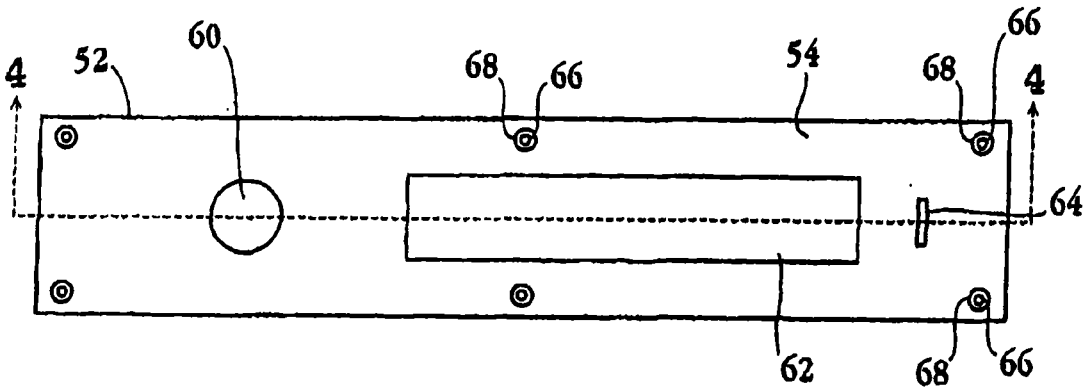

图 3

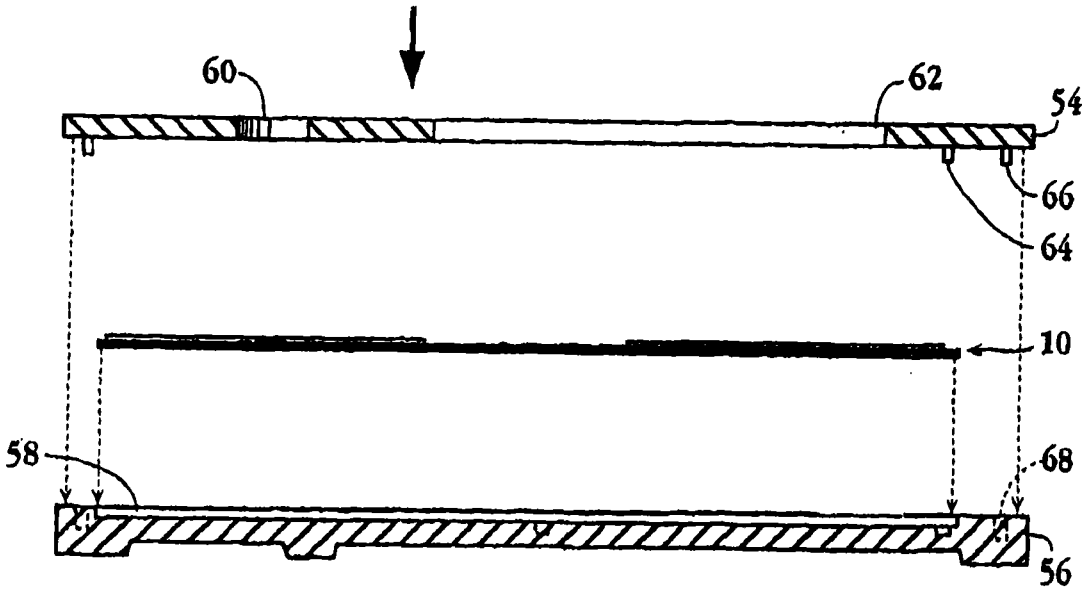

图 4