



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103926402 A

(43) 申请公布日 2014. 07. 16

(21) 申请号 201410100668. 3

G01N 33/531 (2006. 01)

(22) 申请日 2005. 12. 13

(30) 优先权数据

2004-361828 2004. 12. 14 JP

(62) 分案原申请数据

200580042948. 2 2005. 12. 13

(71) 申请人 爱科来株式会社

地址 日本京都府

(72) 发明人 大代京一 大宫一紘 泉井直子

(74) 专利代理机构 北京东方亿思知识产权代理
有限责任公司 11258

代理人 肖善强

(51) Int. Cl.

G01N 33/569 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书8页

(54) 发明名称

检体前处理方法和使用了该方法的免疫测定方法

(57) 摘要

本发明提供检体前处理方法和使用了该方法的免疫测定方法。所述的检体前处理方法为免疫测定方法中的检体前处理方法,其特征在于,所述检体为来自于鼻涕的检体,在实施所述免疫测定方法之前用蛋白酶对所述检体进行处理,其中,所述蛋白酶为半碱性蛋白酶 (EC3. 4. 21. 63),所述检体中的测定对象物质为流感病毒;所述免疫测定方法为下述方法:使所述检体中的测定对象物质与负载在不溶性载体粒子上且与所述测定对象物质发生免疫反应的免疫学物质发生免疫反应,测定此时产生的所述不溶性载体粒子的凝集程度,由此测定所述测定对象物质的浓度。

1. 检体前处理方法,其为免疫测定方法中的检体前处理方法,其特征在于,

所述检体为来自于鼻涕的检体,在实施所述免疫测定方法之前用蛋白酶对所述检体进行处理,其中,所述蛋白酶为半碱性蛋白酶(EC3.4.21.63),所述检体中的测定对象物质为流感病毒;所述免疫测定方法为下述方法:使所述检体中的测定对象物质与负载在不溶性载体粒子上且与所述测定对象物质发生免疫反应的免疫学物质发生免疫反应,测定此时产生的所述不溶性载体粒子的凝集程度,由此测定所述测定对象物质的浓度。

2. 权利要求1所述的检体前处理方法,其中,所述负载在不溶性载体粒子上的免疫学物质为所述流感病毒的抗体。

3. 权利要求1所述的检体前处理方法,其中,蛋白酶处理的pH条件为5~11的范围。

4. 免疫测定方法,其为利用了免疫反应的免疫测定方法,其特征在于,检体为来自于鼻涕的检体,所述检体中的测定对象物质为流感病毒,所述方法包括:

对该检体通过权利要求1所述的检体前处理方法进行前处理之后,实施免疫测定;

所述免疫测定包括使检体中的测定对象物质与负载在不溶性载体粒子上且与所述测定对象物质发生免疫反应的免疫学物质发生免疫反应,测定此时产生的所述不溶性载体粒子的凝集程度,由此测定所述测定对象物质的浓度。

5. 权利要求4所述的免疫测定方法,其中,所述负载在不溶性载体粒子上的免疫学物质为所述流感病毒的抗体。

检体前处理方法和使用了该方法的免疫测定方法

[0001] 本分案申请为申请号 200580042948.2(国际申请号 PCT / JP2005 / 022883)、申请日 2005 年 12 月 13 日的发明专利的分案申请,该发明专利申请的发明名称为“检体前处理方法和使用了该方法的免疫测定方法”。

技术领域

[0002] 本发明涉及检体前处理方法和使用了该方法的免疫测定方法。

背景技术

[0003] 利用了抗原抗体反应的免疫测定方法由于能够以高灵敏度检测出检体或试样中的成分或者物质,因此在临床检查领域中,以血液(血浆、血清、全血)、尿、脊髓液、粪便等各种检体等为对象而被利用。作为利用了抗原抗体反应的免疫测定方法,例如有酶免疫测定法(EIA法)、荧光免疫测定法(FIA)、化学发光免疫测定法(CLIA)、免疫层析法、免疫比浊法(TIA法)、胶乳免疫比浊法(LTIA)等各种方法。

[0004] 其中,免疫比浊法、胶乳免疫比浊法、在载玻片上的胶乳凝集法(以下有时将这3种方法统称为“免疫凝集法”)由于其原理为不需要将抗原和未反应的抗体进行分离的B/F(结合/自由)分离的操作,因此称为均相免疫测定。而且,作为简便性和迅速性优异的方法,适用在例如CRP(C反应性蛋白)、ASO(抗链球菌溶血素O)、RF(类风湿因子)、尿中微量白蛋白、弹性蛋白酶等多个项目的临床检查中。

[0005] 这些免疫凝集法的测定对象检体通常为血液(血清、血浆、全血)、尿、宫颈粘液等。另一方面,对于作为鼻腔擤出液、鼻腔吸引液、鼻腔洗涤液等采集的来自于鼻涕的检体,作为其测定的项目,有时用于判定流感病毒、RS病毒等呼吸器官感染症。但是,这些项目的测定方法的原理均为利用了免疫层析法或膜过滤器的EIA法,对于来自于鼻涕的检体,利用免疫凝集法的测定方法目前还未实用化(例如参照非专利文献1~4)。

[0006] 另外,来自于鼻涕的检体根据个别检体的差别而有一定程度的不同,多为具有某种程度的粘性的检体,由该情况也可知,除了目标的测定对象物质之外,还非常大量地含有糖蛋白等高分子物质。在利用了免疫层析法或膜过滤器的EIA法中,虽然原因物质还未确定,但已知有时会发生检体中的共存物质发生非特异性反应、从而导致错误检查结果的情况。由于错误的检查结果导致假阳性时,会延误真正病因的确定,而且有时还会发生由于不恰当的措施而加重病症使其恶化的情况。因此,来自于鼻涕的检体例如添加表面活性剂后使粘度降低、或者预先使用滤纸或滤器等将来自于鼻涕检体中的固体物质(共存物质)除去后进行测定。但是,即便这样,由于非特异性的反应,还是产生很多假阳性。

[0007] 本发明人等对与利用了简单的免疫层析法或膜过滤器的EIA法同样地、利用简单的免疫凝集法对来自于鼻涕的检体也进行测定,对此进行了研究。但是,在仅添加表面活性剂、或仅预先进行固体成分的除去处理的检体前处理中,仍然发生了很多的非特异性反应,本来应该为阴性的检体呈现阳性,即产生了假阳性。

[0008] 非专利文献1:日本小儿科学会杂志108卷3号406-411(2004)

- [0009] 非专利文献 2 : 感染症学杂志第 78 卷 9 号 865-871 (2004)
- [0010] 非专利文献 3 : 感染症学杂志第 77 卷 12 号 1007-1014 (2003)
- [0011] 非专利文献 4 : 医学检查 VOL. 52NO. 2141-144 (2003)

发明内容

[0012] 因此, 本发明的目的在于提供在免疫测定方法中防止非特异性反应、同时能够对来自于鼻涕的检体进行测定的检体前处理方法和使用了该方法的免疫测定方法。

[0013] 为了实现上述目的, 本发明的检体前处理方法为免疫测定方法中的检体前处理方法, 上述检体为来自于鼻涕的检体, 是在实施上述免疫测定方法之前利用蛋白酶对上述检体进行处理的检体前处理方法。

[0014] 另外, 本发明的免疫测定方法为利用了免疫反应的免疫测定方法, 检体为来自于鼻涕的检体, 是对该检体通过上述本发明的检体前处理方法进行前处理之后, 实施上述免疫反应的免疫测定方法。

[0015] 这样, 如果利用蛋白酶预先对来自于鼻涕的检体进行处理, 则即便是免疫测定方法, 也能够进行防止了非特异性反应的测定。结果, 通过本发明, 可以实现简便性和迅速性优异的来自于鼻涕的检体的测定。

具体实施方式

[0016] 下面, 详细地说明本发明。

[0017] 本发明中, 上述免疫测定方法没有特别限定, 例如有下述方法: 使上述检体中的测定对象物质与负载在不溶性载体上且与上述测定对象物质发生免疫反应的免疫学物质发生免疫反应, 测定此时所产生的上述不溶性载体的凝集程度, 由此对上述测定对象物质的浓度进行测定 (所谓的“免疫凝集法”)。本发明的检体前处理方法优选用于上述免疫凝集法中。

[0018] 本发明中适用的蛋白酶没有特别限定, 例如除了来自于动物、植物的蛋白酶之外, 还可以列举出曲霉菌属、杆菌属、链霉菌属、根霉属、青霉属等来自于微生物的蛋白酶。作为具体的酶的名称, 例如可以列举出半碱性蛋白酶、胰蛋白酶、糜蛋白酶、弹性蛋白酶、枯草杆菌蛋白酶 (subtilisin)、蛋白酶 K、链霉蛋白酶、木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶等。蛋白酶并非仅可使用 1 种, 还可以并用 2 种以上。

[0019] 来自于鼻涕的检体例如可以使用作为鼻腔擤出液、鼻腔吸引液、鼻腔洗涤液而获得的物质。

[0020] 另外, 本发明中, 当测定对象物质为流感病毒时, 可以优选使用。此时, 如果使用本发明, 则通过对上述不溶性载体的凝集程度进行定量, 可以定量地测定病毒量。通过对应于临床症状进行判断, 当检体中的病毒量多时, 则可以预想该患者的重病程度达到某种程度, 另外, 可以预想该患者对周围人的传染力较强。当随着发病时间的推移病毒量减少时, 也可以容易地判断为感染末期, 可以有助于治疗方针和对患者进行说明。

[0021] 利用蛋白酶进行的来自于鼻涕的检体的处理除了使用蛋白酶之外, 没有特别限定, 例如与测定蛋白酶的酶活性的情况相同, 在酶活性有效的 pH 范围内, 可以在一般的条件下进行。当蛋白酶为半碱性蛋白酶时, 例如将酶溶解在 50mM 的 CHES (N- 环己基 -2- 氨基

乙磺酸)缓冲液(pH为9.8、含有1重量%的正-辛酰基-N-甲基葡萄糖酰胺、0.1重量%的EDTA·2Na、0.9重量%的NaCl、0.09重量%的叠氮化钠)中,将该溶液作为检体提取液,使其与来自于鼻涕的检体发生反应。另外,上述检体提取液的缓冲液并非限定于上述CHES缓冲液,例如也可以优选使用磷酸缓冲液、Tris-盐酸(三羟甲基氨基甲烷盐酸盐)缓冲液、CAPS(N-环己基-3-氨基丙磺酸)缓冲液等。另外,缓冲液的pH例如优选为pH5~11,在该pH范围的情况下,例如缓冲剂的种类也没有特别限定。当蛋白酶为胰蛋白酶、糜蛋白酶、弹性蛋白酶、枯草杆菌蛋白酶时,例如可以溶解在50mM的Tris-盐酸缓冲液(pH为8.4、含有4.1重量%的正-辛酰基-N-甲基葡萄糖酰胺、0.03重量%的CaCl₂、0.9重量%的NaCl、0.09重量%的叠氮化钠),然后与来自于鼻涕的检体发生反应。

[0022] 在这些优选的蛋白酶中,例如从最不易受到检体的影响、且与上述不溶性载体的相容性特别良好的观点出发,特别优选使用半碱性蛋白酶(EC3.4.21.63)作为本发明的蛋白酶。

[0023] 本发明中,上述免疫测定方法如上所述,优选为利用使用了不溶性载体的免疫凝集法的方法。作为上述不溶性载体,没有特别限定,可以列举出不溶性载体粒子。作为上述不溶性载体粒子,例如通常为聚苯乙烯制的胶乳粒子,但并不限定于聚苯乙烯,还可以使用聚丙烯制粒子、聚乙烯制粒子、明胶粒子、金属胶体等能够致敏抗体或抗原的粒子。粒子与抗原或抗体的结合例如可以适用利用了物理吸附力的物理吸附法,另外,例如还可以是使上述粒子上的羧基与抗原或抗体的氨基发生共价键合等的化学结合法。凝集程度的检测方法例如可以使用用于测定浊度的分光光度计等自动控制的光学测定装置,还可以是使用目测确认在载玻片上等有无凝集的方法。

[0024] 本发明中,当测定对象物质为流感病毒时,优选鉴别流感病毒的A型和B型。此时,例如优选使用对流感病毒的核蛋白特异性的抗体。作为流感病毒表面蛋白的血细胞凝集素等,由于抗原性逐渐变异,因此当使用一定的抗血细胞凝集素抗体时,根据流行的病毒的亚型不同而反应性有所不同,有些情况下有可能不发生反应。但是,如果使用针对核蛋白的抗体,则由于核蛋白维持将A型和B型分类时的基本的抗原性,显示出与亚型种类无关的恒定的反应性,因此适于鉴别A型和B型。

[0025] 核蛋白由于局部存在于由病毒粒子的脂质双层膜构成的包膜内部、且不存在于病毒表面,因此有必要用某些方法将核蛋白提取出来。作为该方法,例如有超声波处理或反复进行冷冻融化的物理的病毒粒子破坏或者利用表面活性剂等化学处理方法。在化学处理方法中,一般来说有利用Tween20(商品名,常用名为聚氧乙烯山梨糖醇酐单月桂酸酯)之类的非离子性表面活性剂等提取剂进行提取的方法。在EIA法或免疫层析法等以往的方法中,在抗原的提取中使用作为表面活性剂的Tween20,但如果将Tween20直接用于胶乳免疫比浊法中,则对抗原的反应性显著降低。此时,如果使用正-辛酰基-N-甲基葡萄糖酰胺(商品名:MEGA-8)作为表面活性剂,则很少影响到胶乳免疫比浊反应的反应性,且还具有提取效果,因此优选。

[0026] 下面说明本发明的实施例。但本发明并不限定于下述实施例。

[0027] 实施例1

[0028] (实验1)抗流感A型抗体致敏胶乳的制备

[0029] 将0.5mL的按照抗流感A型小鼠单克隆抗体的浓度达到0.8mg/mL的方式制备

的抗体液 (50mM 磷酸缓冲液, pH 为 7.4) 和 0.5mL 的 1% (w / v) 的聚苯乙烯胶乳粒子 (积水化学公司生产, 平均粒径为 0.5 μ m) 进行混合, 在 37°C 下培养 1 小时, 使抗体致敏于胶乳。在其中添加 BSA (Sigma 公司生产、牛血清白蛋白), 使其达到 1 重量%, 在 37°C 下培养 1 小时后进行封闭。利用 50mM 磷酸缓冲液 (pH 为 7.4) 洗涤封闭了的抗体致敏胶乳后, 在胶乳分散缓冲液 (50mM 的 Tris-HCl 缓冲液, pH 为 8.4、0.1 重量%的 BSA、0.1 重量%的 NaN_3) 中分散, 使其达到 0.1% (w / v), 从而制成抗流感 A 型抗体致敏胶乳试液。

[0030] (实验 2) 抗流感 B 型抗体致敏胶乳的制备

[0031] 将 0.5mL 的按照抗流感 B 型小鼠单克隆抗体的浓度达到 0.6mg / mL 的方式制备的抗体液 (50mM 磷酸缓冲液, pH 为 7.4) 和 0.5mL 的 1% (w / v) 的聚苯乙烯胶乳粒子 (积水化学公司生产, 平均粒径为 0.6 μ m) 进行混合, 在 37°C 下培养 1 小时, 使抗体致敏于胶乳。封闭之后的操作与 (实验 1) 同样地进行, 从而制成抗流感 B 型抗体致敏胶乳试液。

[0032] 以下的一系列实验为使用半碱性蛋白酶作为蛋白酶所进行的实验。

[0033] (实验 3) 检体提取液的制备

[0034] 将 0.4mg 的半碱性蛋白酶 (来自于蜂蜜曲霉 (*Aspergillus melleus*)、Amano Enzyme 公司生产的半碱性蛋白酶) 溶解在 1mL 的含有 1 重量%的正 - 辛酰基 -N- 甲基葡萄糖酰胺 (商品名 MEGA-8、以下相同)、0.1 重量%的 EDTA · 2Na、0.9 重量%的 NaCl、0.09 重量%的叠氮化钠的 50mM CHES (N- 环己基 -2- 氨基乙磺酸) 缓冲液 (pH 为 9.8) 中, 制成检体提取液 A。

[0035] 另外, 将 0.4mg 的半碱性蛋白酶 (来自于蜂蜜曲霉 (*Aspergillus melleus*)、Amano Enzyme 公司生产的半碱性蛋白酶) 溶解在 1mL 的含有 1 重量%的正 - 辛酰基 -N- 甲基葡萄糖酰胺、0.5 重量%的 BSA、0.9 重量%的 NaCl、0.1 重量%的 EDTA · 2Na 的 50mM Tris-HCl 缓冲液 (pH 为 8.4) 中, 制成检体提取液 B。

[0036] (实验 4) 利用胶乳免疫比浊法测定流感 A 型抗原标准液

[0037] 使用精制流感 A 型病毒 A / Kiev / 301 / 94 (H3N2) 作为抗原, 将其利用检体稀释液 (含有 1 重量%的 BSA 和 0.1 重量%的叠氮化钠的 PBS, pH 为 7.4) 进行稀释, 使其达到规定的病毒浓度 (4 μ g / mL 和 20 μ g / mL), 从而制备了两种病毒溶液。另外, 在刚要测定前, 利用检体提取液 B (含有 0.4mg / mL 的半碱性蛋白酶、1 重量%的正 - 辛酰基 -N- 甲基葡萄糖酰胺、0.5 重量%的 BSA、0.9 重量%的 NaCl、0.1 重量%的 EDTA · 2Na 的 50mM Tris-HCl 缓冲液, pH 为 8.4) 将各浓度的病毒液稀释 10 倍, 将其作为检体用于胶乳免疫比浊法的测定中。作为病毒浓度为零的检体, 使用利用上述检体提取液 B 将上述检体稀释液稀释 10 倍后获得的溶液。

[0038] 作为反应用缓冲液, 使用含有 2.1 重量%的聚乙二醇 20000 (Nacalai Tesque 公司生产)、1 重量%的 BSA、0.9 重量%的 NaCl、0.1 重量%的 EDTA · 2Na 和 0.1 重量%的叠氮化钠的 200mM 的 Tris-HCl (pH 为 8.4) 缓冲液。在吸光度的测定中, 使用免疫反应测定装置 SPOTCHEM IM (爱科来株式会社生产), 按照以下比例在比色杯内混合各试剂和检体, 测定在 37°C 下处理 5 分钟时的 5 分钟的吸光度 (测定波长为 660nm) 变化量。所得结果示于下述表 1 中。

[0039] S (检体) : 28 μ L

[0040] R1 (反应用缓冲液) : 56 μ L

[0041] R2(抗体致敏胶乳试液):56 μ L

[0042] 表 1

		流感 A 型病毒抗原浓度 (μ g/ml)		
		0	4	20
[0043] 5 分钟的吸光度差 (660nm)		0	4	20
		-0.0039	0.0344	0.1043

[0044] 由上述表 1 可知,由于吸光度差与 A 型流感病毒浓度成比例地增加(发生反应),因此通过利用含有半碱性蛋白酶的检体提取液处理检体,能够利用胶乳免疫比浊法定量地测定 A 型流感病毒量。

[0045] (实验 5) 利用胶乳免疫比浊法测定病毒 B 型抗原标准液

[0046] 使用精制流感 B 型病毒 B / Victoria / 504 / 00 作为抗原,将其利用检体稀释液(含有 1 重量%的 BSA 和 0.1 重量%的叠氮化钠的 PBS, pH 为 7.4)进行稀释,使其达到规定的病毒浓度(1 μ g / mL 和 5 μ g / mL),从而制备了两种病毒液。另外,在刚要测定前,利用检体提取液 B(含有 0.4mg / mL 的半碱性蛋白酶、1 重量%的正-辛酰基-N-甲基葡萄糖酰胺、0.5 重量%的 BSA、0.9 重量%的 NaCl、0.1 重量%的 EDTA·2Na 的 50Mm 的 Tris-HCl 缓冲液, pH 为 8.4)将各浓度的病毒液稀释 10 倍,将其作为检体用于胶乳免疫比浊法的测定中。作为病毒浓度为零的检体,使用利用上述检体提取液 B 将上述检体稀释液稀释 10 倍后获得的溶液。

[0047] 作为反应用缓冲液,使用含有 1.95 重量%的聚乙二醇 20000(Nacalai Tesque 公司生产)、1 重量%的 BSA、0.9 重量%的 NaCl、0.1%的 EDTA·2Na 和 0.1 重量%的叠氮化钠的 200mM 的 Tris-HCl(pH 为 8.4)缓冲液。在吸光度的测定中,使用免疫反应测定装置 SPOTCHEM IM(爱科来株式会社生产),按照以下比例在比色杯内混合各试剂和检体,测定在 37 $^{\circ}$ C 下处理 5 分钟时的 5 分钟的吸光度(测定波长为 730nm)变化量。所得结果示于下述表 2 中。

[0048] S(检体):28 μ L

[0049] R1(反应用缓冲液):56 μ L

[0050] R2(抗体致敏胶乳试液):56 μ L

[0051] 表 2

[0052]

		流感 B 型病毒抗原浓度 (μ g/ml)		
		0	1	5
5 分钟的吸光度差 (730nm)		0	1	5
		0.0003	0.0193	0.0642

[0053] 由上述表 2 可知,由于吸光度差与 B 型流感病毒浓度成比例地增加(发生反应),因此通过利用含有半碱性蛋白酶的检体提取液处理检体,能够利用胶乳免疫比浊法定量地测定 B 型流感病毒量。

[0054] (实验 6) 流感 A 型阴性检体的测定

[0055] 从通过症状明确可知未患流感的人采集鼻腔吸引液,将其中通过以免疫层析法为原理的市售流感病毒检测试剂盒(Nippon Becton Dickinson 公司,商品名为 Capolia FluA / B)能够确认为 A 型阴性的鼻腔吸引液作为检体使用(14 个检体),测定流感 A 型病毒。除了将缠绕在棉棒上的鼻腔吸引液混悬在 1mL 的检体提取液中之外,基本上利用与实施 4 相同的方法进行。作为检体提取液,除了蛋白酶之外,与在上述实验 4 中使用的检体提取液 B 具有相同的组成,使用不含半碱性蛋白酶的提取液 B-1 和含有 0.4mg / mL 半碱性蛋白酶的提取液 B-2。使用这些提取液 B-1 和 B-2,比较各自的结果,研究半碱性蛋白酶对非特异性反应的抑制效果。定性判定结果为吸光度差在 0.0050 以上时为阳性(+)、小于 0.0050 时为阴性(-)。这些结果示于下述表 3 中。需要说明的是,使用了提取液 B-1 的例子为比较例,使用了提取液 B-2 的例子为实施例。

[0056] 表 3

[0057]

检体序号 #	比较例 提取液 B-1		实施例 提取液 B-2	
	吸光度差	判定	吸光度差	判定
1	0.0044	-	-0.0037	-
2	0.0416	+	-0.0002	-
3	0.0039	-	-0.0060	-
4	0.0323	+	-0.0043	-
5	0.0109	+	-0.0052	-
6	0.0411	+	-0.0001	-
7	0.0593	+	-0.0022	-
8	0.0455	+	-0.0084	-
9	0.0382	+	0.0013	-
10	0.0254	+	-0.0101	-
11	0.0153	+	-0.0064	-
12	0.0260	+	-0.0086	-
13	0.0227	+	-0.0083	-
14	0.0209	+	-0.0042	-

[0058] 由上述表 3 可知,在利用胶乳免疫比浊法的流感 A 型病毒的测定中,当利用不含半碱性蛋白酶的提取液 B-1 进行处理时,14 个检体中的 12 个检体发生了非特异性的凝集反应,显示了假阳性,但利用含有半碱性蛋白酶的提取液 B-2 进行处理时,14 个检体全部为本来的阴性结果。

[0059] (实施例 7) 流感 B 型阴性检体的测定

[0060] 从通过症状明确可知未患流感的人采集鼻腔吸引液,将其中通过以免疫层析法

为原理的市售流感病毒检测试剂盒 (Nippon Becton Dickinson 公司, 商品名为 Capolia FluA / B) 能够确认为 B 型阴性的鼻腔吸引液作为检体使用 (8 个检体), 测定流感 B 型病毒。除了将缠绕在棉棒上的鼻腔吸引液混悬在 1mL 的检体提取液中之外, 基本上利用与实验 5 相同的方法进行。作为检体提取液, 除了蛋白酶之外, 与在上述实验 5 中使用的检体提取液 B 具有相同的组成, 使用不含半碱性蛋白酶的提取液 B-1 和含有 0.4mg / mL 半碱性蛋白酶的提取液 B-2。使用这些提取液 B-1 和 B-2, 比较各自的结果, 研究半碱性蛋白酶对非特异性反应的抑制效果。定性判定结果为吸光度差在 0.0050 以上时为阳性 (+)、小于 0.0050 时为阴性 (-)。这些结果示于下述表 4 中。检体 #15 ~ #19 为 A 型 B 型均阴性, 但 #20 ~ #22 的 3 个检体为 A 型阳性 B 型阴性。需要说明的是, 使用了提取液 B-1 的例子为比较例, 使用了提取液 B-2 的例子为实施例。

[0061] 表 4

[0062]

检体序号 #	比较例 提取液 B-1		实施例 提取液 B-2	
	吸光度差	判定	吸光度差	判定
15	0.0028	-	-0.0058	-
16	0.0203	+	-0.0018	-
16	0.0319	+	-0.0032	-
17	0.0274	+	-0.0034	-
19	0.0328	+	-0.0043	-
20	0.0651	+	-0.0033	-
21	0.0298	+	-0.0018	-
22	0.0241	+	-0.0040	-

[0063] 由上述表 4 可知, 在利用胶乳免疫比浊法的流感 B 型病毒的测定中, 当利用不含半碱性蛋白酶的提取液 B-1 进行处理时, 8 个检体中的 7 个检体发生了非特异性的凝集反应, 显示了假阳性, 但利用含有半碱性蛋白酶的提取液 B-2 进行处理时, 8 个检体全部为本来的阴性结果。

[0064] (实验 8) 流感 A 型病毒的相关性试验

[0065] 采集 61 名临床上疑似流感感染的患者的鼻腔吸引液, 将其作为检体。根据本发明利用含有半碱性蛋白酶的检体提取液 A (通过实验 3 制备) 处理这些检体, 并利用胶乳免疫比浊法进行测定。测定方法利用与上述实验 6 相同的方法进行。对于所得吸光度差的数据, 根据上述基准, 定性地判定阳性 (+)、阴性 (-), 将该结果与对象法的结果进行比较。作为对照法, 实施使用了 MDCK (马-达二氏犬肾, Madin-Darby canine kidney) 细胞的病毒分离培养法。将利用两方法产生的一致结果示于下述表 5 中。

[0066] 表 5

[0067]

		病毒分离培养		共计
		阳性 (+)	阴性 (-)	
胶乳免疫比浊法 (本发明)	阳性 (+)	23	5	28
	阴性 (-)	4	29	33
共计		27	34	61

[0068] 由上述表 5 可知,当利用含有半碱性蛋白酶的检体提取液 A 对鼻腔吸引液检体进行前处理、并利用胶乳免疫比浊法测定流感 A 型病毒时,确认了与对照法的病毒分离培养法的结果具有良好的相关性。由此结果可以说,本发明的免疫测定方法作为以往的病毒分离培养法的代替法可以充分地利用。

[0069] (实验 9) 流感 B 型病毒的相关性试验

[0070] 采集 35 名临床上疑似流感感染的患者的鼻腔吸引液,将其作为检体。根据本发明利用含有半碱性蛋白酶的检体提取液 A(通过实验 3 制备)处理这些检体,并利用胶乳免疫比浊法进行测定。测定方法利用与上述实验 7 相同的方法进行。对于所得吸光度差的数据,根据上述基准,定性地判定阳性 (+)、阴性 (-),将该结果与对照法的结果进行比较。作为对照法,实施以免疫层析法为原理的市售 B 型流感病毒检测试剂盒 (Nippon Becton Dickinson 公司,商品名为 Capolia FluB)。将利用两方法产生的一致结果示于下述表 6 中。

[0071] 表 6

[0072]

		免疫层析法		共计
		阳性 (+)	阴性 (-)	
胶乳免疫比浊法 (本发明)	阳性 (+)	11	3	14
	阴性 (-)	1	20	21
共计		12	23	35

[0073] 由上述表 6 可知,当利用含有半碱性蛋白酶的检体提取液 A 对鼻腔吸引液检体进行前处理、并利用胶乳免疫比浊法测定流感 B 型病毒时,确认了与对照法的免疫层析法的结果具有良好的相关性。由此结果可以说,本发明的免疫测定方法作为以往的免疫层析法的代替法可以充分地利用。

[0074] 如上所述,如果使用本发明的前处理方法,则能够实施防止了非特异性反应的来自于鼻涕的检体的免疫测定方法。因此,本发明的前处理方法可以适用在医学或生物学等广泛领域中,特别在临床检查的领域中是有用的。

专利名称(译)	检体前处理方法和使用了该方法的免疫测定方法		
公开(公告)号	CN103926402A	公开(公告)日	2014-07-16
申请号	CN201410100668.3	申请日	2005-12-13
[标]申请(专利权)人(译)	爱科来株式会社		
申请(专利权)人(译)	爱科来株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	爱科来株式会社		
[标]发明人	大代京一 大宫一紘 泉井直子		
发明人	大代京一 大宫一紘 泉井直子		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/56983 G01N33/5306 G01N2333/11 G01N2333/95		
优先权	2004361828 2004-12-14 JP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供检体前处理方法和使用了该方法的免疫测定方法。所述的检体前处理方法为免疫测定方法中的检体前处理方法，其特征在于，所述检体为来自于鼻涕的检体，在实施所述免疫测定方法之前用蛋白酶对所述检体进行处理，其中，所述蛋白酶为半碱性蛋白酶(EC3.4.21.63)，所述检体中的测定对象物质为流感病毒；所述免疫测定方法为下述方法：使所述检体中的测定对象物质与负载在不溶性载体粒子上且与所述测定对象物质发生免疫反应的免疫学物质发生免疫反应，测定此时产生的所述不溶性载体粒子的凝集程度，由此测定所述测定对象物质的浓度。

	流感 A 型病毒抗原浓度 (μg/ml)		
5 分钟的吸光度差	0	4	20
(660nm)	-0.0039	0.0344	0.1043