

(12) 发明专利申请

(10) 授权公告号 CN 103069002 A

(43) 申请公布日 2013. 04. 24

(21) 申请号 201180039453. X

代理人 李程达

(22) 申请日 2011. 07. 20

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

C12Q 1/24 (2006. 01)

61/366, 076 2010. 07. 20 US

G01N 33/53 (2006. 01)

C12Q 1/68 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2013. 02. 16

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2011/044674 2011. 07. 20

(87) PCT申请的公布数据

W02012/012527 EN 2012. 01. 26

(71) 申请人 贝克顿·迪金森公司

地址 美国新泽西州

(72) 发明人 J·J·卡里诺 J·范

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

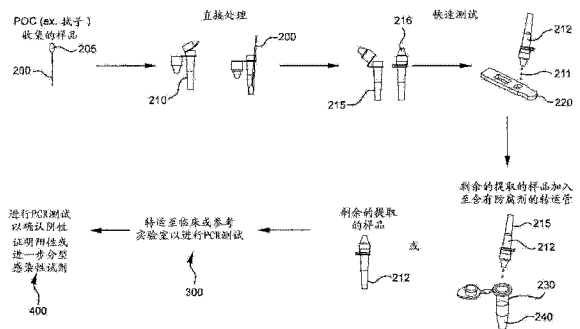
权利要求书2页 说明书12页 附图6页

(54) 发明名称

用于将及时现场护理快速诊断测试结果与基于实验室的方法相连的方法

(57) 摘要

将怀疑含有微生物的单一样品用于本地快速测试免疫测定和远程实验室测试二者的方法。所述样品收集自医生办公室处的患者或者待测试的环境。使用拭子或其它工具收集所述样品并将其与快速测试加工试剂结合,且将一部分经加工的样品用于本地快速测试。所述快速测试加工试剂通常由缓冲剂、盐和去污剂组成并且与本地快速测试免疫测定相容。仅将经加工的样品的一部分用于本地快速测试,留下经加工的样品的剩余部分用于远程实验室测定。将经加工的样品的剩余部分的至少一些与稳定剂结合,其中所述稳定剂至少保存经加工的样品中的核酸用于远程实验室测定。



1. 将怀疑含有靶微生物的单一样品用于本地快速测试和远程实验室测试二者的方法，所述方法包括：

- a) 在用于快速测试的位置收集怀疑含有靶微生物的样品，
- b) 通过将所收集的样品与被配置为与快速测试一起使用的快速测试加工试剂组合，而加工所述样品以用于快速测试，
- c) 将一部分经加工的样品用于快速测试，和
- d) 将经加工的样品的剩余部分的至少一部分用于远程实验室测试。

2. 权利要求 1 的方法，其中使用工具来收集样品，并且所述工具选自刮板和拭子。

3. 权利要求 1 的方法，其中所述用于快速测试的位置是医生的办公室。

4. 权利要求 1 的方法，其中所述快速测试是免疫测定。

5. 权利要求 4 的方法，其中快速测试加工试剂是温和裂解剂。

6. 权利要求 5 的方法，其中所述快速测试加工试剂包含至少一种盐，至少一种缓冲剂和至少一种去污剂。

7. 权利要求 1 的方法，其中，在移出一部分经加工的样品用于快速测试之后，将经加工的样品的剩余部分的至少一部分与稳定转移稀释剂在转移容器中结合以使样品在转移至远程实验室测试过程中稳定化。

8. 权利要求 7 的方法，其中所述稳定转移稀释剂使经加工的样品中的核酸稳定化，并且包含至少一种缓冲剂和至少一种盐。

9. 权利要求 1 的方法，在移出一部分经加工的样品用于快速测试之后，不将经加工的样品的剩余部分的至少一部分与用于在转移至远程实验室测试过程中使样品稳定化的稳定转移稀释剂结合。

10. 权利要求 8 的方法，其中所述远程实验室测试是基于核酸测定进行亚分型。

11. 权利要求 1 的方法，其中所述远程实验室测试是反射测试。

12. 权利要求 8 的方法，其中所述远程实验室测试是核酸测定。

13. 权利要求 12 的方法，其中所述核酸测定是 PCR。

14. 权利要求 7 的方法，其中将所述稳定转移稀释剂加入含有经加工的样品的剩余部分的至少一部分的容器中。

15. 权利要求 7 的方法，其中将经加工的样品的剩余部分的至少一部分加入含有稳定转移稀释剂的容器中。

16. 权利要求 1 的方法，其中所述怀疑含有靶微生物的样品选自生物学样品和环境样品。

17. 将怀疑含有靶微生物的单一样品用于本地快速测试免疫测定和远程实验室测试二者的方法，所述方法包括：

- a) 收集用于本地快速测试的样品，
- b) 通过将所收集的样品与包含缓冲剂、盐和去污剂的快速测试加工试剂结合而加工所述用于本地快速测试的样品，
- c) 选择本地快速测试；
- d) 仅将一部分经加工的样品用于本地快速测试，留下经加工的样品的剩余部分；
- e) 在容器中将经加工的样品的剩余部分的至少一部分与稳定转移稀释剂结合，其中所

述稳定转移稀释剂至少使得与所述稳定转移稀释剂结合的所述经加工样品的那部分中的核酸稳定化；

f) 将含有已结合的经加工的样品的剩余部分和稳定转移稀释剂的容器转运至远程位置用于实验室测试,和

g) 将结合的经加工的样品的剩余部分和稳定转移稀释剂用于反射测试或亚分型,其中使用 PCR。

18. 权利要求 17 的方法,其中使用工具来收集生物学样品并且所述工具选自刮板和拭子。

19. 权利要求 17 的方法,其中所述用于快速测试的位置是医生的办公室。

20. 权利要求 17 的方法,其中所述快速测试加工试剂是温和裂解剂。

21. 权利要求 20 的方法,其中所述快速测试加工试剂包含至少一种盐,至少一种缓冲剂和至少一种去污剂。

22. 权利要求 17 的方法,其中所述稳定转移稀释剂使经加工的样品中的核酸稳定化并且包含至少一种缓冲剂和至少一种盐。

23. 权利要求 17 的方法,其中所述怀疑含有靶微生物的样品选自生物学样品和环境样品。

## 用于将及时现场护理快速诊断测试结果与基于实验室的方法相连的方法

[0001] 与相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2010 年 7 月 20 日递交的美国临时专利申请号 61/366,076 的递交日的权益,所述美国临时专利申请的公开内容在此通过引用而并入。

[0003] 发明背景

[0004] 及时现场护理 (POC) 快速测试与基于实验室的测试之间的连接通常是通过保留样品以支持基于培养物的实验室测试方法而实现的。目前,在 POC 场所收集的样品要么被加工并直接用于快速测试中(未用于快速测试中的经处理的那样品部分被丢弃),要么在液体转运介质中被稀释以使得能够转移而用于基于实验室的测试,例如快速免疫测定,培养和/或聚合酶链式反应 (PCR)。在 POC 测试中产生阴性结果的样本通常被反射测试 (reflex tested) - 通过基于实验室的测试方法(例如 PCR) 来证实所述阴性结果。此外,常常就其它表征(例如亚分型或其它流行病学信息)测试产生阳性 POC 测试结果的样本。

[0005] 参见图 1,在医生办公室 POC 场所(以及患者就诊或收集用于快速测试的样品的其它非实验室场所),拭子样本 100 几乎全部地用于将样品递送到溶液 110 中用于快速测试 120。在医生办公室和其它非实验室样品收集场所加工和测试样品不涉及使得能够进行基于实验室的测试(例如证实性和/或反射测试,或要求基于实验室的分析的其它测试)的手段。用目前的方法,医生(或 POC 快速测试的其它施用者)不能使用在所述场所(例如医生办公室)收集的样品既进行 POC 快速测试又进行基于实验室的测试。因此,丧失了在此类样品上进行基于实验室的测试的机会。在医院或诊所内的 POC 场所收集的拭子样品 130 几乎被专门地置于一定体积的液体转运介质 140 中以向测试实验室转移用于远程测试。通过将经稀释的样品 150 加入溶液 160 中,可对其进行进一步加工用于快速测试 170。然而,这种方法通常产生被稀释了 5 至 10 倍、或更多倍的 POC 样品,这可由于样品稀释效应而削弱所述快速测试的效能。

[0006] 可利用在 POC 场所收集和转移第二拭子来解决进行基于实验室的测试的需要,虽然这明显不是标准操作并且使得待取的样品数目加倍。此外,虽然是从同一患者收集的,但是当在两个独立收集的拭子样本间比较测试结果时,收集方法、生物负载等的变化可导致错误的结果。因此,需要解决这些问题的系统和方法。

### 发明概要

[0007] 本发明的各种实施方案使得能够通过使用在 POC 处收集并经受快速测试的单一样品来连接 POC 快速测试(例如免疫测定,例如用于流感病毒的测试)与基于实验室的测试(证实性测试或其它实验室测试,例如诊断和鉴别测试)。收集样品(怀疑含有靶微生物的任何样品)并在用于所利用的特定 POC 测试的最佳条件下对其进行加工,确保所述 POC 测试(在本申请中也称作快速测试)的最佳可能临床表现。所述样品可以是收集自患者的生物学样品并且可包括任何生物学流体或组织样品,这包括但不限于,血液,尿,唾液,以及从患者刮下或拭下的组织。样品也可包括以擦或拭抹怀疑具有污染性微生物的表面的常规

方式而收集的环境样品。环境样品也可包括土壤样品,空气样品,水样品,食物样品等。通常,通过将样品与和快速测试相容的加工试剂结合而加工所述样品。未用于所述快速测试的样品部分通常被丢弃。根据本发明的一个实施方案,保留经加工的样品的剩余部分以允许转移至可进行证实性测试(例如基于核酸的测试)的基于实验室的测试环境。在其它实施方案中,所述剩余部分不被进一步稀释,但仍经受实验室测试。为了本发明的目的,样品收集和快速测试的场所被称作本地或 POC,而用于基于实验室的测试的场所被称作远程。在本发明的情境中,远程只不过是指出从样品收集和快速测试的场所去除。远程可以是从小距离(例如同一建筑物中的不同位置)到大得多的距离。

[0008] 本文中所述的方法可被应用于在 POC 处使用的快速免疫测定,其用于导致关键性治疗决定的快速诊断。用于 POC 场所的快速免疫测定是熟知的并且是商业上可得的。在本申请中对它们没有详述。例如,已知快速免疫测定用于从患者样品中检测广泛的传染性疾病,这包括但不限于流感测试(例如 H1N1),RSV 测试,沙眼衣原体测试,淋病双球菌测试等。

[0009] 在另一个实施方案中,收集样品并首先将其加工直接用于快速免疫测定。加工步骤利用快速测试加工试剂并被优化用于产生对于所使用的特定免疫测定而言的最大临床表现。这通常涉及在各种盐和去污剂存在下的相对温和的裂解处理。此类裂解剂是熟知的并且与商业上可得的快速免疫测定共同使用,在本申请中不进行详述。本领域技术人员知晓需要选择这样的快速测试加工试剂:其不会降解样品而使得它不适用于所预期的实验室测试。

[0010] 然后,将一部分经加工的样品递送至 POC 测试设备以产生快速诊断测试的测试结果。保存样品的剩余部分(或其一部分),以转移至基于实验室的测试环境用于测试,例如使用分子诊断方法的证实性测试。在一个实施方案中,所述分子诊断测试是基于核酸的。在优选的实施方案中,所述基于核酸的诊断测试是 PCR。

[0011] 在本发明的另一个实施方案中,利用了不同的稳定转移稀释剂来增加样品的稳定性。多种制剂都是可能的,其中可能的组分包括但不限于缓冲剂,盐,螯合剂,酶抑制剂,核酸结合蛋白,离液剂等。本领域技术人员知晓用于特定应用的稳定转移稀释剂的合适构成和条件(例如 pH)。例如,如果怀疑样品中的靶微生物易被离液剂降解,则本领域技术人员将知道不在稳定转移稀释剂中包括离液剂。在本发明的某些实施方案中,可将未用于快速测试的经加工样品的剩余部分加入稳定转移稀释剂中。在一个实施方案中,所述稳定转移稀释剂可已经存在于用于 POC 测试的快速测试加工试剂中。在另一个实施方案中,所述稳定转移稀释剂可在一部分样品被移出并用于快速免疫测定后被加入经加工的样品的剩余部分中。在优选的实施方案中,所述稳定转移稀释剂稳定样品中的核酸。

#### 附图说明

[0012] 图 1A 阐释了用于 POC 和基于实验室的测试的标准方案的现有技术方法。

[0013] 图 1B 阐释了本发明的用于 POC 和基于实验室的测试的方法。

[0014] 图 2A/B 显示了对于流感 A 的 RT-PCR 结果,所述流感 A 来自于用于 POC 测试而在不同稀释条件下被加工的样品。

[0015] 图 3 显示了对于流感 A 的 RT-PCR 结果,所述流感 A 来自于用于 POC 测试而使用本

发明的方法、使用两种不同的快速测试加工试剂和各种存储条件被加工的样品。

[0016] 图 4 显示了对于流感 A 的 RT-PCR 结果,所述流感 A 来自于这样的样品:其用于 POC 测试而被加工,然后使用本发明的方法与两种不同的稳定转移稀释剂以及各种存储条件相混合。

[0017] 图 5 显示了对于流感 A 的 RT-PCR 结果,所述流感 A 来自于这样的样品:其用于 POC 测试而被加工,然后使用本发明的方法与稳定转移稀释剂以及各种存储条件相混合。

[0018] 图 6A-C 显示了使用本发明的方法、在各种存储条件下对于两株流感 A 和一株流感 B 的 RT-PCR 结果。

[0019] 优选实施方案详述

[0020] 图 1A 阐释了用于 POC 和基于实验室的测试的目前标准方案。收集了样本 105(例如,使用拭子 100)。料想到在其中使用用于收集生物学样品的其它常规工具。此类工具,例如刮板或压舌板在本申请中未经详述并且是本领域技术人员所熟知的。然后,通过将带有样品 105 的拭子 100 置于用于 POC 快速测试 120 的溶液 110 中而直接加工样本 105。在此种情形中,任何剩余的样品均被丢弃并且必须收集新的样品用于其它的基于实验室的测试(例如证实性测试或反射测试)。在备选的标准方案中,首先在转移介质 140 中稀释拭子 130 上的样本 105。一部分含有样本 105 的经稀释的转移介质 140 在溶液 160 中被进一步加工用于 POC 测试 170。在此情形中,经加工的样本 105 被稀释至这样的水平:其削弱 POC 测试 170 的结果,如下面的实施例 1 中所示。稀释剂中的剩余部分用于实验室测试 150,例如亚分型和反射测试。

[0021] 图 1B 阐释了本发明的用于 POC 和实验室测试的一个实施方案。在拭子 200 上收集样本 205 并使用快速测试加工试剂 210 直接进行加工,所述快速测试加工试剂 210 经优化用于产生进行特定免疫测定的最大临床表现。移出拭子 200 并用分配器盖子 216 闭合快速测试容器 215。使用带有分配器盖子 216 的加盖的测试容器 215 来将一部分经加工的样品 211 分配到快速测试带 220 上。使用一部分在快速测试加工试剂中加工过的样本 211 来进行快速 POC 测试 220。POC 测试之后,经加工的样品的剩余部分 212 被转运 300 至临床实验室用于实验室测试 400。备选地,POC 测试之后,经加工的样品的剩余部分 212 被加入含有稳定转移稀释剂 240 的转移管 230 中。所述稳定转移稀释剂被设计为帮助保持样品的完整性。在这方面,多种制剂都是可能的,这取决于多种因素,包括靶微生物的稳定性,所料想的实验室测试类型,以及所述快速测试剂的构成。考虑到这些因素,本领域技术人员将选择条件(例如最佳 pH 条件)和构成(例如缓冲剂类型,盐,螯合剂,酶抑制剂,核酸结合蛋白,离液剂等)用于稳定转移稀释剂。然后,将稳定化的样品转运至临床实验室 300 用于证实性或其它实验室测试 400。这种实施方案阐释了一种样品(样本 205)怎样能在 POC 场所被加工而用于 POC 测试和基于实验室的测试二者。这种实施方案还显示了在对于 POC 测试为最优的条件下被加工的样品可被用于基于实验室的测试。

[0022] 存在目前商业上可得的多种快速测试。此类快速测试在本申请中没有详述,但是可从多种来源获得,包括 Becton Dickinson, Alere, Quidel, Meridian, Genzyme 等。本发明不限于与特定的快速测试一起使用。

## 实施例

[0023] 下列实施例阐释了本发明的多种实施方案而不意在限制本发明(除非是以与本申请所提供的权利要求相一致的方式)。

[0024] 实施例 1

[0025] 使用 H1N1 阳性临床样本显示了检测样品中流感病毒 RNA 的能力,其中所述样品经用于 POC 快速免疫测定的加工,所述 H1N1 阳性临床样本是通过上鼻涕子收集自显示阳性流感症状的个体的。将所述拭子置于 3ml 商业上可得的转移介质 (BD™ 通用病毒转移介质,可从 Becton Dickinson 获得) 并且获得了下述证实:所测试的样品对于 H1N1 呈阳性。为了测试,获得了某些 50  $\mu$  l 等份的所述样本。将一等份与快速测试加工试剂直接混合用于免疫测定,而将其它的用稳定转移稀释剂进一步稀释 (5X, 25X, 125X 或 625X), 然后与快速测试加工试剂混合。将每个 50  $\mu$  l 等份的样品与 25  $\mu$  l 快速测试加工试剂结合。优化所述快速测试加工试剂 (tris 缓冲剂, NaCl, 6% 去污剂并将 pH 调节至 8.0), 以释放和保存流感核蛋白,所述流感核蛋白是所述快速免疫测定的靶抗原。表 1 中显示了对于多种样品稀释物的免疫测定的测试结果。

[0026] 表 1: 免疫测定结果

[0027]

H1N1 临床样品	快速免疫测定结果
未稀释的	Flu A 阳性 /Flu B 阴性
1:5 稀释	Flu A 阳性 /Flu B 阴性
1:25 稀释	Flu A 阴性 /Flu B 阴性
1:125 稀释	Flu A 阴性 /Flu B 阴性
1:625 稀释	Flu A 阴性 /Flu B 阴性

[0028] 表 1 中免疫测定的测试结果显示样本稀释对于快速测试表现的影响。经大于 1:5 稀释的样品产生阴性快速免疫测定测试。因此,为了提供最优的 POC 临床表现,应最小化或避免样本稀释。大于 1:5 的样本稀释(除了最初将样品置于溶液中之外)削减了用快速免疫测定测试进行检测的可能性。在 POC 情境中使用直接拭子加工增强了快速免疫测定的临床表现。然而,如上文所述,使用直接拭子样品的标准 POC 测试方法不能使得进行基于实验室的测试,因为起初将所述样品置于了转移稀释剂中。

[0029] 实施例 2

[0030] 将在实施例 1 中制备的每种稀释物的等份 (50  $\mu$  l) 与 25  $\mu$  l 快速测试加工试剂混合。将一组经加工的样品在室温 (RT) 下存储 5 分钟,然后根据制造商的说明使用 Qiagen 病毒 RNA 小提试剂盒进行 RNA 提取。将其它组的经加工的样品在 4° C 或 RT 下存储 4 小时,然后进行 RNA 提取。然后,使用 5  $\mu$  l 部分的所提取的 RNA 样品作为靶标用于逆转录-聚合酶链式反应 (RT-PCR), 其中使用特异于流感 A 病毒基质基因的引物。RT-PCR 结果显示在图 2A 和 2B 中。表 2 和 3 显示了加工条件,其对应于图 2A 和 2B 中所示 RT-PCR 结果的琼脂糖凝胶的每条道。

[0031] 表 2: 图 2A 的琼脂糖凝胶的道

	加工方法	琼脂糖凝胶上的道
	分子量标记物	M
	1:5 稀释的样品, 经用于快速测试的加工, 立即提取 RNA	1
[0032]	1:5 稀释的样品, 经用于快速测试的加工, 在 RNA 提取前于 4°C 存储 4 小时	2
	1:5 稀释的样品, 经用于快速测试的加工, 在 RNA 提取前于室温存储 4 小时	3
	1:25 稀释的样品, 经用于快速测试的加工, 立即进行 RNA 提取	4
	1:25 稀释的样品, 经用于快速测试的加工, 在 RNA 提取前于 4°C 存储 4 小时	5
	1:25 稀释的样品, 经用于快速测试的加工, 在 RNA 提取前于室温存储 4 小时	6
	1:5 稀释的样品, RNA 提取(无快速测试/无快速测试试剂)	7
[0033]	1:25 稀释的样品, RNA 提取(无快速测试/无快速测试试剂)	8
	1:125 稀释的样品, RNA 提取(无快速测试/无快速测试试剂)	9
	1:625 稀释的样品, RNA 提取(无快速测试/无快速测试试剂)	10

[0034] 表 3: 图 2B 的琼脂糖凝胶的道

	加工方法	琼脂糖凝胶上的道
	分子量标记物	M
	1:125 稀释的样品, 经用于快速测试的加工, 立即进行 RNA 提取	11
	1:125 稀释的样品, 经用于快速测试的加工, 在 RNA 提取前于 4°C 存储 4 小时	12
[0035]	1:125 稀释的样品, 经用于快速测试的加工, 在 RNA 提取前于室温存储 4 小时	13
	1:625 稀释的样品, 经用于快速测试的加工, 立即进行 RNA 提取	14
	1:625 稀释的样品, 经用于快速测试的加工, 在 RNA 提取前于 4°C 存储 4 小时	15
	1:625 稀释的样品, 经用于快速测试的加工, 在 RNA 提取前于室温存储 4 小时	16
	1:5 稀释的样品, RNA 提取(无快速测试/无快速测试试剂)	17
	1:25 稀释的样品, RNA 提取(无快速测试/无快速测试试剂)	18
[0036]	1:125 稀释的样品, RNA 提取(无快速测试/无快速测试试剂)	19
	1:625 稀释的样品, RNA 提取(无快速测试/无快速测试试剂)	20

[0037] 图 2A 和 2B 显示了经用于快速免疫测定测试的加工的样品也能被用于 RNA 提取, 这使得能够进行基于实验室的 PCR 测试。从样品中提取了 RNA, 其中所述样品被稀释为远低于快速测试的检测极限, 这表明即使少量的病毒 RNA 在经加工的样品中仍保持稳定。在 RNA 提取前于 4°C 或室温存储经加工的样品达 4 小时也表明病毒核酸在加工后保持稳定。比较使用从经加工的样品分离的 RNA 与使用从样品稀释物(道 7-10, 17-20)直接提取的 RNA 的 PCR 测试结果, 显示出病毒 RNA 的完整性被快速测试的加工步骤最低限度地影响。

[0038] 实施例 3

[0039] 使用两种不同的快速测试加工试剂检测了经加工的样品中病毒 RNA 的稳定性, 所述快速测试加工试剂被优化用于流感 A/B 的快速免疫测定。用于快速免疫测定的样品加工

通常涉及使用相对温和的裂解处理,这是由含有各种盐和去污剂的试剂介导的。就与所述方法的相容性检测了快速测试加工试剂的两种不同制剂。制剂 A 含有 Tris 缓冲剂, NaCl, 16% 去污剂, pH 为 7.8。制剂 B 含有 Tris 缓冲剂, NaCl, 6% 去污剂, pH 为 8.0。用两种制剂加工实施例 1 中所描述的 H1N1 阳性临床样本的等份,将经加工的样品立即用于 RNA 提取(使用 Qiagen 病毒 RNA 小提试剂盒),或者在 RNA 提取前存储于 RT 和 4° C 达 24 小时。然后,使用一部分所提取的 RNA 样品作为 RT-PCR 的靶标,所述 RT-PCR 使用特异于流感 A 病毒的基质基因的引物。RT-PCR 结果显示在图 3 中。表 4 显示了加工条件,其对应于图 3 中所示 RT-PCR 结果的琼脂糖凝胶的每条道。

[0040] 表 4: 图 3 的琼脂糖凝胶的道

[0041]

加工方法	琼脂糖凝胶上的道
分子量标记物	M
用快速测试加工试剂 A 加工的样品, 立即进行 RNA 提取	1
用快速测试加工试剂 A 加工的样品, 在 RNA 提取前于 4°C 存储 4 小时	2
用快速测试加工试剂 A 加工的样品, 在 RNA 提取前于 4°C 存储 24 小时	3
用快速测试加工试剂 B 加工的样品, 立即进行 RNA 提取	4
用快速测试加工试剂 B 加工的样品, 在 RNA 提取前于 4°C 存储 4 小时	5
用快速测试加工试剂 B 加工的样品, 在 RNA 提取前于 4°C 存储 24 小时	6
用快速测试加工试剂 A 加工的样品, 在 RNA 提取前于室温存储 4 小时	7
用快速测试加工试剂 A 加工的样品, 在 RNA 提取前于室温存储 24 小时	8
用快速测试加工试剂 B 加工的样品, 在 RNA 提取前于室温存储 4 小时	9
用快速测试加工试剂 B 加工的样品, 在 RNA 提取前于室温存储 24 小时	10

[0042] 图 3 显示出, 制剂 A 和制剂 B 均与使用经加工的样品用于 RNA 提取和 PCR 测试是相容的。在 RNA 提取前, 将经加工的样品存储在 4° C 达 24 小时, 显示在用任一种所述制剂加工的样品中, 有很少的病毒 RNA 降解发生。然而, 在 RT 延长存储所提取的样品显示出降低的 PCR 表现, 这可能是由于病毒 RNA 随时间降解 (道 8, 10)。

[0043] 实施例 4

[0044] 检测了两种潜在的稳定转移稀释剂, 以试图增加经用于 POC 测试的加工的样品中病毒 RNA 的稳定性。将稳定转移稀释剂设计为帮助维持样品中存在的核酸的完整性。多种制剂都是可能的, 其中可采用最优 pH 条件, 缓冲剂类型, 盐, 螯合剂, 酶抑制剂, 核酸结合蛋白, 离液剂等。稳定转移稀释剂 A 含有 Qiagen 病毒 RNA 裂解 / 结合缓冲剂。稳定转移稀释剂 B 含有 6M 硫氰酸胍 + 20mM EDTA。使用快速测试加工试剂 B 来加工 H1N1 阳性临床样本的等份。将经加工的样品立即用于 RNA 提取, 或者在 RNA 提取之前将经加工的样品与所述两种不同的稳定转移稀释剂之一相混合并存储于 4° C 达 6 天。然后, 使用一部分所提取的 RNA 样品作为 RT-PCR 的靶标, 其中所述 RT-PCR 使用特异于流感 A 病毒的基质基因的引物。RT-PCR 结果显示在图 4 中。表 5 显示了加工条件, 其对应于图 4 中所示 RT-PCR 结果的琼脂糖凝胶的每条道。

[0045] 表 5: 图 4 的琼脂糖凝胶的道

	加工方法	琼脂糖凝胶上的道
	分子量标记物	M
	样品经用于快速测试的加工, 立即进行 RNA 提取	1
	样品经用于快速测试的加工, 与稳定转移稀释剂 A 混合, 在 RNA 提取前于 4°C 存储 3 天	2
[0046]	样品经用于快速测试的加工, 与稳定转移稀释剂 B 混合, 在 RNA 提取前于 4°C 存储 3 天	3
	样品经用于快速测试的加工, 与稳定转移稀释剂 A 混合, 在 RNA 提取前于 4°C 存储 6 天	4
	样品经用于快速测试的加工, 与稳定转移稀释剂 B 混合, 在 RNA 提取前于 4°C 存储 6 天	5

[0047] 使用所述稳定转移稀释剂的任一种制剂, 从经用于 POC 测试的加工的样品提取了完整的病毒 RNA, 其中所述样品于 4° C 被存储了达 6 天。将经存储的样品的 PCR 结果 (道 2-5) 与使用加工后立即提取的 RNA 所获得的 PCR 结果 (道 1) 进行比较, 显示出在以任何一种稳定转移稀释剂处理的经加工的样品中, 有很少的 (如果有的话) 病毒 RNA 的降解随时间发生。

[0048] 实施例 5

[0049] 使用了稳定转移稀释剂, 以试图增加经用于 POC 测试的加工的样品中病毒 RNA 的稳定性, 特别是当样品在室温下被更长时间地存储时。使用实施例 3 中所描述的快速测试

加工试剂制剂 B 来加工 H1N1 阳性临床样本的等份,并且将经加工的样品立即用于 RNA 提取,或者在 RNA 提取之前将经加工的样品与稳定转移稀释剂 A 相混合并存储于 RT 和 4° C 至多七天。然后,使用一部分所提取的 RNA 样品作为 RT-PCR 的靶标,其中所述 RT-PCR 使用特异于流感 A 病毒的基质基因的引物。RT-PCR 结果显示在图 5 中。表 6 显示了加工条件,其对应于图 5 中所示 RT-PCR 结果的琼脂糖凝胶的每条道。

[0050] 表 6: 图 5 的琼脂糖凝胶的道

	加工方法	琼脂糖凝胶上的道
	分子量标记物	M
	样品经用于快速测试的加工, 立即进行 RNA 提取	1
[0051]	样品经用于快速测试的加工, 与稳定转移稀释剂相混合, 在 RNA 提取前于 4°C 存储 3 天	2
	样品经用于快速测试的加工, 与稳定转移稀释剂相混合, 在 RNA 提取前于 4°C 存储 4 天	3
	样品经用于快速测试的加工, 与稳定转移稀释剂相混合, 在 RNA 提取前于 4°C 存储 5 天	4
	样品经用于快速测试的加工, 与稳定转移稀释剂相混合, 在 RNA 提取前于 4°C 存储 6 天	5
	样品经用于快速测试的加工, 与稳定转移稀释剂相混合, 在 RNA 提取前于 4°C 存储 7 天	6
	样品经用于快速测试的加工, 与稳定转移稀释剂相混合, 在 RNA 提取前于室温下存储 1 天	7
[0052]	样品经用于快速测试的加工, 与稳定转移稀释剂相混合, 在 RNA 提取前于室温下存储 2 天	8
	样品经用于快速测试的加工, 与稳定转移稀释剂相混合, 在 RNA 提取前于室温下存储 3 天	9
	样品经用于快速测试的加工, 与稳定转移稀释剂相混合, 在 RNA 提取前于室温下存储 4 天	10

[0053] 将经加工的样品与稳定转移稀释剂相混合增加了病毒核酸的稳定性,并且使得能够在多种温度下更长期地存储和转移经加工的样品。图 5 显示了在于 4° C 存储所述样品至多 7 天或于室温存储所述样品至多 4 天后,可从与稳定转移稀释剂相混合的经加工的样

品中提取出完整的病毒 RNA。

[0054] 实施例 6

[0055] 使用稳定转移稀释剂 B 来检测不同流感株间的稳定特性：

[0056] A: 流感 A A 株 / 所罗门群岛 /03/06 (H1N1)；

[0057] B: 流感 A A 株 / 威斯康辛 /67/2005 (H3N2)；以及

[0058] C: 流感 B B 株 / 江苏 /10/2003。

[0059] 取来自培养物的细胞培养上清液等份 (50  $\mu$  l)，并将这些等份与快速测试加工试剂 B (25  $\mu$  l) 结合，其中在所述等份中引入了来自显示流感症状的患者鼻拭子的病毒，将经加工的样品立即用于 RNA 提取，或者在 RNA 提取前将经加工的样品与稳定转移稀释剂 B (75  $\mu$  l) 相混合并于 4° C 或 -20° C 存储至多 14 天。然后，使用一部分所提取的 RNA 样品作为 RT-PCR 的靶标，其中所述 RT-PCR 使用特异于流感 A 的基质基因或流感 B 的核蛋白基因的引物。PCR 结果显示在图 6 中。表 7 显示了加工条件，其对应于图 6 中所示 RT-PCR 结果的琼脂糖凝胶的每条道。

[0060] 表 7: 图 6 的琼脂糖凝胶的道

[0061]

加工方法	琼脂糖凝胶上的道
样品经用于快速测试的加工，立即进行 RNA 提取	1
样品经用于快速测试的加工，与稳定转移稀释剂 B 相混合，在 RNA 提取前于 4° C 存储 2 天	2
样品经用于快速测试的加工，与稳定转移稀释剂 B 相混合，在 RNA 提取前于 4° C 存储 7 天	3
样品经用于快速测试的加工，与稳定转移稀释剂 B 相混合，在 RNA 提取前于 4° C 存储 10 天	4
样品经用于快速测试的加工，与稳定转移稀释剂 B 相混合，在 RNA 提取前于 4° C 存储 14 天	5
样品经用于快速测试的加工，与稳定转移稀释剂 B 相混合，在 RNA 提取前于 -20° C 存储 7 天	6

[0062] 对于在 4° C 下至多 14 天或在 -20° C 下至多 7 天，将经加工的样品与稳定转移稀释剂相混合增加了所有三株流感中病毒核酸的稳定性。图 6 显示出，将样品于 4° C 下存储至多 7 天或于 -20° C 下存储至多 14 天后，可从与稳定转移稀释剂相混合的经加工的样品中由各个毒株提取出完整的病毒 RNA。对于毒株 A 和 B 二者，在所有条件下的存储后都提取出了完整的病毒 RNA。

[0063] 实施例 7

[0064] 在 2010-2011 流感季节间进行的临床试验中显示出了图 1B 中所示的本发明的方

法的一种实施方案的用处。从参与 POC 流感研究的患者收集了配对的鼻咽 (NPS) 或上鼻拭子 (NS)。一个拭子被加工而直接用于在 POC 场所的调查快速免疫测定,然后将一部分 (3 至 5 滴) 剩余样品与稳定转移稀释剂 B (200  $\mu$  l) 相混合并在送到实验室进行 PCR 分析之前在 2 至 8°C 存储至多 5 天或在 -20°C 存储至多两周。将第二个拭子置于 3ml 病毒转移介质中并直接送到临床实验室用于 PCR 测试。

[0065] 所有的 PCR 测试都是使用 Prodesse ProFlu+ 测定进行的,其可从 GenProbe, Inc. (圣地亚哥, CA) 获得。所述 Prodesse ProFlu+ 测试是经 FDA 批准的并且能够检测和区分呼吸系统样本中的流感 A, 流感 B 和 RSV。对于转移介质中的拭子样本,根据 Prodesse ProFlu+ 说明书,使用 NucliSENS easyMAG 系统 (bioMérieux) 提取了 RNA。对于稳定转移稀释剂中的经 POC 加工的样品,按照制造商所述,使用 Qiagen 病毒 RNA 小提试剂盒提取了 RNA。按照 Prodesse ProFlu+ 说明书中所描述的测定程序,使用 Cepheid SmartCycler II 设备,用 5 微升所提取的 RNA 进行 PCR 扩增。按照 Prodesse ProFlu+ 说明书中所列的方案,使用 Cepheid SmartCycler Dx 软件来解释样本和对照的 PCR 结果。下面的表 7 中显示了从 POC 稳定化样品 (POC PCR) 和转移介质中的拭子样品 (参照 PCR) 获得的结果之间的阳性和阴性百分比一致性。

[0066] 表 7: 来自经 POC 加工的样品的 PCR 结果与参照 PCR 的比较

[0067]

流感 A			
	参照 PCR		
POC PCR	P	N	
P	150	22	172
N	5	335	340
	155	357	512
参照方法: 来自转移介 质中的拭子的 PCR 阳性百分比一致性: <b>96.8%</b> 阴性百分比一致性: <b>93.8%</b>			

流感 B			
	参照 PCR		
POC PCR	P	N	
P	91	12	103
N	8	401	409
	99	413	512
参照方法: 来自转移介 质中的拭子的 PCR 阳性百分比一致性: <b>91.9%</b> 阴性百分比一致性: <b>97.1%</b>			

RSV			
	参照 PCR		
POC PCR	P	N	
P	18	2	20
N	1	491	492
	19	493	512
参照方法: 来自转移介 质中的拭子的 PCR 阳性百分比一致性: <b>94.7%</b> 阴性百分比一致性: <b>99.6%</b>			

[0068] 表 7 显示出样品可被加工用于快速 POC 测试并且经加工的样品的一部分可被用于基于实验室的测试, 例如 PCR。当将直接加工用于 PCR 的样品与首先在最优于快速 POC 测试的条件下加工随后被加工用于 PCR 的样品进行比较时, 在多种病毒株中都获得了大于 91.9% 的一致性。

[0069] 虽然参照具体实施方案描述了本发明, 要理解, 这些实施方案仅仅是阐释本发明的原理和应用。因此, 要理解可对所述阐释性的实施方案进行许多修饰并且可设计其它的配置而不偏离由所附权利要求限定的本发明的精神和范围。

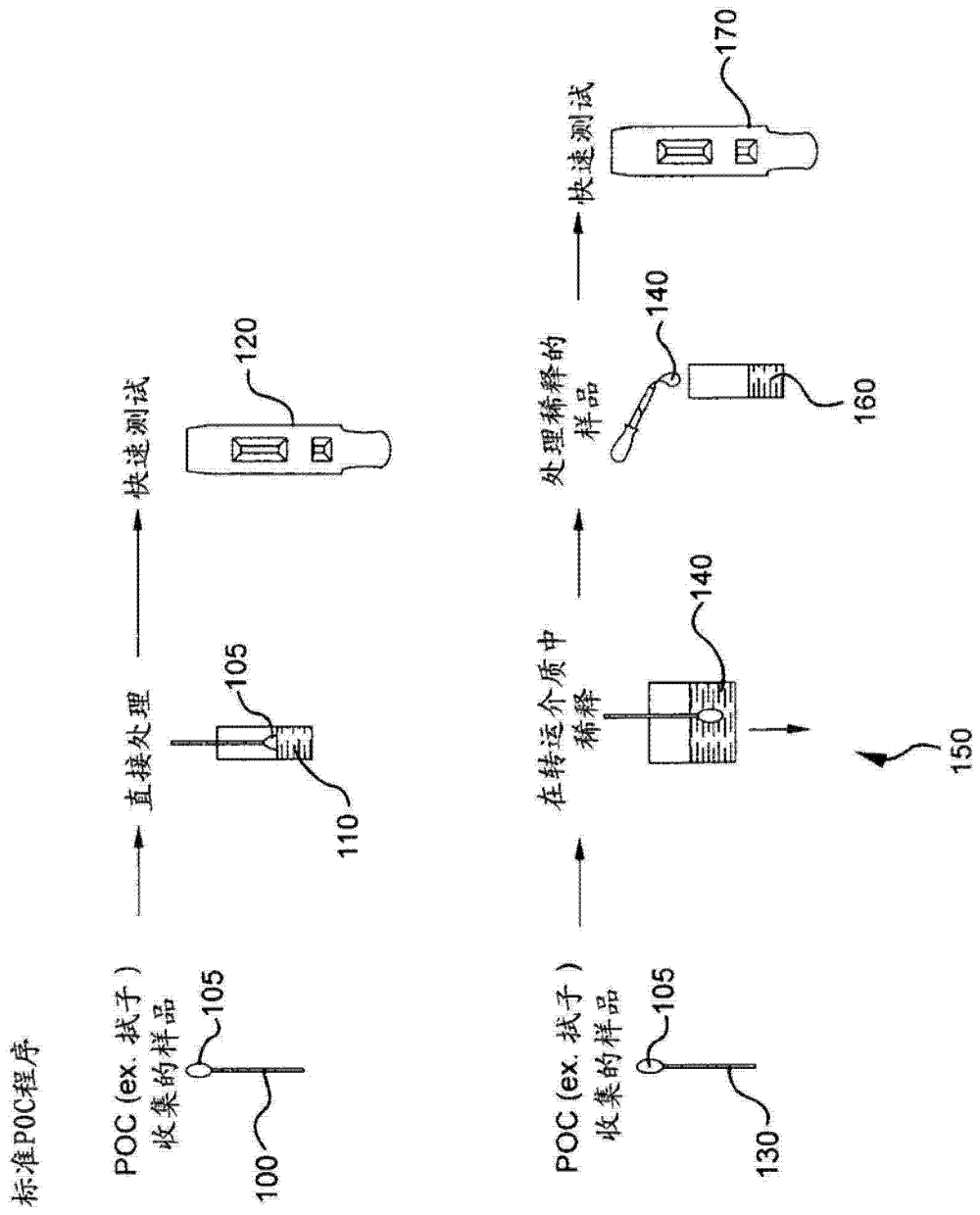


图 1A

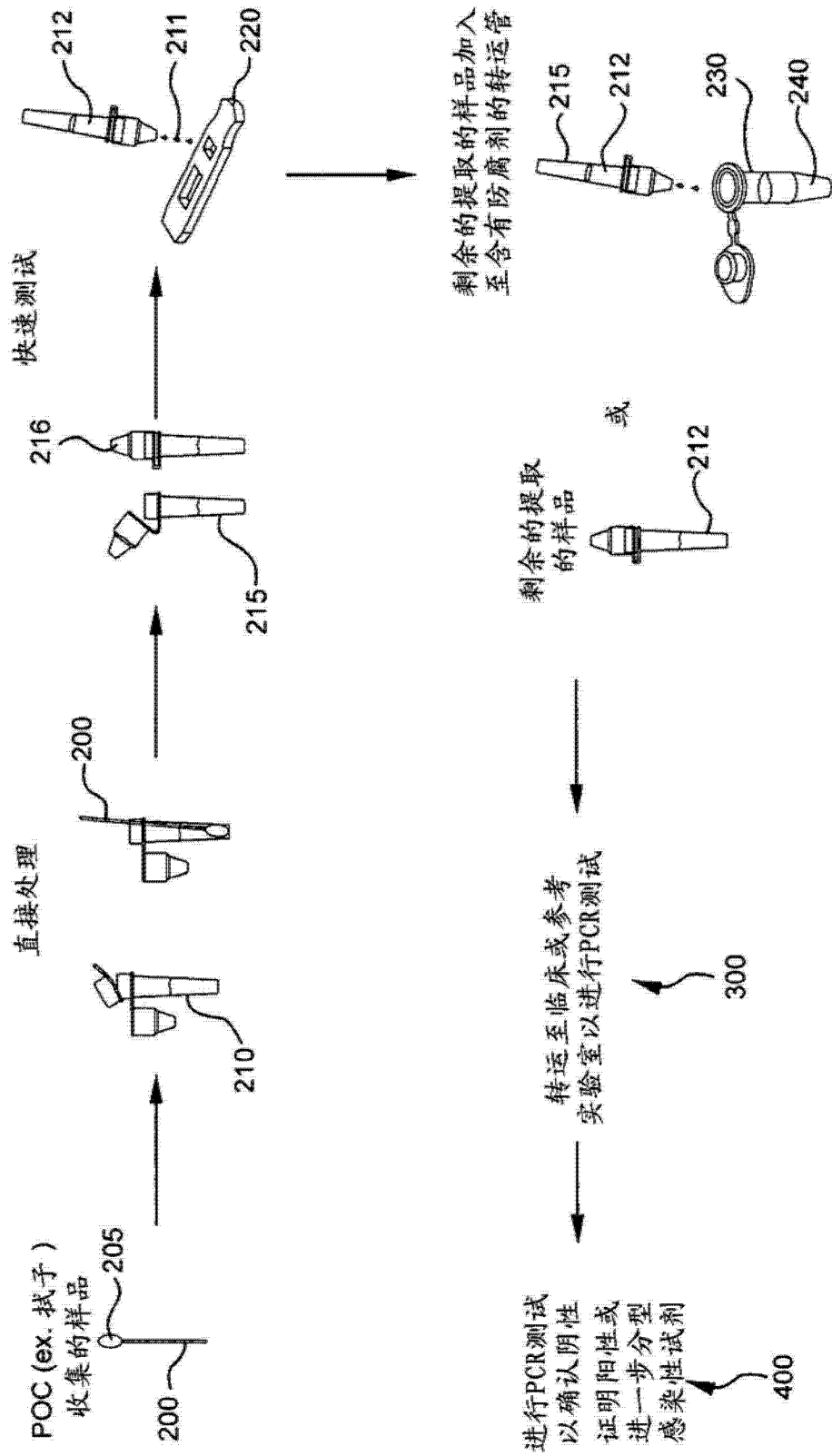


图 1B

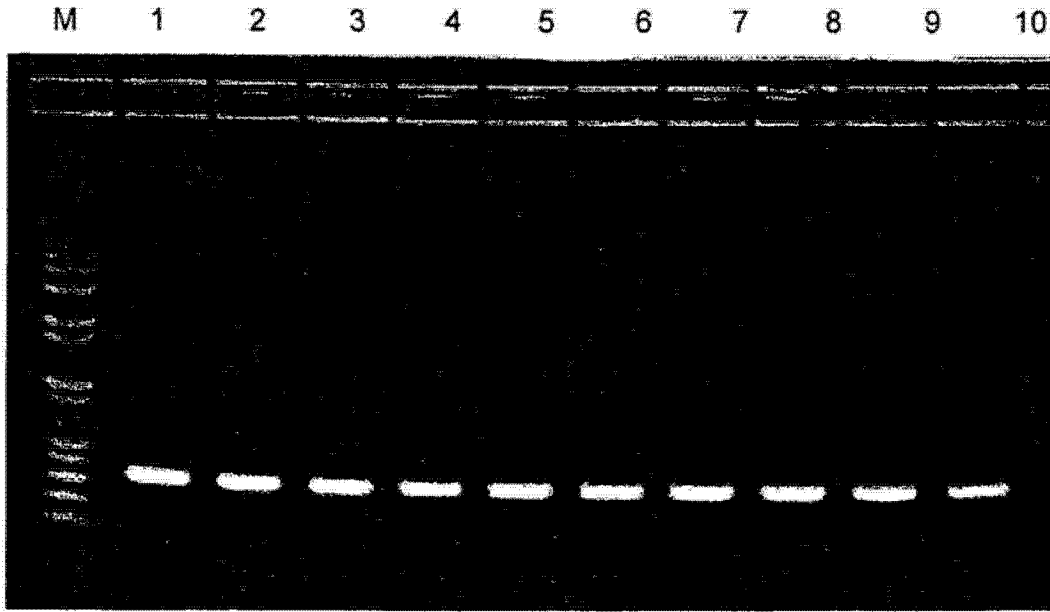


图 2A

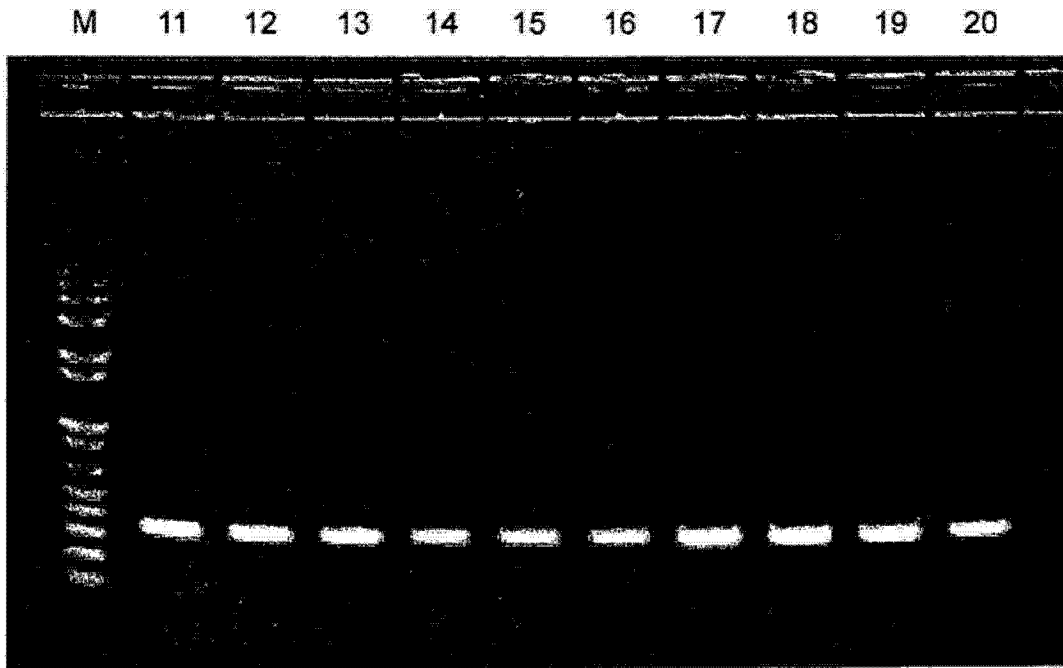


图 2B

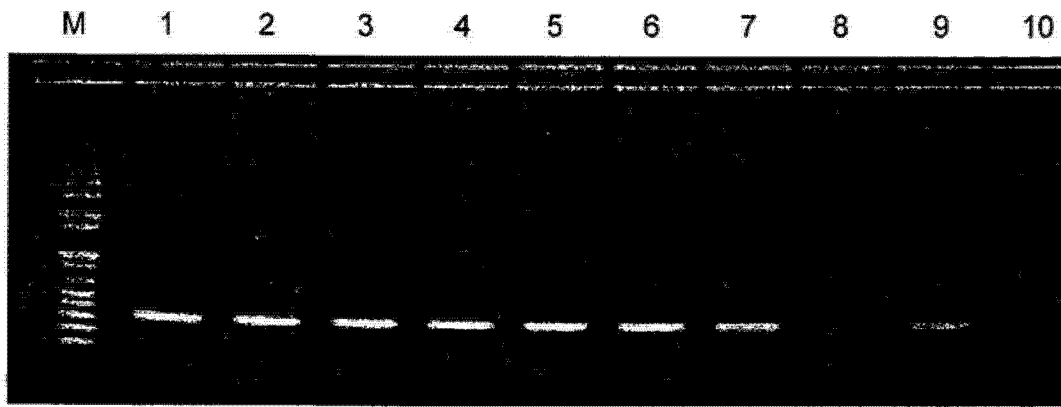


图 3

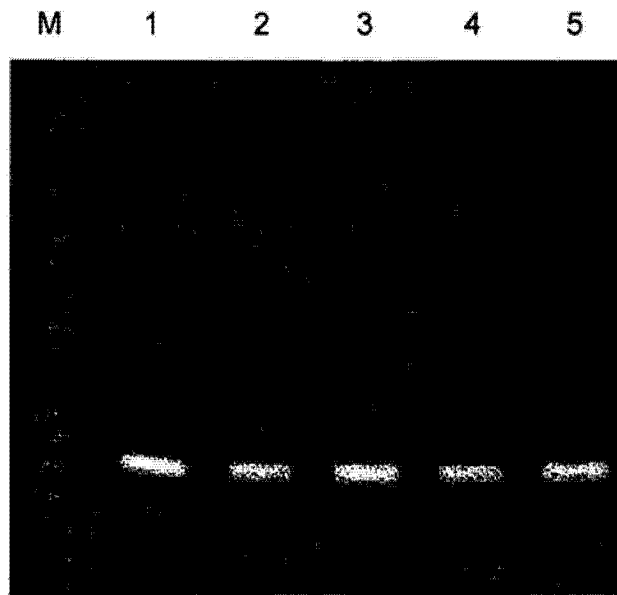


图 4

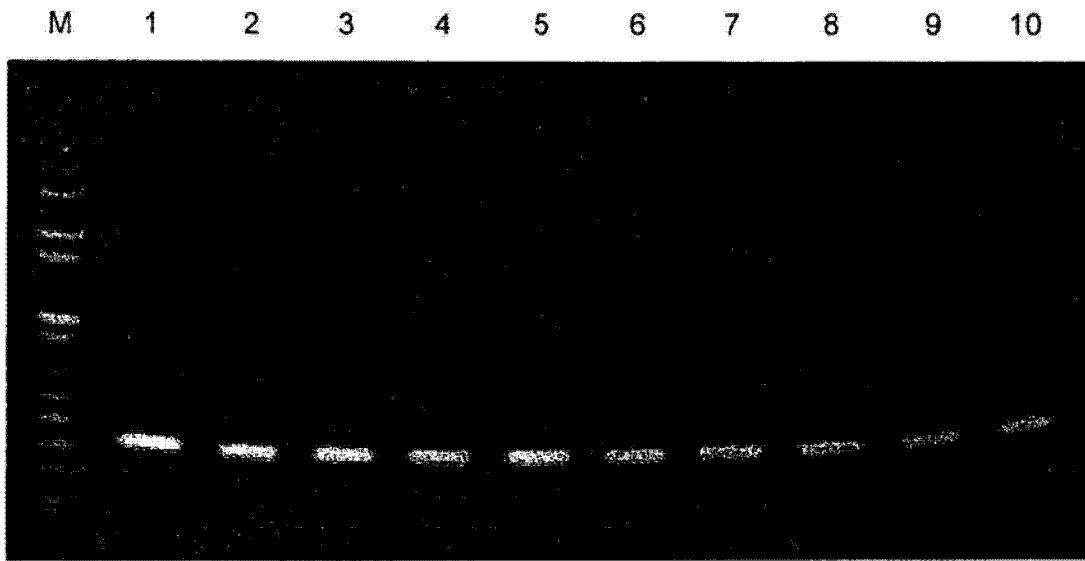


图 5

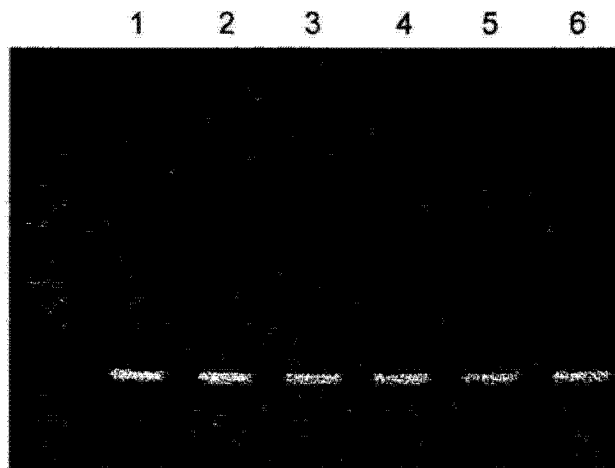


图 6A

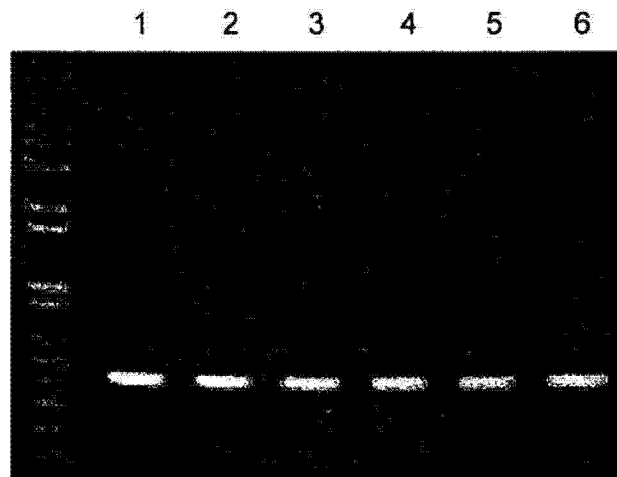


图 6B

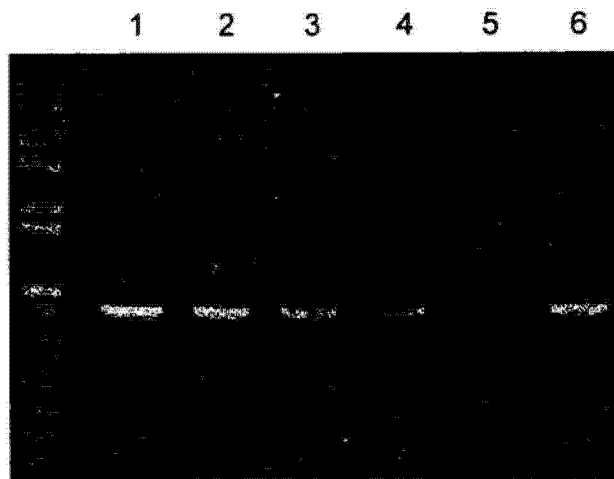


图 6C

专利名称(译)	用于将及时现场护理快速诊断测试结果与基于实验室的方法相连的方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN103069002A</a>	公开(公告)日	2013-04-24
申请号	CN201180039453.X	申请日	2011-07-20
[标]申请(专利权)人(译)	贝克顿·迪金森公司		
申请(专利权)人(译)	贝克顿·迪金森公司		
当前申请(专利权)人(译)	贝克顿·迪金森公司		
[标]发明人	JJ·卡里诺 J·范		
发明人	J·J·卡里诺 J·范		
IPC分类号	C12Q1/24 G01N33/53 C12Q1/68		
CPC分类号	C12Q1/70 G01N33/56983 C12Q1/6806 C12Q2527/125		
优先权	61/366076 2010-07-20 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

将怀疑含有微生物的单一样品用于本地快速测试免疫测定和远程实验室测试二者的方法。所述样品收集自医生办公室处的患者或者待测试的环境。使用拭子或其它工具收集所述样品并将其与快速测试加工试剂结合，且将一部分经加工的样品用于本地快速测试。所述快速测试加工试剂通常由缓冲剂、盐和去污剂组成并且与本地快速测试免疫测定相容。仅将经加工的样品的一部分用于本地快速测试，留下经加工的样品的剩余部分用于远程实验室测定。将经加工的样品的剩余部分的至少一些与稳定剂结合，其中所述稳定剂至少保存经加工的样品中的核酸用于远程实验室测定。

