



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104246505 A

(43) 申请公布日 2014. 12. 24

(21) 申请号 201380018968. 0

代理人 刘新宇 李茂家

(22) 申请日 2013. 04. 04

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

G01N 33/569 (2006. 01)

2012-086566 2012. 04. 05 JP

G01N 33/48 (2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

G01N 33/53 (2006. 01)

2014. 10. 08

G01N 33/543 (2006. 01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2013/060301 2013. 04. 04

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/151122 JA 2013. 10. 10

(71) 申请人 株式会社比尔生命

地址 日本静冈县

申请人 有限会社阿诺泰克

(72) 发明人 野中浦雄 北川俊之

(74) 专利代理机构 北京林达刘知识产权代理事

务所(普通合伙) 11277

权利要求书2页 说明书9页 附图1页

(54) 发明名称

结核菌群的免疫学检测方法和试剂盒

(57) 摘要

由于用于检测结核菌群的常规方法需要时间长且还需要大量劳力和费用,因此,还不能进行结核病的确定诊断和早期治疗开始。已存在对快速检测方法的需求。即使对于从生物样品直接检测,如果生物样品中不存在 MPT64 或仅存在非常少量的 MPT64,也不能进行检测。结果,已产生结核菌群感染被忽略的风险,并且更可靠的检测方法十分必要。提供一种方法和试剂盒,其中加热处理施加至含有结核菌群的生物样品,从而使结核菌群特异的分泌蛋白质,特别是 MPB64,分泌到细菌细胞外,并将得到的处理样品进行免疫学测定,从而在不培养生物样品的情况下以更迅速且简便的方式检测结核菌群。

1. 一种结核菌群的检测方法,其包括使结核菌群特异的蛋白质进行免疫学测定,其中所述蛋白质通过使含有所述结核菌群的生物样品进行加热处理而被细胞外分泌。

2. 根据权利要求 1 所述的结核菌群的检测方法,其中所述生物样品的所述加热处理在 40℃至 60℃下进行。

3. 根据权利要求 2 所述的结核菌群的检测方法,其中所述生物样品的所述加热处理在 40℃至 55℃下进行。

4. 根据权利要求 1 至 3 任一项所述的结核菌群的检测方法,其中所述生物样品的所述加热处理进行至少 15 分钟。

5. 根据权利要求 4 所述的结核菌群的检测方法,其中所述生物样品的所述加热处理进行 15 分钟以上且 2.5 小时以下。

6. 根据权利要求 1 至 5 任一项所述的结核菌群的检测方法,其中所述生物样品为选自痰、支气管分泌物、胸膜积液、胃液、血液、脊髓液、尿液、排泄物、支气管灌洗液和收集自支气管或肺的组织组成的至少一种样品。

7. 根据权利要求 6 所述的结核菌群的检测方法,其中所述生物样品为痰。

8. 根据权利要求 1 至 7 任一项所述的结核菌群的检测方法,其中所述生物样品在进行所述加热处理之前用样品处理剂溶解。

9. 根据权利要求 8 所述的结核菌群的检测方法,其中用样品处理剂溶解的所述生物样品在进行所述加热处理之前分散或溶于溶剂中。

10. 根据权利要求 1 至 9 任一项所述的结核菌群的检测方法,其中所述免疫学测定为使用抗所述结核菌群特异的分泌蛋白质的第一抗体和第二抗体的夹心免疫学测定。

11. 根据权利要求 10 所述的结核菌群的检测方法,其中所述免疫学测定为免疫层析测定。

12. 根据权利要求 10 所述的结核菌群的检测方法,其中所述免疫学测定为 ELISA。

13. 根据权利要求 10 至 12 任一项所述的结核菌群的检测方法,其中所述结核菌群特异的分泌蛋白质为 MPB64 或 MPT64。

14. 一种结核菌群检测用试剂盒,其至少包括使含有所述结核菌群的生物样品进行加热处理的处理容器,和用于检测通过所述加热处理分泌的结核菌群特异的分泌蛋白质的免疫学测定装置。

15. 根据权利要求 14 所述的结核菌群检测用试剂盒,其进一步包括样品处理剂和 / 或溶剂。

16. 根据权利要求 14 或 15 所述的结核菌群检测用试剂盒,其中所述免疫学测定为使用抗所述结核菌群特异的分泌蛋白质的第一抗体和第二抗体的夹心免疫学测定。

17. 根据权利要求 14 或 15 所述的结核菌群检测用试剂盒,其中所述免疫学测定装置为免疫层析测定装置。

18. 根据权利要求 14 或 15 所述的结核菌群检测用试剂盒,其中所述免疫学测定装置为 ELISA 测定装置。

19. 根据权利要求 14 至 18 任一项所述的结核菌群检测用试剂盒,其中所述结核菌群特异的分泌蛋白质为 MPB64 或 MPT64。

20. 一种用于细胞外分泌结核菌群特异的蛋白质的方法,其包括使含有所述结核菌群

的生物样品进行加热处理。

结核菌群的免疫学检测方法和试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及高度安全的结核菌群 (*Mycobacterium tuberculosis complex*) 的免疫学检测方法和试剂盒,其通过在预定的温度下加热处理生物样品并免疫学检测由此被细胞外分泌 (extracellularly secreted) 的结核菌群特异的分泌蛋白质,可在不进行培养操作的情况下由含有结核菌群的生物样品直接简便且迅速地进行。

背景技术

[0002] 结核 (Tuberculosis) 为目前高度重要的传染病,据称每年日本国内有数千人、世界各地有数百万人死于该疾病,根据传染病法 (Infectious Disease Law) 疑似结核感染的患者必须入院。当诊断患者患有结核时医师必须立即报告给当局,因而需要及时的响应。

[0003] 属于结核菌群的结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, 人型结核菌)、牛结核分枝杆菌 (*Mycobacterium bovis*, 牛型结核菌)、鼠结核分枝杆菌 (*Mycobacterium microti*, 鼠型结核菌) 和非洲结核分枝杆菌 (*Mycobacterium africanum*, 非洲型结核菌) 已知为对人类致病的抗酸菌 (acid-fast bacteria)。鸟结核分枝杆菌 (*Mycobacterium avium*)、堪萨斯结核分枝杆菌 (*Mycobacterium kansasii*) 和海鱼结核分枝杆菌 (*Mycobacterium marinum*) 等已知为非结核性分枝杆菌 (non-tuberculous mycobacteria)。

[0004] 感染有结核菌群的人类主要由结核分枝杆菌引起,在某些罕见病例中,由牛结核分枝杆菌引起。近年来,非结核性分枝杆菌种中,感染有鸟结核分枝杆菌的病例增加。由于这两类感染存在类似的临床症状,病因细菌的鉴定对于确定治疗方针也是重要的。

[0005] 因此,结核感染或非结核性分枝杆菌感染的区别检测对于减轻患者负担和适当地进行早期治疗同样是重要的。在另一方面,从公共卫生的角度,区别检测对于防止第三人继发感染的目的也是重要的。

[0006] 迄今为止,作为检测结核菌群的方法,已实施了基于培养的检测方法。此类培养方法通过将待试验的生物样品接种至液体培养基或固体培养基并检测生长的细菌细胞来进行。尽管使用液体培养基的方法可缩短待试验的生物样品的培养期,但该方法在操作期间具有继发感染的高风险,因而需要高度安全的设备和装置。使用固体培养基的方法需要长达大约 2 个月的时间才能获得检测结果。结核菌群必须使用高度安全的装置在高度安全的环境中特别小心地培养以防止继发感染。

[0007] 作为用于从上述培养的生物样品的培养基中鉴定结核菌群的方法,已知涉及免疫学测定分泌至培养基中的结核菌群特异的蛋白质的简便检测方法。

[0008] 日本专利特开平 11-108931 号公报公开了用于检测结核菌群存在的方法,该方法包括:将从结核病患者收集的生物样品接种至固体培养基或液体培养基,培养结核菌群数日至数周;然后免疫学检测分泌至培养基中的结核菌群特异的分泌蛋白质 MPB64。根据该文献,该方法与常规方法相比允许在培养后立即鉴定和检测结核菌群并减少操作期间继发感染的风险。

[0009] 然而,该方法涉及培养包含在生物样品中的结核菌群,并使用得到的培养物作为样品。因此,该方法需要与直至结核菌群被检测和鉴定的培养期几乎相同的时间,因而需要大量劳力和费用。

[0010] 如日本专利特开平 11-108931 号公报所述,MPB64 为牛结核分枝杆菌 BCG (*M. bovis* BCG) 产生并被细胞外分泌的结核菌群特异的分泌蛋白质。MPT64 为结核分枝杆菌产生并被细胞外分泌的结核菌群特异的分泌蛋白质。MPB64 和 MPT64 已知为相同的物质。

[0011] 日本专利特开 2002-62299 号公报指出,结核菌群特异的分泌蛋白质 MPT64 可在不培养包含在生物样品中的结核菌群的情况下通过免疫学测定来检测。该方法涉及处理生物样品如痰并检测包含在生物样品中的 MPT64,从而检测结核菌群的存在。

[0012] 然而,即使结核菌群存在于生物样品中,除非 MPB64 由结核菌群被细胞外分泌并包含在生物样品中,否则该方法也不能检测出结核菌群。另外,丰度小的 MPT64,即使分泌也需要大量的生物样品并使操作复杂化。该操作增加了试验对象和负责试验人员的负担。同时,可能会忽略结核菌群的感染,导致公共卫生问题。

[0013] 国际公开 W02009/084481 号公开了一种更快速、更安全且比以往更精确地诊断结核菌感染的方法,该方法包括使用抗 MPB64 中特定表位的抗体特异地检测生物样品中的 MPB64。根据该方法,可应用的样品可为通过使用少量液体培养基仅在结核菌群的细菌细胞实质上开始生长之前的一段时间内培养生物样品获得的培养物。

[0014] 然而,该方法仍需要促进 MPB64 从生长前的细菌细胞分泌以使大量 MPB64 在培养基中累积的方法。

[0015] 现有技术文献

[0016] 专利文献

[0017] 专利文献 1:日本专利申请特开平 11-108931 号公报

[0018] 专利文献 2:日本专利申请特开 2002-62299 号公报

[0019] 专利文献 3:国际公开 W02009/084481 号

发明内容

[0020] 发明要解决的问题

[0021] 如上所述,常规方法需要长时间检测结核菌群还需要大量劳力和费用。出于这些原因,结核的确定诊断和早期治疗开始不能进行。因此,已存在对快速检测方法的需求。另外,如果生物样品不含有 MPT64 或含非常少量的 MPT64,也不能进行生物样品的直接检测。结果,结核菌群感染可能被忽略。因此,需要更可靠的检测方法。本发明的目的为通过提供简便、快速且更可靠的结核菌群检测方法来解决这些问题。

[0022] 用于解决问题的方案

[0023] 本发明人已进行了孜孜不倦的研究来解决上述问题,因此发现该问题可通过加热处理含有结核菌群的生物样品以便细胞外分泌结核菌群特异的分泌蛋白质如 MPB64 并检测由此分泌的蛋白质来解决,结果,已完成了本发明。

[0024] 根据一个方面,本发明提供一种结核菌群的检测方法,其包括使结核菌群特异的蛋白质进行免疫学测定,其中所述蛋白质通过使含有结核菌群的生物样品进行加热处理而被细胞外分泌。根据另一方面,本发明还提供一种结核菌群检测用试剂盒,作为出于进行上

述方法的目的的结核菌群检测用试剂盒,其至少包括使含有结核菌群的生物样品进行加热处理的处理容器,和用于检测通过加热处理分泌的结核菌群特异的分泌蛋白质的免疫学测定装置。该试剂盒可进一步包括样品处理剂和/或溶剂。本发明的检测方法和试剂盒能够快速且简便地检测结核菌群。根据另外的方面,本发明还提供用于细胞外分泌结核菌群特异的蛋白质的方法,其包括使含有结核菌群的生物样品进行加热处理。

附图说明

[0025] 图1为示出当使用 *M. bovis* BCG 东京菌株的细菌细胞时加热处理温度与促进细胞外 MPB64 分泌的效果之间关系的图。

[0026] 图2为示出当使用 *M. bovis* BCG 东京菌株的细菌细胞时加热处理时间与促进细胞外 MPB64 分泌的效果之间关系的图。

具体实施方式

[0027] 用于本发明的生物样品不特别限定,只要生物样品可含有结核菌群即可。生物样品的实例包括痰、胸膜积液、支气管分泌物、胃液、血液、脊髓液、尿液和排泄物。优选地,使用痰是因为其细菌浓度高。可选地,呼吸检查期间收集的支气管灌洗液或收集自支气管或肺的组织等可用作生物样品。这些生物样品可各自单独使用或可作为其两种以上的混合物而使用。

[0028] 生物样品的加热处理优选通过将生物样品置于气闭密封的容器中,然后将该容器作为整体进行加热处理来进行,这是因为待处理的生物样品含有高感染性结核菌群。从确保操作者安全的观点,加热处理操作优选在安全橱内进行。加热处理中使用的容器不特别限定,只要该容器可保持其气闭密封的状态并可抵抗预定的加热温度即可。容器可根据待试验的生物样品适当地选择。容器可在其开口部安装有带滤器的滴嘴 (dropper nozzle) 以便促进由此处理的生物样品从容器排出,以用于免疫学测定。优选使用带滤器的滴嘴,是因为带滤器的滴嘴可除去包含在处理的生物样品中的固体物质如变性组分,并进一步可简便地将得到的生物样品置于免疫学测定装置。

[0029] 生物样品可根据其加热处理前的性质利用样品处理剂进行处理如溶解。例如,当痰用作样品时,可用减少痰的粘度的碱性物质、还原物质、蛋白酶、糖、表面活性剂或蛋白质变性剂等溶解,从而改进加热处理的效力。特别地,使用氢氧化钠作为碱性物质和 N-乙酰基-L-半胱氨酸作为还原物质的组合处理是简便的且优选使用。

[0030] 根据另一实施方案,生物样品可分散或溶于溶剂,接着进行加热处理。溶剂可为,例如可保持包含在生物样品中的结核菌群活着的任何溶剂。可使用缓冲液如磷酸盐缓冲盐水或在抗酸菌分离培养中使用的液体培养基如 Middlebrook7H9。特别地,优选使用液体培养基,因为需要通过加热处理来细胞外分泌蛋白质而不影响结核菌群的活性,还因为由此处理的样品可直接进行免疫学测定。可选地,用样品处理剂溶解的生物样品可再分散于溶剂中。

[0031] 生物样品的处理温度可为蛋白质可被结核菌群细胞外分泌至生物样品或溶剂中的任何温度,并优选在 40°C 至 60°C 的范围内,更优选在 40°C 至 55°C 的范围内。特别地,有效促进分泌的温度在 45°C 至 50°C 的范围内。

[0032] 生物样品的处理时间可为当处理温度保持在上述范围内时,足以细胞外分泌可检测量的结核菌群特异的分泌蛋白质的时间。处理时间优选 15 分钟以上,更优选 15 分钟以上且 2.5 小时以下,进一步优选 15 分钟以上且 1.5 小时以下,最优选 30 分钟以上且 1 小时以下。

[0033] 由此加热处理的样品可仅通过升高加热温度进行结核菌群失活处理。结核菌群的失活处理温度不特别限定但优选 100°C。包含在样品中的结核菌群的失活使免疫学测定安全进行而无继发感染的风险。

[0034] 加热处理用加热设备不特别限定,只要该设备能够保持温度恒定即可。可使用恒温器浴、加热器块 (heater block) 或培养器等。特别优选小型加热设备,因为所有检测结核菌群的步骤可在安全橱中完成。

[0035] 根据本发明,结核菌群特异的蛋白质可通过加热处理生物样品来细胞外分泌。因此使用由此处理的生物样品通过免疫学测定等可容易地检测结核菌群的存在。

[0036] 本发明中,被细胞外分泌的结核菌群特异的蛋白质不特别限定,只要蛋白质被细胞外分泌即可。

[0037] 由结核菌群细胞外分泌的蛋白质的实例包括许多蛋白质如 MPT64、MPB64、MPB70、ESAT-6 和 CFP-10。这些蛋白质中,在短时间内被大量细胞外分泌的蛋白质优选作为用作本发明中使用的指示免疫学测定中结核菌群存在的指标的蛋白质。例如,MPB64,即 MPT64,通过根据本发明的加热处理生物样品,在无培养的情况下,即在细菌细胞开始增殖之前,被大量细胞外分泌或释放。由此观点,MPB64,即 MPT64 优选用作检测结核菌群存在的靶标。被细胞外分泌的 MPB64,即 MPT64 可被免疫学测定,从而确定结核菌群存在与否。

[0038] 在本发明的检测方法中,免疫学测定不特别限定,且优选使用抗结核菌群特异的分泌蛋白质的第一抗体和第二抗体的夹心免疫学测定 (sandwich immunoassay),特别是酶联免疫吸附测定 (ELISA) 或免疫层析测定。第一抗体和第二抗体可相同或可彼此互不相同,只要它们允许结核菌群特异的分泌蛋白质检测即可。

[0039] 该免疫学测定可为能够免疫检测通过生物样品的加热处理而被细胞外分泌的 MPB64 的任何方法,且优选免疫层析测定,特别优选使用抗 -MPB64 单克隆抗体的免疫层析测定。MPB64 检测用免疫层析测定可根据日本专利特开平 11-108 931 号公报记载的方法容易地进行。另外,可使用商购可得的 MPB64,即 MPT64 检测用免疫层析测定装置 Capilia[®] TB (由 TAUNS Laboratories, Inc. 制造)。

[0040] 实施例

[0041] 本发明将借助下述实施例进一步详细描述。然而,本发明不意欲受这些实施例的限制。

[0042] 参考例 1 (供试菌液的制备)

[0043] 将 4.7g Middlebrook7H9 肉汤培养基 (broth base) (由 Difco Laboratories Inc. 制造) 溶于 900ml 含 0.5g 吐温 80 的蒸馏水中。将溶液在高压釜中 121°C 高压灭菌 10 分钟。冷却后,100ml 的 ADC 增菌液 (ADC Enrichment) (白蛋白 - 葡萄糖 - 过氧化氢酶 (albumin-dextrose-catalase)) 在无菌下加入其中,从而制备 Middlebrook7H9 液体培养基。

[0044] M. bovis BCG 东京菌株 (下文中称作,BCG 菌株) 接种至上述制备的液体培养基,

并根据标准方法培养。继续培养直至获得对应于马克法兰氏标准 1 的浊度。离心所得细菌溶液以回收细菌细胞。回收的细菌细胞通过加入上述 Middlebrook 7H9 液体培养基而重悬,接着进一步离心以回收细菌细胞。该操作重复三次。洗涤细菌细胞以除去附着至细菌细胞的结核菌群分泌蛋白质。洗涤操作之后将 100 μ L 悬浮液应用于 MPB64 检测的免疫层析测定装置 **Capilia**[®] TB (由 TAUNS Laboratories, Inc. 制造)。结果,该产物显示阴性,证实分泌的 MPB64 不存在悬浮液中。

[0045] 实施例 1 (加热处理温度的最佳条件的研究)

[0046] 将参考例 1 中制备的具有对应于马克法兰标准 1 的浊度的菌液的光密度调整至在 530nm 的吸光度下为 O. D. 为 0.1,从而制备试验用菌液 (细菌计数:相当于 10^7 CPU)。试验用菌液进一步用液体培养基稀释,从而制备 10 倍稀释菌液 (细菌计数:相当于 10^6 CFU) 和 100 倍稀释菌液 (细菌计数:相当于 10^5 CFU)。200 μ l 各制备的菌液分散于各塑料管中 (核酸扩增用管) 并使用核酸扩增设备用温度可控加热器块加热处理。加热温度设为从 35 $^{\circ}$ C 至 75 $^{\circ}$ C 以 5 $^{\circ}$ C 间隔的温度。加热处理进行 30 分钟。在 35 $^{\circ}$ C 的普通培养温度下加热处理的样品用作对照。从由此处理的各试样收集 100 μ l 等份,并以与参考例 1 相同的方式应用于 **Capilia**[®] TB (由 TAUNS Laboratories, Inc. 制造),从而检测 MPB64 的存在。使用 Immno Chromato-Reader (由 Otsuka Electronics Co., Ltd. 制造) 测量读取部 (reading area) 的吸光度。

[0047] 结果示于图 1。图 1 中,纵坐标表示 **Capilia**[®] TB (由 TAUNS Laboratories, Inc. 制造) 中显色强度 (color intensity) (吸光度) 的测量值,横坐标表示加热温度。吸光度与处理温度之间的关系由实线、虚线和长虚线表示,其中实线为关于试验用菌液 (细菌计数:相当于 10^7 CPU) 的结果,虚线为关于 10 倍稀释菌液 (细菌计数:相当于 10^6 CPU) 的结果,长虚线为关于 100 倍稀释菌液 (细菌计数:相当于 10^5 CPU) 的结果。

[0048] 从结果来看,所有试验样品显示在 40 $^{\circ}$ C 至 60 $^{\circ}$ C 下吸光度升高,特别是在 45 $^{\circ}$ C 至 50 $^{\circ}$ C 下显著升高。这表示细菌细胞的热处理促进其细胞外 MPB64 分泌。在 35 $^{\circ}$ C 的普通培养条件下处理的对照不显示吸光度的升高,表明仅在室温下或在与其相当的条件保持样品不使 MPB64 被细胞外分泌。另一方面,在比证实了 MPB64 分泌的 40 $^{\circ}$ C 至 60 $^{\circ}$ C 温度范围高的温度范围内证实吸光度不升高。这表明,MPB64 在等于或高于 60 $^{\circ}$ C 的温度范围内不分泌。

[0049] 因此,从这些结果证实细菌样品在 40 $^{\circ}$ C 至 60 $^{\circ}$ C 下、特别是在 45 $^{\circ}$ C 至 50 $^{\circ}$ C 下的加热处理显著促进细胞外 MPB64 分泌并显著增加免疫学测定的检出率。

[0050] 实施例 2 (加热处理温度的最佳条件的研究)

[0051] 将参考例 1 中制备的具有对应于马克法兰标准 1 的浊度的菌液的光密度调整至在 530nm 的吸光度下为 O. D. 为 0.1,从而制备试验用菌液 (细菌计数:相当于 10^7 CPU)。200 μ l 各制备的菌液分散于各塑料管中 (核酸扩增用管) 并使用核酸扩增设备用温度可控加热器块加热处理。加热温度设为 35 $^{\circ}$ C、从 40 $^{\circ}$ C 至 64 $^{\circ}$ C 以 2 $^{\circ}$ C 间隔的 13 个温度和作为高温范围的 70 $^{\circ}$ C 和 80 $^{\circ}$ C 的 2 个温度。加热处理进行 60 分钟。将在 35 $^{\circ}$ C 的普通培养温度下加热处理的样品用作对照。从由此处理的各试样收集 100 μ l 等份,并以与参考例 1 相同的方式应用于 **Capilia**[®] TB (由 TAUNS Laboratories, Inc. 制造),从而检测 MPB64 的存在。通过目

视观察标记物质在读取部累积的显色强度进行评价。显色强度目视评价为品红色的程度，分为 5 级：-（不着色），±（微弱着色），+（明显着色），++（较明显着色），和 +++（显著着色）。评价结果示于表 1。

[0052] 表 1

[0053]

处理温度	评价
35℃（对照）	-
40℃	±
42℃	+
44℃	+
46℃	++
48℃	+++
50℃	+++
52℃	++
54℃	+
56℃	+
58℃	+
60℃	±
62℃	-
64℃	-
70℃	-
80℃	-

[0054] 从表 1 的结果来看，40℃至 60℃下显示显色强度的升高，特别是在 44℃至 52℃下证实显著升高。这表明如实施例 1 中所述，细菌细胞的加热处理促进它们的细胞外 MPB64 分泌。在 35℃的普通培养条件下处理的对照不显示吸光度的升高，表明仅在室温下或在与其相当的条件保持样品不使 MPB64 被细胞外分泌。另一方面，在等于或高于 62℃的温度下或者在 70℃和 80℃的高温范围内证实吸光度不升高。这显示，MPB64 在等于或高于 60℃的温度范围内不分泌。

[0055] 因此，由这些结果证实细菌样品在 40℃至 60℃下、特别是在 45℃至 50℃下的加热

处理显著促进细胞外 MPB64 分泌并显著增加免疫学测定的检出率。

[0056] 实施例 3(加热处理时间的最佳条件的研究)

[0057] 将参考例 1 中制备的具有对应于马克法兰标准 1 的浊度的菌液的光密度调整至在 530nm 的吸光度下为 O.D. 为 0.1, 从而制备试验用菌液(细菌计数:相当于 10^7 CPU)。将 200 μ l 各制备的菌液分散于各塑料管中(核酸扩增用管)并使用核酸扩增设备用温度可控加热器块加热处理。在设为从 35°C 至 75°C 以 5°C 间隔的温度的加热温度进行加热操作。处理时间设为 0 分钟、15 分钟、30 分钟和 60 分钟。从由此处理的各试样收集 100 μ l 等份, 并以与实施例 1 相同的方式应用于 Capilia[®] TB(由 TAUNS Laboratories, Inc. 制造)。使用 Immno Chromato-Reader(由 Otsuka Electronics Co., Ltd. 制造)测量读取部的吸光度。

[0058] 结果示于图 2 中。在图 2 中, 纵坐标表示 Capilia[®] TB(由 TAUNS Laboratories, Inc. 制造)中显色强度(吸光度)的测量值, 横坐标表示加热温度。吸光度和加热温度之间的关系由虚线、实线和长虚线表示, 其中虚线为关于处理时间为 15 分钟的处理样品的结果, 实线为处理时间为 30 分钟的处理样品的结果, 和长虚线为处理时间为 60 分钟的处理样品的结果。

[0059] 从结果来看, 处理时间为 15 分钟、30 分钟和 60 分钟的所有处理样品在 45°C 至 50°C 的温度下吸光度显著升高。在处理时间之间没有看出差异。甚至加热时间为 60 分钟的处理样品也没有证实与其它样品存在大的区别。因此, 至少 15 分钟的加热处理时间证实具有促进细胞外 MPB64 分泌的效果。

[0060] 实施例 4(加热处理时间的最佳条件的研究)

[0061] 将参考例 1 中制备的具有对应于马克法兰标准 1 的浊度的菌液的光密度调整至在 530nm 的吸光度下为 O.D. 为 0.01, 从而制备试验用菌液(细菌计数:相当于 10^6 CPU)。将 200 μ l 各制备的菌液分散于各塑料管中(核酸扩增用管)并在 50°C 下使用核酸扩增设备用温度可控加热器块加热处理。在设为 0 分钟、15 分钟、30 分钟、45 分钟、60 分钟、75 分钟、120 分钟和 150 分钟的处理温度下进行加热处理。作为对照, 将与上述相同的待试验菌液置于室温下而不进行加热处理。从由此处理的各试样收集 100 μ l 等份, 并以与实施例 1 相同的方式应用于 Capilia[®] TB(由 TAUNS Laboratories, Inc. 制造)。目视观察累积的标记物质的显色强度。显色强度目视评价为品红色的程度, 分为 5 级:-(不着色), ±(微弱着色), +(明显着色), ++(较明显着色), 和 +++(显著着色)。评价结果示于表 2。

[0062] 表 2

[0063]

	50°C加热处理	对照(无加热处理)
	评价	评价
0 分钟	-	-
15 分钟	+	-
30 分钟	+	-
45 分钟	++	-
60 分钟	+++	-
75 分钟	+++	-
120 分钟	+++	-
150 分钟	+++	-

[0064] 从表 2 的结果来看,非加热处理的对照样品和处理时间为 0 分钟的处理样品证实读取部不显示颜色。15 分钟的加热处理证实产生源自细胞外 MPB64 分泌的颜色。加热处理 60 分钟的样品证实显著地显示颜色。加热处理长达 150 分钟的样品不进一步显示显色强度的升高并证实显著显色水平与加热处理 60 分钟的样品的显著显色水平相同。从这些结果证实加热处理至少 15 分钟具有促进细胞外 MPB64 分泌的效果,其在 60 分钟达到峰值。

[0065] 实施例 5(溶剂的研究)

[0066] 使用含吐温 80 的磷酸盐缓冲溶液或 Middlebrook 7H9 液体培养基作为生物样品处理用溶剂,将参考例 1 中制备的具有对应于马克法兰标准 1 的浊度的菌液制成具有相当于 10^7 CFU、 10^6 CFU 或 10^5 CFU 的细菌计数的菌液,从而制备试验样品。将 200 μ l 各试样分散于各塑料管中。然后将样品在加热器块中在 50°C 下加热 30 分钟。接着,从由此处理的各试样收集 100 μ l 等份,并以与实施例 1 相同的方式应用于 Capilia[®] TB(由 TAUNS Laboratories, Inc. 制造),接着评价。通过目视观察读取部中累积的标记物质的显色强度进行评价。显色强度目视评价为品红色的程度,分为 5 级:-(不着色),±(微弱着色),+(明显着色),++(较明显着色),和 +++(显著着色)。评价结果示于表 3。

[0067] 表 3

[0068]

		溶剂	
		含吐温 80 的磷酸盐缓冲溶液	Middlebrook 7H9 液体培养基
试样(细菌浓度)	相当于 10^5 CFU	+	++
	相当于 10^6 CFU	++	+++
	相当于 10^7 CFU	+++	+++

[0069] 从表 3 的结果显而易见的是,在含吐温 80 的磷酸盐缓冲溶液用作溶剂和 Middlebrook 7H9 液体培养基用作溶剂的两种情况中可检出被细胞外分泌的 MPB64。因此,

证实免疫学测定在溶剂组成的变化上没有差异。

[0070] 实施例 6(痰样品的检测)

[0071] 将参考例 1 中制备的具有对应于马克法兰标准 1 的浊度的菌液加入已证实结核感染阴性的痰中,从而制备具有相当于 10^7 CFU 的细菌计数的假阳性痰样品。该样品分散于塑料管中。向这些痰样品的每一个等量添加 N-乙酰基-L-半胱氨酸和氢氧化钠水溶液,并将混合物静置于室温 15 分钟以溶解样品。接着,将样品使用加热器块在 50°C 下加热处理 30 分钟。然后,从由此处理的各试样收集 $100\ \mu\text{l}$ 等份,并以与实施例 1 相同的方式应用于 Capilia[®] TB(由 TAUNS Laboratories, Inc. 制造),接着评价。对照痰样品除了静置于室温下 30 分钟而不加热处理以外,以与上述相同的方式处理,接着评价。目视观察读取部中累积的标记物质的显色强度来进行评价。显色强度目视评价为品红色的程度,分为 5 级:-(不着色), ±(微弱着色), +(明显着色), ++(较明显着色),和 +++(显著着色)。评价结果示于表 4。

[0072] 表 4

[0073]

	无加热处理	50°C 加热处理
样品 <1>	-	+
样品 <2>	-	+
样品 <3>	- 至 ±	++
样品 <4>	-	+

[0074] 结果,加热处理的样品证实在读取部明显地显示颜色,表明在样品中存在 MPB64。相比之下,对照样品明显不同于加热处理样品,尽管某些样品在读取部显示微弱的颜色。因此,证实即使在痰样品中加热处理也促进 MPB64 分泌,表明结核菌群可迅速且简便地从生物样品中检出。

[0075] 产业上的可利用性

[0076] 本发明提供一种结核菌群的检测方法,其能够直接由含有结核菌群的生物样品在无培养操作下通过在预定温度下加热处理生物样品并免疫学测定由此被细胞外分泌的结核菌群特异的分泌蛋白质来快速简便地进行,还提供一种直接针对其的试剂盒。本发明不仅对于结核菌群的检测有用,而且还对结核的适当诊断和处理有用。

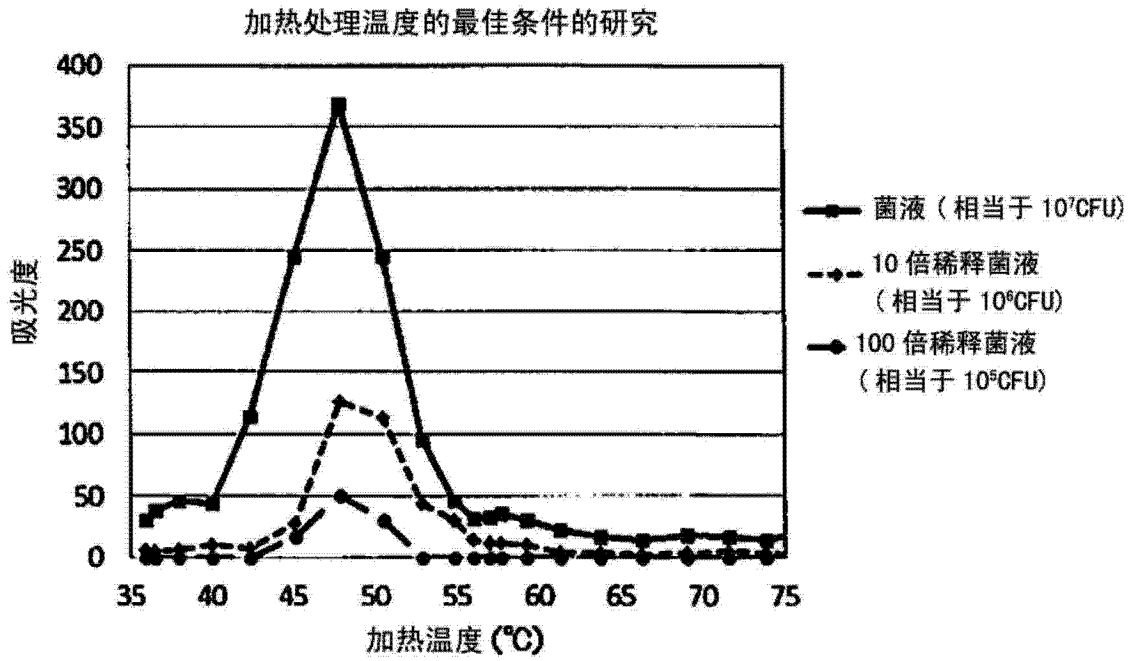


图 1

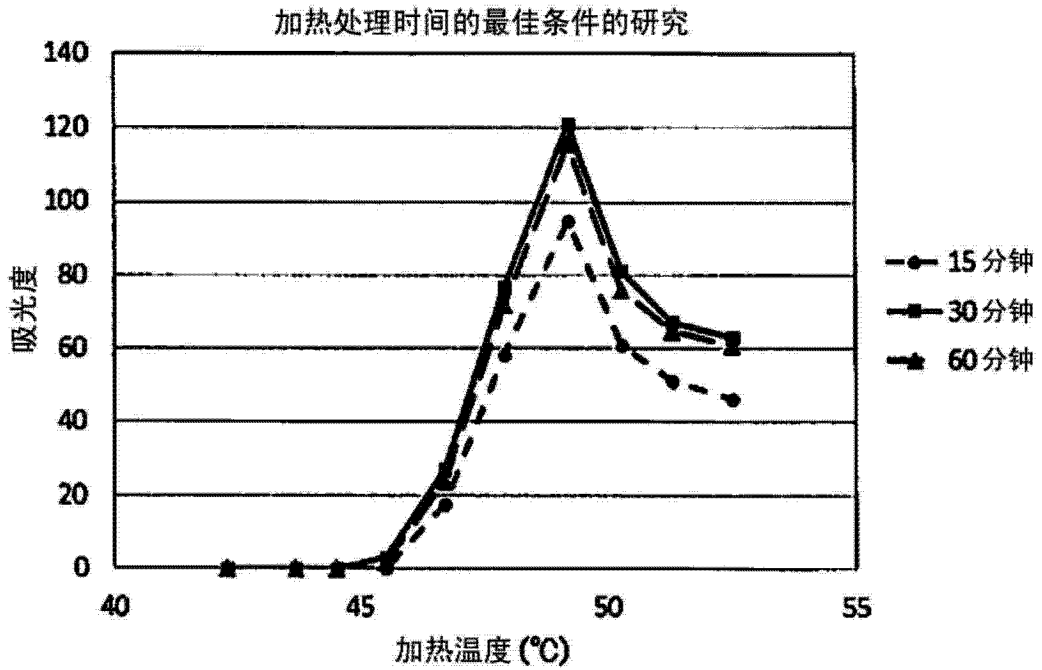


图 2

专利名称(译)	结核菌群的免疫学检测方法和试剂盒		
公开(公告)号	CN104246505A	公开(公告)日	2014-12-24
申请号	CN201380018968.0	申请日	2013-04-04
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社比尔生命有限会社阿诺泰克		
申请(专利权)人(译)	株式会社比尔生命有限会社阿诺泰克		
当前申请(专利权)人(译)	株式会社比尔生命有限会社阿诺泰克		
[标]发明人	野中浦雄 北川俊之		
发明人	野中浦雄 北川俊之		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/48 G01N33/53 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/56911 G01N33/5695 G01N33/68 G01N33/543		
代理人(译)	刘新宇		
优先权	2012086566 2012-04-05 JP		
其他公开文献	CN104246505B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

由于用于检测结核菌群的常规方法需要时间长且还需要大量劳力和费用，因此，还不能进行结核病的确定诊断和早期治疗开始。已存在对快速检测方法的需求。即使对于从生物样品直接检测，如果生物样品中不存在MPT64或仅存在非常少量的MPT64，也不能进行检测。结果，已产生结核菌群感染被忽略的风险，并且更可靠的检测方法十分必要。提供一种方法和试剂盒，其中加热处理施加至含有结核菌群的生物样品，从而使结核菌群特异的分泌蛋白质，特别是MPB64，分泌到细菌细胞外，并将得到的处理样品进行免疫学测定，从而在不培养生物样品的情况下以更迅速且简便的方式检测结核菌群。

	50℃加热处理	对照(无加热处理)
	评价	评价
0 分钟	-	-
15 分钟	+	-
30 分钟	+	-
45 分钟	++	-
60 分钟	+++	-
75 分钟	+++	-
120 分钟	+++	-
150 分钟	+++	-