(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 1769295 B
(45)授权公告日 2011.09.14

(21)申请号 200510084709.5

(22)申请日 1999.09.20

(30)优先权数据
09/156,486 1998.09.18 US
09/397,110 1999.09.16 US

(62)分案原申请数据
99811042.6 1999.09.20

(73)专利权人 比南股份有限公司
地址 美国缅因州

(72)发明人 N·J·穆尔 M·K·芬顿
V·A·库奇纳 E·V·莫洛科夫

(74)专利代理机构 浙江杭州金通专利事务所有限公司 33100
代理人 徐关寿

(51)Int.Cl.
C07K 14/195(2006.01)
C07K 16/12(2006.01)
C07K 1/14(2006.01)
C07K 1/22(2006.01)

(56)对比文件
CN 1156826 ,1997.08.13, 全文.
LARRY G.BENNETT 等,.Binding studies with antibodiew having phosphorylcholinespecificity and fragments derived from their homologousstreptococcus pneumoniae type 27 capsular pholysaccharide".the journal of immunology122 6.1979,122(6),2356.

审查员 周霞

权利要求书 1 页 说明书 13 页 附图 2 页

(54)发明名称

使用纯化的抗原特异性抗体快速检测肺炎链球菌的体外方法和材料

(57)摘要

公开了一种肺炎链球菌的纯化的细胞壁C-多糖抗原,其含有不多于10%重量的蛋白质,如下获得:(a)处理肺炎链球菌培养物,杀死细菌细胞;(b)在约7.0-7.4的弱碱性pH条件下,分离作为湿细胞沉淀的被杀死的细菌细胞;(c)将沉淀与足量的0.1NNaOH一起保温至少45分钟,所述0.1NNaOH将其pH提高到超过12.0,溶液中混合;(d)用强酸将溶液调节到pH3以下,诱使其分层;(e)分离上清液,并用强蛋白酶处理,除去蛋白质;(f)分离出肺炎链球菌的纯化的细胞壁C-多糖抗原,它含有不多于10%重量的蛋白质。还公开了在动物体内产生的针对肺炎链球菌或其细胞壁C-多糖抗原的多价抗体。

CN 1769295 B

1. 一种肺炎链球菌的纯化的细胞壁C-多糖抗原，其特征在于，该细胞壁C-多糖抗原含有不多于10％重量的蛋白质，所述多糖抗原是通过以下方法获得的：

(a) 处理肺炎链球菌培养物，以杀死细菌细胞；

(b) 在弱碱性pH条件下，分离作为湿细胞沉淀的被杀死的细菌细胞；

(c) 将步骤(b)的沉淀与足量的0.1N NaOH一起保温至少45分钟，所述0.1NNaOH将其pH提高到碱性一侧；

(d) 用强酸将来自步骤(c)的溶液调节到酸性pH以下，诱使其分层；

(e) 分离步骤(d)的上清液，并用蛋白酶处理，除去蛋白质；

(f) 分离出肺炎链球菌的纯化的细胞壁C-多糖抗原，它含有不多于10％重量的蛋白质。

2. 如权利要求1所述的肺炎链球菌的纯化的细胞壁C-多糖抗原，其特征在于，该细胞壁C-多糖抗原含有5-8％重量的蛋白质，其中用叠氮化钠处理杀死步骤(a)中的细菌细胞。

3. 如权利要求1所述的肺炎链球菌的纯化的细胞壁C-多糖抗原，其特征在于，所述步骤(b)中的碱性pH是7.2。

4. 如权利要求1所述的肺炎链球菌的纯化的细胞壁C-多糖抗原，其特征在于，所述步骤(c)中的碱性pH是12.34。

5. 如权利要求1所述的肺炎链球菌的纯化的细胞壁C-多糖抗原，其特征在于，所述步骤(d)中的pH是2.75。

6. 如权利要求1所述的肺炎链球菌的纯化的细胞壁C-多糖抗原，其特征在于，所述步骤(e)中的蛋白酶是蛋白酶K。

7. 在动物体内产生的针对肺炎链球菌或其细胞壁C-多糖抗原的多价抗体，其特征在于，所述多价抗体经过亲和纯化，所述亲和纯化是将其通过层析亲和柱而赋予其抗原特异性，所述层析亲和柱上的凝胶全部是非离子交换材料，在所述非离子交换材料上偶联有权利要求1所述的纯化的细胞壁C-多糖抗原。

8. 在动物体内产生的针对肺炎链球菌或其细胞壁C-多糖抗原的多价抗体，其特征在于，所述多价抗体经过亲和纯化，所述亲和纯化是将其通过层析亲和柱而赋予其抗原特异性，所述层析亲和柱上的凝胶全部是非离子交换材料，在所述非离子交换材料上偶联有权利要求2所述的纯化的细胞壁C-多糖抗原。

9. 权利要求1所述的肺炎链球菌的纯化的细胞壁C-多糖抗原的用途，其特征在于，用于制备针对肺炎链球菌的纯化的细胞壁C-多糖抗原的多价抗体。

10. 如权利要求9所述的用途，其特征在于，所述细胞壁C-多糖抗原是权利要求2所述的细胞壁C-多糖抗原。

使用纯化的抗原特异性抗体快速检测肺炎链球菌的体外方法和材料

[0001] 本申请是 1999 年 9 月 20 日提交的申请号为 99811042.6，名为使用纯化的抗原特异性抗体快速检测肺炎链球菌的体外方法和材料的发明专利的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及一种特异和灵敏的，可在 15 分钟内完成的免疫层析（“ICT”）试验，用于检测呈现肺炎链球菌感染临床症状病人的体液，如尿或脑脊髓液中的肺炎链球菌。

背景技术

[0003] 肺炎链球菌（“S.pneumoniae”）是一种肺炎类疾病和其它下呼吸道感染（如支气管炎），和上呼吸道感染，如感染性中耳炎和鼻窦炎，以及播散性侵袭性感染，包括菌血症和脑膜炎的致病生物体。当未被正确诊断和治疗时，肺炎链球菌肺部感染会导致心包炎、脓胸、暴发性紫癜、心内膜炎和至少一种关节炎，在每种病例中，肺炎链球菌都是致病生物体。这些肺部感染常常是菌血症或脑膜炎的前驱。目前诊断和治疗肺炎链球菌引起的肺炎仍在一定程度上是凭经验的。

[0004] 在一个显著的程度上凭经验，这是因为现行检测肺炎链球菌的试验是 (1) 费时、费力，需要仪器的辅助来阅读结果，或 (2) 缺乏灵敏性和 / 或特异性。由于问题和缺乏灵敏度和 / 或特异性有关，所以医生倾向于给肺炎型呼吸道感染病人开昂贵、广谱抗生素处方，而不是足以治愈该感染的、对肺炎链球菌有特效的、较不昂贵的抗生素。这种和其它形式的滥用广谱抗生素当然是今天众所周知的、许多类型感染性细菌对原先高效抗生素的抗性增加而产生的医学危机的主要原因。这种危机和对于至少某些病人凭经验诊断和治疗而引起的潜在不良后果，是为什么需要检测人体液中肺炎链球菌的可靠和快速的试验的原因之一。

[0005] 肺炎链球菌肺炎是一种严重疾病，估计每年仅在美国每 1000 个人中要发生 1-5 例。视患肺炎链球菌肺炎感染病人的年龄和健康状况（基于无关因素），该疾病在感染病人中引起的死亡率为 4-30％。

[0006] 尝试诊断肺炎链球菌疾病，尤其是肺炎的最由来已久的方法，涉及对病人咳出的怀疑携带该病菌的痰进行革兰氏染色和培养，随后作生化鉴定的方法。该程序从开始到结束，需要约 1-4 天。已证明，这是一种不令人满意的诊断方法，因为 (1) 存在于病人唾液中的其它细菌常常长得超过痰培养物，和 (2) 即使病人没有该细菌引起的疾病症状时，肺炎链球菌也常常存在于人上呼吸道中。例如，估计美国 30％的儿童都是肺炎链球菌的习惯性携带者。太多的成人中有肺炎链球菌寄居，而本身不进入疾病状态。儿童和成人的携带率随拥挤状况和在冬天将增加。

[0007] 已开发了协同凝集、乳胶颗粒凝集和对流免疫电泳方法来检测痰标本中肺炎链球菌多糖荚膜抗原，这些方法是快速但未显示可靠的灵敏度或特异性，可能是由于肺炎链球菌有 83 种血清型，每种的免疫原性和其它方面都可能不同。商业上开发的和用于这些试验

的多价抗血清含有针对所有 83 种肺炎链球菌血清型抗原的抗体，但尽管如此，它还是不能检测出免疫原性较低的抗原血清型。该多价抗血清还显示了和其它链球菌以及某些其它感染性细菌，如流感嗜血杆菌 (Haemophilusinfluenza) 的交叉反应性。所以当这些试验用于痰样本时，可能同时随机发生假阴性和假阳性反应。

[0008] 已开发了几种酶联免疫试验 (“EIA”)，它们是基于检测发现在所有肺炎链球菌血清型的肺炎球菌细胞壁都存在着的肺炎球菌 C- 多糖抗原。见例如，Parkinson，A.J.，Rabiego，M.E.，Sepulveda，C.，Davidson，M. 和 Johnson，C.，临床微生物学杂志 30：318-322(1992)。该 C- 多糖抗原是衍生自磷壁酸的、含有磷酸胆碱的多糖。这些 EIA 试验具有可接受的特异性和灵敏度，即使常用于痰样品检测。然而，这些试验每一种都要求在样品收集后 2-3 个小时内进行，而且要用主要在临床实验室中才可得到的仪器。另外，这些试验必须由受过训练的人员，或在其密切监督下进行。

[0009] 对痰样品诊断肺炎链球菌感染的可靠性在对肺炎链球菌肺炎的诊断中常常不令人满意，不仅是由于样品可能被口腔中的其它细菌和 / 或固有的上呼吸道肺炎链球菌污染。而且痰往往很难收集，一旦开始对病人用药，痰中存活的肺炎链球菌数目迅速下降。特别是，如果使用了攻击肺炎链球菌微生物细胞壁的抗生素治疗，痰中 C- 多糖抗原的存在将迅速变得难于检测。当肺炎链球菌引起感染性中耳炎、脑膜炎和各种其它上述感染性疾病状态时，痰样品对诊断并无帮助。

[0010] 对怀疑感染了肺炎链球菌的病人作血培养消除了伴随痰样品的污染问题。当在血清样品中发现含有肺炎链球菌时，可能易于作出哪种细菌是疾病的致病原的诊断。该方法的不足是，所有被肺炎链球菌感染的肺炎病人只有 20％产生菌血症；因此，仅靠血样来诊断肺炎链球菌引起的肺炎可能得到假阴性结果。

[0011] 已发现尿样是最可靠、最方便的用于检测肺炎链球菌肺炎的样品，因为它们是非创伤性获得的；它们不会被口腔微生物菌丛污染；而且即使病人治疗已开始，细菌也一直存在于尿中，虽然浓度水平稳定下降。所以每日监测病人尿样，来评估处方治疗的效力，可得到有用的信息。应注意不呈现疾病症状的肺炎链球菌人类携带者往往不存在足够的病原体，因而他们的尿中不存在肺炎链球菌抗原。

[0012] 一篇新近的文章描述了用 EIA 方法检测脑脊髓液样品，成功诊断了肺炎链球菌引起的脑膜炎。在该 EIA 中，使用了单克隆免疫球蛋白 A 抗磷酸胆碱抗体，以检测 C- 多糖抗原。见 Stuertz，K，Merx，I，Eiffert，H.，Schmutzhard，E.，Mader，M. 和 Nau，R.，36 临床微生物学杂志，2346-2348。获得的结果和 Yolken，R.H.，Davis，D.，Winkelstein，J.，Russell，H. 和 Sippel，J.E.，20 临床微生物学杂志 802-805(1984) 的结果（在一 EIA 中获得，其中使用了两种针对脑脊髓液中肺炎链球菌的抗体——一种针对肺球菌 C- 多糖抗原的马抗体，结合于微量滴定板，和一种针对液相中多糖荚膜抗原的合并兔抗血清）比较，是令人满意的。

发明内容

[0013] 根据本发明，用蛋白质含量低于约 10％的分离和纯化的 C- 多糖抗原，亲和纯化在兔中产生的、针对肺炎链球菌 C- 多糖抗原的抗体。

[0014] 将这些亲和纯化的抗体与一种试剂偶联，该试剂在与测试样品中的肺炎链球菌 C- 多糖抗原、和固定在硝酸纤维素基质上的亲和纯化的 C- 多糖抗体形成夹心时，可产生颜

色反应。

[0015] 在一次性使用的免疫层析试验装置中进行该试验，而且不需要用仪器解释结果。该试验可由未受过实验技术训练的人轻易和成功的进行。

[0016] 用于诊断肺炎链球菌肺炎的优选试样是病人尿，但该试验也可用其它含有肺炎链球菌的体液样品，包括血清和痰。用病人脑脊髓液作为试样可容易的诊断肺炎链球菌引起的脑膜炎。

[0017] 本发明首次提供了一种可在 15 分钟内进行，而且特异性和灵敏度和需要 8-12 倍时间或更长方能获得结果的 EIA 试验至少相等的肺炎链球菌试验。该试验易于进行，不需要特殊训练、装备、或仪器，并能迅速诊断肺炎链球菌引起的肺炎。可在医生的办公室中轻易进行，从而允许病人立即接受特别针对肺炎链球菌的治疗方案。当然该试验还能在临床实验室中进行，但也可在养老院、病人家中或任何怀疑流行肺炎链球菌肺炎或其它病理状态的环境下方便的进行。

[0018] 本发明的试验对出现疾病状态，如中耳炎、支气管炎或鼻窦炎时是重要的，因为一旦可确定这些疾病的任一是由于肺炎链球菌，而不是由其它感染性因子引起的，可立即开始合适的治疗。小儿尤其易患中耳炎，因为他们的咽鼓管长度较短，直径较小，因此早期检测（如存在）出肺炎链球菌，将可很好的预防发生更严重的、或甚至威胁生命的疾病状况。Norris 等，儿科学杂志 821-827(1966) 和 Hongeng 等，130 儿科学杂志 No.5(1997 年 5 月）的论文表明，患有镰刀形红细胞疾病的儿童非常容易感染肺炎链球菌，而肺炎链球菌败血症是这些人中最常见的感染性疾病，那些一旦感染了该病的儿童将有高得多的复发率和随后的死亡率。显然使用本发明的 ICT 试验来常规检验这些病人的尿，将有助于减少对这些论文第二篇推荐的、不停顿使用青霉素作预防。

[0019] 该试验易于进行，能检测尿中肺炎链球菌 C- 多糖抗原，提示该试验应谨慎的在没有相关感染明显症状，报告感觉异常的病人中进行。确定肺炎链球菌有显著足够量存在，以至尿 ICT 试验阳性的这类病人，预示很可能发展成更严重的感染——以及本发明新提出的在该疾病变得严重之前通过施用合适的治疗，可能防止疾病发展。

附图说明

[0020] 本文图 1 和相关的图 1A、1B 和 1C 显示了典型 ICT 装置，适合用于进行本文下面详述的肺炎链球菌试验。

具体实施方式

[0021] 广泛的说，可设计和配置本文所述的肺炎链球菌 ICT 试验，在本领域公开的已知一次性 ICT 装置上进行。优选将它设计成将在包括诊断人呼吸道系统疾病的广泛应用领域中，采用 Howard Chandler 的待批美国专利申请系列号 07/706,639 或其部分延续申请之一所公开类型的 ICT 装置进行的试验。所有上述申请被转让给 Smith-Kline Diagnostics, Inc. 但独家授权给 Binax, Inc.（它被赋予转让该申请的权利）。

[0022] 优选的装置在其一区域中适当充满了抗肺炎链球菌 C- 多糖抗原的抗原特异性多克隆抗体。将标记的抗原特异性抗体加到该装置另一区域中。首先使怀疑含有肺炎链球菌的试样和标记的抗原特异性抗体接触，然后和样品一起流到含有未标记的结合的抗原特异

性抗体的该装置区域，如果样品中存在肺炎链球菌，通过接触，已形成的标记的抗体：C- 多糖抗原偶联物与固定的未标记的亲和纯化的抗体结合，从而产生可见的颜色反应。标记可以是任何本领域已知的、能在标记的抗体：抗原复合物和结合的未标记抗体反应时产生可见颜色的物质。这些标记包括各种极细的金属颗粒、各种有机分子和各种分子组合，如酶和另一种产色分子的组合。在本发明中，胶态金颗粒组成了优选标记。

[0023] 设计试验装置最重要的在于，该试验装置发生反应的两个部位每一处的抗体浓度应充分以确保试样中存在的抗原被标记抗体捕获，而标记的抗体 / 抗原易被样品捕获线处结合的抗体捕获和固定。和本发明相关的实验工作已显示，对肺炎链球菌 C- 多糖抗原的活性抗体必须在试验装置两部位的的每个部位都存在，在这种部位抗原：抗体反应发生的浓度为表面面积每平方毫米 7.7 纳克到 385 纳克之间。如果要发生反应的部位抗原浓度低于 7.7 纳克 / 平方毫米，可能会得到假阴性结果。

[0024] 已知各种亲和纯化抗肺炎链球菌 C- 多糖抗原的抗体的方法。本文下面描述的是本发明优选的，但也可用其它方法代替。然而应注意，本发明亲和纯化的抗体可以和 Sjogren 和 Holme，102 免疫学方法杂志 93-100(1987) 描述的亲核纯化抗体制剂明显不同。这些作者描述了获得含有 17％蛋白质的热苯酚纯化的肺炎链球菌 C- 多糖抗原，将其吸附到离子交换凝胶 DEAE-Sepharose CL6B 上。48 小时培育后，将该制备物以中性 pH7.2 装填入柱。据说该抗原和凝胶的结合效率大约 60％。将抗体加到这些柱上，培育 30 分钟，然后用 0.5M NaCl 的 PBS 溶液洗脱该柱。据知抗原从离子交换柱上渗漏是常常发生的。在该系统中，假设从凝胶上洗脱的产物是原位形成的抗体抗原复合物，而不是本发明的纯化抗原制备物是合理的。应特别注意的是，在本发明中，含有少于 10％蛋白质的纯化抗原与间隔分子，如 BSA- 肼偶联物共价偶联，然后将产生的标记的抗原：偶联配体与层析凝胶 -(如实施例 4 的 Formyl Spherilose) 共价偶联，然后填充柱。加入抗体并用强酸性缓冲液将抗体从柱上的固定抗原上洗脱下来。

[0025] 本文优选的抗体是通过用肺炎链球菌菌株 R6(一种无荚膜的肺炎链球菌菌株，从美国典型培养物保藏中心 ATCC 号 39938 获得，在注射入动物前，加热杀死细胞) 常规注射家兔产生的。经过一段合适时间后，对动物取血，获得含有所需抗体的血清，然后纯化。可用其它针对肺炎链球菌 C- 多糖抗原的抗体代替本文具体描述的那些，而不违背本发明。

[0026] 首先，应测试该抗体与其它常见感染性细菌的交叉反应性。用 ELISA 法测试了本文所称的优选抗体的交叉反应性，测试的细菌如下：弗氏柠檬酸杆菌 (Citrobacter freudii)，金黄色葡萄球菌 (Staphylococcus aureus)，阴沟肠杆菌 (Enterobacter cloacae)，粪肠杆菌 (Enterobacter faecalis)，链球菌 B 组 III 型，大肠杆菌，脑膜炎奈瑟氏菌 (Neisseria meningitidis)，古巴沙门氏菌 (Salmonella cubana)，甲型副伤寒沙门氏菌 (Samonella paratyphiA)，肺炎克雷伯氏菌 (Klebsiella pneumoniae)，链球菌 B 组 I I 型，表皮葡萄球菌 (Staphylococcus epidermidis)，肠炎沙门氏菌 (Salmonellaenteritidis)，链球菌 A 组，粘质沙雷氏菌 (Serratia marcescens)，白色念珠菌 (Candida albicans)，流感嗜血菌 (Haemophilus influenza)，粘膜炎莫拉氏菌 (Moraxella catarrhalis)，库氏棒杆菌 (Corynebacterium kutscheri)，恶臭假单胞菌 (Pseudomonas putida)，普通变形菌 (Proteus vulgaris)，鸟肠球菌 (Enterococcus avium)，鲍氏不动杆菌 (Acinetobacter baumannii)，产酸克雷伯氏

菌(Klebsiella oxytoca),鲁氏不动杆菌(Acinetobacter lwoffii),铜绿假单胞菌(Pseudomonas aeroginosa),腐生葡萄球菌(Staphylococcus saphrophyticus),耐久肠球菌(Enterococcus durans),牛棒杆菌(Corynebaterium bovis),奇异变形菌(Proteus mirabilis),施氏假单胞菌(Pseudomonas stutzeri),洋葱伯克霍尔德氏菌(Pseudomonas cepacia),伤寒沙门氏菌(Salmonella typhi),链球菌F组,链球菌B组1a型,类星形念珠菌(Candida stellatoides),副血链球菌(Streptococcus parasanguis),链球菌G组,链球菌C组,变异链球菌(Streptococcusmutans),摩氏摩根氏菌(Morganellamorganii),溶血葡萄球菌(Staphylococcus haemolyticus),乙型流感嗜血菌,嗜麦芽糖寡养单胞菌(Stenotrophomonas maltophilia),丁型流感嗜血菌,阴道加德纳氏菌(Gardnerella vaginalis),缓症链球菌(Streptococcus mitis),副流感嗜血菌(Haemophilus parainfluenzae),血链球菌(Streptococcussanguis)和不能分型的流感嗜血菌。

[0027] 发现仅有的明显交叉反应性是和缓症链球菌和金黄色葡萄球菌。前者,缓症链球菌,是心内膜炎的病原体,医生可轻易的从临床上将有其显著症状的病人和肺炎链球菌肺部感染的病人区分开来。缓症链球菌含有与肺炎链球菌相同的C-多糖抗原,而且两者具有相同的引起心内膜炎的能力。虽然肺炎链球菌通常仅在初期肺炎未受到适当治疗的病人中引起该疾病,而且病人随后可能发生菌血症和/或心内膜炎或其它病原性二次感染。相反,缓症链球菌不是肺炎的病原体;缓症链球菌引起的心内膜炎通常不伴随任何其它感染。因此,相信当需要时,可用本发明的试验确认怀疑患缓症链球菌引起的初期心内膜炎病例。然而应注意的是,缓症链球菌比肺炎链球菌在尿中要存在的可能性少,因此在该情况下血清试验将更可能获得可信的信息。

[0028] 已知某些金黄色葡萄球菌菌株分泌蛋白A,一种非特异性蛋白,能不加区别的和IgG结合,因此能和所有抗体结合。可通过本领域熟知的其它简单试验轻易的确定或排除这些金黄色葡萄球菌物质的存在。(如实施例9所示,无蛋白A的金黄色葡萄球菌菌株显示对本发明的抗体无交叉反应性。)观察到对流感嗜血菌的微量交叉反应,但相信这点交叉反应在检测尿样肺炎链球菌中不足以产生显著问题。

[0029] 下列实施例说明了亲和纯化本发明抗体的优选模式,包括初步分离和纯化用于抗体纯化的抗原,从而得到抗原特异性多价抗体制备物。

[0030] 实施例1-细菌生长条件

[0031] 在补充了20mM Hepes缓冲液的肺炎链球菌肉汤中培养肺炎链球菌菌株R6(ATCC No.39938)。每升肉汤具有下列组合物:

[0032] 酪蛋白的胰酶消化物 17.0克

[0033] 葡萄糖 10.0克

[0034] NaCl 5.0克

[0035] 大豆粉的木瓜蛋白酶消化物 3.0克

[0036] 酵母抽提物 3.0克

[0037] K_2HPO_4 2.5克

[0038] HEPES 20mM

[0039] 该肉汤在26℃具有起始pH7.2±0.2。在15psi和121℃高压蒸汽灭菌15分钟,放置冷却。

[0040] 将肺炎链球菌菌株 R6(ATCC No.39938) 的冷冻等分接种到 5％绵羊血琼脂平板上，使其生长。将平板上的生长物收集到更小等分的接种肉汤中，将该接种肉汤接种到三个烧瓶中，各含有 1,700 毫升补充的上述组合物的肺炎链球菌肉汤中，在 37℃，5％ CO_2 中搅拌但不通气培养。当肉汤的 pH 下降到 5.5 以下（它的对数晚期）时，从温箱中取出烧瓶，用 0.1％叠氮化钠杀死细胞，将 pH 调节到 7.0 以上，防止自溶。然后将烧瓶保藏在 4℃过夜。翌日，8,000rpm 离心各烧瓶中的悬液 60 分钟。然后合并沉淀，13,000rpm 再次离心 30 分钟。记录沉淀的湿重，将其储藏在 -20℃。

[0041] 实施例 2- 分离含蛋白质少于 10％的肺炎链球菌 C- 多糖抗原

[0042] 将实施例 1 中生长、处理并储藏的细胞室温融化，将其悬浮在 pH7.2 的、含有 0.2％叠氮化钠的磷酸缓冲盐溶液（“PBS”）中，比例为 1.2 毫升缓冲液比 1 克湿细胞，室温放置两天。

[0043] 然后按每 1 克湿细胞 11 毫升 0.1N 的 NaOH 加到肺炎链球菌悬液（磷酸缓冲盐中）中，得到 pH12.34（用 pH 计测量），约 30℃培育 45 分钟。然后用 2N HCl 将悬液 pH 调节到 2.75（用 pH 计测量），然后 3,500rpm 离心悬液 25 分钟。然后分离上清液，用 1N NaOH 将其 pH 调节到 7.0-7.1。该基本中性的上清液置于透析管（从 Spectra/Por 获得，具有 12,000 到 14,000 的分子量截留值）中 4℃对水透析两日。在真空旋转蒸发器上浓缩该透析上清液 25-40 倍。

[0044] 按每克湿细胞加入 0.20mg 的蛋白酶 K（购自 Boehringer Mannheim），混合物置于 37℃ 3.5-4 小时，然后室温过夜至第二天。

[0045] 用蛋白酶 K 消化后，在 Spectra/Por 的具有 12,000-14,000 的分子量截留值的透析管中 4℃对水透析得到的上清液。然后将透析上清液分成 12 等份，各置于 30 毫升玻璃管中，和等体积的 90％苯酚混合。密封试管，在热水浴中 68-72℃培育 23 分钟，水平面比试管中的混合物平面稍高。不时用玻璃的 Pasteur 移液管搅拌各试管中的悬液制备肉眼看来更均匀的悬液。在该培育后，室温放置悬液 30 分钟，然后 5,000rpm、15℃离心 40 分钟。

[0046] 接着，将各试管中的上方水相用玻璃针筒小心吸出；对于各试管，仔细测量该水相的体积，用等体积的新鲜水替换。再次进行 68-72℃培育，然后 5,000rpm、15℃离心 40 分钟的步骤，再重复一次。

[0047] 然后用玻璃针筒小心吸出各试管下面的苯酚相，剩下中间层（混合的水 - 苯酚）和上层（水）相在试管中。此时，将含有与合并的从试管中抽提的苯酚相体积比为 10 ： 1 的冷乙醇的烧瓶置于冰浴中。缓慢将苯酚相滴加到烧瓶中，一面充分搅拌。加入所有苯酚相后，继续搅拌 10-15 分钟，然后将混合物置于 4℃的冰箱中，放置过夜，以形成 C- 多糖抗原沉淀。翌日，12,000rpm、4℃离心该混合物 20 分钟。将产生的 C- 多糖抗原沉淀以每克湿细胞悬浮在 0.4 毫升水中，4℃对蒸馏水透析过夜，使用上述具有 12,000-14,000 截留分子量的 Spetra/Por 透析管。冻干得到的 C- 多糖抗原水溶液并称重。用 Lowry 法评估其蛋白浓度；用蛋白质免疫印迹试验在 SDS-PAGE（12％凝胶）上检查其成分并用 ELISA 检查其 C- 多糖抗原活性。

[0048] 该操作重复多次。发现肺炎链球菌 C- 多糖抗原的总产量是每克肺炎链球菌 R6 菌株湿细胞 1.2-1.4％，而其蛋白质含量在约 5-8％之间。

[0049] 应注意的是，一般蛋白质含量超过 10％的 C- 多糖抗原制备物与蛋白质含量少于

10％的制备物相比，不能满意的用于本发明。

[0050] 实施例 3- 抗原 BSA 偶联物的制备

[0051] 为了将纯化的肺炎链球菌菌株 R6 的 C- 多糖抗原和层析柱偶联，以亲和纯化兔抗 - 肺炎链球菌菌株 R6 的抗体，选择了 BSA- 肼偶联物。还可选择和偶联其它具有相似功能的已知物质来执行该偶联功能。

[0052] 如下制备了 BSA- 肼偶联物：

[0053] 将从 Aldrich Chemical Co. 获得的二盐酸肼溶解在水中，得到 0.5M 溶液。用无水 NaOH 将 pH 调节到 5.2，加入 Sigma Chemical Co. 的无水牛血清白蛋白（“BSA”），产生最终浓度为每毫升溶液 25 毫克 BSA。BSA 完全溶解后，加入一定量的 N-（二甲基氨基丙基）-N^1- 乙基碳二亚胺盐酸盐（购自 Fluka Chmical Co.），产生最终浓度为每毫升 2.5 毫克的溶液。室温培育该反应混合物，持续搅拌过夜。翌日，4℃对蒸馏水充分透析。在 Beckman DU640 分光光度计上在 280 纳米处测量偶联物浓度（作为 BSA 浓度）。

[0054] 为了将该偶联物与肺炎链球菌菌株 R6C- 多糖抗原偶联，程序如下：

[0055] 将该抗原的无水制备物溶于蒸馏水，其量为每毫升 1.1 毫克。用稀 HCl 将溶液 pH 调节到 5.0-6.0。用稀 HCl 处理浓度为 23 毫克 / 毫升的 BSA ：肼偶联物水溶液，将其 pH 调到 4.0 和 5.0 之间，然后将该溶液以体积比为约 1 ： 6.65（重量比约 3 ： 1）缓慢加到抗原溶液中。搅拌 3 分钟后，将溶于 100-200 毫升蒸馏水的 N-（二甲基氨基丙基）-N^1- 乙基碳二亚胺盐酸盐（购自 Fluka Chemical Co.）加到该反应混合物中，N- 乙基碳二亚胺盐酸盐与 C- 多糖抗原的重量比是约 1-1.92。

[0056] 室温搅拌 2 小时后，用稀 NaOH 将得到的混合液 pH 调节到约 9.0。继续在室温下搅拌该培养物 1 小时，然后 4℃过夜。

[0057] 实施例 4- 亲和柱制备和抗体纯化

[0058] 在实施例 3 的配体溶液中，加入稀 HCl 使其 pH 至 7.0。选择 Isco Inc. 的 FormylSpherilose 作为免疫吸附凝胶的基质。用已知程序，如“Spherilose 应用”，ISCO 应用简报 78，28-35 页所述的，将 C- 多糖抗原的配体和该基质偶联。可用其它已知基质和偶联程序代替。

[0059] 将凝胶填装入柱，并用蒸馏水、0.2M pH2.5 的甘氨酸 -HCl 溶液、3 倍离子强度的 pH7.2 磷酸缓冲盐水和常规强度的 pH7.2PBS 洗涤，每种溶液用 5-10 凝胶柱体积。

[0060] 然后用得到的活化柱亲和纯化抗体，从而产生了抗原特异性抗体，如下：

[0061] 将针对热杀死全细胞的肺炎链球菌菌株 R6(ATCC 号 39938) 的兔抗血清与无水 NaCl 混合，使 NaCl 最终浓度为 0.5M，8,500rpm 离心该混合物 20 分钟，将上清液滤过棉花。将滤液加到亲和柱上。用三倍强度的 pH7.2 磷酸缓冲盐水和常规强度的 pH7.2 的磷酸缓冲盐水从柱上洗涤除去未结合的成分。用 0.2M pH2.5 甘氨酸 -HCl 缓冲液从柱上洗脱出抗体。在 Beckman 分光光度计上 280 纳米处监测洗脱液，将含有抗体的组分合并在置于冰浴中的烧瓶内。用 pH9.0、0.5M NaH_2PO_4 水溶液中和合并的组分。

[0062] 在分光光度计上，用 280 纳米处的吸光度值评估抗体的浓度。

[0063] 对 pH7.2 的 PBS 透析抗体溶液，在从 Amicon 获得的 PM-10 滤膜上浓缩，直到达到 0.8-1.5mg/ml 的抗体浓度。

[0064] 发现从如此处理的每 25 毫升肺炎链球菌菌株 R6 的兔抗血清中可回收 18-20 毫克

亲和纯化的抗体。

[0065] 如在下一个实施例中所述，在肺炎链球菌 C- 多糖抗原特异性的 ICT 试验中采用了这些亲和纯化的抗体。

[0066] 实施例 5-ICT 装置及其制备

[0067] A. 试验装置的制备：

[0068] 如图 1 所示，制备了一试验装置，它含有一装有铰链的纸板箱，箱上有一窗口，可同时观察试验结果和对照结果。该装置有一凹槽，在槽中置有预制的塑料拭子孔，用于接受右侧沾有样品的拭子（在图中标为 1）。然后将图 1A 中所示的外贴条贴在该装置的整个右侧。该外贴条上有两个孔—下方的孔（在图 1A 中标为 B）中将插入饱和的拭子，而上方的（在图 1A 中标为 B）孔可将插入孔 B 的拭子推到该孔（A）中。外贴条和它的孔 A 和 B 的位置，和拭子孔共同操作，在试验过程中可将拭子固定在恰当位置，并促进吸附的液体从拭子上排出。

[0069] 如下所述，将一预装配的测试条（图 1 中标为 C）插入凹槽（图 1 中标为 2），并通过与凹槽底部粘合而固定。将图 1B 中所示的外贴条置于左手侧顶部。它上面有一个孔（图 1B 中标为 D），当该装置关闭进行试验时孔 D 和右侧的孔 A 相匹配。

[0070] 将装配好的该装置保存于密封的、装有干燥剂的袋中，直到使用。在密封和储藏前，将一条略带粘性的胶带置于该装置右半边的外缘上。

[0071] B. 测试条的构建和制备

[0072] 图 1C 显示了预装配条的构建。它由一块吸收材料的偶联物纸垫构成，其中浸润了金颗粒和如上所述的抗原特异性家兔抗—肺炎链球菌 C- 多糖抗原抗体的偶联物。一块桥梁纸垫 Ahlstrom1281（未显示）将该偶联物纸垫和硝酸纸垫连接，它上面有一条与该偶联物反应的样品捕获线，它是通过嵌入如上所述制备的一条抗原特异性的家兔抗—肺炎链球菌 C- 多糖抗原的抗体条建立的。硝酸纤维素纸垫还有一条下游对照线，通过用山羊抗—家兔免疫球蛋白（IgG）在板上划线建立。沿着硝酸纤维素纸垫，该条带终止于吸收纸垫，吸收纸垫起到液体贮器的作用。所有这些纸垫背面都用黏胶带固定并置于装置中。

[0073] 偶联物纸垫常用无纺聚酯或挤压乙酸纤维素酯制备。为了制备用于该试验的纸垫，将 50 纳米直径的金颗粒与如上所述制备的亲和纯化的家兔抗—肺炎链球菌 C- 多糖抗体偶联。用已知的，如 DeMay 于 Polak，J.M. 和 Van Norden，S.（编），免疫化学：现代方法和应用（Wright，bristol，England，1986）所述的方法实现了该偶联。将偶联金颗粒与干燥剂混合，该干燥剂由含有 1.0％ BSA、0.1％ Triton X-100、2.0％ Tween20、6.0％蔗糖和 0.02％叠氮化钠的，pH8.0 的 5mM 四硼酸钠水溶液构成。对纸垫充分加热，除去所有存在的液体，并储藏在低湿度环境中，直到装配测试条。这些纸垫及其处理是特别选定的，从而使纸垫能保持住干燥的偶联物，并仅在随后被样品浸湿时才释放它。

[0074] 首先将一纸条亲和纯化的家兔抗—肺炎链球菌 C- 多糖抗体（用磷酸缓冲盐水作载体溶液）嵌入硝酸纤维素纸垫的第一部分。这些抗体作为捕获线。在装配好的测试装置第一部分的下游，纸垫的第二部分中，用溶于同一载体溶液的山羊抗—家兔 IgG 在该纸垫表面划线，建立对照线。然后 18-25℃干燥硝酸纤维素纸垫，以促使蛋白质划线条被纸垫永久吸收。

[0075] 所用的吸水纸垫是可商品购得的以商品名 Ahlstrom939 出售的纤维素材料。该纸

垫不需要特殊处理。

[0076] C. 试剂盒制备

[0077] 如商品所售，装配含有做好的测试条的该试验装置。在实施中，许多装置和同等数量的拭子包装在一起，这些拭子采用纤维状 Dacron，以及一瓶“试剂 A”，装试剂 A 的该瓶子有一适合滴加试剂 A 的瓶盖。“试剂 A”是 2.0% Tween20，0.05%叠氮化钠和 0.5%十二烷基磺酸钠的 0.05MpH6.5 柠檬酸钠—磷酸钠缓冲液的溶液。在各试剂盒中还包括了阳性和阴性对照。

[0078] 实施例 6- 进行 ICT 试验

[0079] 在实施中，将各装置配备的拭子浸入液体样品中，完全浸没拭子头。拭子的用途是作为液体生物学样品，如尿、血液、淋巴液等，和环境学液体样品中存在的不溶解固体、半固体和胶体的过滤器，在 Norman Moore 和 Vincent Sy，1998 年 3 月 19 日提交的待批申请号 09/044,677（随后被转让给 Binax，Inc.）的内容中有所描述。将拭子插入该装置底部的孔（图 1A 的孔 B），并轻轻向上推，使拭子尖端在顶部孔（图 1A 的孔 A）中可见。将试剂 A 小管垂直倒置于孔 B 上方，缓慢滴加 3 滴试剂 A。然后立即剥离该装置右侧边缘的粘性带，关闭该装置，安全密封，从而将拭子孔中的拭子推入正对金偶联物纸垫的拭子孔。15 分钟后，可在该装置窗口读到结果。阴性样品—即不含肺炎链球菌 C- 多糖抗原的样品—将在窗口上半部只显示对照线。含有靶抗原的阳性样品将显示两条线，下面的一条是病人（或样品）线；甚至一条微弱的样品线也表明样品中存在的靶抗原。如果 15 分钟后在窗口中还未出现任何线条，或仅在窗口下半部出现样品线，则该试验是无效的，必须重做。

[0080] 使用上述程序，在前述 ICT 程序中以实施例 5 所述制备的装置对 146 个来自疾病控制中心的病人尿样测试。由于与肺炎链球菌感染有关的病人诊断是根据各种不同指标，包括血培养、革兰氏染色、痰培养、自溶酶 PCR 和肺炎球菌自溶酶 PCR，但没有尿试验结果，在我们的实验室中每个样品都用本文所述的 ICT 和 ELISA 测试了肺炎链球菌 C- 多糖抗原的存在。

[0081] 进行 ICT 和 ELISA 试验的人员未被告知疾病控制中心对这些尿样是从诊断为肺炎链球菌感染阳性还是从阴性的病人中得到的。发现 ICT 和 ELISA 的结果在最低的程度上，在 134 个例子中灵敏度和特异性是基本相当的。然而要注意，某些例子中 ELISA 和 ICT 试验的结果都和疾病控制中心提供的病人诊断不完全一致。据信，本领域认为这种培养结果的评价不足以作为诊断肺炎链球菌感染的基础，并且不能提供任何关于给予病人何种药物治疗的信息、或不能提供相对于采集尿样时间的开始治疗的时间信息，这阻碍了对所有结果进行有意义的完全比较。

[0082] 在 134 例中 ICT 和 ELISA 结果基本可比，从而肯定了本发明的 15 分钟 ICT 试验可提供对肺炎链球菌引起的感染的快速诊断和随之早期制定最有效的病人治疗方案的优点。

[0083] 实施例 7- 临床试验

[0084] 用实施例 5 所述制备的装置，和实施例 6 第一段所述的 ICT 程序，在 3 个地点用特征明确的标本库进行了临床研究。包括住院和门诊病人的 273 份尿样品。在 273 个病人中，35 个得出血培养阳性结果，238 个得出血培养阴性结果（应注意的是，培养方法常常随地方变化有很大的不同）。推测血培养阳性的病人尿样是在采集血样并开始施用抗生素 24 小时内收集的。在血培养试验阴性的 238 个病人的尿样中，28 个是从菌血症病人收集的，4 个是

从脓胸病人收集的，53 个是从肺炎病人收集的，而 153 是从患有尿道感染的病人收集的。

[0085] 另外，在本发明与实施例 5 制备的装置和实施例 6 所述 ICT 程序的试验中，从患有未知感染的个人中收集了 100 个尿样。这些人的血样培养试验阴性。

[0086] 在血培养试验中测试肺炎链球菌阳性的 35 个病人尿中，30 个本发明试验结果阳性，5 个结果阴性。在病人的 338 个尿样品中，血培养试验均为阴性，100 个被假定为阴性；在本发明试验中 21 个阳性，317 个测试阴性。计算出 ICT 试验的灵敏度为 86％，特异性是 94％，准确率是 93％。

[0087] 应注意的是，尿肺炎链球菌 ICT 测试阳性，和血培养肺炎链球菌呈阴性结果的病人中，用其它试验确定，患有尿道感染的病人中，5 人有大肠杆菌感染，2 人有阴沟肠杆菌感染，3 人有乳杆菌感染，1 人有斯氏普罗威登斯菌 (PovidenciaStuartii) 感染，1 人有金黄色葡萄球菌感染，1 人有链球菌（非甲非乙）感染，1 人有链球菌（非丁）感染。患肺炎的两人也有结核分枝杆菌 (Mycobacteriumtuberculosis) 感染，1 人有堪萨斯分枝杆菌 (Mycobacterium kansasii) 感染。1 位菌血症病人也有奇异变形菌 (Proteus mirabilis) 感染。4 位未知感染的病人尿样用本发明的 ICT 试验测试为阳性。

[0088] 实施例 8- 临床试验

[0089] 在 7 家医院进行了试验，6 家在美国，1 家在西班牙，评估了 215 位住院和出院病人（患有下呼吸道症状和败血症症状之一，或怀疑携带肺炎球菌）的尿样。在这些试验中，在实施例 6 的程序中使用了根据实施例 5 制备的装置，将结果和对同一病人的血样进行的血培养结果比较。未进行确定培养方法在参与的医院之间的一致性。

[0090] 血培养评估结果肺炎链球菌 31 个阳性和 184 个阴性。在 31 个血培养阳性的病人中，对尿样进行本发明的 ICT 试验显示 28 个阳性和 3 个阴性。对于 184 个血培养结果阴性的病人，45 个尿样本发明 ICT 试验为阳性，而 139 个病人尿样测试为阴性。该测试中本发明试验的灵敏度计算为 90％，特异性为 76％，准确率为 78％。

[0091] 必须结合与培养试验有关的公知问题，以及约 80％肺炎球菌感染病人不产生含有肺炎链球菌的血样的可能性，来考虑实施例 7 和实施例 8 中本发明的 ICT 试验获得的结果。相信用本发明的试验作进一步实验，将令人可信的证明其特异性、灵敏度和准确率在实施例 7 和 8 中被低估了，因为使用了血培养实验作为比较。

[0092] 实施例 9- 进一步的交叉反应性试验

[0093] 使用实施例 5 制备的装置和实施例 6 的程序，测试了浓度为 10^6-10^9CFU/ml 的 144 种细菌。测试的各细菌在合适的琼脂上生长，并在 37℃，5％ CO_2 培育过夜，检查平板的纯度，选择良好分离的菌落用于测试。

[0094] 在 144 种细菌中，仅一种—缓症链球菌 ATCC#49456，得出了阳性结果，从而是交叉反应性的。这是如上文预期的，因为已知缓症链球菌含有本发明的试验设计要检测的 C- 多糖细胞壁抗原。

[0095] 下列每种细菌都获得了本发明试验的阴性结果：无硝不动杆菌 (Acinetobacter anitratus)(ATCC#49136)，鲍氏不动杆菌 (Acinetobacterbaumanii)(ATCC#1906-T)，乙酸钙不动杆菌 (Acinetobacter calcoaceticus)(ATCCNo.49466)，溶血不动杆菌 (Acinetobacter haemolyticus)(ATCC#19002)，腺病毒 2 和 3（从疾病控制中心获得的合并纯培养样品），粪产碱菌 (Alcaligenesfaecalis)(ATCC#6633)，百日咳博德特氏菌

(Bordetella pertussis)(ATCC#3467)，粘膜炎布兰汉氏球菌(Branhamella catarrhalis)(ATCC#25238-T)，皮炎芽生菌(Blastomyces dermatitidis)(从疾病控制中心获得的纯培养物，菌株号未知)，白色念珠菌(Candida albicans)(ATCC#e10231，14053和60193，每种分别测试)，类星形念珠菌(Candida stellatoides)(ATCC#11006)，弗氏柠檬酸杆菌(Citrobacter freudii)(ATCC#375GT)，粗球孢子菌(Coccidiodes immitis)(疾病控制中心获得的纯培养物，菌株号未知)，库氏棒杆菌(Corynebacteriumkutscheri)(ATCC#15677-T)，马氏棒杆菌(Corynebacterium matruchotii)(ATCC#14266-T)，假白喉棒杆菌(Corynebacterium pseudodipheriticum)(ATCC#10700-T)，阴沟肠杆菌(Enterobacter cloacae)(ATCC#1304-T，23355，35030和49141，每种分别测试)，鸟肠球菌(Enterococcus avium)(ATCC No.49462)，耐久肠球菌(Enterococcus durans)(ATCC#49135)，屎肠球菌(Enterococcusfaecalis)(ATCC#19433-T，29212，49477，49478，49149和51299，每种分别测试)，大肠杆菌(Escherichia coli)(ATCC#23513，8739，23514，25922，35218，1173GT，35421和15669和一种未编号的样本，各分别测试)，赫氏埃希氏菌(Escherichia hermannii)(ATCC#33650-T和4648GT，各分别测试)，吲哚金黄杆菌(Flavobacterium indologenes)(ATCC#49471)，脑膜炎金黄杆菌(Flavobacterium meningosepticum)(ATCC#49470)，阴道加德纳氏菌(Gardnerella vaginalis)(ATCC#14018-T)流感嗜血菌(Haemophilusinfluenzae)(ATCC#9006)，流感嗜血菌b(Haemophilus influenzae，b)(ATCC#9795和33533，每种分别测试)，流感嗜血菌c(ATCC#9007)，流感嗜血菌d(ATCC#9008)，流感嗜血菌e(ATCC#8142)，流感嗜血菌f(ATCC#9833)，流感嗜血菌NT(ATCC#49144，49247和49766，每种分别测试)，副流感嗜血菌(ATCC#3339Z-T，从疾病控制中心作为纯培养物获得)，荚膜组织胞浆菌(Histoplasmacapulatum)(从疾病控制中心获得的两种分离的纯培养物，每种分别测试)，产酸克雷伯氏菌(Klebsiella oxytoca)(ATCC#43086和49131，每种分别测试)，肺炎克雷伯氏菌(Klebsiella pneumoniae)(ATCC#13882，13883-T和49472，每种分别测试)，嗜酸乳杆菌(Lactobacillus acidophilus)(ATCC#4356)，干酪乳杆菌(Lactobacillus casei)(ATCC#393)，加氏乳杆菌(Lactobacillus gasseri)(ATCC#33323)，詹氏乳杆菌(Lactobacillus jensenii)(ATCC#25258)，侵肺军团菌(Leginella pneumophila)(ATCC#33152)，单核细胞增生利斯特氏菌(Listeriamonocytogenens)(ATCC#7644)，藤黄微球菌(Micrococcus luteus)(ATCC#9341和49732，各分别测试)，奥斯陆莫拉氏菌(Moraxella osloensis)(ATCC#15276)，摩氏摩根氏菌(Morganella morganii)(ATCC#25830-T)，生殖道枝原体(Mycoplasma genitalium)(ATCC#33530，从疾病控制中心作为纯培养物获得)，人型枝原体(Mycoplasma hominis)(ATCC#27545，从疾病控制中心作为纯培养物获得)(Mycoplasma pneumoniase)(FH2型，从疾病控制中心作为纯培养物获得)灰色奈瑟氏菌(Neisseria cinerea)(ATCC#14685)，淋病奈瑟氏菌(Neisseriagonorrheae)(ATCC#8660，19424-T和27631，各分别测试)，乳糖奈瑟氏菌(Neisseria lactamica)(ATCC#23970-T)，脑膜炎奈瑟氏菌(Neisseriameningitidis)(ATCC#13077-T)，微黄奈瑟氏菌(Neisseria subflava)(ATCC#49275)，皮诺卡氏菌(Nocardia farcinia)(从疾病控制中心作为纯培养物获得)，巴西副球孢子菌(Paracoccidiodes brasiliensis)(菌株#未知，从疾病控制中心作为纯培养物获

得）副流感 1 型（菌株 C39，从疾病控制中心作为纯培养物获得），副流感 2 型（菌株号 A47885，从疾病控制中心作为纯培养物获得），奇异变形菌 (Proteus mirabilis)(ATCC#7002 和 12453，各分别测试），普通变形菌 (Proteusvulgaris)(ATCC#13315-T 和 49132，各分别测试），斯氏普罗威登斯菌 (Providenciastuartii)(ATCC#49809)，铜绿假单胞菌 (Pseudomonas aeruginosa)(ATCC#15442 和 27853，各分别测试），洋葱伯克霍尔德氏菌 (Pseudomonas cepacia)(ATCC#25416-T)，皮氏伯克霍尔德氏菌 (Pseudomonas pickettii)(ATCC#49129)，恶臭假单胞菌 (Pseudomonas putida)(ATCC#49128)，腐败假单胞菌 (Pseudomonasputrefaciens)(ATCC#49138)，施氏假单胞菌 (Pseudomonas stutzeri)(ATCC#17588-T)，合并的呼吸道合胞病毒（病毒株 A2 和 ATCC#18573 的合并样本，从疾病控制中心作为纯培养物获得），鼻病毒 (ATCC#088 和 077，各从疾病控制中心作为纯培养物获得，各分别测试），古巴沙门氏菌 (Salmonella cubana)(ATCC#12007)，肠炎沙门氏菌 (Salmonella enteritidis)(ATCC#13076-T)，甲型副伤寒沙门氏菌 (Salmonella paratyphiA)(ATCC#9150)，伤寒沙门氏菌 (Salmonellatyphi)(ATCC#6539)，粘质沙雷氏菌 (Serratia marcescens)(ATCC#13880-T)，多食鞘氨醇杆菌 (Sphingobacterium multivorum)(ATCC#35656)，金黄色葡萄球菌 (Staphylococcus aureus)(ATCC#12598,6538P,25923,29213,43300 和 49476，各分别测试），表皮葡萄球菌 (Staphylococcus epidermidis)(ATCC#12228,14990-T,49134 和 49461，各分别测试），溶血葡萄球菌 (Staphylococcushaemolyticus)(ATCC#29970-T)，腐生葡萄球菌 (Staphylococcussaprophyticus)(ATCC#15305-T 和 49907，各分别测试），木糖葡萄球菌 (Staphylococcus xylosis)(ATCC#49148)，嗜麦芽糖寡养单胞菌 (Stenotrophomonas maltophilia)(ATCC#13637-T)，咽峡炎链球菌 (Streptococcusanginosus)(ATCC#9895)，牛链球菌 (Streptococcus bovis)(ATCC#49133)，甲型链球菌 (ATCC#1357 和 19615，各分别测试），乙型链球菌 (ATCC#13813-T,12386,12400,12401,27591,12973,12403 和 31475，各分别测试），丙型链球菌 (ATCC#12388)，己型链球菌 (ATCC#12392)，戊型链球菌 (ATCC#12394)，变异链球菌 (Streptolococcus mutans)(Shockman 株），副血链球菌 (Streptococcusparasanguis)(ATCC#15909)，血链球菌 (Streptococcus sanguis)(ATCC#10556-T)，阴道毛单胞菌 (Trichomonas vaginalis)(ATCC#085 和 520，各分别从疾病控制中心作为纯培养物获得，并分别测试）。

[0096] 实施例 10- 对健康和患病儿童的临床实验

[0097] 正在进行对健康和患病儿童的临床实验，至今尚未完成。初期的各地结果显示，使用如实施例 6 中所述制备的装置，并根据实施例 7 中所述程序，在 3 个诊断患有鼻窦炎的儿童中，2 个的尿中检测到了肺炎链球菌。相信，另一鼻窦炎病例（其中该儿童的尿测试为阴性）可能涉及一种不同的病原体。

[0098] 在同样的实验中，用本发明的装置和方法在具有明显脑膜炎症状的儿童的脑脊髓液中检测到了肺炎链球菌，使该儿童能得到迅速有效的治疗处理。

[0099] 实施例 11- 在脑膜炎病人的尿中检测肺炎链球菌抗原

[0100] 让两个具有明显脑膜炎临床症状的病人住院。一个在入院前接受过抗菌药治疗，另一个没有。从各人获得脑脊髓液，并进行培养实验。实验结果是阴性的，血培养结果也一样。

[0101] 作为最后的诊断方法，在实施例 6 所述的程序中对从各病人获得的尿样使用了根据实施例 5 制备的装置。在每一例中，尿样测定肺炎链球菌 C- 多糖细胞壁抗原呈阳性。

[0102] 这些初步结果强烈提示，可常规利用尿样而不是脑脊髓液来测试肺炎链球菌引起的脑膜炎。如果进一步临床实验肯定了尿能够代替脑脊髓液作为测试基质，将对病人和医务人员都有很大的好处。脊髓抽液（通过它获得脑脊髓液）对病人来说是痛苦的，而且某种程度上还有危险。对于医务工作者，脊髓抽液耗时而且要求对细节都集中注意力。

[0103] 通常免疫化学领域的技术人员，尤其是从事免疫试验的技术人员，将会知道有时其它材料、成分、其它程序步骤也可轻易的代替本文中具体推荐的那些。大量专利和非专利的文献讨论了可靠的一次性使用的免疫试验测试装置的设计和使用，该装置可代替本文描述和推荐的优选 ICT 装置。不应将本发明局限于可替换试验装置、材料、成分或方法步骤，除非是权利要求限制的那些。

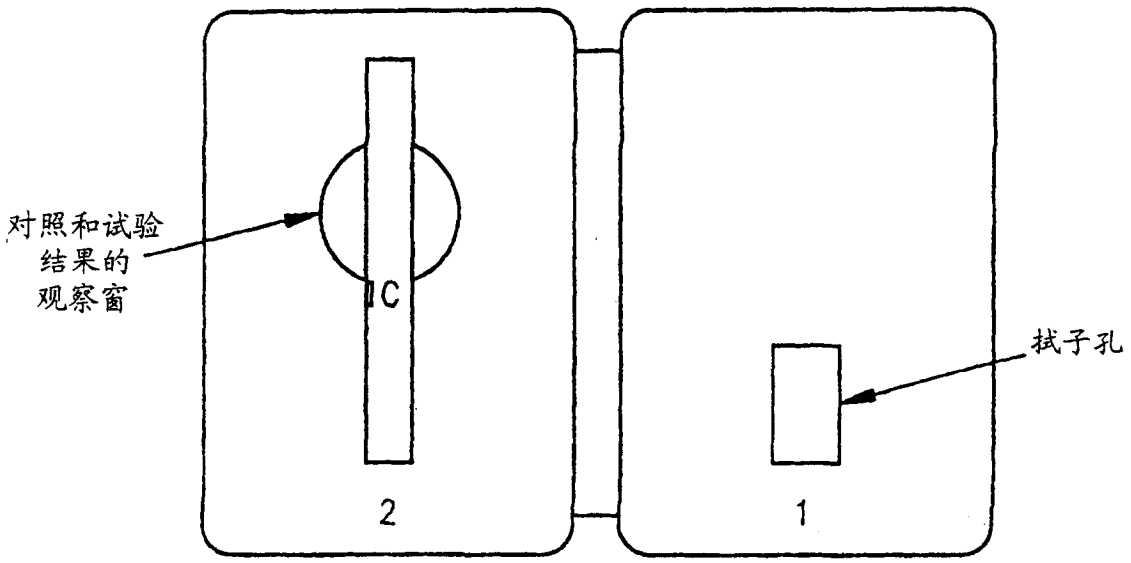


图 1

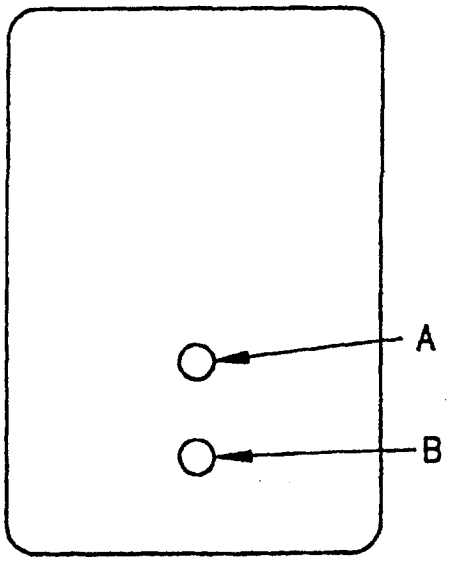


图 1A

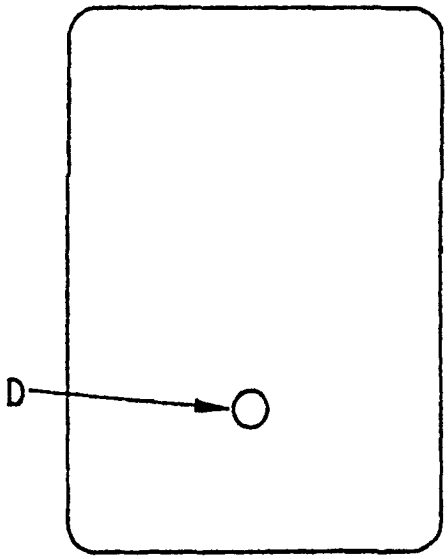


图 1B

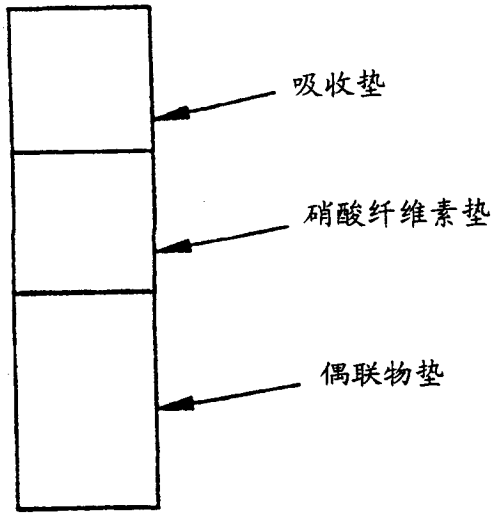


图 1C