

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680052839.3

[51] Int. Cl.

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

[43] 公开日 2009年3月25日

[11] 公开号 CN 101395476A

[22] 申请日 2006.12.14

[21] 申请号 200680052839.3

[30] 优先权

[32] 2005.12.14 [33] JP [31] 360984/2005

[86] 国际申请 PCT/JP2006/324905 2006.12.14

[87] 国际公布 WO2007/069673 日 2007.6.21

[85] 进入国家阶段日期 2008.8.14

[71] 申请人 电化生研株式会社

地址 日本东京都

[72] 发明人 伊藤裕美

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 刘健 孙秀武

权利要求书4页 说明书21页 附图2页

[54] 发明名称

多重耐药葡萄球菌的免疫色谱检测方法和诊断试剂盒

[57] 摘要

本发明提供了一种能够通过免疫色谱检测方法灵敏、简单且快速地检测出由多重耐药性葡萄球菌细菌特异性产生的 PBP2' 的免疫色谱检测装置, 并且该装置能够确定多重耐药性葡萄球菌的感染, 本发明还提供了使用上述检测装置的诊断方法, 以及包含上述检测装置的诊断试剂盒。本发明涉及用于检测多重耐药性葡萄球菌的免疫色谱检测装置, 该装置包括: 在片状固相支持物上的样品供给部位, 该部位提供了推断含有多重耐药性葡萄球菌的样品溶液或推断含有通过样品预处理而由细胞壁释放的 PBP2' 的溶液; 标记试剂单元, 该部位容纳有标记试剂, 在该标记试剂中与 PBP2' 特异性结合的抗体得到标记并且能够扩散穿过所述固相支持物; 和俘

合并俘获 PBP2' 与已经固定化的标记试剂的复合物, 在俘获试剂部位或在固相支持物上的俘获试剂部位上游含有两性表面活性剂, 阴离子表面活性剂, 和/或非离子表面活性剂。

1. 一种用于检测产生细胞壁合成酶 PBP2' 的细菌的方法, 所述方法包括通过基于抗原-抗体反应的免疫色谱检测来检测细胞壁合成酶 PBP2'。

2. 根据权利要求 1 的用于检测产生细胞壁合成酶 PBP2' 的细菌的方法, 所述方法包括使用下述免疫色谱检测装置, 所述装置在片状固相支持物上包括: 样品供给部位, 该部位被提供有推断含有产生细胞壁合成酶 PBP2' 的细菌的样品溶液或者推断含有通过样品预处理而由细胞壁释放的 PBP2' 的溶液; 标记试剂部位, 该部位容纳有试剂, 所述试剂是以能够使该试剂扩散穿过固相支持物的方式与 PBP2' 特异性结合的标记抗体; 和俘获试剂部位, 在该部位俘获试剂能够特异性地结合并俘获 PBP2' 与已经固定化的标记试剂的复合物。

3. 根据权利要求 1 或 2 的用于检测产生细胞壁合成酶 PBP2' 的细菌的方法, 其中使 PBP2' 预先在与固相支持物分离的位置上与标记试剂接触, 并向样品供给部位提供样品试剂混合物和标记试剂, 所述样品试剂混合物包含推断含有产生细胞壁合成酶 PBP2' 的细菌的样品溶液, 或推断含有通过样品预处理而从细胞壁释放的 PBP2' 的溶液, 所述标记试剂是能够特异性结合 PBP2' 的标记抗体。

4. 根据权利要求 2 或 3 的用于检测产生细胞壁合成酶 PBP2' 的细菌的方法, 其中所述标记试剂是与抗体结合了的的不溶性载体。

5. 根据权利要求 2 到 4 任意一项的用于检测产生细胞壁合成酶 PBP2' 的细菌的方法, 其中所述俘获试剂部位含有两性表面活性剂、阴离子表面活性剂和/或非离子表面活性剂。

6. 根据权利要求 2 到 5 任意一项的用于检测产生细胞壁合成酶 PBP2' 的细菌的方法, 其中所述俘获试剂部位含有磺基甜菜碱型表面活性剂。

7. 根据权利要求 5 或 6 的用于检测产生细胞壁合成酶 PBP2' 的细菌的方法, 其中将具有高离子化倾向的阴离子加入到推断含有产生细胞壁合成酶 PBP2' 的细菌的样品溶液或推断含有通过样品预处理而从细胞壁释放的 PBP2' 的溶液中, 然后将这样的溶液提供给样品供给部位。

8. 根据权利要求7的用于检测产生细胞壁合成酶PBP2'的细菌的方法, 其中所述具有高离子化倾向的阴离子是至少一种选自氯离子、溴离子和碘离子的阴离子。

9. 根据权利要求5到8任意一项的用于检测产生细胞壁合成酶PBP2'的细菌的方法, 其中将具有高离子化倾向的阳离子加入到推断含有产生细胞壁合成酶PBP2'的细菌的样品溶液或推断含有通过样品预处理从细胞壁释放的PBP2'的溶液中, 然后将这样的溶液提供给样品供给部位。

10. 根据权利要求9的用于检测产生细胞壁合成酶PBP2'的细菌的方法, 其中所述具有高离子化倾向的阳离子是至少一种选自钾离子、钙离子、钠离子和镁离子的阳离子。

11. 根据权利要求1到10任意一项的用于检测产生细胞壁合成酶PBP2'的细菌的方法, 其包括通过碱处理或中和而进行的样品预处理步骤。

12. 根据权利要求11的用于检测产生细胞壁合成酶PBP2'的细菌的方法, 其中所述碱处理是使用碱金属氢氧化物或碳酸盐的水溶液或者碱土金属氢氧化物或碳酸盐的水溶液进行的。

13. 根据权利要求12的用于检测产生细胞壁合成酶PBP2'的细菌的方法, 其中所述碱金属氢氧化物或碳酸盐的水溶液或者碱土金属氢氧化物或碳酸盐的水溶液的pH为11或更高。

14. 根据权利要求12或13的用于检测产生细胞壁合成酶PBP2'的细菌的方法, 其中所述碱金属氢氧化物或碳酸盐的水溶液或者碱土金属氢氧化物或碳酸盐的水溶液的浓度在0.01N到1.0N之间。

15. 根据权利要求11到14任意一项的用于检测产生细胞壁合成酶PBP2'的细菌的方法, 其中用缓冲液中和碱处理后的水溶液。

16. 根据权利要求1到15任意一项的用于检测产生细胞壁合成酶PBP2'的细菌的方法, 其中所述样品提供部位含有玻璃纤维。

17. 根据权利要求1到16任意一项的用于检测产生细胞壁合成酶PBP2'的细菌的方法, 其中所述产生细胞壁合成酶PBP2'的细菌是多重耐药性葡萄球菌。

18. 一种用于检测产生细胞壁合成酶PBP2'的细菌的免疫色谱检测装置, 所述装置在片状固相支持物上包括: 样品供给部位, 在该部

位被提供有推断含有产生细胞壁合成酶 PBP2'的细菌的样品溶液或者推断含有通过样品预处理而由细胞壁释放的 PBP2'的溶液;标记试剂部位,该部位容纳有试剂,该试剂是以能够使所述试剂扩散穿过固相支持物的方式与 PBP2'特异性结合的标记抗体;和俘获试剂部位,在该部位俘获试剂能够特异性地结合并俘获 PBP2'与已经固定化的标记试剂的复合物,所述俘获试剂部位含有两性表面活性剂、阴离子表面活性剂和/或非离子表面活性剂。

19. 根据权利要求 18 的用于检测产生细胞壁合成酶 PBP2'的细菌的免疫色谱检测装置,其中所述俘获试剂部位包含磺基甜菜碱型表面活性剂。

20. 根据权利要求 18 或 19 的用于检测产生细胞壁合成酶 PBP2'的细菌的免疫色谱检测装置,其中所述样品供应部位含有玻璃纤维。

21. 根据权利要求 18 到 20 任意一项的用于检测产生细胞壁合成酶 PBP2'的细菌的免疫色谱检测装置,其中所述产生细胞壁合成酶 PBP2'的细菌是多重耐药性葡萄球菌。

22. 一种用于检测产生细胞壁合成酶 PBP2'的细菌的试剂盒,其包括:根据[18]到[21]任意一项的用于检测产生细胞壁合成酶 PBP2'的细菌的免疫色谱检测装置;和具有高离子化倾向的阴离子或阳离子溶液,所述溶液将会被加入到推断含有产生细胞壁合成酶 PBP2'的细菌的样品溶液或推断含有通过样品预处理从细胞壁释放的 PBP2'的溶液中。

23. 根据权利要求 22 的用于检测产生细胞壁合成酶 PBP2'的细菌的试剂盒,其中具有高离子化倾向的阴离子是至少一种选自氯离子、溴离子和碘离子的阴离子。

24. 根据权利要求 22 的用于检测产生细胞壁合成酶 PBP2'的细菌的试剂盒,其中具有高离子化倾向的阳离子是至少一种选自钾离子、钙离子、钠离子和镁离子的阳离子。

25. 根据权利要求 22 到 24 任意一项的用于检测产生细胞壁合成酶 PBP2'的细菌的试剂盒,其进一步包括用碱对样品进行碱处理的碱溶液和用于中和的缓冲液。

26. 根据权利要求 25 的用于检测产生细胞壁合成酶 PBP2'的细菌的试剂盒,其中所述碱溶液是碱金属氢氧化物或碳酸盐的水溶液或者

碱土金属氢氧化物或碳酸盐的水溶液。

27. 根据权利要求 26 的用于检测产生细胞壁合成酶 PBP2' 的细菌的试剂盒, 其中所述碱金属氢氧化物或碳酸盐的水溶液或者碱土的金属氢氧化物或碳酸盐水溶液的 pH 为 11 或更高。

28. 根据权利要求 26 或 27 的用于检测产生细胞壁合成酶 PBP2' 的细菌的试剂盒, 其中所述碱金属氢氧化物或碳酸盐的水溶液或者碱土金属氢氧化物或碳酸盐的水溶液的浓度在 0.01N 到 1.0N 之间。

29. 根据权利要求 22 到 28 任意一项的用于检测产生细胞壁合成酶 PBP2' 的细菌的试剂盒, 其中所述产生细胞壁合成酶 PBP2' 的细菌是多重耐药性葡萄球菌。

多重耐药葡萄球菌的免疫色谱检测方法和诊断试剂盒

技术领域

本发明涉及免疫检测以及免疫检测所使用的试剂盒。

背景技术

葡萄球菌 (Staphylococci) 包括 40 种或更多的细菌类型, 从临床的角度来说, 其大体上分为金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 和凝固酶阴性葡萄球菌 (coagulase-negative staphylococci) (以下缩写为“CNS”)。金黄色葡萄球菌被认为是致病生物, 而 CNS 被认为是非致病生物。

感染是通过使用抗生素来治疗的。因为许多葡萄球菌是耐药的, 因此, 从临床的角度来说, 是基于耐药性对它们进行分类的。

在临床上重要的致病生物——金黄色葡萄球菌中, 耐甲氧西林 (methicillin) 的金黄色葡萄球菌 (MRSA) 是对 β -内酰胺试剂显示耐受性的金黄色葡萄球菌, 其中所述 β -内酰胺试剂包括青霉素例如甲氧西林。并且, 许多这样的细菌对许多药物, 例如氨基糖苷类和大环内酯类药物都显示出耐受性。因此, 这样的细菌在临床上被认为是多重耐药性的金黄色葡萄球菌。相反, 对甲氧西林显示出敏感性的金黄色葡萄球菌被称为甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌(以下被称为“MSSA”)。

金黄色葡萄球菌能够产生多种毒素, 包括肠毒素、中毒性休克综合征毒素、溶血素和剥脱性毒素 (Hideo IGARASHI: TSST-1, “*Shinshu to meneki* (Invasion and immunity), ” 3, 3-10, 1994)。被这样的毒素感染将会导致肠炎, 肺炎, 皮炎或组织损伤等, 严重的感染可能会导致死亡。因此, 当将金黄色葡萄球菌从患者中分离出来时, 无论该细菌是否是 MRSA 都必须尽快进行检查。在 MRSA 感染的情况下, 必须选择适当的且认为能有效抵抗 MRSA 的药物, 例如万古霉素或阿贝卡星硫酸酯 (arbekacin sulfate), 并且将其给予患者。

除金黄色葡萄球菌以外的葡萄球菌都是内生细菌, 它们对于健康的个体通常是非致病性的。然而, 当器官移植患者采用免疫抑制剂作为防止术后感染的措施时, 或者在由于年龄引起体力削弱从而导致免

疫系统削弱的所谓妥协患者的情况下，可能会发生机会感染。

除金黄色葡萄球菌以外的一些葡萄球菌已经获得了对甲氧西林的耐受性或者多重耐药性，并且这些细菌分别被统称为甲氧西林耐受性凝固酶阴性葡萄球菌（以下缩写为“MRCNS”）或多重耐药性凝固酶阴性葡萄球菌。就像在 MRSA 的情况下一样，如果是妥协患者被感染了，则对 MRCNS 有效的药物就会受到限制。因此，MRCNS 已经成为了一个医学问题。

MRSA 和 MRCNS 被统称为多重耐药性葡萄球菌。

已知 MRSA 或 MRCNS 的耐药性是由于 PBP2' 的表达所导致的，所述 PBP2' 是除与胞壁质链交联的四种青霉素结合蛋白（即，PBP1，PBP2，PBP3 和 PBP4）以外的一种新酶，其中上述四种青霉素结合蛋白是葡萄球菌细胞壁的构成元素并且它们合成了所述的细胞壁（Utsui, Y. 和 Yokota, T.: Role of an altered penicillin-binding protein in methicillin- and cephem-resistant *Staphylococcus aureus*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 28, 397-403, 1985）。葡萄球菌中通常具有的 PBP1 到 PBP4 蛋白作为细胞壁合成酶会被青霉素抗生素灭活，所述青霉素抗生素是酶底物类似物，当细胞壁的合成难以实现时细菌最终会死亡。然而，MRSA 和 MRCNS 表达了一种新的细胞壁合成酶—PBP2'，其对 β -内酰胺抗菌物质显示出很小的亲合性，也就是说，其不会因此被灭活。MRSA 和 MRCNS 被认为是通过改变细胞壁合成中的角色而增殖的。大部分 MRSA 和 MRCNS 获得了对其它抗生物的耐受机制，并且成为能够耐受许多抗生素的多重耐药性细菌。这样的细菌被认为是多重耐药性葡萄球菌而不是仅对 β -内酰胺抗生物具有耐受性的葡萄球菌。

用于分离和鉴定葡萄球菌的一般技术包括使用鼻腔抹片、咽喉抹片，唾液，血液，脓液，粪便或作为临床样品的其它样品，并且使用琼脂培养基或液体琼脂培养基对其进行隔离培养。当在琼脂培养基中进行培养时，从生长的菌落中选择出推断是葡萄球菌的菌落，并且进一步进行纯净培养，通过革兰氏染色（Gram-stained）显像的显微成像或者关于凝固酶生产能力或甘露糖醇降解能力的生物化学特征试验来鉴别葡萄球菌或金黄色葡萄球菌。当在液体培养基中培养时，将培养溶解播种到琼脂培养基上并在此对隔离的菌落进行培养，同样将被推

断是葡萄球菌的菌落进行纯净培养，接着进行鉴别。对已经被鉴别为金黄色葡萄球菌或葡萄球菌的细菌进行药物敏感性测试或者类似测试，并且基于测试结果确定所研究的细菌是否是 MRSA、MSSA 或 MRCNS。药物敏感性测试通常是通过培养，例如稀释技术或盘式敏感性测试进行的。已知这样的药物敏感性测试需要进行持续 16 到 24 小时的培养（从分离临床样品到确定是否进行隔离培养和纯净培养需要 3 天或更长的时间），并且已知会由于例如细菌浓度、培养温度、培养基组成或者所使用药物的差异而导致测试结果的不同。因此，进行这样的测试的人需要对该过程非常有经验。

在最近今年中，人们开发出了一种检测 mecA 基因编码的 PBP2' 的方法，其中所述 mecA 基因编码的 PBP2' 是耐药机制的主体，该方法通过纯净培养、隔离培养或者直接由临床样品通过 PCR 基于分析物细菌携带 mecA 基因的状况来评价抗体的耐受性。然而，细菌携带 mecA 基因的事实并不总意味着抗生素耐受性的表达，一些细菌即使它们携带了这样的基因也没有获得耐受性。

如上所述，PBP2' 的产生在多重耐药性的表达中扮演了关键的角色，因此从葡萄球菌中检测 PBP2' 可能是了解所研究的细菌是否获得耐受性的一个有效途径。

由多重耐药性葡萄球菌包括 MRSA 特异性产生的 PBP2' 是通过抗原-抗体反应基免疫学方式检测的，例如蛋白质印迹法（Western blotting）、放射性免疫测定或玻片乳胶凝集试验（日本专利 No. 3638731）。然而，检测 PBP2' 的上述方法具有以下问题。蛋白质印迹法的程序复杂，并且难以迅速处理多个样品。放射性免疫测定从常规试验的角度来说是不实际的，因为它涉及放射性同位素的使用，并且该方法要求 BF 分离，其中包括在试验期间从其它非结合抗原或抗体中分离抗原抗体复合物，并且由于在反应体系中存在用于从细菌中提取抗原的变性剂所以该方法需要几个小时的时间才能完成试验。玻片乳胶凝集试验需要在没有外来细菌的情况下进行检测，这是因为污染细菌会导致假阳性反应（例如由于非特异性反应而导致的假阳性反应），并且该方法的灵敏度低。因此，培养必须进行至少两次，即，隔离培养和纯净培养，其依次需要 2 到 3 天的时间来完成测试，这样就增加了用于纯净培养的培养基的费用，并且由于在测定时间之后的凝集其可

能会产生假阳性反应，即使这样的时间可能只有 3 分钟那么短。由于在预处理从细菌中提取的 PBP2' 时，需要从细胞壁产生的碎片中离心分离出含有 PBP2' 的悬浮液，因此该方法也是费力的，其可能会污染实验室的环境，该方法涉及到复杂的操作例如在离心之后通过移液管转移悬浮液，并且其涉及煮沸过程。因此，需要一种能够快速检测出由多重耐药葡萄球菌特异性产生的 PBP2' 的，具有高特异性和灵敏度的方法来代替传统的检测技术。

本发明的公开

发明所要实现的目的

本发明意图提供一种能够检测由多重耐药性葡萄球菌细菌特异性产生的 PBP2' 的免疫色谱检测装置，其具有高灵敏度并且能够以简单迅速的方式通过免疫色谱检测来确定多重耐药性葡萄球菌感染；使用上述检测装置的诊断方法，以及包含上述检测装置的诊断试剂盒。

实现所述目的的方式

本发明人已经对从多重耐药性葡萄球菌细菌中提取 PBP2' 的方法进行了集中的研究，并且在不使用复杂操作程序的情况下以简单快速的方式对其进行了测试。他们以简单的方式通过使用免疫色谱检测装置成功地检测了 PBP2'，其中使用了试剂，该试剂是能够特异性结合 PBP2' 的标记抗体，并且还使用了俘获试剂，所述俘获试剂能够特异性地结合并俘获 PBP2' 与标记试剂的复合物。进一步地，他们发现 PBP2' 能够在不需要复杂的离心作用或其它方式的情况下得到提取和检测，这是通过用碱性溶液在检测之前处理样品，中和样品，并且将所述样品施加到免疫色谱检测装置上而实现的。进一步地，他们发现检测可以在不产生假阳性反应的情况下进行，这是通过向已经固定了俘获剂的免疫色谱检测装置的俘获剂部位施加表面活性剂例如两性表面活性剂而实现的。这样就完成了本发明。

更具体地说，本发明如下所述。

[1]、一种用于检测产生细胞壁合成酶 PBP2' 的细菌的方法，所述方法包括通过基于抗原-抗体反应的免疫色谱检测来检测细胞壁合成酶 PBP2'。

[2]、根据[1]的用于检测产生细胞壁合成酶 PBP2'的细菌的方法，所述方法包括使用下述免疫色谱检测装置，所述装置在片状固相支持物上包括：样品供给部位，该部位被提供有推断含有产生细胞壁合成酶 PBP2'的细菌的样品溶液或者推断含有通过样品预处理而由细胞壁释放的 PBP2'的溶液；标记试剂部位，该部位容纳有试剂，所述试剂是以能够使该试剂扩散穿过固相支持物的方式与 PBP2'特异性结合的标记抗体；和俘获试剂部位，在该部位俘获试剂能够特异性地结合并俘获 PBP2'与已经固定化的标记试剂的复合物。

[3]、根据[1]或[2]的用于检测产生细胞壁合成酶 PBP2'的细菌的方法，其中使 PBP2'预先在与固相支持物分离的位置上与标记试剂接触，并向样品供给部位提供样品试剂混合物和标记试剂，所述样品试剂混合物包含推断含有产生细胞壁合成酶 PBP2'的细菌的样品溶液，或推断含有通过样品预处理而从细胞壁释放的 PBP2'的溶液，所述标记试剂是能够特异性结合 PBP2'的标记抗体。

[4]、根据[2]或[3]的用于检测产生细胞壁合成酶 PBP2'的细菌的方法，其中所述标记试剂是与抗体结合了的不溶性载体。

[5]、根据[2]到[4]任意一项的用于检测产生细胞壁合成酶 PBP2'的细菌的方法，其中所述俘获试剂部位含有两性表面活性剂、阴离子表面活性剂和/或非离子表面活性剂。

[6]、根据[2]到[5]任意一项的用于检测产生细胞壁合成酶 PBP2'的细菌的方法，其中所述俘获试剂部位含有磺基甜菜碱（sulfobetaine）型表面活性剂。

[7]、根据[5]或[6]的用于检测产生细胞壁合成酶 PBP2'的细菌的方法，其中将具有高离子化倾向的阴离子加入到推断含有产生细胞壁合成酶 PBP2'的细菌的样品溶液或推断含有通过样品预处理而从细胞壁释放的 PBP2'的溶液中，然后将这样的溶液提供给样品供给部位。

[8]、根据[7]的用于检测产生细胞壁合成酶 PBP2'的细菌的方法，其中所述具有高离子化倾向的阴离子是至少一种选自氯离子、溴离子和碘离子的阴离子。

[9]、根据[5]到[8]任意一项的用于检测产生细胞壁合成酶 PBP2'的细菌的方法，其中将具有高离子化倾向的阳离子加入到推断含有产生细胞壁合成酶 PBP2'的细菌的样品溶液或推断含有通过样品预处理从

细胞壁释放的 PBP2' 的溶液中，然后将这样的溶液提供给样品供给部位。

[10]、根据[9]的用于检测产生细胞壁合成酶 PBP2' 的细菌的方法，其中所述具有高离子化倾向的阳离子是至少一种选自钾离子、钙离子、钠离子和镁离子的阳离子。

[11]、根据[1]到[10]任意一项的用于检测产生细胞壁合成酶 PBP2' 的细菌的方法，其包括通过碱处理或中和而进行的样品预处理步骤。

[12]、根据[11]的用于检测产生细胞壁合成酶 PBP2' 的细菌的方法，其中所述碱处理是使用碱金属氢氧化物或碳酸盐的水溶液或者碱土金属氢氧化物或碳酸盐的水溶液进行的。

[13]、根据[12]的用于检测产生细胞壁合成酶 PBP2' 的细菌的方法，其中所述碱金属氢氧化物或碳酸盐的水溶液或者碱土金属氢氧化物或碳酸盐的水溶液的 pH 为 11 或更高。

[14]、根据[12]或[13]的用于检测产生细胞壁合成酶 PBP2' 的细菌的方法，其中所述碱金属氢氧化物或碳酸盐的水溶液或者碱土金属氢氧化物或碳酸盐的水溶液的浓度在 0.01N 到 1.0N 之间。

[15]、根据[11]到[14]任意一项的用于检测产生细胞壁合成酶 PBP2' 的细菌的方法，其中用缓冲液中和碱处理后的水溶液。

[16]、根据[1]到[15]任意一项的用于检测产生细胞壁合成酶 PBP2' 的细菌的方法，其中所述样品提供部位含有玻璃纤维。

[17]、根据[1]到[16]任意一项的用于检测产生细胞壁合成酶 PBP2' 的细菌的方法，其中所述产生细胞壁合成酶 PBP2' 的细菌是多重耐药性葡萄球菌。

[18]、一种用于检测产生细胞壁合成酶 PBP2' 的细菌的免疫色谱检测装置，所述装置在片状固相支持物上包括：样品供给部位，在该部位被提供有推断含有产生细胞壁合成酶 PBP2' 的细菌的样品溶液或者推断含有通过样品预处理而由细胞壁释放的 PBP2' 的溶液；标记试剂部位，该部位容纳有试剂，该试剂是以能够使所述试剂扩散穿过固相支持物的方式与 PBP2' 特异性结合的标记抗体；和俘获试剂部位，在该部位俘获试剂能够特异性地结合并俘获 PBP2' 与已经固定化的标记试剂的复合物，所述俘获试剂部位含有两性表面活性剂、阴离子表面活性剂和/或非离子表面活性剂。

[19]、根据[18]的用于检测产生细胞壁合成酶 PBP2'的细菌的免疫色谱检测装置，其中所述俘获试剂部位包含磺基甜菜碱型表面活性剂。

[20]、根据[18]或[19]的用于检测产生细胞壁合成酶 PBP2'的细菌的免疫色谱检测装置，其中所述样品供应部位含有玻璃纤维。

[21]、根据[18]到[20]任意一项的用于检测产生细胞壁合成酶 PBP2'的细菌的免疫色谱检测装置，其中所述产生细胞壁合成酶 PBP2'的细菌是多重耐药性葡萄球菌。

[22]、一种用于检测产生细胞壁合成酶 PBP2'的细菌的试剂盒，其包括：根据[18]到[21]任意一项的用于检测产生细胞壁合成酶 PBP2'的细菌的免疫色谱检测装置；和具有高离子化倾向的阴离子或阳离子溶液，所述溶液将会被加入到推断含有产生细胞壁合成酶 PBP2'的细菌的样品溶液或推断含有通过样品预处理从细胞壁释放的 PBP2'的溶液中。

[23]、根据[22]的用于检测产生细胞壁合成酶 PBP2'的细菌的试剂盒，其中具有高离子化倾向的阴离子是至少一种选自氯离子、溴离子和碘离子的阴离子。

[24]、根据[22]的用于检测产生细胞壁合成酶 PBP2'的细菌的试剂盒，其中具有高离子化倾向的阳离子是至少一种选自钾离子、钙离子、钠离子和镁离子的阳离子。

[25]、根据[22]到[24]任意一项的用于检测产生细胞壁合成酶 PBP2'的细菌的试剂盒，其进一步包括用碱对样品进行碱处理的碱溶液和用于中和的缓冲液。

[26]、根据[25]的用于检测产生细胞壁合成酶 PBP2'的细菌的试剂盒，其中所述的碱溶液是碱金属氢氧化物或碳酸盐的水溶液或者碱土金属氢氧化物或碳酸盐的水溶液。

[27]、根据[26]的用于检测产生细胞壁合成酶 PBP2'的细菌的试剂盒，其中所述碱金属氢氧化物或碳酸盐的水溶液或者碱土金属氢氧化物或碳酸盐水溶液的 pH 为 11 或更高。

[28]、根据[26]或[27]的用于检测产生细胞壁合成酶 PBP2'的细菌的试剂盒，其中所述碱金属氢氧化物或碳酸盐的水溶液或者碱土金属氢氧化物或碳酸盐的水溶液的浓度在 0.01N 到 1.0N 之间。

[29]、根据[22]到[28]任意一项的用于检测产生细胞壁合成酶 PBP2'的细菌的试剂盒，其中所述产生细胞壁合成酶 PBP2'的细菌是多重耐药

性葡萄球菌。

发明效果

使用本发明的免疫色谱检测装置能够高灵敏度地检测 PBP2'。这使得在隔离培养之后只需测试一个菌落。相应地，只需通过在将其从临床样品中分离之后的 1 天内进行一次培养操作，就可以评价出所研究的细菌是否是 MRSA 或 MRCNS。这能够显著降低测试的持续时间和用于纯净培养的培养基费用。进一步地，使得能够从阳性培养基上直接检测以测试 MRSA 菌血症或败血症为目的而进行的血液（液体）培养。这使得能够在早期就开始有效的治疗，减少了治疗的持续时间。

并且，由于使位于已经固定了抗体的支持物上的样品供给元件具有了过滤作用，所以不再需要进行离心分离。因此，可以维持清洁的实验室条件。

可以向免疫色谱检测装置的俘获部位注入表面活性剂，从而可以防止将除抗原以外的破裂细菌结合到标记试剂和/或俘获部位上；即可以避免假阳性反应，并且可以改善灵敏度。这使得不需要再进行先前在细菌预处理过程中所必须的煮沸操作。

本说明书包括了日本专利申请 No. 2005-360984 在说明书和/或附图中所公开的部分或全部内容，所述文件是本申请的优先权文件。

附图简述

图 1 显示了包括标记试剂部位的本发明检测装置的实施方式。

图 2 显示了没有包括标记试剂部位的本发明检测装置的实施方式。

附图标记的描述

- 1: 样品供给部位
- 2: 标记试剂部位
- 3: 俘获试剂（俘获抗体）部位
- 4: 对照部位
- 5: 固相支持物（硝化纤维素膜）
- 6: 吸收部位（吸收垫）
- 7: 顶层压片或外壳

发明的最佳实施方式

下文将详细描述本发明。

本发明涉及能够检测 PBP2' 的免疫色谱检测装置, 所述 PBP2' 是特异性存在于产生细胞壁合成酶 PBP2' 的细菌, 例如多重耐药性葡萄球菌中的, 所述装置具有高灵敏度并且能够以简单快速的方式通过免疫色谱检测来确定是否被产生细胞壁合成酶 PBP2' 的细菌例如多重耐药性葡萄球菌所感染, 本发明还涉及诊断试剂盒。本文中所使用的术语“样品”是指推断含有产生细胞壁合成酶 PBP2' 的细菌的溶液, 更具体来说, 是推断含有多重耐药性葡萄球菌细菌的溶液, 包括细菌悬浮在其中的溶液, 其是通过用被分析物质涂抹生长培养基并且将其在有氧条件下在 35°C 到 37°C 培养 18 小时或更久而制备的, 其中所述生长培养基例如是血液琼脂培养基, 正常琼脂培养基, 心脏浸出液琼脂培养基, 脑心浸液琼脂培养基, 大豆/酪蛋白/消化琼脂培养基, 巧克力琼脂培养基, 含有蛋-蛋黄的甘露糖醇盐琼脂培养基, 或 MRSA 选择培养基, 所述被分析物质例如是来自疑似患者的尿液, 脓液, 脊髓液, 分泌物, 或穿刺液, 以及包括通过在有氧条件下在 35°C 到 37°C 在液体培养基或血液培养基等中振荡培养 18 小时或更久而产生的培养液。该术语还指推断含有从细胞壁中释放的 PBP2' 的提取物, 所述释放是由于对上述细菌悬浮液进行预处理而发生的。“产生细胞壁合成酶 PBP2' 的细菌”包括多重耐药性葡萄球菌, “多重耐药性葡萄球菌”包括多重耐药性金黄色葡萄球菌 (MRSA) 和多重耐药性凝固酶阴性葡萄球菌 (MRCNS)。将被分析物的溶液, 例如尿液, 脓液, 脊髓液, 分泌物, 穿刺液或者从疑似患者中获得的其它样品直接悬浮在生理盐水或磷酸盐缓冲液中也可以成为一种样品。从检测灵敏度的角度来讲, 使用上述方式培养的含有细菌的溶液是优选的。

本发明的免疫色谱检测装置是一种免疫色谱测试部件。例如, 这样的装置是按照图 1 所示的方式组成的。这样的装置在片状固相支持物上具有: 样品供给部位 1, 样品被提供到该部位; 标记试剂部位 2, 其容纳有试剂, 该试剂是以能够使所述试剂扩散穿过固相支持物的方式特异性结合 PBP2' 的标记抗体; 和俘获试剂部位 3, 在该部位俘获试剂能够特异性地结合并俘获 PBP2' 与已经固定的标记试剂的复合物。当

样品被提供给样品供给部位 1 时, 所述样品顺序穿过标记试剂部位 2 和俘获试剂部位 3。在本发明中, 可以向样品供给部位 1 提供样品与能特异性结合 PBP2' 的标记抗体试剂的混合物。在这样的情况下, 可以省略固相支持物上的标记试剂部位 2 (图 2)。当将样品与能特异性结合 PBP2' 的标记抗体试剂的混合物提供给样品供给部位 1 时, 样品中所含有的 PBP2' 能够预先在与固相支持物分离的部位与标记试剂接触。短语“被分析物能够预先在与固相支持物分离的部位与标记试剂接触”是指如下条件, 即标记试剂没有被包含在固相支持物上, 或者其与固相支持物接触但液体没有包括在能够与免疫色谱检测装置的固相支持物例如样品供给部位相连通的位置。在这种情况下, 被分析物预先与标记试剂接触, 其远离了固相支持物或者与固相支持物相接触的部位。

本发明的免疫色谱检测装置可以进一步包含对照试剂部位和吸收部位。对对照试剂没有特别的限制。例如, 可以使用能够与标记试剂中的抗体结合的物质。可以将对照试剂固定在俘获试剂部位下游的位置。在图 1 中, 对照部位 4 相当于这样的部位。吸收部位能够吸收液体, 从而使其能够吸收已经通过了俘获部位的样品以调节样品的流量。可以将这样的部位提供在检测装置的最低位置处。在图 1 中, 吸收部位 6 相当于这样的部位。例如, 可以使用由纸制成的吸收部位作为吸收垫。

在本发明的免疫色谱检测装置中, 样品供给部位可以如现在的样子由固相支持物的一端构成, 或者其可以由不同于固相支持物的元件所构成。在后一种构成方式中, 为了使样品供给部位首先吸收样品或样品与标记试剂的混合物, 应使样品供给部位与固相支持物接触, 从而使得溶液能够扩散并在毛细流动的帮助下迁移到固相支持物上, 然后将所吸收的样品或混合物提供给固相支持物。除固相支持物以外的元件的例子包括, 但不限于, 由天然或合成聚合物所组成的元件, 所述天然或合成的聚合物包括硝化纤维素、醋酸纤维素、尼龙、聚醚砜、聚乙烯醇、聚酯、玻璃纤维、聚烯烃、纤维素或聚苯乙烯以及这样的物质的混合物。

本发明免疫色谱检测装置的“标记试剂”是能够特异性结合 PBP2' 的抗体与足够的标记物质的共轭物。标记物质的例子包括金属胶体例如胶体金, 非金属胶体例如硒胶体, 和不溶物质例如着色树脂颗粒。

在本发明中，这样的标记物质偶尔被称为“不溶性载体”。优选地，不溶性载体是带负电荷的。通常，先将标记试剂注入到不同于固相支持物的元件中，干燥，然后将其置于与固相支持物相连的部位。或者，可以直接将标记试剂施加到固相支持物上然后干燥。当样品到达含有标记试剂的标记试剂部位时，所述标记试剂被溶于样品中，然后所产生的溶液可以扩散穿过固相支持物。具体地，标记试剂是以在支持物上可扩展的方式被保持在标记试剂部位上的。

本发明的免疫色谱检测装置的俘获试剂是一种能够特异性结合 PBP2' 的抗体，俘获试剂部位可以特异性地结合并俘获 PBP2' 与标记试剂的复合物，然后形成标记试剂/PBP2'/俘获试剂的复合物。虽然对制备方法没有限制，但是通常，俘获试剂是通过直接施加到固相支持物上而后进行干燥而制备的。可以将俘获试剂注入到除固相支持物以外的其它元件上然后干燥，并且将所产生的物质置于固相支持物上。将俘获试剂固定在固相支持物上的方法不限于吸附。固定可以通过常规的技术进行，例如借助官能团例如氨基或羧基的化学结合。

用作俘获试剂的抗体可以与用作标记试剂的抗体相同。然而，当 PBP2' 中仅有一个位点能与这样的物质结合时，则不会形成标记试剂/PBP2'/俘获试剂的复合物。因此，在这种情况下，俘获试剂需要结合到不同于标记试剂结合位点的 PBP2' 位点上。

固相支持物可以是任何物质，只要样品可以被这样的物质所吸收并且能够通过毛细现象流动即可。例如，所述支持物可选自天然或合成的聚合物，所述聚合物包括硝化纤维素、醋酸纤维素、尼龙、聚醚砜、聚乙烯醇、聚酯、玻璃纤维、聚烯烃、纤维素或聚苯乙烯以及上述物质的混合物。固相支持物优选是条形的。

由多重耐药性葡萄球菌特异性产生的细胞壁合成酶 PBP2' 存在于位于细胞壁内部的细胞膜上。通过预处理破坏或融化多重耐药性葡萄球菌细胞壁有利于俘获试剂和标记试剂识别 PBP2'。作为破坏或融化多重耐药性葡萄球菌细胞壁的萃取试剂，细胞壁消化酶或者具有杀菌作用的给定表面活性剂，例如给定的阳离子表面活性剂或两性表面活性剂是已知的。使用这样的试剂是困难的，因为这样的试剂价格昂贵并且在进行免疫色谱检测时其强烈地抑制了抗原-抗体反应，并且还有其它的原因。因此，在进行本发明的免疫色谱检测时，优选使用稀的碱

性溶液作为 PBP2' 萃取试剂。所述碱性溶液的具体例子包括 0.01N 到 1.0N 碱金属氢氧化物或碳酸盐的水溶液和 0.01N 到 1.0N 碱土金属氢氧化物或碳酸盐的水溶液。上述稀碱性溶液的 pH 优选为 11 或更高。

当使用如上所述的稀碱性溶液预处理含有细菌的溶液时，如果预处理后 pH 保留在 11 或更高，则会抑制抗原-抗体反应。因此，需要对碱性溶液进行中和。对中和溶液没有特别的限制，其例子包括磷酸盐缓冲液，Tris 缓冲液，和 Good's 缓冲液，例如 MES，Bis-Tris，ADA，PIPES，ACES，MOPSO，BES，MOPS，TES，HEPES，DIPSO，TAPSO，POPSO，HEPPSO，EPPS，Tricine，Bicine 或 TAPS，它们在免疫色谱测试反应体系的最优 pH 下，即 6 到 8 之间显示出缓冲能力。在本发明中，细菌的预处理是对产生细胞壁合成酶 PBP2' 的细菌，更特别地是对产生作为抗原的 PBP2' 的细菌进行的提取过程，其是通过将推断含有多重耐药性葡萄球菌的细菌溶液暴露在碱性条件下而进行的。“预处理”还指中和碱性条件的过程。预处理可以通过将碱性溶液加入到用于碱化的含有细菌的样品溶液中，然后向其中加入中和溶液而进行。或者，可以将用铂环或棉签收集的细菌直接悬浮在碱性溶液中，然后再加入中和溶液。对所加入的上述溶液的量没有限制，可以如下地确定其加入量，即能够使中和后样品溶液的 pH 达到 6 到 9 左右。并且，可以将中和溶液预先注入到样品供给部位，然后进行干燥。

在本发明中，可以对细菌溶液进行预处理，然后进行中和，可以向其中加入添加剂，例如盐、表明活性剂、蛋白质、聚合物、酸性化合物以及碱性化合物，可以将所获得的物质彻底混合，然后可将样品提供给免疫色谱检测装置的样品供给部位。这些添加剂可以提高抗原-抗体反应的灵敏度并且能够减少假阳性反应（例如由于非特异性反应而导致的假阳性反应）。进一步地，可以将上述添加剂预先加入到上述稀碱性溶液或中和溶液中，以减少操作步骤。

当想要检测多重耐药性葡萄球菌时，源自非多重耐药性葡萄球菌（MSSA 或 MSCNS）或除葡萄球菌以外的其它细菌的物质可能偶尔会与抗体（即，标记试剂以及俘获试剂）结合，并且可能显示出假阳性结果。因此，在乳液聚集试验中使用 PBP2' 检测试剂时，必须通过在碱性试剂存在下煮沸细菌溶液来将存在于金黄色葡萄球菌细胞壁上且显示出与 IgG 结合的能力的假阳性病原物质例如蛋白 A 灭活，还必须将

离心后的细胞衰竭残余物除去，并且必须使用离心后的悬浮液进行测试。采用根据本发明的免疫色谱检测，可以通过向免疫色谱检测装置的俘获试剂部位注入表面活性剂来抑制假阳性病原物质与俘获抗体的结合，而不再需要通过煮沸来灭活假阳性病原物质。两性表面活性剂，阴离子表面活性剂或非离子表面活性剂是优选的，并且含有它们中的一种就足够了。表面活性剂能够帮助抑制假阳性病原物质与俘获抗体结合的原因被认为是表面活性剂掩蔽了抗体与假阳性病原物质结合的位点。因此，认为具有更大分子量和/或更多环状结构的表面活性剂更有效。例如，与不加入表面活性剂的情况相比，使用以下任何非离子表面活性剂都能够更多地抑制由非多重耐药性金黄色葡萄球菌产生的非多重耐药性假阳性结果：分子量为 646 且具有一个 6 元环状结构的非离子表面活性剂（商品名：Tx100；Nacalai Tesque）；分子量为 364 且不具有 6 元环状结构的两性表面活性剂（商品名：SB3-14；Calbiochem）；分子量为 615 且具有三个 6 元环状结构和一个 5 元环状结构的两性表面活性剂（商品名：CHAPS；DOJINDO LABORATORIES）；或者分子量为 878 且具有三个 6 元环状结构和一个 5 元环状结构的非离子表面活性剂（商品名：BIGCHAP，DOJINDO LABORATORIES）。使用 CHAPS 和 BIGCHAP 获得的抑制效果大于使用 Tx100 和 SB3-14 所获得的效果。因此，认为表面活性剂的分子量应当优选为 300 或更高，更优选 600 或更高，并且认为表面活性剂应当优选包含更多的环状结构，例如 6 元环。为了抑制假阳性反应，优选使用以与不溶性载体相同的方式带电的表面活性剂。当不溶性载体是带负电荷的乳液或胶体金时，优选表面活性剂也带负电荷。

特别关心的是由存在于金黄色葡萄球菌细胞壁中的蛋白 A 所产生的假阳性反应。蛋白 A 能够与免疫球蛋白 G 的 Fc 区域强烈地结合。特异性识别 PBP2' 的抗体被用作为标记试剂和俘获试剂。抗体可以是免疫球蛋白 G 或免疫球蛋白 M，这没有特别的限制。当使用免疫球蛋白 G 时，需在除去 Fc 区域的情况下使用所述抗体，并且俘获试剂区域是与上述表面活性剂结合的。这样就可以避免由蛋白 A 所引起的假阳性反应。使用已知的降解酶例如胃蛋白酶或木瓜蛋白酶可以很容易地将 Fc 区域除去。

G 族链球菌细胞壁中所含的蛋白 G 也能特异性地与免疫球蛋白 G

的 Fc 区域结合。因此，蛋白 G 也可以像蛋白质 A 那样与标记试剂或俘获试剂进行非特异性的反应。这样，假阳性反应也可以以上述方式得以避免。

在将要施加到俘获试剂部位的表面活性剂中，离子型表面活性剂的性质特别容易受到穿过俘获试剂区域的溶液中的阴离子或阳离子浓度的影响。这需要根据所使用的表面活性剂的类型、浓度、性质或其它条件来确定溶液中阴离子或阳离子的最佳浓度。阴离子的离子包括具有高离子化倾向的氯离子，溴离子和碘离子。阳离子的离子包括具有高离子化倾向的钾离子、钙离子、钠离子和镁离子。在这种情况下，可以使用多种阴离子或阳离子。

根据本发明的方法的检测灵敏度可以通过向俘获试剂部位加入含有磺基甜菜碱部分的表面活性剂而得到改善。由于在乳液凝集试验中不能通过使用 PBP2' 检测试剂来以高灵敏度检测出 PBP2'，因此必须通过在碱性试剂的存在下煮沸细菌溶液来破坏细胞壁，从而完全地提取出 PBP2'。根据本发明，能够通过加入含有磺基甜菜碱部分的表面活性剂来改善检测灵敏度，这使得即使在没有进行煮沸且 PBP2' 洗脱不完全的情况下也能够以高灵敏度检测出 PBP2'。在碱性试剂的存在下进行煮沸将会导致 PBP2' 降解，或者由于结构的改变导致抗体识别部位的改变进而导致脱敏；然而，不进行煮沸有利于检测灵敏度的保持。

分别含有磺基甜菜碱部分的表面活性剂的例子包括 CHAPS，CHAPSO，十四烷基磺基甜菜碱 (SB3-14)，和十二烷基二甲基铵基丁烷磺酸酯 (DDABS)。

当要将俘获试剂固定到俘获试剂部位上时，可以预先将用于抑制假阳性病原物质与俘获抗体结合的表面活性剂，和用于改善灵敏度的表面活性剂加入到俘获试剂中。可以使用用于抑制假阳性病原物质与俘获抗体结合的表面活性剂，和用于改善灵敏度的磺基甜菜碱型表面活性剂中的任意一种或两种。或者，用于抑制假阳性病原物质与俘获抗体结合的表面活性剂可以是磺基甜菜碱型表面活性剂，在这种情况下也可以改善灵敏度。

进一步地，本发明的方法可以通过向俘获试剂部位加入分子量优选为 300 或更高，更优选为 600 或更高的含有磺基甜菜碱部分的表面活性剂而产生抑制假阳性病原物质与俘获抗体结合的效果和改善灵敏

度的效果。具体地，GHAPS 和 SB3-14 是优选的，CHAPS 是特别优选的。可以向俘获试剂部位加入多种表面活性剂。

当如上所述地加入阴离子或阳离子时，可以将这样的阴离子或阳离子加入到推断含有多重耐药性葡萄球菌的样品溶液中，或者加入到推断含有通过样品预处理而由细胞壁释放的 PBP2' 的样品溶液中。

本发明的方法进一步包括一种防止假阳性病原物质到达俘获试剂部位，从而避免了这样的假阳性病原物质所带来的影响的方法。例如，可以在本发明装置中俘获试剂的上游部位除去假阳性病原物质。作为除去假阳性病原物质的方法，免疫色谱检测装置的样品供给部位优选含有玻璃纤维。源自细菌的假阳性病原物质被玻璃纤维所吸附，这样就抑制了假阳性病原物质穿过俘获试剂。其继而抑制了假阳性反应。

本发明的方法是一种基于抗原-抗体反应的检测方法，其使用细胞壁合成酶 PBP2' 作为抗原并且使抗体与其反应。因此，如果样品中存在细胞壁合成酶 PBP2'，则该 PBP2' 就可以被本发明的方法检测到。通常，细胞壁合成酶 PBP2' 是由多重耐药型葡萄球菌特异性产生的，并且特异性地存在于这样的细菌中。

目前，除了多重耐药性葡萄球菌以外的 PBP2' 产生细菌的存在是未知的。在本说明书中，术语“多重耐药性葡萄球菌”偶尔用作代替术语“产生细胞壁合成酶 PBP2' 的细菌”的具体例子。这样的使用并没有试图将细菌限制为“多重耐药性葡萄球菌”。该术语在本发明方法被允许实施的范围内可被解读为“产生细胞壁合成酶 PBP2' 的细菌”。也就是说，本发明的方法也可以检测除多重耐药性葡萄球菌以外的其它能够产生 PBP2' 的细菌。此外，每种含有细胞壁合成酶 PBP2' 的细菌都可以通过本发明的方法进行检测。通常，认为细胞壁合成酶 PBP2' 特异性地存在于多重耐药性葡萄球菌细胞壁内部的细胞膜上。本发明的方法包括使用 PBP2' 提取试剂来进行破坏或融化细胞膜的预处理。因此，每种在细胞壁内部含有细胞壁合成酶 PBP2' 的细菌都可以通过本发明的方法得到有效地检测。

实施例

下文参照以下实施例更加详细地描述了本发明，但本发明不并限于这些实施例。

实施例 1: 通过免疫色谱检测法检测 MRSA 中的 PBP2' (图 1)

(1) 用抗体敏化的乳胶颗粒的制备和干燥

根据常规方法用胃蛋白酶处理抗-PBP2'单克隆抗体以获得 F(ab')₂。对所产生的物质进行 0.4 μm 乳胶颗粒的敏化, 并且将所获得的溶液喷雾到无纺聚苯乙烯织物上。然后将所产生的物质在减压条件下在减压装置中干燥 1 小时以制备干燥的乳液抗体垫。将所述垫以 4 mm 的间隔进行切割以供使用, 并且用作标记部位 2。

(2) 免疫色谱检测装置的制备

根据常规方法用胃蛋白酶处理第二抗-PBP2'单克隆抗体, 该抗体的识别位点不同于乳液敏化的抗-PBP2'单克隆抗体的识别位点, 从而获得 F(ab')₂。用含有 0.075% CHAPS 的柠檬酸盐缓冲液 (pH 6) 稀释所获得的物质, 将所产生的物质施加到硝化纤维膜 (固相支持物 5) 上, 并且将所述膜彻底干燥 (俘获试剂部位 3)。作为对照试剂, 将抗-小鼠 IgGs 以相同的方式施加到硝化纤维膜上并彻底干燥 (对照部位 4)。

将包括对照部位 4 的俘获试剂部位 3 和固相支持物 5 置于疏水片 7 上, 在任意位置处设置标记试剂部位 2 以及作为样品供给部位 1 的玻璃纤维和作为吸收部位 6 的滤纸。

(3) 样品的预处理

将金黄色葡萄球菌 (14 细菌) 在血液琼脂培养基上在 35°C 下培养过夜, 并且将一接种环量(loopful)的培养物直接悬浮在 0.2N 的 NaOH 中。类似地, 挑选一个菌落, 然后将其悬浮在 100 μl 0.2N 的 NaOH 中。然后用 50 μl 0.6M 的 Tris-HCl 缓冲液中和所产生的溶液, 其中所述缓冲液中含有非离子表面活性剂、牛血清白蛋白和兔 IgG。

(4) 测试

将免疫色谱检测装置引入到一个 1.5 ml 的试管中, 所述试管中含有经过样品预处理的溶液, 十分钟后用肉眼评价俘获试剂 3 的显色情况, 显色的俘获试剂被判定为阳性。没有显色的试剂被判定为阴性。

(5) 药物敏感度测试

将与(3)相同方式培养的细菌悬浮在灭菌的0.9%氯化钠溶液钟,并且将溶液在578 nm处的吸光度调节到0.3。将所获得的溶液接种到含有6 μg/ml 苯唑西林(oxacillin)和4%氯化钠的Muller-Hinton琼脂培养基上,在35℃下培养24小时,生长的细菌被确定为MRSA,而没有生长的细菌被确定为MSSA。

(6) 结果

结果显示在表1中。

表1

一接种环量

		药物敏感度		合计
		MRSA	MSSA	
本发明	MRSA	4	0	4
	MSSA	0	10	10
	合计	4	10	14

一个菌落

		药物敏感度		合计
		MRSA	MSSA	
本发明	MRSA	4	0	4
	MSSA	0	10	10
	合计	4	10	14

如表1所示,MRSA和MSSA之间的阳性一致率为100%(4/4),它们之间的阴性一致率也为100%(10/10)。这表明总体上的一致率为100(14/14)。这些结果显示出了本发明相对于常规方法的优越性。

实施例2: 向俘获试剂部位加入表面活性剂的效果

(1) 用抗体敏化的乳胶颗粒的制备和干燥

使用实施例1中制备的乳胶颗粒。

(2) 免疫色谱检测装置的制备

按照与实施例 1 相同的方式制备该装置。在这种情况下，制备并使用包含捕获试剂部位并向其中加入了 0.05% CHAPS、Tx100、SB3-14、BIGCHAP 和 DTAC（十二烷基三甲基氯化铵）的装置以及不含上述物质的装置。

(3) 样品的预处理

按照与实施例 1 相同的方式培养被药物敏感测试评价为药物敏感的细菌，即 MSSA，和被评价为具有耐药性的细菌，即 MRSA。选取二和三接种环量的 MSSA 和一接种环量的 MRSA，然后进行预处理。

(4) 测试

除稀释以外，按照与实施例 1 相同的方式测试 MSSA。此外，用以 2:1 的比例含有 0.2N NaOH 和 0.6M Tris HCl 缓冲液（含有非离子表面活性剂，牛血清白蛋白和兔 IgG）的混合物对 MRSA 进行两步稀释，并且按照与实施例 1 相同的方式测试 150 μ l 稀释了至少 1024 倍的该稀释液。

(5) 结果

将由使用含有加入到俘获试剂部位的表面活性剂的装置所获得的结果与由使用没有包含表面活性剂的装置所获得的结果进行比较。使用 MSSA 所获得的结果显示于表 2 中。阴性结果以“-”代表，假阳性反应的程度以“+”的数目代表。使用 MRSA 所获得的结果显示于表 3 中。阴性结果以“-”代表，阳性的结果以“+”代表。

表 2

MSSA						
	没有加入	Tx 100	CHAPS	SB3-14	BIGCHAP	DTAC
MSSA (2 接种环量)	+	-	-	-	-	+
MSSA (3 接种环量)	++	+	-	+	-	++

当没有加入表面活性剂和加入阳离子表面活性剂 DTAC 时, 2 接种环量的 MSSA 获得了假阳性结果。当加入具有相对较小分子量的 Tx100 或 SB3-14 时, 3 接种环量的 MSSA 也产生了假阳性反应, 虽然其程度不如没有加入表面活性剂或者加入 DTAC 时的强。当加入了具有相对较大分子量的 CHAPS 或 BIGCHAP 时, 2 和 3 接种环量的 MSSA 均产生了阴性结果。

如表 2 中所示, 向俘获试剂部位加入非离子表面活性剂即 Tx100 或 BIGCHAP, 或者加入两性表面活性剂即 CHAPS 或 SB3-14 能够抑制由 MSSA 所引起的假阳性反应。同时, 包含多个环状结构并且具有大分子量的 CHAPS 或 BIGCHAP 能够更加有效地抑制假阳性反应。这些结果证明了向俘获试剂部位加入表面活性剂的优越性。

表 3

MRSA						
	没有加入	Tx 100	CHAPS	SB3-14	BIGCHAP	DTAC
1:1024	+	+	+	+	+	+(假阳性)
1:2048	-	-	+	+	-	+(假阳性)
1:4096	-	-	-	-	-	+(假阳性)

向俘获试剂部位加入 CHAPS 或 SB3-14 改善了检测灵敏度。加入 DTAC 所获得的结果被认为是构成了假阳性。

如表 3 所示, 与没有加入表面活性剂或加入了非磺基甜菜碱型表

面活性剂即 Tx100 或 BIGCHAP 的情况相比，向俘获试剂部位加入磺基甜菜碱型表面活性剂，即 SB3-14 或 CHAPPS，能够改善灵敏度。这些结果证明了向俘获试剂部位加入磺基甜菜碱型表面活性剂的优越性。

实施例 2 的结果证明了 CHAPS 在抑制假阳性反应和改善灵敏度方面尤其显示出了令人满意的效果，因此 CHAPS 是特别有效的。

实施例 3: 通过免疫色谱检测法检测 MRCNS 中的 PBP2'

(1) 用抗体敏化的乳胶颗粒的制备和干燥

使用实施例 1 中制备的乳胶颗粒。

(2) 免疫色谱检测装置的制备

按照与实施例 1 相同的方式制备该装置。

(3) 样品的预处理

在通过革兰氏染色法显示了葡萄球菌特性的葡萄球菌中，以及在已经通过过氧化氢酶测试被评价为阳性并且通过凝固酶测试被评价为阴性的葡萄球菌中，按照与实施例 1 相同的方式培养被药物敏感度测试评价为对甲氧西林敏感和耐药的两种细菌，即 MSCNS，和被药物敏感度测试评价为对甲氧西林耐药的细菌，即 MRCNS，并且选取一接种环量的上述物质，然后进行预处理。

(4) 测试

按照与实施例 1 相同的方式进行试验。

(5) 药物敏感度测试

按照与实施例 1 相同的方式进行测试。

(6) 结果

结果示于表 4 中。药物敏感度测试的结果代表如下含义：S: 敏感；R: 耐受；+; 阳性结果；-: 阴性结果。

表 4

	药物敏感度测试	本发明
菌株 A	S	-
菌株 B	S	-
菌株 C	R	+

被药物敏感性测试评价为敏感的两个菌株，即 MSCNS，显示出阴性结果，而被药物敏感性测试评价为耐受的菌株，即 MRCNS，显示出阳性结果。

本文中所引用的所有出版物，专利和专利申请都被全文引入本文作为参考。

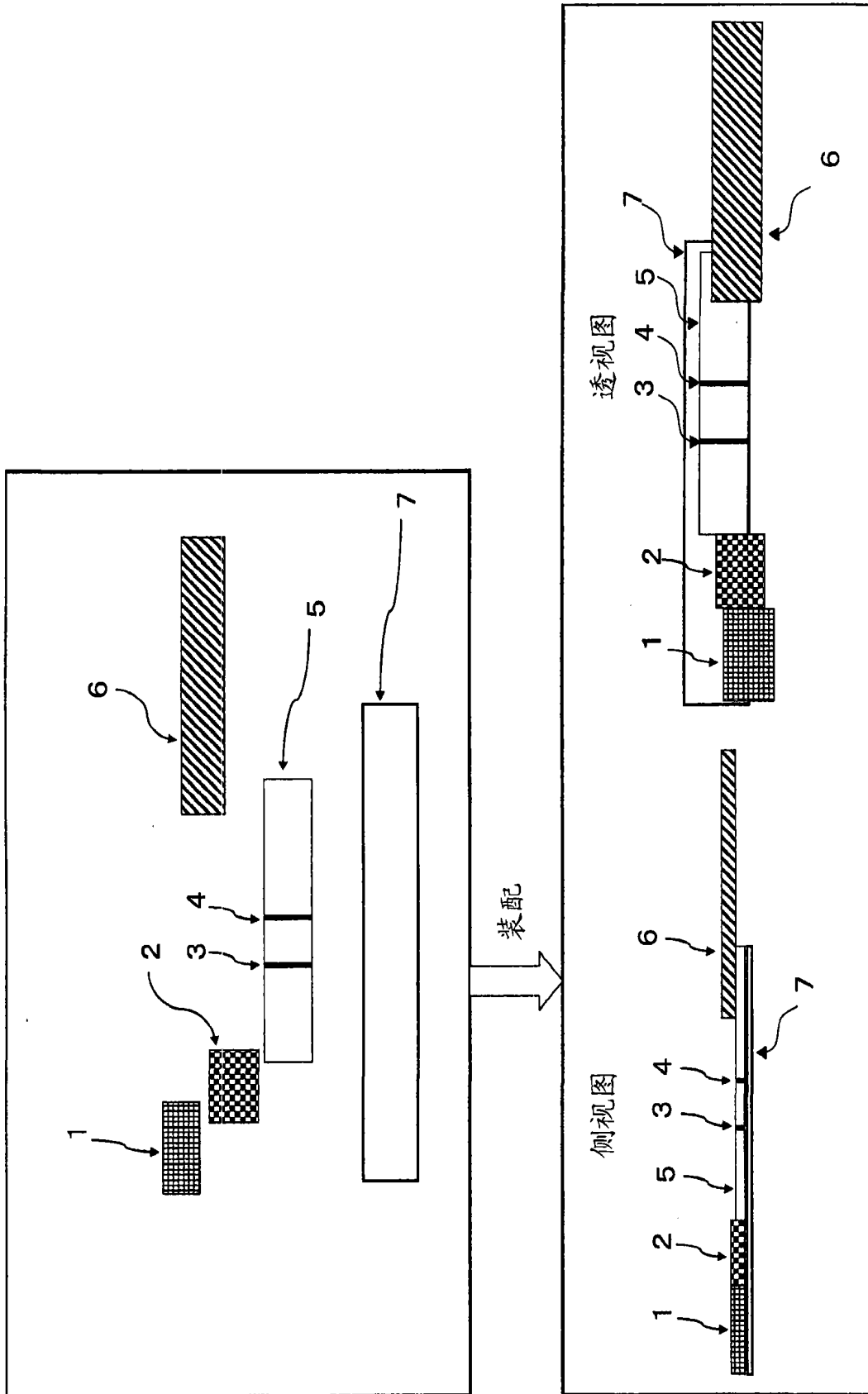


图 1

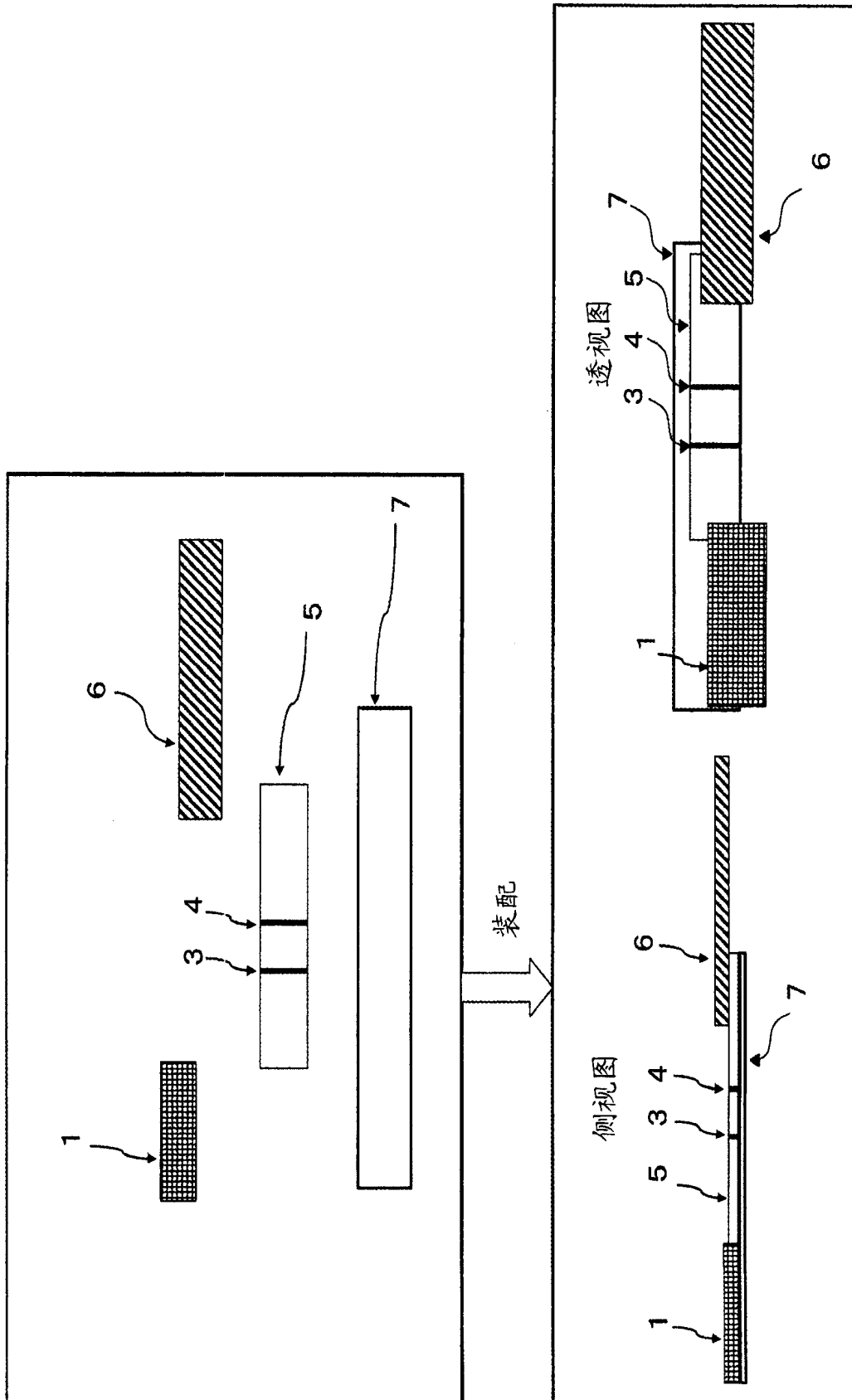


图 2

专利名称(译)	多重耐药葡萄球菌的免疫色谱检测方法和诊断试剂盒		
公开(公告)号	CN101395476A	公开(公告)日	2009-03-25
申请号	CN200680052839.3	申请日	2006-12-14
[标]申请(专利权)人(译)	电化生研株式会社		
申请(专利权)人(译)	电化生研株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	电化生研株式会社		
[标]发明人	伊藤裕美		
发明人	伊藤裕美		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/543 G01N33/531		
CPC分类号	G01N2333/31 G01N2800/44 G01N33/56911		
代理人(译)	刘健 孙秀武		
优先权	2005360984 2005-12-14 JP		
其他公开文献	CN101395476B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种能够通过免疫色谱检测方法灵敏、简单且快速地检测出由多重耐药性葡萄球菌细菌特异性产生的PBP2'的免疫色谱检测装置，并且该装置能够确定多重耐药性葡萄球菌的感染，本发明还提供了使用上述检测装置的诊断方法，以及包含上述检测装置的诊断试剂盒。本发明涉及用于检测多重耐药性葡萄球菌的免疫色谱检测装置，该装置包括：在片状固相支持物上的样品供给部位，该部位提供了推断含有多重耐药性葡萄球菌的样品溶液或推断含有通过样品预处理而由细胞壁释放的PBP2'的溶液；标记试剂单元，该部位容纳有标记试剂，在该标记试剂中与PBP2'特异性结合的抗体得到标记并且能够扩散穿过所述固相支持物；和俘获试剂部位，在该部位俘获试剂能够特异性地结合并俘获PBP2'与已经固定化的标记试剂的复合物，在俘获试剂部位或在固相支持物上的俘获试剂部位上游含有两性表面活性剂，阴离子表面活性剂，和/或非离子表面活性剂。