



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104185790 A

(43) 申请公布日 2014. 12. 03

(21) 申请号 201280055383. 1

代理人 徐关寿

(22) 申请日 2012. 11. 09

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

G01N 33/53 (2006. 01)

61/558, 848 2011. 11. 11 US

61/561, 767 2011. 11. 18 US

61/617, 974 2012. 03. 30 US

61/714, 649 2012. 10. 16 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 05. 09

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/064535 2012. 11. 09

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/071175 EN 2013. 05. 16

(71) 申请人 美艾利尔圣地亚哥公司

地址 美国加利福尼亚州圣地亚哥市夏山路
9975 号

(72) 发明人 R·易瑞特 S·莫列克

J·J·瑞嘉麦 J·布鲁且尔

(74) 专利代理机构 浙江杭州金通专利事务所有

限公司 33100

权利要求书2页 说明书20页

序列表17页 附图17页

(54) 发明名称

检测杀细胞的毒素 (PVL) 的装置和方法

(57) 摘要

本发明提供检测生物样本中生物分子, 例如 PVL, PBP2a 和 SPA 的方法和装置。

1. 一种检测样品中生物分子的方法,包括:
 - a) 让样本与抗体或抗体的功能片段接触并形成轭合物,该抗体特异结合选自以下一个或多个基因的表达产物:lukS-PV, lukF-PV, lukM, lukF-P83, mecA, 和 spa;
 - b) 检测轭合物,从而检测所述的毒素。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中抗体或抗体的功能片段是 PVL-1841 的克隆, PVL-1321 的克隆, 或 PVL-1401 的克隆。
3. 根据权利要求1所述的方法,其中,样本与抗体或抗体片段接触,所述的抗体或抗体的功能片段为 PVL-1841 克隆, PVL-1321 克隆, 和 PVL-1401 克隆中的至少两个克隆。
4. 根据权利要求1所述的方法,其中,抗体或抗体片段从下列中进行选择:PVL-1031, PVL-1061, PVL-1101, PVL-1321, PVL-1401, PVL-1451, PVL-1631, PVL-1711, PVL-1771, PVL-1841, PVL-1881, PBP2a-1631, PBP2a-1721, PBP2a-1941, PBP2a-6G10, PBP2a-17A10, PBP2a-17C8, PBP2a-19B1, PBP2a-8A5, PBP2a-9C6, PBP2a-pc-2. 1, PBP2a-pc-2. 2, SPA-A135, 和 SPA-4412。
5. 根据权利要求1所述的方法,其中,抗体或抗体片段为下列 PVL-1031, PVL-1061, PVL-1101, PVL-1321, PVL-1401, PVL-1451, PVL-1631, PVL-1711, PVL-1771, PVL-1841, PVL-1881, PBP2a-1631, PBP2a-1721, PBP2a-1941, PBP2a-6G10, PBP2a-17A10, PBP2a-17C8, PBP2a-19B1, PBP2a-8A5, PBP2a-9C6, PBP2a-pc-2. 1, PBP2a-pc-2. 2, SPA-A135, 和 SPA-4412 中的至少选择两个。
6. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述的功能结合片段选自抗体或抗体片段从下列 Fab, F(ab')₂, Fd, Fv 或者它们的组合进行选择。
7. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述的抗体与可被检测的标记物轭合。
8. 根据权利要求7所述的方法,其中,所述的标记物为金属颗粒。
9. 根据权利要求8所述的方法,其中,所述的金属为金。
10. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述的样本包括预培养的金黄色葡萄球菌的细胞中的表达产物。
11. 根据权利要求10所述的方法,其中,所述的培养基为液体或固态培养基。
12. 根据权利要求1所述的方法,其中,该方法进一步包括让样本与抗体或抗体的功能片段接触,其中所述的抗体或功能片段特异结合 PVL, PBP2a, 或 A 蛋白或者它们的组合。
13. 根据权利要求1所述的方法,其中,步骤(a)在免疫检测装置或微阵列上进行。
14. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述的免疫检测装置为横向流动免疫检测装置。
15. 抗体或抗体的功能结合片段,该抗体或功能结合片段特异结合 lukS-PV, lukF-PV, lukM, lukF-P83, mecA, 和 spa 基因中的一个或多个基因的表达产物,其中所述的抗体选自于 PVL-1031, PVL-1061, PVL-1101, PVL-1321, PVL-1401, PVL-1451, PVL-1631, PVL-1711, PVL-1771, PVL-1841, PVL-1881, PBP2a-1631, PBP2a-1721, PBP2a-1941, PBP2a-6G10, PBP2a-17A10, PBP2a-17C8, PBP2a-19B1, PBP2a-8A5, PBP2a-9C6, PBP2a-pc-2. 1, PBP2a-pc-2. 2, SPA-A135, 和 SPA-441216。
16. 根据权利要求15所述的抗体,其中所述的功能结合片段从 Fab, F(ab')₂, Fd, Fv, 或它们的组合中进行选择。

17. 根据权利要求 16 所述的抗体,所述的抗体或者功能结合片段与可被检测的标记物轱合。
18. 根据权利要求 17 所述的抗体,所述的可被检测的标记物为金属颗粒。
19. 根据权利要求 18 所述的抗体,所述的金属为金。
20. 根据权利要求 15 所述的抗体,其中所述的抗体或功能结合片段被下列核酸序列 SEQ ID NOs:1, 3, 5, 7, 9 或 11 所克隆。
21. 根据权利要求 15 所述的抗体,其中所述的抗体或功能结合片段包括 SEQ ID NOs:2, 4, 6, 8, 10 或 12 的氨基酸序列。
22. 检测样本中生物分子的检测装置,该装置包括如权利要求 15 所述的抗体或功能结合片段。
23. 根据权利要求 22 所述的装置,其中该装置被设置为微列阵或横向流动试剂盒。
24. 用于检测样本中生物分子的盒子,该盒子包括如权利要求 15 所述的抗体或功能结合片段。
25. 根据权利要求 24 所述的盒子,进一步包括一个或多个试剂和说明书。
26. 用于检测耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (MRSA) 的方法,包括通过让样本接触如权利要求 15 所述的抗体来形成抗体轱合物,从而检测 lukS-PV, lukF-PV, lukM, lukF-P83, mecA, 和 spa 基因中的一个或多个基因的表达阐述的水平 ;和检测所述的轱合物。
27. 抗体或抗体的工能结合片段,其中该抗体或其功能结合片段特异结合 lukS-PV, lukF-PV, lukM, lukF-P83, mecA, 和 spa 基因中的一个或多个基因的表达产物或它们的肽链,其中所述的抗体与权利要求 20-21 所述的结合所述表达产物的抗体竞争。

检测杀细胞的毒素 (PVL) 的装置和方法

技术领域

[0001] 本发明涉及检测生物样品中细菌毒素的装置和方法。尤其本发明涉及一种用于识别样品中存在的金黄色葡萄球菌菌株产生的生物分子,如杀细胞的毒素 (Panton-Valentine Leukocidin, PVL) 和 PBP2a,的横向流动检测。

背景技术

[0002] 接下去的背景信息旨在帮助读者理解本发明,并不属于现有技术。

[0003] 金黄色葡萄球菌是一种临床医学革兰氏阳性菌。约 20-30% 的健康人群的粘膜上携带金黄色葡萄球菌。金黄色葡萄球菌可引起多种疾病,包括败血症,中毒性休克,肺炎,皮肤和软组织感染,骨和人造植入物的感染。金黄色葡萄球菌也在多种动物中被检测到。

[0004] 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (MRSA) 是含有被称为 PBP2a 的另一种青霉素结合蛋白的金黄色葡萄球菌, PBP2a 由基因 *mecA* 基因和不同的等位基因编码。正如其名称所示, MRSA 的检测是通过存在甲氧西林情况下观察到金黄色葡萄球菌的生长,也可以是其他 β -内酰胺类抗生素如青霉素类,头孢菌素类和碳青霉烯类。

[0005] 由于治疗方法的局限性, MRSA 是住院患者发病和死亡的一个重要原因,并对感染控制和公共卫生提出了挑战。由于需要昂贵的二线药物和检疫措施, MRSA 花费了医疗服务提供者相当多的成本。世界上估计有 5300 万 MRSA 携带者,美国有 250 万 MRSA 携带者。

[0006] 杀白细胞毒素 (PVL) 的毒素是金黄色葡萄球菌的噬菌体源性致病因子。它是金黄色葡萄球菌和 MRSA 临床上重要的噬菌体源性的致病因子。PVL 是由两个相邻的共同表达基因 *lukS-PV* 和 *lukF-PV* (*lukS-PV*, *lukF-PV*, GenBank BA000033.2:MW1378und MW1379) 编码。*lukS-PV* 的 T 细胞表位能诱发 L_S T 细胞强烈增殖,该 *lukS-PV* 的 T 细胞表位目前具有以下特点: $N_{169}YISEVERQNSKSVQWGIKANSFIT_{193}$ (Brown, et al., Open J. Immunol., 2(3):111-115(2012))。这些分子的聚合物在人类白细胞细胞膜上形成孔,导致细胞死亡和细胞因子的释放否。或者,其低浓度可诱导粒细胞的细胞凋亡。

[0007] PVL 与 γ -溶血素 (*lukF/S-hlg*) 和其他杀白细胞素有关 (金黄色葡萄球菌中的 *lukE/D*, *lukM/lukF-P83* 和中间葡萄球菌 (*S. intermedius*)/假中间葡萄球菌 (*S. pseudintermedius*) 中的 *lukF/S-int*)。PVL 在结构上,按照序列相似性,与其它杀白细胞素有关,如金黄色葡萄球菌中的 *lukE/D*, *lukM/lukF-P83* 和中间葡萄球菌 (*S. intermedius*)/假中间葡萄球菌 (*S. pseudintermedius*) 中的 *lukF/S-int*, 与 *hlgA/lukF/S-hlg* - γ -溶血素 / 杀白细胞素位点。

[0008] 如上所述, PVL 是人类白细胞素,因为它在白血细胞的细胞膜上形成聚合微孔。白细胞死亡导致细胞因子的释放并吸引新的白血细胞。PVL 基因为噬菌体源性并且是可移动的;它们被发现具有非常多样化的克隆物 (例如 CC1, 5, 8, 15, 22, 25, 30, 45, 59, 72, 80, 88, 93, 96/154, 121, 188, 398)。到目前为止, PVL 仅限于从人体分离的金黄色葡萄球菌菌株中。来自反刍动物 (如牛, 山羊和绵羊) 的金黄色葡萄球菌有另一种特异的杀白细胞素,由 *lukM* 和 *lukF-P83* (例如, 在 CC479, 151, 133, 97, 30, 20 中) 基因编码。

[0009] 当皮肤和软组织感染 (SSTI) 与慢性 / 复发性感染有关时, 如疔病, 尤其是在年轻人和曾健康的成年人中, 从那里分离出的金黄色葡萄球菌中 PVL 经常能被检测到。PVL 阳性的金黄色葡萄球菌也可引起更严重的疾病, 例如坏死性肺炎。这种情况偶尔是其他呼吸道感染的并发症如感冒, 其致死率可高达 40%。与此相反, 分离自健康携带者的金黄色葡萄球菌, 或从那些与其他感染类型如菌血症有关的菌株中, PVL 很少被分离到。

[0010] 虽然 PVL 在 20 世纪 30 年代才有描述, 但在 19 世纪后期 (28) 就已假设 PVL 为由某些金黄色葡萄球菌菌株产生的一种强效杀白细胞素。在 20 世纪 40 年代和 60 年代, 全球爆发 PVL 阳性, 甲氧西林敏感的金黄色葡萄球菌, 到 20 世纪 90 年代后期已经出现 PVL 阳性 MRSA 后天免疫性群体 (caMRSA)。

[0011] 很多临床状况与 PVL 有关, 包括皮肤和软组织感染, 脓肿, 疔病 (疔), 和乳腺炎。这些状况的范围从轻微感染到威胁生命, 例如坏死性筋膜炎。与 PVL 相关的感染往往是慢性或反复出现的。金黄色葡萄球菌偶尔也引起肺炎, 常作为重复感染或流行感冒的并发症。坏死性肺炎, 肺炎的最严重形式, 通常与 PVL 有关, 并且往往是致命的。

[0012] 从健康携带者或与植入物有关的感染中分离到的金黄色葡萄球菌中, PVL 是极罕见的。而来自如脓肿或疔等感染的菌株中, PVL 是普遍的。由于倾向于引起慢性、复发性或特别严重感染, 要确保对 PVL 阳性金黄色葡萄球菌菌株的治疗不同于“正常”金黄色葡萄球菌, 要更加积极。在英国, 这是卫生防护局做出的指导方针的官方推荐。

[0013] 迄今为止, PVL 检测主要使用分子方法, 该方法基本上局限于具有设备和经验的参考中心和专业实验室来进行这种测定。目前检测 PVL 和 PBP2a 的方法包括聚合酶链反应 (PCR) 来鉴定 PVL 和 PBP2a 的基因。PCR 只能在专门的实验室用专用硬件和训练有素的人员来执行并且需要样品的制备。那些具有家庭医生和初级保健中心的患者不能使用这样的实验设施。这些不能确诊案例因而可能没有得到充分治疗, 对病人造成更大的健康风险, 并对医生和医院造成潜在的经济后果。鉴定产生 PVL 的金黄色葡萄球菌和耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌的其他方法, 诸如那些在美国 2010/0129839 中公开的方法, 需要预处理生物样品 (即, 加热) 以变性 PVL, 除了要耗费更多时间和工作的免疫性测定如 ELISA。

[0014] 因此, 最小限度样品处理的快速检测 PVL, PBP2a 与金黄色葡萄球菌蛋白 A (SPA) 的方法和装置, 同时确保准确和可靠的结果, 这个需求持续存在。一个简单, 快速的检测可以促进在初级和二级保健机构对 PVL 相关疾病的诊断, 并确定该菌株是否耐甲氧西林。快速检测节省时间, 因为来自参考实验室的结果往往需要数天或数周。从 PVL 阴性 MRSA 菌株中区分 PVL 阳性的 MASA 菌株的测试可能最终对患者造成更大的治疗益处, 有助于在医院内预防前者的传播。另外, 从 PBP2a 阴性 MRSA 菌株中区分 PBP2a 阳性 MRSA 菌株的测试可能最终对患者造成更大的治疗益处, 有助于在医院内预防前者的传播。

发明内容

[0015] 本发明提供了用于检测生物分子如生物样品中的 PVL, PBP2a 和 SPA 的横向流动测定。该测定包括利用噬菌体展示技术培育针对金黄色葡萄球菌的 PVL, PBP2a 和 SPA 的重组抗体。

[0016] 在一些实施例中, 生物样品是培养物, 液体培养物, 伤口拭子, 鼻拭子, 或在兽医学中, 伤口或乳房拭子。在实施例中, 初代培养物是采自感染的患者, 例如可能由多种病原体

引起的疖病和脓肿。

[0017] 本发明上述的摘要不意味着限制,从接下去的详细描述以及权利要求中将会明显体现本发明的其他特征和优点。

附图说明

[0018] 图 1A 是一个表格,所述数据来自本发明的一些具体实施方式中的毒素抗体测定,显示了代表菌株体外产生 PVL 的浓度。

[0019] 图 1B 是一个图,所述数据来自本发明的毒素抗体测定实施例,显示了代表菌株体外产生 PVL 的浓度。

[0020] 图 2 是一个表格,其所述数据来自本发明毒素抗体测定实施例,来说明产生不同浓度毒素的不同菌株被确认。

[0021] 图 3 是一个表格,其所述数据来自本发明毒素抗体测定实施例。描述了一个矩阵用于序列测定,来确定抗体的最优组合。0,无反应;(+)到+++ ,活性从弱到强。

[0022] 图 4 是一个图形,显示了本发明的一个实施例 (PVL-1401) 中抗体的 DNA 和蛋白质序列信息。

[0023] 图 5 是一个图形,显示了本发明的一个实施例 (PVL-1841) 中抗体的 DNA 和蛋白质序列信息。

[0024] 图 6 是一个图形,显示了本发明的一个实施例 (PVL-1321) 中抗体的 DNA 和蛋白质序列信息。

[0025] 图 7 是一个图形,显示了本发明的一个实施例中使用 Binax 卡片形式来测定的过程。

[0026] 图 8A 的表格中描述数据来自本发明的毒素抗体测定实施例,说明产生不同浓度的毒素的不同菌株已经被确认。

[0027] 图 8B 表格中描述数据来自本发明的毒素抗体测定实施例,说明产生不同浓度的毒素的不同菌株已经被确认。

[0028] 图 9 是一个表格,所述数据来自本发明的毒素抗体测定实施例,来说明不同的固体培养基可以被使用。

[0029] 图 10 是一个表格,所述数据来自本发明的毒素抗体测定实施例,来说明不同的液体培养基可以被使用。

[0030] 图 11 的表格表示数据来自本发明的毒素抗体测定实施例。通过测定 588 个临床分离物和 12 个参考菌株,同时平行的用分子手段 (DNA 芯片) 定性,获得敏感性,特异性,阳性和阴性预测值。

[0031] 图 12A 列出了菌株和克隆物,并从复合物中鉴定 PVL 阳性的菌株,来开发本发明实施例中的毒素抗体测定。

[0032] 图 12B 列出了菌株和克隆物,并从复合物中鉴定 PVL 阳性的菌株,来开发本发明实施例中的毒素抗体测定。

[0033] 图 13 是一个表格,所示数据是来自几个国家的临床分离菌株的初步试验。

[0034] 图 14 的表格表示通过位点研究获得的 PVL 阴性 MSSA, PVL 阴性 MRSA, PVL 阳性 MSSA 和 PVL 阳性 MRSA 的概率。

[0035] 详细描述

[0036] 本发明提供的装置和方法用于确定样品中被分析物的存在或存在数量。在一个实施例中,本发明提供检测细菌生物分子或毒素的设备和方法,例如生物样品中的金黄色葡萄球菌的 PVL 或 PVP2a。在一个实施例中,样品是来自患者的生物样品。

[0037] 用 PCR 产物来构建一个 HisTaq-PVL 融合质粒,该 PCR 产物包括来自自己经过测序的参考菌株 MW2/USA400 中,PVL 和 lukF-PV 两个组分中的一个组分的完整开放读码框。纯的 lukF-PV 融合蛋白被合成,分离和纯化。将纯化的材料作为抗原用于初次免疫,随后通过特定的噬菌体展示技术产生抗体。用不同的技术,天然和重组 PV 被用来进行噬菌体展示技术。类似的方法被用于开发 PVP2a 和 SPA 的抗体。

[0038] 噬菌体展示抗体通过 ELISA 法初步定性,不同稀释物在微量管 / 带式蛋白质微芯片中被识别 (ArrayTube™(AT) 或 ArrayStrip™(AS) 的平台,由美艾利尔 (Alere) 技术有限公司开发)。捕获和检测抗体之间的所有可能组合都用微芯片来检测,从而发现在已知浓度的重组和天然毒素制剂的特定条件下的最特异,最敏感的抗体对。因此,对这些抗体的每一种可能的组合进行了测定,并且对 PVL, SPA 或 PBP2a 具有最高的灵敏度和特异性的抗体对进行鉴定。

[0039] 针对重组生物分子产生的噬菌体展示抗体进行活性筛选,不仅只针对 HisTaq 融合蛋白,也针对生物分子的原始形式。微芯片分析结果表明,重组抗体能识别原始生物分子。然后这些抗体被用于开发横向流动测定,以检测包括 PVL, SPA 和 PBP2a 的生物分子。通过一系列毒素稀释物,横向流的检测极限大约是在 1 纳克 / 毫升的数量级 (见下文)。固定在微芯片上的抗体被用于评估金黄色葡萄球菌临床分离物的生物分子产物。一般来说,在相同培养条件下克隆物从属关系和外毒素产量间有一定的相关性。

[0040] 收集的 USA300 临床分离物 (ST8MRSA-IV, 平均产生约 4000 纳克 / 毫升 PVL, F 组分), 昆士兰克隆 (ST93-MRSA-IV, 约 5000 纳克 / 毫升), ST93-MSSA (ca. 6, 500 纳克 / 毫升) 和 ST59-MRSA-VT (约 3, 000 纳克 / 毫升) 显然平均产生比其他 PVL 阳性 MRSA 或 MSSA 菌株更多的 PVL, 例如 ST80-MRSA-IV (ca. 250 纳克 / 毫升), 和 CC5-MSSA (ca. 750 纳克 / 毫升)。这些实验证明,任何测试的菌株产生 PVL 产量的浓度明显高于所选的抗体组合的检测极限。

[0041] 在一个实施例中,在检测设备中使用的抗体是 PVL, SPA 或 PBP2a 特异的重组噬菌体展示的抗体。在实施例中,在检测设备中使用的抗体是下列抗体克隆中的一个或多个: PVL-1031, PVL-1061, PVL-1101, PVL-1321, PVL-1401, PVL-1451, PVL-1631, PVL-1711, PVL-1771, PVL-1841, PVL-1881, PBP2a-1631, PBP2a-1721, PBP2a-1941, PBP2a-6G10, PBP2a-17A10, PBP2a-17C8, PBP2a-19B1, PBP2a-8A5, PBP2a-9C6, PBP2a-pc-2. 1, PBP2a-pc-2. 2, SPA-A135, and SPA-4412.

[0042] 在实施例中,抗体对包括抗体克隆 PVL-1841,其可以与金颗粒轭合,抗体对也包括抗体克隆 PVL-1401,它可以被固定,例如,在硝酸纤维素膜上作为捕获抗体。在其他实施例中,抗体对包括抗体克隆 PVL-1841,其可以与金颗粒轭合,它也包括抗体克隆 PVL-1321 和抗体克隆 PVL-1401 作为捕获抗体被固定在,例如硝酸纤维素膜上。抗体克隆 PVL-1321 检测人的 PVL, 而抗体克隆 PVL-1401 检测人的 PVL 以及与牛乳腺炎的发病有关的牛变种 (lukF-P83)。

[0043] 在一个实施例中,在基础微生物实验室的条件下化验可以被用于检测金黄色葡萄球菌培养物中的生物分子。在一些实施方案中,使用的基本设备来执行化验,例如接种环,培养基,培养箱,和在细菌学和生物安全中的基本知识。本发明允许快速检测 PVL, PBP2a 和 SPA, 例如, 直接对过夜细菌培养物进行化验, 无需使用专门的设备, 例如热循环仪, 不需要生物分子的变型, 例如通过加热, 不需要专业分子生物学技术知识, 如, 核酸扩增。

[0044] 在实施例中, 用从患者皮肤和软组织感染中得到的拭子来执行化验, 拭子样品可以在固体培养基上进行过夜初培养, 金黄色葡萄球菌克隆在初培养中被鉴定并检测 PVL, PBP2a 和 / 或 SPA 的存在。在混合培养物或具有皮肤植物区系污染物的情况下, 通过标准实验程序分离金黄色葡萄球菌进行二次培养。无论在初次或者二次培养中的生物分子都用试验设备检测, 例如横向流动试纸, 卡或试剂盒。

[0045] 各种各样的检测设备可用于检测生物样品中生物分子的存在或不存在。在一个实施例中, 测试装置可以是一种免疫测定装置, 诸如横向流测试条, 其被广泛用于测试各种分析物。然而, 任何适宜的化验装置可以在本发明中被使用。

[0046] 在一个实施例中, 也可使用折叠卡片形式化验装置, 例如霍华德钱德勒的美国专利号 5468648 (这里完整的引用在参考文献中) 所述的装置。在另一个实施方案中, 可使用带盒式测定装置。通过本发明中所述的测试装置对各种分析物进行检测或定量。该被分析物可以是传染性病原体。

[0047] 测试试纸可被用于多种形式, 如免疫或化学检测形式, 用于检测样品中的目的被分析物。在特异结合化验中, 如免疫测定法, 浸渍试剂测试条的使用, 是众所周知的 (见, 例如, May 等的美国专利号 5622871, 完整的被引用在参考文献中)。测试条也可配置在非竞争性或竞争性测定形式中。在一些形式中, 具有样品应用区, 试剂区, 和测试结果区的测试试纸条具有吸水材料。样品被施加到样品应用区并通过毛细管作用流入试剂区。

[0048] 在试剂区, 样品溶解并与检测被分析物 (如果存在) 必需的试剂混合。现在样品承载着试剂, 继续流至测试结果区域中。另外一些试剂被固定在测试结果区域中, 诸如与被分析物特异结合的分子。这些试剂与被分析物 (如果存在的话) 或者来自试剂区的第一试剂中的一种反应, 结合。用来提供可检测的信号标记存在于试剂区域中, 或者在一个单独的标记区域。

[0049] 一般, 在非竞争性形式中, 如果样品中含有被分析物则产生信号, 如果不存在被分析物则没有信号产生。在竞争形式中, 没有被分析物存在时产生信号, 如果被分析物存在则没有信号产生。

[0050] 在被分析物通过信号产生系统被检测的实施例中, 例如通过与被分析物特异性反应的一种或多种酶, 信号产生系统的一个或多个组件可以与测试条材料上的被分析物检测区绑定, 绑定的方式与上述的特异结合成分与检测试纸条材料的相同。可替代的或附加的, 包括在样品应用区, 试剂区, 或测试条的分析物检测区的信号产生系统的组成部分, 或者被包括在整个测试条中的部分, 可被浸渍到测试条的一种或多种材料中。可以通过这些组分溶液的表面处理, 或通过一个或多个测试条材料浸入这些组分溶液来实现。一个或多个表面处理或一个或多个浸没之后, 测试条材料被干燥。可替代的或附加的, 包括在样品应用区, 试剂区, 或测试条的被分析物检测区的信号产生系统的组分, 或包含在整个测试条中的组分, 可被应用到一个或多个测试条的测试条材料的表面, 如同标记试剂一样。

[0051] 使用过程中,一个取样装置,例如拭子,可用于收集生物样品,如来自患者受感染的伤口的样品。一旦样品被收集,可以在培养基中培养,或直接施加到测定装置。生物样品可以在应用到测定装置之前,先在固体或液体培养基中培养一段时间,下面的例子中有进一步描述。该样品被施加到一个测定装置以确定目的被分析物的存在或存在浓度。在实施例中,测定可用于单独检测金黄色葡萄球菌 PVL、金黄色葡萄球菌 PBP2a、SPA 的存在,不存在,或存在浓度,或者用于检测它们的任意组合,或包括其他相关标记组合例如,中毒性休克综合征毒素 (TST1 编码),肠毒素 A(entA 或 sea),肠毒素 B(entB 或 seb),来自 *S. pseudintermedius*, *S. intermedius*, 或 *S. delphini* 的杀白细胞毒素, α 毒素 (α -溶血素,HLA) 或 β -溶血素 (HLB)。在其它实施例中,上述的方法和装置可用于检测来源于动物样品的金黄色葡萄球菌或其毒素。例如,在反刍动物的各种物种中,包括,金黄色葡萄球菌克隆物 CC151 和 479 占主导地位,它们是引起牛乳腺炎的常见原因。显然,大多数牛菌株携带杀白细胞素基因 lukM/lukF-P83,它可以作为偶然在人菌株间传播的牛群流行菌株变异的一个标记。

[0052] 如本文中讨论的,本发明提供了抗体,或能特异结合 PVL 毒素的功能性结合片段。所述抗体或抗体片段不需要预处理就能够特异性结合生物分子,例如,通过生物分子的变性。在一个实施例中,抗体或它的功能性结合片段,其特异性结合下面的一个或多个基因的表达产物:LUKS-PV, lukF-PV, lukM, lukF-P83, mecA 和 spa。例如,本发明的抗体可以是对 LUKS-PV 的 T 细胞表位具有特异性的抗体:N169YISEVERQNSKSVQWGIKANSFIT193(Brown, et al., Open J. Immunol., 2(3):111-115(2012))。

[0053] 在一个实施例中,本发明的抗体包括克隆 PVL-1031, PVL-1061, PVL-1101, PVL-1321, PVL-1401, PVL-1451, PVL-1631, PVL-1711, PVL-1771, PVL-1841, PVL-1881, PBP2a-1631, PBP2a-1721, PBP2a-1941, PBP2a-6G10, PBP2a-17A10, PBP2a-17C8, PBP2a-19B1, PBP2a-8A5, PBP2a-9C6, PBP2a-PC-2.1, PBP2a-PC-2.2, SPA-A135 和 SPA-4412。然而,本领域技术人员应当理解,相同或基本相同的抗体可通过本领域已知的很多方法产生。

[0054] 特别地,对本文演示的 PVL 具有亲和力的抗体可被鉴定,例如,通过使用公开抗体的竞争化验法,特别是那些对 PVL 具有高亲和力的公开抗体即, PVL-1321, PVL-1401 和 PVL-1841。抗体也可以是共享 PVL 表位结合区域的那些抗体。在这方面,这些领域的技术人员将熟悉那些识别抗体中结合区域的技术,包括但不限于 Whitelegg 和 Rees, Marcatili, 和 Sivasubramanian 所公开的模式技术 (Protein Engineering 13(12):819 - 824(2000); Marcatili, et al. Bioinformatics, 24(17):1953 - 1954(2008); and Sivasubramanian, et al. Proteins, 74(2):497 - 514(2009))。

[0055] 如本文所用,术语“抗体”广义上包括多克隆和单克隆抗体,以及这些抗体的功能性结合片段。在本发明中有用的抗体,或它的功能性结合片段的特征在于,例如,对 PVL 毒素的表位具有特异性结合活性。

[0056] 就抗体而言,使用的术语“特异性结合”或“特异性结合活性”是指抗体的互作,或其功能性结合片段,与特定表位的相互作用具有一个解离常数,至少约为 1×10^{-6} ,一般至少约 1×10^{-7} ,通常至少约 1×10^{-8} ,和特别地至少约 1×10^{-9} 或 1×10^{-10} 或更小。就此而言,保留了与 PVL 的表位特异性结合的抗体的 Fab, F(AB')₂, Fd 和 Fv 片段被包括在抗体的定义

内。

[0057] 此外,本文所用的术语“抗体”包括天然存在的抗体以及非天然存在的抗体,包括,例如,单链抗体,嵌合抗体,双功能和人源化抗体,以及它的抗原结合片段。

[0058] 在不同实施例中,PVL,PBP2a 和 / 或 SPA 的检测可以组合一种或多种另外的被分析物。例如,本发明采用的方法和装置可适于检测一个或多个肠毒素 A(ent A) 的,肠毒素 B(ent B),毒素休克综合症毒素 (tst1), α 毒素, α 溶血素 (HLA), β 溶血素 (HLB),和葡萄球菌激酶 (SAK)。

[0059] 下列实例被用来进一步说明本发明的实施例,但不意味着限制本发明的范围。虽然这些实例是使用实例中的典范,也可以选择使用本领域技术人员已知的其它程序,方法或技术。

[0060] 实施例子

[0061] 毒素抗体分析

[0062] 图 1A 和 1B 显示了 PVL 的浓度和许多金黄色葡萄球菌菌株 (包括 MRSA 和 MSSA) 的克隆物的从属关系。

[0063] 实施例子 1

[0064] 培养参数

[0065]

培养参数	
接种物	来自冷库的一个珠子
培养基	Kato&Noda肉汤培养基
培养时间	18小时

[0066] 以前鉴定的产 PVL 的金黄色葡萄球菌 (产量高水平的,低水平的生产菌株和牛的变体) 生长在 Kato&Noda 肉汤培养基中过夜培养产生 PVL。培养物上清液用横向流测定法检测 (试纸片形式)。如图 2 所示,与微芯片测定的结果几乎完全一致。在金黄色葡萄球菌菌株 NCTC8235 上观察到微弱的假阳性结果

[0067] 实施例子 2

[0068] 培养参数

[0069]

培养参数	
接种物	来自冷库的一个珠子
培养基	Kato &Noda肉汤培养基
培养时间	2小时

[0070] 以前鉴定的产 PVL 的金黄色葡萄球菌 (产量高水平的,低水平的生产菌株和牛的变体) 在 Kato&Noda 肉汤培养基中培养 2 小时用于检测,用横向流 PVL 试纸检测 PVL 的产量。结果与微芯片测定的结果几乎完全一致。

[0071] 实施例子 3

[0072] 培养参数

培养参数	
[0073] 接种物	从血琼脂挑选的克隆（老培养物，在冰箱里放置48小时后）
培养基	血琼脂培养基
培养时间	18-24小时

[0074] 以前鉴定的产 PVL 的金黄色葡萄球菌（高水平的生产菌株，低水平的生产菌株和牛菌株变体，lukM/lukF-P83）被接种到血琼脂平板上过夜培养，从过夜琼脂平板上分离的克隆被直接检测 PVL 的产量。结果与微芯片测定的结果几乎完全一致。

[0075] 实施例子 4

[0076] 培养参数

培养参数	
[0077] 接种物	过夜培养物，来自图5中指定的各种生长培养基
培养基	一系列固体生长培养基（琼脂）
培养时间	18-24小时

[0078] 以前鉴定的产 PVL 的金黄色葡萄球菌菌株（PVL 阳性 ST8-MRSA-IV USA300 和 ST22-MRSA-IV）在不同的固体培养基上过夜培养后被直接检测 PVL 的产量。从过夜琼脂平板上分离的克隆被直接用于横向流 PVL 测定（试纸形式）。所有的固体培养基都是阳性结果。

[0079] 实施例子 5A

[0080] 培养参数

培养参数	
[0081] 接种物	来自冷库的一个接种环
培养基	BioMerieux MRSA ID 显色琼脂
培养时间	18-24小时

[0082] 以前鉴定的产 PVL 的金黄色葡萄球菌菌株（很多不同克隆物）用 MRSA ID 显色琼脂（BioMerieux）过夜培养后在平板上被直接检测 PVL 的产量。从过夜琼脂平板上分离的克隆被直接用于横向流 PVL 测定（试纸形式）。所有克隆物都是阳性结果。

[0083] 实施例子 5B

[0084] 培养参数

[0085]

培养参数	
接种物	来自冷库的一个接种环
培养基	BioMerieux MRSA ID显色琼脂
样品准备	在Staphytype的A1缓冲液中的一个接种环
培养时间	24小时

[0086] 以前鉴定的PVL阴性的金黄色葡萄球菌菌株（很多不同克隆的复合物）用MRSA ID显色琼脂（BioMerieux）过夜培养后在平板上被直接检测PVL的产量。从过夜琼脂平板上分离的克隆被直接用于横向流动PVL测定（试纸形式）。其结果与以不同克隆物为阴性对照的微芯片的结果几乎完全一致。

[0087] 实施例子 6

[0088] 金黄色葡萄球菌菌株 ATCC25923（从文化的加藤和野田肉汤上清中纯化）产生的一系列PVL毒素稀释物被用来确定试纸检测形式的检测极限。抗原浓度为10微克/毫升。按手册中所描述的，不同稀释物（终浓度）被施加并应用到横向流动PVL检测（试纸片形式）中。作为参考，用蛋白质芯片（ArrayStrip™）的检出极限被确定为约0.5毫微克/毫升。

[0089]

加入 200 μ l 试剂 A 后的终浓度
33.3ng/mL
10ng/mL
1ng/mL
0.1ng/mL
0.01ng/mL
0.001ng/mL
检测极限被确定为~1纳克/毫升。

[0090] 实施例子 7

[0091] 来自金黄色葡萄球菌菌株 ATCC25923 上清液的未纯化的PVL毒素用来确定横向流PVL测定（浸渍片形式）受Kato和Noda培养基的所有组分影响的检测极限。不同稀释物（终浓度）如手册上描述的那样被施加并应用到横向流PVL测定（浸渍片形式）上。检测的检出限被确定为约1纳克/毫升。这些结果与实施例6相结合表明Kato&Noda肉汤培养基的组分似乎不影响测定的检出极限。

[0092]

PVL 浓度 (ArrayStrip™ 检测) ~ 15 微克 / 毫升
ToxArray™ 的检测极限是约 1.5 纳克 / 毫升
200 微升试剂 A 的终浓度, 用 1 倍的 PBS 稀释。
33.3ng/mL
16.7ng/mL
3.33ng/mL
1.67ng/mL
0.33ng/mL
0.033ng/mL
检测极限被确定为约 1 纳克 / 毫升

[0093] 实施例子 8

[0094] 通过凝固酶阴性的葡萄球菌 (CNS) 菌株作为阴性对照来确定横向流 PVL 测定的特异性。在 Columbia 血琼脂上和 Kato&Noda 肉汤培养基中过夜培养一批 CNS 菌株。从 Columbia 血琼脂以及 Kato&Noda 上清液直接分离的菌落用横向流 PVL 测定 (浸渍片形式) 进行检测

[0095] 生长在 Columbia 血琼脂上的所有 CNS 菌株的 PVL 检测结果呈阴性。当 CNS 菌株在 Kato&Noda 中生长, 那些在人体中经常被发现的 CNS 菌株的小种, 其 PVL 检测结果呈阴性。

[0096] 实施例子 9

[0097] 此前鉴定的包括高产 PVL 和低产 PVL 的金黄色葡萄球菌株, PVL 阴性的菌株和产生假阳性结果的菌株 (NCTC8325), 在 Kato&Noda 肉汤培养基中生长后, 分别划线接种到 Columbia 血琼脂上过夜培养。分离的克隆在葡萄糖肉汤和脑心浸剂肉汤中过夜再培养。每个生长培养基的样品上清液直接用横向流 PVL 检测 (试纸形式) PVL 的产量。

[0098] PVL 阴性菌株在两种培养基中仍然保持 PVL 阴性。在 Kato&Noda 肉汤培养基中呈假阳性的菌株在两种培养基中 PVL 是阴性。用两种培养基培养高产和低产 PVL 的菌株的横向流 PVL 检测是阳性。

[0099] 实施例子 10

[0100] 以前鉴定的金黄色葡萄球菌 (冷冻库存珠子), 包括高产 PVL 和低产 PVL 的菌株, 划线接种到哥伦比亚血琼脂过夜。分离的克隆在葡萄糖肉汤与增加了人体血液或 Fe^{++} 的葡萄糖肉汤培养基中过夜再培养。同样的, 分离的菌落在 Schaedler 液体肉汤培养基与增加了人体血液或 Fe^{++} 的 Schaedler 肉汤培养基过夜再培养。每种生长培养基的上清液样品直接用横向流 PVL 检测 (试纸形式) PVL 的产量。无论是培养基平板还是添加有 Fe^{++} 的培养基都无 PVL 产生。然而, 添加了人血到两种培养基中的任意一种都导致 PVL 的表达

[0101] 实施例子 11

[0102] 设计一个研究来确定是否鼻腔样品中的正常细菌群落和分泌物会干扰横向流 PVL 的检测。具体地说,使用 Puritan25-3316 鼻拭子从具有阳性和阴性的金黄色葡萄球菌的患者上收集鼻样品。以前鉴定的金黄色葡萄球菌菌株加标后 ($\sim 10^5$ CFU) 直接进入鼻腔样品。用该拭子样品接种 Kato&Noda 液体培养基并培养过夜。用横向流 PVL 测定 (试纸片形式) 检测培养基中的 PVL。正常鼻腔菌群并不干预 PVL 的检测。该实验结果表明,该试验具有筛选鼻腔样品的潜力,并且这些样品可被培养并用来检测 PVL。

[0103] 实施例子 12

[0104] 为了评估在常规实验室条件下使用的潜力,不同的接种时间和生长培养基被检测。

[0105] 金黄色葡萄球菌用下列液体培养基中的一种在 36°C 摇床上生长 3-12 小时:葡萄糖肉汤,脑心浸液,或 Kato 和 Noda 培养基。用横向流 PVL 测定 (试纸片形式) 过夜培养物中 PVL 的产量。测定按照提供的手册进行。200 微升检测试剂移入含有测定轭合物沉淀的反应管中。涡旋管子直到测定轭合物 (紫色沉淀) 被悬浮。加入 100 微升过夜培养物并晃动管子。试纸插入含有检测试剂和培养物样品的反应管中。10 分钟后结果可被读取。观察到两个条带或线 (检测与对照) 被视为阳性结果。仅观察到对照线被认为是阴性结果。

[0106] 可选择使用固体培养基,金黄色葡萄球菌在下列固体生长培养基的一种上 36°C 过夜生长:琼脂, Mueller Hinton 琼脂, MRSA ID™ 显色培养基 (BioMerieux), Columbia 血琼脂,加血的 Mueller Hinton 琼脂, C. A. P. 琼脂和“巧克力”琼脂。生长过夜后挑取分离的克隆并重悬浮在 100 微升下列缓冲液中的一种:缓冲液 A1 (来自 Alere Staphytype 测定), PBS, or TRIS/EDTA。200 微升检测试剂被移入含有轭合物 (紫色的沉淀) 的反应管。沉淀通过涡旋重悬浮。100 微升重悬浮细菌加入反应管,通过涡旋混匀。或者挑取一个接种环的菌落直接溶解在含有 200 微升检测试剂的反应管中。试纸片放入含有反应试剂和检测样品的反应管中。10 分钟后结果可读取。观察到两个条带或线 (试验与对照) 被视为阳性结果。仅观察到对照线被认为是阴性结果。PVL 浓度大概从 1-5 纳克 / 毫升开始,大于这个浓度可以被这个测定检测到。

[0107] 实施例子 13

[0108] 在本实例中,从临床条件下分离的培养物被检测,该临床条件中 PVL 占合理的比例。分离物来自下面的条件:皮肤脓肿,“蜘蛛咬伤”病变 (尤其是慢性 / 复发),疖病 (“疔疮”),疔,脓肿形成乳腺炎,蜂窝组织炎,以及不寻常的或严重的皮肤及软组织感染,如热带性脓皮病或坏死性筋膜炎。分别对金黄色葡萄球菌进行鉴定和药敏试验,以及通过分子手段检测 PVL 基因并分配到克隆物和菌株。

[0109] 231 个金黄色葡萄球菌分离物被检测的,其来自美国、欧洲、澳大利亚、非洲和中东。属于 26 个不同金黄色葡萄球菌菌种的 123 个分离物为 PVL 阳性。属于 33 个金黄色葡萄球菌菌种的 108 个分离物是 PVL 阴性。

[0110] 横向流 PVL 测定 (试纸片形式) 产生的结果如下列表 1 所示 (包括重复试验)。

[0111] 表 1:横向流 PVL 测定 (试纸片形式) 结果

[0112]

真阳性结果	124
-------	-----

真阴性结果	108
假阳性结果	2
假阴性结果	0
灵敏性	100%
特异性	98.18%
阳性预测值	98.41%
阴性预测值	100%

[0113] 横向流 PVL 测定（卡片形式）产生的结果如下列表 2 所示（包括重复试验）。

[0114] 表 2:横向流 PVL 测定（卡片形式）结果

[0115]

真阳性结果	23
真阴性结果	48
假阳性结果	6
假阴性结果	0
灵敏性	100%
特异性	88.89%
阳性预测值	79.31%
阴性预测值	100%

[0116] 实施例子 14

[0117] 一项涉及快速检测金黄色葡萄球菌培养物中的 PVL 的研究被执行,该研究使用单克隆抗体的横向流测定。研究的目的是为了评估检测 PVL 的横向流测定。

[0118] 如这里所述,PVL 是金黄色葡萄球菌噬菌体源的致病因子。它包含 2 个部件 (S 和 F 组分),由 2 个虽然共定位、共表达,但独立的基因编码。这些分子的聚合物在人类白血球膜上形成孔导致细胞死亡。PVL 与慢性 / 复发性皮肤和软组织感染 (SSTI) 有关,尤其是在年轻人和以前健康的成年人中,和坏死性肺炎。由于其临床相关性,携带 PVL 基因的金黄色葡萄球菌的检测具有积极治疗和感染控制措施 (见万维网 hpa.org.uk/webc/HPAwebFile/HPAweb_C/1218699411960)。然而,因为 PVL 检测是用分子的方法进行,目前该检测基本上限制于参照中心和专业实验室。为了促进快速,非分子的检测在临床实验室中的应用,单克隆抗体被培育,横向流测定被开发。

[0119] 通过噬菌体展示法过量表达的 PVL, F 组分被用于产生单克隆抗体。接下去免

疫小鼠,分离 B 细胞的 mRNA 并扩增。得到对抗体的抗原结合部分特异的 cDNA, 连接入噬菌体, 然后转化到大肠杆菌中。得到纯化的抗体, 通过 ELISA 初步定性, 不同稀释物在 microtiterstrip-mounted 蛋白质芯片上显迹。这样可以快速地确定捕捉和检测抗体的最佳组合。这些抗体被用来设计横向流动测定如, 免疫层析测定, 在该测定中金标检测抗体与样品材料 (金黄色葡萄球菌培养物) 混合, 通过毛细作用向固定了检测抗体的区域流动。在阳性情况下, 可观察到一个明显的线形成。制作两种不同的测定形式 (试纸和 Binax 卡) 平行处理来优化操作过程和和条款。这个试验被用于来自皮肤和软组织感染的金黄色葡萄球菌分离物, 平行的, 分离物通过芯片杂交测定基因型, 来确定菌株和克隆物的从属关系以及它们的 PVL 状态

[0120] 图 7 描述了 Binax 卡片形式的检测过程。对于试纸片形式, 用接种环挑取培养物并搅拌放入含有标记抗体缓冲液的管子中。然后, 试纸片放入管子中, 10 分钟后结果可读取。

[0121] 为了选择捕捉和标记抗体的最优组合, 每一种抗体的 4 种不同浓度在蛋白芯片上显迹。这些芯片用重组 PVL 的 F 组分, 原始 PVL (2 种不同浓度, 来自菌株 ATCC25923) 或来自兽医 CC705 分离物的“牛杀白细胞素”lukM/lukF-P83 以及所有抗体的所有生物素标记的制备物来检测。根据这些结果, 抗体 5 和抗体 10 的组合物被选定来建立检测 PVL (F 组分) 以及 lukF-P83 基因产物的横向流测定。

[0122] 在最初的一系列的实验中, 检测在不同的生长培养基中培养的已知菌株。如 Kato&Noda 或 Schaedler 描述的, 在肉汤中, 在脑心浸液中以及从普通琼脂挑取的克隆材料中, 具有或不具有血液的 Mueller Hinton 琼脂中, MRSA ID 琼脂 (BioMerieux), Columbia 血, C. A. P. 和“巧克力”琼脂中被注意到有可检测的 PVL 产量。在葡萄糖肉汤上偶尔观察到假阴性结果, 以及来自 Kato&Noda 肉汤或血琼脂的克隆物 CC8 菌株的假阳性结果。这些横向流测定用于筛选来自 SSTI 诊断标本中的共计 450 个临床分离物。这些菌株源于澳大利亚, 特立尼达和多巴哥, 美国, 英国, 德国, 瑞典, 西班牙, 挪威, 日本, 乌干达和沙特阿拉伯。258 株被证明是阳性。它们所属的分离物属于 20 个克隆物的 37 个不同的菌株。已检测了 192 PVL 阴性分离物属于 29 克隆物的 47 个不同的菌株。PVL 阳性分离物的比例在被检测的全部 SST I 分离物中占 10.5% (瑞典样品) 到 81.4% (澳大利亚样品)。

[0123] 该检测允许 PVL 快速检测在不能够进行分子检测的常规细菌学实验室条件下进行。因为它利用标准培养基的过夜纯培养 (包括显色琼脂筛选 MRSA), 可以很容易地与这样的实验室的工作流程相结合。因此, 预计将有助于及时干预治疗 PVL 相关感染病例, 以及帮助选取一些分离物递交参考中心进一步分型。

[0124] 实施例子 15

[0125] 用筛选测定对使用 PBP2a 结合抗体的 PBP2a 检测进行评估, PBP2a 结合抗体通过这里所讨论的噬菌体展示技术产生。一系列来自金黄色葡萄球菌 USA300 的稀释过的 PBP2a 被用于检测评估。很多克隆物 (数据未显示) 具有阳性结果。

[0126] 实施例子 16

[0127] 此前鉴定的金黄色葡萄球菌 (很多不同的克隆物) 用本发明的抗体检测 PBP2a 和 SPA 产量。很多克隆物 (数据未显示) 具有阳性结果。

[0128] 实施例子 17

[0129] 此前鉴定的金黄色葡萄球菌（很多不同的克隆物）用本发明的抗体检测 PVL, PBP2a 和 SPA 产量。很多克隆物（数据未显示）具有阳性结果。

[0130] 实施例子 18

[0131] 这个实例描述了横向流检测法的发展,使用这里所述的单克隆抗体在常规临床微生物实验室建立快速,非分子的 PVL 检测。该测定对生长在各种不同培养基的分离物进行了验证,然后利用从 SSTI 重新获得的国际金黄色葡萄球菌对检测进行评估。

[0132] 为了开发快速的表型测定,通过噬菌体展示法,重组 PVL 的 F 组分被用于产生单克隆抗体。在蛋白芯片上显迹,用不同的 lukF 制备物和测定抗体筛选这些抗体。这样就鉴定出了用于建立横向流测定的最优抗体组合。这个试验被用来检测金黄色葡萄球菌培养物中的 PVL。对纯化的天然和重组抗原的检测极限被确定为约 1 纳克 / 毫升。各种固体和液体培养基的过夜培养物都适用于 PVL 检测。

[0133] 600 个被测定的菌株和临床分离物来自美国、欧洲、澳大利亚,非洲和中东的患者。平行的分离物通过 DNA 芯片杂交确定基因型来证实 PVL 类型并被转移到克隆表达中。这个试验中测定的灵敏性,特异性,阳性和阴性预测值分别是 99.7%,98.3%,98.4%和 99.7%。302 个临床分离物和参考菌株是 PVL 阳性并被归属到 21 个不同的克隆物。

[0134] 总的来说,横向流检测允许在常规细菌学实验室进行快速的经济的 PVL 检测。因为检测利用标准培养基的培养物,不需要高级设备,可以简单的整合到实验室的工作流程中,有助于及时治疗 PVL 相关感染病例。

[0135] 下面为所用的材料和方法

[0136] 重组 PVL, F 组分

[0137] PVL F 组分基因 (lukF-PV) 用在 5' 和 3' 端包含一个 EcoRI 酶切位点和 NotI 酶切位点的设计引物 (lukF-PV_fw_5Eco, CCTGAATTCATGAAAAAATAGTCAAATC (SEQ ID NO:13) 和 lukF-PV_rev_5Not, ATAGCGGCCGCTTAGCTCATAGGATTTT (SEQ ID NO:14)) 进行扩增。来自全测序 ST1-MRSA-IV 参考菌株 MW2 的 DNA 作为模板。PCR 产物被克隆到一个市售载体 (TOPO II, Invitrogen, Karlsruhe, 德国) 上并测序。得到的序列与 GenBank 登记的相应序列比较 (BA000033.2;1529381:153035)。确认的克隆用 EcoRI/NotI 酶切,包含开放性读码框的 DNA 片段被插入 pet28a 表达载体 (Novagen, Darmstadt, 德国) 连接后,表达载体转化入大肠杆菌 BL21。用 50 毫升异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (IPTG, 1 毫摩尔) 诱导后,在 50 毫升 LB 培养基中 (LB 培养基,添加了卡那霉素) 获得表达重组蛋白。离心收集大肠杆菌细胞并冰冻过夜。表达重组蛋白在镍-次氨基三乙酸-琼脂糖 (Ni-NTA-琼脂糖) 柱 (Qiagen, Hamburg, 德国) 上按照生产商的说明书纯化。每个步骤取出部分试样通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析重组蛋白的存在。每一个样品中的蛋白质浓度用二辛可宁酸 (BCA) 蛋白质测定试剂盒 (Pierce 公司, 波恩, 德国) 测定。

[0138] 噬菌体展示过程和抗体的初测定

[0139] 通过噬菌体展示法过表达的 PVL F 组分被用于产生单克隆抗体。接下去免疫小鼠,分离扩增 B-细胞的 mRNA。获得对抗体的抗原结合部分特异的 cDNA,被连入噬菌体,并转化到大肠杆菌。获得的抗体被纯化,通过 ELISA 初鉴定,不同的稀释物在 microtiterstrip-mounted 蛋白芯片显迹。

[0140] 根据此前描述的手册使用抗体芯片。

[0141] 为了选择捕捉和标记抗体的最优组合,每一个选定的 11 种抗体中的 5 个不同浓度被点样到蛋白芯片上。为了测定所有可能的组合,这些芯片用重组 PVL F 组分,天然的 PVL(2 种不同浓度,来自 CC30-MSSA 菌株 ATCC25923) 或“牛杀白细胞素”lukM/lukF-P83(来自兽用 CC151/705 分离物) 作为抗原,以及用生物素标记的所有 11 种抗体的制备物作为检测抗体来测定。然后通过链霉亲和素-辣根过氧化物酶轭合物和通过过氧化物酶引发的染料沉淀来进行染色。

[0142] 这个途径能确定捕捉检测抗体的最优组合(见图 3)。

[0143] 横向流测定 PVL 的原理

[0144] 检测金黄色葡萄球菌初代培养中 PVL 的横向流测定是免疫层析膜测定,该测定用上述芯片选定的 2 个高灵敏性的噬菌体展示重组单克隆抗体。针对 PVL 的 2 个选定抗体被用于设计横向流测定,其中一个抗体在检测试纸上作为捕获抗原,而第二种抗体在反应管内被金标记并包被。测定试纸由固定在膜支撑物上的 PVL 捕获抗体和对照蛋白组成,加样品和吸收剂后形成两条明显的线。T 执行检测时,金黄色葡萄球菌分离物或培养物上清液被加到包被的反应管中,反应管含有与已添加的萃取剂共轭的金标。然后 PVL 检测试纸条被放入反应管支持液体样品和轭合物。10 分钟后根据粉色到紫色样品线的存在或不存在对检测的结果进行解释。两条带(PVL 线和对照线)说明是有效的阳性结果,而一条线(对照线)说明有效的阴性结果。没有明显的对照线说明这是无效的检测。

[0145] 测定的执行

[0146] 对来自 SSTI(见下文)的金黄色葡萄球菌的分离物进行检测,该菌通过芯片杂交检测基因型来确定菌株和克隆物的从属关系和 PVL 状态。280 微升萃取剂被特异的加入含有冻干抗体-金轭合物的包被反应管内。挑取一个接种环的金黄色葡萄球菌克隆材料,放入管子,用接种环彻底混合直到细胞和轭合物沉淀全部溶解。使用液体培养基时,200 微升缓冲液和 100 微升过夜液体培养物被加入反应管并混合。然后检测试纸被插入反应管,在室温下培养 10 分钟后,检测试纸离开管子并进行读取。

[0147] 菌株和分离物

[0148] 检测共计 600 个金黄色葡萄球菌菌株和分离物的 lukF-PV 产量,同时包括甲氧西林敏感(MSSA)和抗加氧西林(MRSA)的金黄色葡萄球菌。

[0149] PVL 阴性参考菌株是 Sanger MSSA476(测过序的 ST1-MSSA-SCC/us, GenBank 检索号 BX571857.1), Mu50 和 N315(同时测过序的 ST5-MRSA-II, GenBank BA000017.4 和 BA000018.3), NCTC8325(测过序的 ST8-MSSA, GenBank CP000253.1), COL(测过序的 CC8/ST250-MRSA-I, GenBank CP000046.1) 以及澳大利亚(WA)MRSA-8(ST75-MRSA-IV03-17848;(23)) 和 WA-MRSA-59(具有非典型 SCCmec 元件的 CC12-MRSA)。

[0150] PVL 阳性参考菌株是 MW2-USA400(测过序的 ST1-MRSA-IV, GenBank BA000033.2), USA300-FPR3757(测过序的 ST8-MRSA-IV, GenBank CP000255.1), ATCC25923(以质量控制为目的广泛用于诊断生物学的著名分离物 ST30-MSSA), 昆士兰 caMRSA(ST93-MRSA-IV03-16790) 和 WA-MRSA-60/孟加拉海湾 caMRSA(ST772-MRSA-V)。

[0151] 另外,包括从具有 SSTI 的患者上收集到的 588 个临床分离物。

[0152] 源自澳大利亚的临床分离物(作为全国性的澳大利亚集团金黄色葡萄球菌的

耐药性监测项目 SAP2008 and SAP2010 的部分)可在万维网 www.agargroup.org/files/FED%20REPORT%20SAP2008%20MRSA%20final.pdf 和 www.agargroup.org/files/FED%20REPORT%20SAP210%20MRSA%20FINAL%20shrink.pdf 上获得。

[0153] 更多的临床分离物来自德国的诊断实验室 (Dresden 大学医院), 沙特阿拉伯 (法赫德国王医学城, 利雅得), 西班牙 (Hospital Universitari Germans, Trias i Pujol, 巴达洛纳), 瑞典 (Oerebro 大学附属医院), 特立尼达和多巴哥共和国 (从全国各地区医院), 乌干达 (在恩德培的医学研究理事会) 和英国 (包括在布里斯托尔西南部的一个医院, 和国家葡萄球菌参考单位, HPA, 伦敦)。所有来自英格兰的分离物和来自其他国家 (8 个来自沙特阿拉伯, 7 个来自德国, 3 个来自澳大利亚) 分离物的 PVL 状态是已知的。这些菌株被包括是为了最大限度地代表广泛的克隆物范围, 在对来源于不同的国家的 PVL 进行概率分析时, 这些菌株被排除在外。

[0154] 另外, 检测 17 个分离物的 LukF-P83; 包括属于家畜相关菌系 CC133, CC151/705 和 CC479 的兽医来源 (牛和羊) 的 P83 阳性分离物。这些分离物来自以前的研究或参考弗里德里希洛弗勒研究所, 德国耶拿。作为对照, 3 个 lukM/lukF-P83 阴性分离物被包括: 2 个 CC133 分离物, 一个来自疣鼻天鹅, 一个是来自 Dresden 大学医院的人类分离物和来自牛的 CC479 分离物。没有 lukF-P83 阴性 CC151/705 分离物可用于检测。

[0155] 用不同培养基验证横向流动测定

[0156] 液体培养基包括葡萄糖肉汤 (OXOID, 目录为 Nr. CM67 加葡萄糖), 脑心浸液 (OXOID, CM225), 2XTY (胰蛋白胨 / 酵母提取物), Schaedler 肉汤 + 维生素 K3 (梅里埃, 42106) 和 Kato 和 Noda 所描述的肉汤

[0157] 接下去所用的固体培养基为: 普通琼脂 (OXOID, CM3), 加血与不加血的 Mueller Hinton 琼脂 (OXOID, CM337), 哥伦比亚血琼脂 (琼脂主要成分 OXOID, CM331 和羊血 OXOID, FSR1055), C AP 琼脂, “巧克力”琼脂 (琼脂基础 OXOID, CM331 和羊血 OXOID FSR1055 加水晶素, 赛瓦, 24410, 和 NAD, 默克, 1.024542) 和市售葡萄球菌 MRSA 显色培养基 (MRSA ID 琼脂, bioMerieux, 43459)。

[0158] 芯片程序

[0159] 为了确认 PVL 状态并分配给相应的克隆物和菌株, 所用分离物用 DNA 芯片杂交定性。根据生产商家的说明执行程序; 引物、标记和进一步的细节同上所述。

[0160] 酶裂解后简单的制备 DNA。多重引物延伸来扩增和标记 (通过混合生物素 -16-dUTP) 大概对应 170 个基因的共计 333 条靶序列。单链扩增产物与具有相应探针的芯片进行杂交。添加了能结合生物素标记的链霉亲和辣根过氧化物酶结合物, 并用过氧化物酶 - 引发染料沉淀, 使杂交可视化。对由此产生的芯片上的斑点图案进行扫描, 分析, 与此前模式菌株的参考数据相比较。在补充文件中提供了所有菌株和分离株的全杂交图。

[0161] 获得下列试验结果

[0162] 抗体筛选

[0163] 根据图 3 显示的筛选结果, 抗体 1401 (这里也指 PVL-1401) 和抗体 1841 (这里也指 PVL-1841) 的组合被选定来建立能检测 PVL (F 组分) 以及 lukF-P83 基因产物的横向流测定。通过一些稀释, 确定横向流测定对纯化的天然和重组抗原的检测极限约为 1 纳克 / 毫升。

[0164] 对不同生长培养基的横向流检测试验

[0165] 在最初的一系列实验中,检测在不同生长培养基上培养的已知菌株。培养 PVL 阴性 Mu50 (ST5-MRSA-II), NCTC8523 (ST8-MSSA), ST398-MRSA-V 和 ST8-MSSA 的已知菌株以及 PVL 阳性的 USA300-FPR3757 (ST8-MRSA-IV, USA300), CC30-MSSA 和 ST93-MRSA-IV (昆士兰克隆) 分离物的液体生长培养基中 (葡萄糖肉汤, 脑心浸液, 2XTY, Schaedler, Kato&Noda) 被检测。PVL 阴性 ST8-MSSA 菌株 NCTC8325 在 Kato&Noda 所描述的生长培养基中具有微弱但一致的假阳性结果。用 ST8-MSSA 相同表型的临床分离菌株没有观察到相同情况。所有其他的结果是正确的。

[0166] 从产生正确阳性结果的普通琼脂, 无血和有血 Mueller Hinton 琼脂, 哥伦比亚血, C. A. P 和“巧克力”琼脂上挑取克隆材料 (USA300-FPR3757 和 PVL 阳性的 ST22-MRSA-IV)。然后从哥伦比亚血琼脂的过夜培养菌落筛选临床分离株 (见下文)。

[0167] 除了前述的生长培养基, 对市售的用于检测 MRSA 的发光培养基进行了测试 (MRSA ID 琼脂来自梅里埃公司)。对以下的 PVL 阳性菌株进行了测试, 并取得了正确的结果: CC1-MRSA-IV (MW2, USA400), CC5-MRSA-IV, ST8-MRSA-IV (USA300-FPR3757), ST22-MRSA-IV, ST30-MRSA-IV (西南太平洋克隆), ST59/ST952-MRSA-V (T) (台湾克隆), CC80-MRSA-IV (欧洲 caMRSA 克隆), CC88-MRSA-IV 和 CC152-MRSA-V。PVL 阴性菌株 CC1-MRSA-IV&SCC/us (WA-MRSA-1/45), ST22-MRSA-IV (UK-EMRSA-15/Barnim), ST45-MRSA-IV (柏林 EMRSA), ST75-MRSA-IV (WA-MRSA-8), ST239-MRSA-III (维也纳/匈牙利/巴西流行株), 以及在 MRSA ID 琼脂上产生准确 (阴性) 结果的 CC80-MRSA-IV 的一个 PVL 阴性变体。

[0168] LukF-P83 的检测

[0169] 14 个 lukF-P83 阳性分离物 (2 个 CC133, 4 个 CC479 和 8 个 CC151) 在横向流测定中产生阳性结果。3 个 lukF-P83 阴性分离物 (2 个 CC133 和 1 个 CC479) 被正确的鉴定为阴性。

[0170] 用横向流测定和芯片筛选临床分离物

[0171] 与芯片的基因分型数据比较时, 301 个实验是真阳性, 293 个是真阴性; 有 5 个假阳性, 和 1 个假阴性。这相当于灵敏性 99.7%, 特异性 98.3%, PPV98.4% 和 NPV99.7%。随后对这六个错误结果的实验进行重复并取得正确的结果, 这说明在初级测定时操作错误。

[0172] 总的来说, 297 个检定分离物和 5 个参考菌株是 PVL 阳性。通过芯片杂交, 它们被分配到 21 个克隆物中, CC1 (包括 ST772), CC5, CC8 (包括 ST72), CC15, CC22, CC25, CC30, CC45, CC49, CC59, CC80, CC88, CC93, CC96, CC121, CC152, CC188, CC398 和 3 个未鉴定的菌系 (图 13)。它们中的一个产生 1-141-1-1-128-3 的 MLST (与 STs1279/1496/1982 有关)。最常分离到的 PVL 阳性菌系是 CC12 (来自不同区域的 50 个分离物, 都是 MSSA), CC8 (46 个分离物包括来自特立尼达岛和多巴哥岛的 MSSA, 以及来自各区域的“US300”) 和 CC93 (42 个分离物, MSSA 和 ST93-MRSA-IV, 昆士兰 caMRSA 克隆, 几乎全部来自澳大利亚)。287 个 PVL 阴性检测分离物和 7 个参考菌株属于 31 个不同克隆物: CC1, CC5, CC6, CC7, CC8 (包括 ST72 和 ST239), CC9 (ST834), CC12, CC15, CC20, CC22, CC25, CC30 (包括 ST34), CC45, CC50, CC59, CC75, CC80, CC88, CC96, CC97, CC101, CC121, CC140, CC188, CC398, CC425, CC509, CC707 和 CC1021。一个 CC 不能分派 2 个分离物。

[0173] 阳性金黄色葡萄球菌在不同国家的流行

[0174] 在所有 SSTI 的分离物中流行的 PVL 阳性分离物在不同国家之间存在广泛的变化。在澳大利亚的样品中观察到的 PVL 阳性率最高,有 82.2% (90 中的 72) 为 PVL 阳性。PVL 阳性菌株的一半 (74 个中的 37 个) 是 CC93,并且其中大部分是 MRSA (37 个 CC93 分离物的 29 个,78%),这反映了目前所谓的昆士兰 caMRSA 克隆所造成的负担。第 2 位和第 3 位常在澳大利亚被分离到的 PVL 阳性克隆是 CC121-MSSA (N = 15) 和 CC93-MSSA (N = 8)。仅有两个 ST8-MRSA-IV (USA300) 菌株被鉴定。PVL 阴性金黄色葡萄球菌菌株分别来自多个 CC 菌系,包括 CC1, CC5, CC8, CC8/ST72, CC15, CC22, CC30, CC45, CC88 和 CC188,包括两个 MRSA 克隆;ST22-MRSA-IV (UK-EMRSA-15/Barnim EMRSA) 和 ST5-MRSA-IV (小儿克隆/WA-MRSA-65)。

[0175] 来自德国的 SSTI 分离物中,有 PVL 概率是 40% (50 个中 20 个)。最常见的菌株是 CC121-MSSA (n = 7) 和 CC30-MSSA (n = 4)。每一个 ST8-MRSA-IV (USA300) 和 ST93-MRSA-IV (昆士兰 caMRSA 克隆) 分离物都被鉴定,后者与传播到澳大利亚有关。在 PVL 阴性之中,CC30 和 CC8 是最常被分离到的;其他 CC 包括 CC5, CC7, CC8/ST72, CC15, CC22, CC45, CC101 和 CC398。属于 CC7-MRSA-IV, CC22-MRSA-IV (UK-EMRSA-15/BarnimEMRSA), ST5/ST225-MRSA-II (UK-EMRSA-3/Rhine-Hesse EMRSA) 和 CC45-MRSA-IV (柏林 EMRSA) 的 PVL 阴性的 MRSA 单菌落被鉴定。

[0176] 对于来自沙特阿拉伯的分离物,47.3% 被证实是 PVL 阳性。大约一半是 MRSA (n = 13),该 MRSA 具有属于 CC80-MRSA-IV (欧洲 caMRSA 克隆) 的最常见的 PVL 阳性单克隆。最常见的分离物 PVL-MSSA 克隆是 CC30-MSSA (n = 4) 和还未被鉴定的 MSSA (n = 3)。PVL 阴性菌株属于 CC1, CC5, CC6, CC7, CC8, CC9/ST834, CC15, CC22, CC25, CC30, CC45, CC75 (与 ST1667 有关), CC80, CC96, CC97, CC398 (ST291/813), 和一个未鉴定菌系。MRSA 的比例高 (29 个 PVL 阴性中 8 个是 MRSA);最常见的菌株是 ST239-MRSA-III (维也纳/匈牙利/巴西克隆, n = 4)。其他 MRSA 属于 CC22-MRSA-IV 的 *tst1*- 阳性变种, CC80-MRSA-IV 的 PVL 阴性变种,仅知道来自马耳他 (27) 的 CC5-MRSA-IV&SCC/us 菌株和 CC9/ST834-MRSA-VI。

[0177] 第二高的 PVL 概率被发现在西班牙,具有 75% (44 个中 33 个) 的 PVL 基因和分泌 LukF-PV 蛋白阳性。这里最常见的克隆是 ST8-MRSA-IV (USA300) 的 ACME 阴性变种,有 10 个分离物被分配给该变种。接着是 CC30-MSSA (n = 6) 和 CC22-MSSA (n = 5)。PVL 阴性属于各种各样的 CC (CC5, CC8/ST72, CC15, CC30, CC45, CC121, CC188 和 CC707),不包括任何 MRSA。

[0178] 最低的 PVL 流行率在瑞典分离物中被发现,仅 16.7% (114 个中 19 个) 是 PVL 阳性,都是 MSSA。最常见的 PVL 阳性菌株是 CC30-MSSA (n = 4) 和 CC121-MSSA (n = 3)。PVL 阴性分离物是 CC1, CC5, CC7, CC8, CC12, CC15, CC20, CC22, CC30, CC45, CC50, CC88, CC97, CC101, CC121, CC188, CC509 and CC1021。CC45 (n = 19) 和 CC15 (n = 18) 是最常见的 CC 分离物。MRSA 没有被发现。

[0179] 在特立尼达岛和多巴哥岛共和国,PVL 流行率是 50% (80 个中 40 个分离物)。最丰富的 PVL 阳性菌株是 CC8-MSSA (n = 18),该菌株另外携带肠毒素基因 *sed*, *sej*, *ser*, *sek* 和 *seq*。两个 CC8-MRSA-IV 分离物被鉴定为具有相同的毒素属性,但缺乏 ACME,因此与 WA-MRSA-62 类似。ST8-MRSA-IV (USA300),即携带 ACME 位点和肠毒素基因 *sek* 和 *seq*,在三种情况下被鉴定。其他分离到的常见的 PVL 阳性菌株是 CC30-MSSA (n = 10) 和 CC5-MSSA (n = 5)。PVL 阴性分离物包括 CC1, CC6, CC7, CC8, CC8/ST72, CC8/ST239, CC12, CC15, CC45, CC59, CC101, CC121, CC188 和与 CC75 (ST1223, ST1667) 有关的不寻常菌株。PVL 阴性 MRSA 菌株

是 CC59-MRSA-V&SCC/us 和 ST239-MRSA-III (维也纳 / 匈牙利 / 巴西克隆)。

[0180] 与来自其他国家的收集菌株相对应的,英国的分离物的 PVL 状态是已知的,因此其 PVL 率不能与其他国家的进行比较。很多不同的 PVL-MRSA 菌株在伦敦的分离物中被鉴定出,CC30-MRSA-IV(西南太平洋 caMRSA 克隆),CC5-MRSA-IV(小儿克隆),CC5-MRSA-V,CC80-MRSA-IV(欧洲 caMRSA 克隆),ST59/ST952-MRSA-V(T)(台湾 caMRSA 克隆),ST772-MRSA-V(孟加拉海湾 caMRSA 克隆/WA-MRSA-60),ST8-MRSA-IV(USA300)和 ST93-MRSA-IV(昆士兰 caMRSA 克隆)。PVL 阴性分离物属于 CC1,CC8,CC8/ST239,CC12,CC22,CC25,CC30,CC45,CC59,CC121,CC425 包括 MRSA 菌株 CC1-MRSA-IV(WA-MRSA-1/57),ST239-MRSA-III(维也纳/匈牙利/巴西克隆),CC22-MRSA-IV(UK-EMRSA-15/Barnim EMRSA)和 ST59-MRSA-V。进一步包括来自英国西南部第二中心的已知为 PVL 阳性的 28 个分离物。这些分离物被排除在 PVL 概率分析之外,但他们的种群结构是值得注意的。这个组仅包括 2 个 PVL 阳性 MRSA,ST772-MRSA-V(孟加拉海湾 caMRSA 克隆/WA-MRSA-60)and CC1-MRSA-IV(USA400)。也包括一个 CC59-MSSA 可能是 ST59/ST952-MRSA-V(T)(台湾 caMRSA 克隆)的 SCCmec 检测突变体,根据抗性基因和毒性标记(erm(B),apha3,sat,tet(K),cat,fexA,seb/k/q,lukF/S-PV)的杂交属性。这个组中最常见的菌株是 PVL 阳性 CC22-MSSA(n=10)。另外 5 个具有 SPA 类型 t417 或 t1601 的 PVL 阳性 CC22 分离物携带“SCCfus”组件(ccrA/B-1,and Q6GD50,or fusC)。这些分离物来自平均年龄接近 94 岁的患者。这在 PVL 阳性中是不寻常的发现,这说明这个克隆物与这个区域护理设备间的可能联系。PVL 是金黄色葡萄球菌独特的毒力标志,与临床症状的关联非常普遍,这些症状往往要么慢性/反复发作,或偶尔进展迅速而危及生命。因此 PVL 的诊断检测能满足目标患者的管理的需要。这里所述的横向流测定允许在不能轻易进行分子测定的常规细菌学实验室中进行 PVL 快速检测。当利用标准培养基的过夜培养物时,例如 Columbia 血琼脂,这样就能轻易的整合入常规诊断实验室的工作流程中。因此测定可能有助于及时干预 PVL 相关感染病例,也能帮助选择一些需要递交参考中心进一步分型的菌株。金黄色葡萄球菌体外分泌的 PVL 有广泛的变化,然而基因型和表型间的高度一致说明 lukS/F-PV 阳性菌株在标准培养基条件下通常能表达可检测数量的 PVL。在这个研究中没有鉴定到含有 PVL 基因却不产生体外毒素的分离物。由于缺少体外表达造成假阴性的可能性是很低的。这个研究中所包括的 PVL 和 lukM/lukF-P83 阳性菌株的多样性说明,可能的 PVL 序列特异变体菌系不会对 PVL 检测造成障碍,PVL 检测使用这里所述的抗体。这里描述的菌株收集物进一步提供了与 SSTI 相关的金黄色葡萄球菌的分子流行病学的快照。在 PVL 阳性甲氧西林敏感的金黄色葡萄球菌中,CC121(总计 50 个分离物)和 CC30(35 个分离物)占主导地位。在特立尼达和多巴哥共和国中 PVL 阳性 CC8-MSSA 是非常丰富的,虽然这个菌株在其他地方罕见。这印证了 USA300 菌株在加勒比海/拉丁美洲地区出现的假说。这个研究还显示了 MRSA 在世界的不同部分造成了严重的问题。MRSA(在这个研究中)流行率低或没的国家是瑞典和乌干达,瑞典在 MRSA 感染控制是具有非常严格的政策,乌干达在医疗保健和兽医中使用抗生素对金黄色葡萄球菌的选择压力比其他国家有更多的限制。在别的地方,由 PVL 阳性/ACME 阳性 ST8-MRSA-IV(USA300),PVL 阳性/ACME 阴性 ST8-MRSA-IV,PVL 阳性 ST80-MRSA-IV(欧洲 caMRSA 克隆)和 ST93-MRSA-IV(昆士兰 caMRSA 克隆)和 PVL 阴性 ST239-MRSA-III 主导的 MRSA 经常被分离到。横向流测定与 MRSA 显色筛选培养基相结合的可能性促进了新兴

的 PVL 阳性 caMRSA 菌株的快速筛选。这有助于捕获它们的传播和进一步的扩散。在澳大利亚和西班牙分离物中 PVL 阳性的高百分率以及 ST93-MRSA-IV(昆士兰 caMRSA 克隆)和 ST8-MRSA-IV 在这两个国家的主导优势说明,是以建立 PVL 阳性 MSSA 种群为代价外, PVL 阳性 caMRSA 的扩展没有发生。除了限制 β -内酰胺的功效作为主要的治疗选择, PVL 阳性 caMRSA 的出现可能因此导致 PVL 疾病相关的负担增加。虽然在当前研究中分离物的数量不足以明白的证明这样的趋势, 还需进行关于 PVL 阳性金黄色葡萄球菌的分子流行学的进一步研究。

[0181] 这里所述的发明可以在缺少未具体公开的任何要素或多个要素, 一个或多个限制的情况下实施。所采用的术语或表达被用作描述术语而不是限制, 并且, 这里也没有任何意图在使用本发明的术语和解释的时候, 并没有排除那些与本发明描述的特征等同的例子, 但是, 可以认识到, 很多基于本发明权利要求范围内的改动也是可能的。以你, 可以理解, 尽管本发明机遇很多的实施例子进行了揭示和描述, 基于发明描述的精髓进行改进或改变是本领域一般技术人员可以进行的, 这样的改变和活便也被认为是属于本发明哪些从属权利要求所限定的范围。

[0182] 本发明说明书中提到的所有文章、专利和专利申请, 和所有其他文献和电子信息和杂志的全部或部分作为本发明的一部分作为参考。这里所引用的所有专利和出版物都被同样列在参考文献中, 跟每一个出版物具体的单独被参考引用一样。申请人保留物理上的上述文章、专利、专利申请或其他文献与本申请说明书结合的权利。

[0183] 这里采用的术语和表达方式所描述方式, 而不受其限制, 这里也没有任何意图来指明此书描述的这些术语和解释排除了任何等同的特征, 但是可以知道, 可以在本发明和权利要求的范围内做任何合适的改变或修改。可以理解, 本发明所描述的实施例子都是一些优选的实施例子和特点, 任何本领域的一般技术人员都可以根据本发明描述的精髓下做一些更改和变化, 这些更改和变化也被认为属于本发明的范围和独立权利要求以及附属权利要求所限制的范围。

SEQUENCE LISTING

<110> 美艾利尔圣地亚哥有限公司

<120> 检测杀细胞的毒素(PVL)的装置和方法

<150> US 61/714,649

<151> 2012-10-16

<150> US 61/617,974

<151> 2012-03-30

<150> US 61/561,767

<151> 2011-11-18

<150> US 61/558,848

<151> 2011-11-11

<160> 14

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 660

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<400> 1

gacgttgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctgactgtga cagcaggaga gaaggtcact 60

atgagctgca agtccagtca gagtctgtta ctcagtggaa atcaaaagaa cctcttgacc 120

tggttccagc agaaaccagg gcagcctcct aaactgttga tctactgggc atccactagg 180

gaatctgggg tcctgatcg cttcacaggc agtggatctg gaacagattt cactctcacc 240
 atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gtcagaatga ttataattat 300
 ccgtacacgt tcggaggggg gaccaagctg gaaataaaac gggctgatgc tgcaccaact 360
 gtatccatct tcccaccate cagtgagcag ttaacatctg gaggtgcctc agtcgtgtgc 420
 ttcttgaaca acttctacce caaagacatc aatgtcaagt ggaagattga tggcagtgaa 480
 cgacaaaatg gcgtcctgaa cagttggact gatcaggaca gcaaagacag cacctacagc 540
 atgagcagca ccctcacgtt gaccaaggac gagtatgaac gacataacag ctataacctgt 600
 gaggccactc acaagacatc aacttcaccc attgtcaaga gcttcaacag gaatgagtct 660

<210> 2

<211> 220

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<400> 2

Asp Val Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly
 1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Leu Ser
 20 25 30

Gly Asn Gln Lys Asn Leu Leu Thr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
85 90 95

Asp Tyr Asn Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser
115 120 125

Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn
130 135 140

Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu
145 150 155 160

Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp
165 170 175

Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr
180 185 190

Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr
195 200 205

Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Ser
 210 215 220

<210> 3

<211> 681

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<400> 3

caggtccagc tgcagcagtc tgggcctcag ctggttaggc ctggggcttc agtgaagata 60

tcctgcaagg cttctgggtca ctattcacc acctactgga tgcactgggt gaagcagagg 120

cctggacaag gtcttgagtg gattggcatg attgacctt ccgatagtga aactaggtta 180

aatcagaagt tcaaggacaa ggccacattg actgtagaca aatcctccag cacagtctac 240

atgcaactca gcagcccgac atctgaagac tctgtggtct attactgtgc aagctactat 300

ggcaattcta tggactactg gggtaagga acctcagtca ccgtctctc agccaaaacg 360

acaccccat ctgtctatcc actggcccct ggatctgctg cccaaactaa ctccatgggtg 420

accctgggat gcttgggtcaa gggctatttc cctgagccag tgacagtgac ctggaactct 480

ggatecc tgt ccagegggtgt gcacaccttc ccagctgtcc tgcagttetga cctctacact 540

ctgagcagct cagtgactgt cccctccage acctggccca gcgagaccgt cacctgcaac 600

gttgcccacc cgccagcag caccaagggtg gacaagaaaa ttgtgcccag ggattgtcat 660

catcaccate accatcacta a 681

115

120

125

Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys
 130 135 140

Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser
 145 150 155 160

Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 165 170 175

Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp
 180 185 190

Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr
 195 200 205

Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys His His His His His
 210 215 220

His His
 225

<210> 5

<211> 657

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<400> 5	
gatgttgtgg tgactcaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc	60
atctcttgca gatctagtca ggccttgta cacagtgatg gaaacaccta ttacattgg	120
tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtttc caaccgattt	180
tctgggggcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc	240
agcagagtgg aggctgaaga tctgggagtt tatttctgct ctcaaatac acatgttcca	300
ttcacattcg gctcggggac aaagttggaa ataaaacggg ctgatgctgc accaactgta	360
tccatcttcc caccatccag tgagcagtta acatctggag gtgcctcagt cgtgtgcttc	420
ttgaacaact tctaccccaa agacatcaat gtcaagtgga agattgatgg cagtgaacga	480
caaatggcg tcctgaacag ttggactgat caggacagca aagacagcac ctacagcatg	540
agcagcacc tcacgttgac caaggacgag tatgaacgac ataacagcta tacctgtgag	600
gccactcaca agacatcaac ttaccatt gtcaagagct tcaacaggaa tgagtct	657

<210> 6

<211> 219

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<400> 6

Asp Val Val Val Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser

20	25	30
Asp Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser 35	40	45
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro 50	55	60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile 65	70	75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Asn 85	90	95
Thr His Val Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys 100	105	110
Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu 115	120	125
Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe 130	135	140
Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg 145	150	155 160
Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser 165	170	175

Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu
 180 185 190

Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser
 195 200 205

Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Ser
 210 215

<210> 7

<211> 681

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<400> 7

gagatccagc tgcagcagtc tggagctgag ctggggaggc ctgggtcctc agtgaagctg 60

tctgcaaga cttctggata tactttcaca aacttttata taacctggct gaaacagagg 120

cctggacagg gcctggaatg gattggattt atttatcctg gaaatggta tactgcatac 180

aatgagaaat tccagggaga ggccacactg acttcagaca catcttccag cacagcctac 240

atgcacctca gaagcctgac atctgaggac tctgcaatct atttctgtgc aagactggga 300

cgaaatgaag ttgactactg gggccaagge accactctca cagtctcctc agccaaaacg 360

acacccccat ctgtctatcc actggcccct ggatctgctg cccaaactaa ctccatggtg 420

accctgggat gcctggtaaa gggctatttc cctgagccag tgacagtgac ctggaactct 480

ggatccctgt ccagcgggtg gcacaccttc ccagctgtcc tgcagtctga cctctacact 540

ctgagcagct cagtgactgt ccctccagc acctggccca gcgagaccgt cacctgcaac 600
 gttgccacc cggccagcag caccaaggtg gacaagaaaa ttgtgccag ggattgtcat 660
 catcaccatc accatcacta a 681

<210> 8

<211> 226

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<400> 8

Glu Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Gly Arg Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Phe
 20 25 30

Tyr Ile Thr Trp Leu Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Phe Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Tyr Thr Ala Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Glu Ala Thr Leu Thr Ser Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met His Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Arg Leu Gly Arg Asn Glu Val Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110

Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu
 115 120 125

Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys
 130 135 140

Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser
 145 150 155 160

Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 165 170 175

Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp
 180 185 190

Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr
 195 200 205

Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys His His His His His
 210 215 220

His His
 225

<210> 9

<211>	660	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	Synthetic construct	
<400>	9	
	gacatcgтта tgtctcagtc tccatcctcc ctagctgtgt cagttggaga gacggttact	60
	atgagctgca agtccagtca gaccctttta tatagtagca atcaaaagaa ttacttggcc	120
	tggtaccagc agaaaccagg acagtctcct aaattgctga ttactgggc atccactagg	180
	gaatctgggg tcccagatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc	240
	atcagcagtg tgaaggctga agacctggca gtttattact gtcagcaata ttatgactat	300
	ccgctcacgt tcggtgctgg gaccaagctg gagctgaaac gggctgatgc tgcaccaact	360
	gtatccatct tcccaccatc cagtgagcag ttaacatctg gaggtgcctc agtcgtgtgc	420
	ttcttgaaca acttctacce caaagacatc aatgtcaagt ggaagattga tggcagtgaa	480
	cgacaaaatg gcgtcctgaa cagttggact gatcaggaca gcaaagacag cacctacagc	540
	atgagcagca ccctcagtt gaccaaggac gagtatgaac gacataacag ctatacctgt	600
	gaggccactc acaagacatc aacttcacce attgtcaaga gcttcaacag gaatgagtct	660
<210>	10	
<211>	220	
<212>	PRT	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	Synthetic construct	

<400> 10

Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Val Gly
1 5 10 15

Glu Thr Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Thr Leu Leu Tyr Ser
 20 25 30

Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95

Tyr Tyr Asp Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu
 100 105 110

Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser
 115 120 125

Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn
 130 135 140

Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu

145	150	155	160
Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp			
	165	170	175
Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr			
	180	185	190
Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr			
	195	200	205
Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Ser			
	210	215	220

<210> 11

<211> 684

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<400> 11

gacgtgcagg tgggtggagtc tgggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaacte 60

tcctgtgcag tctctggatt cactttcagt agttatcaca tgtcttgggt tcgccagact 120

ccggcgaaga ggctggagtg ggtcgcaacc attagtgggtg gtggtggtaa cacctactat 180

ccagacagtg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgttc 240

ctgcaaatga gcagtctgag gtctgaggac acggccttgt attactgtgc aagacatgag 300

ggtccttact actccttcga tgtctggggc acagggacca cggtcaccgt ctcttcagcc 360

aaaacgacac ccccatctgt ctatccactg gcccttgat ctgctgcca aactaactcc 420
 atggtgacce tgggatgcct ggtcaagggc tatttcctg agccagtac agtgacctgg 480
 aactctggat cctgtccag cgggtgac accttcccag ctgtcctgca gtctgacctc 540
 tacactctga gcagctcagt gactgtcccc tccagcacct ggcccagcga gaccgtcacc 600
 tgcaacgttg cccaccggc cagcagcacc aaggtggaca agaaaattgt gccagggat 660
 tgatcatc accatcacca teac 684

<210> 12

<211> 228

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<400> 12

Asp Val Gln Val Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

His Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Ala Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

His His His His
225

<210> 13

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 13

cctgaattca tgaaaaaat agtcaaate

29

<210> 14

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 14

atagcgccg cttagctcat aggatttt

28

菌株	CC1-MSSA	CC1-MRSA-N, USA400	CC1-MRSA-V	CC5-MSSA	CC5-MRSA-V 小儿克隆	ST7-MRSA-N, USA300	ACME-119 USA300
分离物检测:	1	2	1	4	1	16	4
最低PVL产量(F组分, ng/mL):		573.3		39.6		358.4	197.0
最高PVL产量(F组分, ng/mL):		956.6		1753.0		7193.5	6873.0
平均PVL产量(F组分, ng/mL):	1004.9	768.5	764.2	746.8	546.2	3168.3	4021.0

菌株	CC2-MSSA	ST22-MRSA-N	CC25-MSSA	CC30-MSSA	ST20-MRSA-N, SNPP 克隆	ST39-MRSA-N, WA MRSA-55/56	ST28152-MRSA-VIT, Taiwan CI
分离物检测:	0	2	3	16	7	3	4
最低PVL产量(F组分, ng/mL):	391.1	179.8	1155.0	52.0	203.3	401.2	632.4
最高PVL产量(F组分, ng/mL):	488.5	234.0	2005.0	6459.0	2770.0	2633.0	5210.0
平均PVL产量(F组分, ng/mL):	2112.3	1206.9	1575.3	737.0	828.9	1482.7	2918.9

菌株	CC30-MSSA	CC30-MRSA-V, Europ. clMSSA	CC18-MRSA	CC18-MRSA-N	STR-MSSA	ST13-MRSA-V, 昂士兰克隆
分离物检测:	1	7	2	1	6	10
最低PVL产量(F组分, ng/mL):		149.1	248.0		4974.2	402.1
最高PVL产量(F组分, ng/mL):		477.8	1457.9		10025.4	12170.4
平均PVL产量(F组分, ng/mL):	651.8	259.4	882.5	2571.0	6482.7	5165.3

菌株	CC36/154-MSSA	CC121-MSSA	CC112-MSSA	CC118-MRSA-V	ST398-MRSA-V	ST142-MSSA
分离物检测:	1	5	2	2	2	2
最低PVL产量(F组分, ng/mL):		522.8	300.0	140.5	649.5	0.0
最高PVL产量(F组分, ng/mL):		2245.0	2685.0	88.1	882.9	0.0
平均PVL产量(F组分, ng/mL):	2113	1183.7	1507.5	754.3	781.2	0.0

图 1A

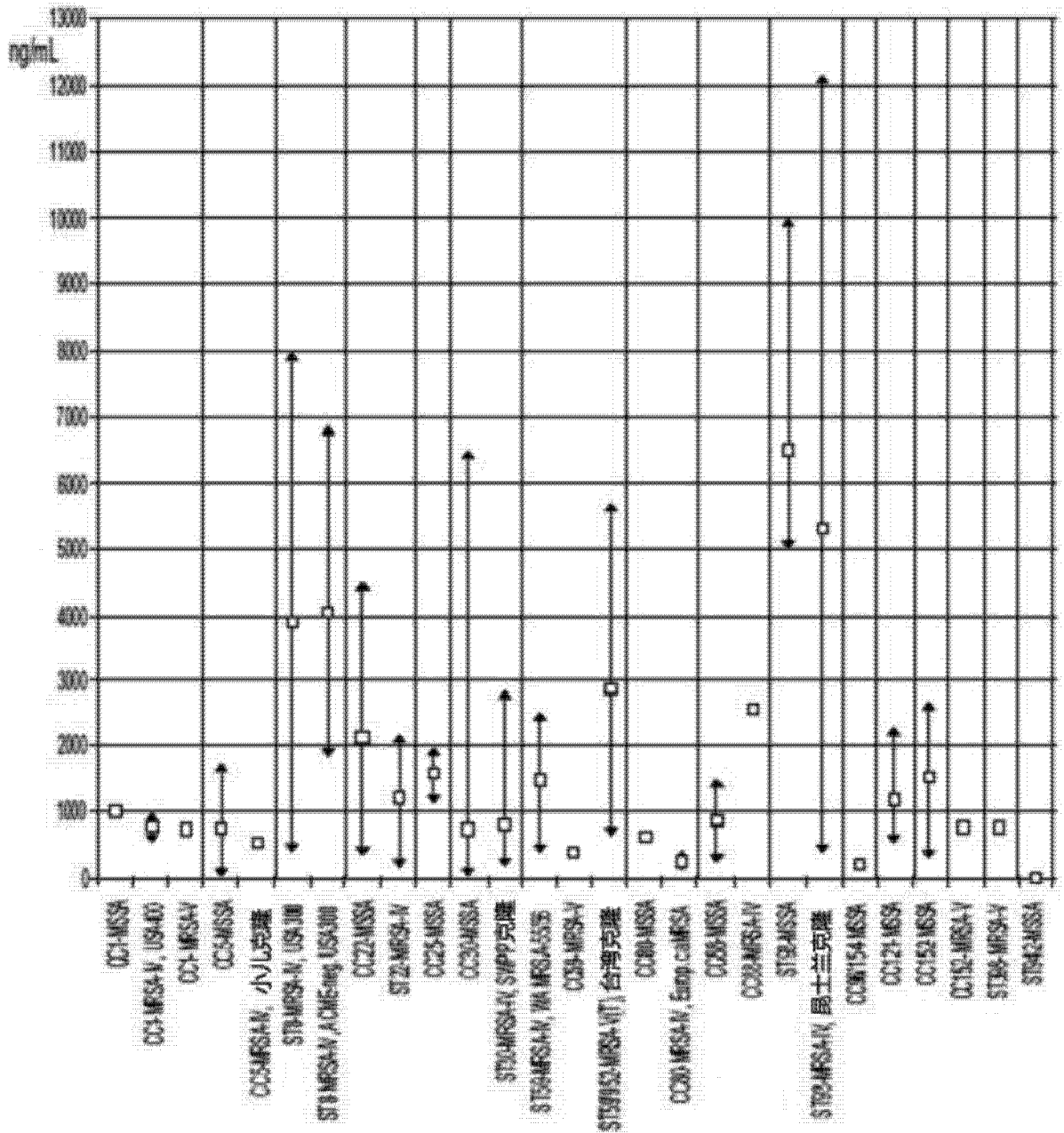


图 1B

分离物	收集的菌株	菌株的从属关系	基于抗体芯片检测的分类	横向流测定
09/1943	A20	CC-01-HSSA [PVL+]	高水平 (>4,500 ng/mL)	阳性 / 有效
06/15104	X54	CC-2-HSSA [PVL+]	高水平 (>4,500 ng/mL)	阳性 / 有效
AUSTR-03-12/10	Z112	ST03-HSSA [PVL+] 昆士兰克隆	高水平 (>4,500 ng/mL)	阳性 / 有效
AUSTR-06-F08H-14	Z482	ST03-HSSA [PVL+] 昆士兰克隆	高水平 (>4,500 ng/mL)	阳性 / 有效
AUSTR-05-212L	Z487	ST03-HSSA [PVL+]	高水平 (>4,500 ng/mL)	阳性 / 有效
USA-10-FRR37/B	Z300	ST03-HSSA [PVL+] USA300	高水平 (>4,500 ng/mL)	阳性 / 有效
09/14335	D06	CC-0154-HSSA [PVL+]	低水平 (<450 ng/mL)	阳性 / 有效
06/12517	A82	CC-5-HSSA [PVL+]	低水平 (<450 ng/mL)	阳性 / 有效
08/10366	X100	CC-20-HSSA [PVL+]	低水平 (<450 ng/mL)	阳性 / 有效
06/14809	A124	CC-2-HSSA [PVL+]	低水平 (<450 ng/mL)	阳性 / 有效
ATCC 29622-Submodan	087	CC-3-HSSA [PVL+]	低水平 (<450 ng/mL)	阳性 / 有效
SA-R1-HSSA-0723	Z362	STZ-HSSA [PVL+]	低水平 (<450 ng/mL)	阳性 / 有效
JBNA-FL-04-160-F07-016	V571	CC-10-HSSA	牛杀白细胞素 (lukM/lukF-PY-P83)	阳性 / 有效
JBNA-FL-KS-01-22	V572	CC-151-HSSA	牛杀白细胞素 (lukM/lukF-PY-P83)	阳性 / 有效
JBNA-FL-KS-02-141	V573	CC-61-HSSA	牛杀白细胞素 (lukM/lukF-PY-P83)	阳性 / 有效
JBNA-FL-KS-05-159	V574	CC-49-HSSA	牛杀白细胞素 (lukM/lukF-PY-P83)	阳性 / 有效
JBNA-FL-KS-06-234	V575	CC-475-HSSA	牛杀白细胞素 (lukM/lukF-PY-P83)	阳性 / 有效
JBNA-FL-2Jug-160	V106	CC-103-HSSA	牛杀白细胞素 (lukM/lukF-PY-P83)	阳性 / 有效
CC1	R11	CC-8-HSSA-I	PVL 阴性	阴性 / 有效
MSSA76	R20	CC-1-HSSA	PVL 阴性	阴性 / 有效
M09	M4	CC-5-HSSA-II	PVL 阴性	阴性 / 有效
K315	R17	CC-5-HSSA-III	PVL 阴性	阴性 / 有效
KC12-K25	R15	CC-8-HSSA	PVL 阴性	假阳性 / 有效
ATCC 35841/N1 BBA 101	R21	Staph. epidermidis	PVL 阴性	阴性 / 有效

图 2

抗体	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
抗原	培养物上清液 lukF-P83	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	培养物上清液 ATCC25923	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
抗体	培养物上清液 lukF-P83	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	培养物上清液 ATCC25923	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
101	培养物上清液 lukF-P83	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	培养物上清液 ATCC25923	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
102	培养物上清液 lukF-P83	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	培养物上清液 ATCC25923	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
103	培养物上清液 lukF-P83	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	培养物上清液 ATCC25923	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
104	培养物上清液 lukF-P83	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	培养物上清液 ATCC25923	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
105	培养物上清液 lukF-P83	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	培养物上清液 ATCC25923	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
106	培养物上清液 lukF-P83	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	培养物上清液 ATCC25923	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
107	培养物上清液 lukF-P83	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	培养物上清液 ATCC25923	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
108	培养物上清液 lukF-P83	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	培养物上清液 ATCC25923	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
109	培养物上清液 lukF-P83	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	培养物上清液 ATCC25923	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
110	培养物上清液 lukF-P83	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	培养物上清液 ATCC25923	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
111	培养物上清液 lukF-P83	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	培养物上清液 ATCC25923	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
112	培养物上清液 lukF-P83	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	培养物上清液 ATCC25923	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
113	培养物上清液 lukF-P83	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	培养物上清液 ATCC25923	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
114	培养物上清液 lukF-P83	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	培养物上清液 ATCC25923	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
115	培养物上清液 lukF-P83	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	培养物上清液 ATCC25923	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
116	培养物上清液 lukF-P83	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	培养物上清液 ATCC25923	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
117	培养物上清液 lukF-P83	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	培养物上清液 ATCC25923	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
118	培养物上清液 lukF-P83	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	培养物上清液 ATCC25923	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
119	培养物上清液 lukF-P83	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	培养物上清液 ATCC25923	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
120	培养物上清液 lukF-P83	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	培养物上清液 ATCC25923	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

基于多个在不同情况下的多个组合实验，描述了一个矩阵用于确定抗体的最优组合。0，无反应；(+) 到+++，活性从弱到强

图 3

>CL0001 Z1 01401 轻链 (DNA)

GACGTTGIGATGTCACAGTCTCCATCCICCCCTGACTGTGACAGCAGGAGAGAAGGTCACTATGAGCT
GCAAGTCCAGTCAGAGTCTGTTACTCAGTGGAAATCAAAGAACCCTCTTGACCTGGTTCCAGCAGAA
ACCAGGGCAGCCTCCTAAACTGTTGATCTACTGGGCATCCACIAGGGAATCTGGGGTCCCTGATCGC
TTCACAGGCAGTGGATCTGGAACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGG
CAGTTTATTACTGTCAGAATGATTATAATTATCCGTACACGTTCCGAGGGGGGACCAAGCTGGAAAT
AAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATCTGGA
GGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAACCTTCTACCCCAAAGACATCAATGTCAAGTGGAAGATTG
ATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCCTGAACAGTTGGACTGATCAGGACAGCAAAGACAGCACCTA
CAGCATGAGCAGCACCTCACGTTGACCAAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACCTGTGAG
GCCACTCACAAGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTCT (SEQ ID NO:
1)

>CL0001 Z1 01401 重链 (DNA)

CAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGGCCTCAGCTGGTTAGGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGCA
AGGCTTCTGGTCACTCAITCACCACCTACTGGATGCACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAAGGTCT
TGAGTGGATTGGCATGATTGATCCTTCCGATAGTGAAACTAGGTTAAATCAGAAGTTCAAGGACAAG
GCCACATTGACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGTCTACATGCAACTCAGCAGCCCGACATCTGAAG
ACTCTGTGGTCTATTACTGTGCAAGCTACTATGGCAATTCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTC
AGTCACCGTCTCCTCAGCCAAAACGACACCCCATCTGTCTATCCACTGGCCCCTGGATCTGCTGCC
CAAATAACTCCATGGTGACCCITGGGATGCCTGGTCAAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGA
CCTGGAACCTCTGGATCCCTGTCCAGCGGTGTGCACACCTTCCCAGCTGTCTGAGTCTGACCTCTA
CACTCTGAGCAGCTCAGTACTGTCCCTCCAGCACCTGGCCCAGCGAGACCGTCACCTGCAACGTT
GCCACCCGGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTGTGCCAGGGATTGTCATCATCACCATC
ACCATCACTAA (SEQ ID NO: 3)

>CL0001 Z1 01401 轻链

DVMSQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLLSGNQKNLLTWFQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDR
FTGSGSGTDFTLTISVQAEDLAVYYCQNDYNYPYTFGGGKLEIKRADAAPTIVSIFPPSSEQLTSG
GASVVCFLNMFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCE
ATHKTSTSPIVKSFNRNES (SEQ ID NO: 2)

>CL0001 Z1 01401 重链

QVQLQQSGPQLVLRPGASVKISCKASGHSFTTYWMHWVKQRPGQGLEWIGMIDPSDSETRLNQKFKDK
ATLTVDKSSSTVYMQLSPTSEDSVYVYCASYYGNSMDYWGQTSVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAA
QTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSSETVTCNV
AHPASSTKVDKIVPRDCHHHHHHH (SEQ ID NO: 4)

图 4

>CL0001 Z1 01841 轻链 (DNA)

GATGTTGTGGGTGACTCAAACCTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTT
GCAGATCTAGTCAGAGCCTTGTACACAGTGATGGAAACACCTATTTACATTGGTACCTGCAGAAGCC
AGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTT
AGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAAGATCTGGGAG
TTTATTTCTGCTCTCAAATAACACATGTTCCATTACATTTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAAATAAA
ACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATCTGGAGGT
GCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAACTTCTACCCCAAAGACATCAATGTCAAGTGGAAAGATTGATG
GCAGTGAACGACAAAATGGCGTCTGAACAGTTGGACTGATCAGGACAGCAAAGACAGCACCTACAG
CATGAGCAGCACCCCTCACGTTGACCAAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGCC
ACTCACAAGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTCT (SEQ ID NO: 5)

>CL0001 Z1 01841 重链 (DNA)

GAGATCCAGCTGCAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGGGGAGGCTGGGTCCCTCAGTGAAGCTGTCCTGCA
AGACTTCTGGATATACTTTACAAACTTTTATATAACCTGGCTGAAACAGAGGCCTGGACAGGGCCT
GGAATGGATTGGATTTATTTATCCTGGAAATGGTTATACTGCATACAATGAGAAATTCCAGGGAGAG
GCCACACTGACTTCAGACACATCTTCCAGCACAGCCTACATGCACCTCAGAAGCCTGACATCTGAGG
ACTCTGCAATCTATTTCTGTGCAAGACTGGGACGAAATGAAGTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCAC
TCTCACAGTCTCCTCAGCCAAAACGACACCCCATCTGTCTATCCACTGGCCCCTGGATCTGCTGCC
CAAATAACTCCATGGIGACCCCTGGGATGCCTGGTCAAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGA
CCTGGAACCTCTGGATCCCTGTCCAGCGGTGTGCACACCTTCCCAGCTGTCTGCACTCTGACCTCTA
CACTCTGAGCAGCTCAGTGAAGTGTCCCCTCCAGCACCTGGCCCAGCGAGACCGTCACCTGCAACGTT
GCCACCCCGGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTGTGCCAGGGATTGTCATCATCACCATC
ACCATCACTAA (SEQ ID NO: 7)

>CL0001 Z1 01841 轻链

DVVVTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSDGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRF
SGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQNTHPVPTFGSGTKLEIKRADAAPTIVSIFPPSSEQLTSGG
ASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEA
THKTSTSPIVKSFNRNES (SEQ ID NO: 6)

>CL0001 Z1 01841 重链

EIQLOQSGAELGRPGSSVKLSCKTSGYTFNFIITWLKQRPGQGLEWIGFIYPNGYIAYNEKFQGE
ATLTSSTSSSTAYMHLRSLTSEDSAIYFCARLGRNEVDYWGQGTTLTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAA
QTNSMVTLGCLVKGYFPEPVITVWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVIVPSSSTWPSSETVTCNV
AHPASSTKVDKIVPRDCHHHHHH (SEQ ID NO: 8)

图 5

>CL0001 Z1 01321 轻链(DNA)

GACATCGTIIATGTCTCAGTCTCCATCCTCCCIAGCTGTGTCAGTTGGAGAGACGGTTACTATGAGCT
GCAAGTCCAGTCAGACCCTTTTATATAGTAGCAATCAAAGAATTACTTGGCCTGGTACCAGCAGAA
ACCAGGACAGTCTCCTAAATTGCTGATTTACTGGGCATCCACTAGGGAATCTGGGGTCCCAGATCGC
TTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTGTGAAGGCTGAAGACCTGG
CAGTTTATTACTGTGTCAGCAATATTATGACTATCCGCTCACGTTCCGGTGTGGGACCAAGCTGGAGCT
GAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATCTGGA
GGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAACCTTACCCCAAAGACATCAATGTCAAGTGGAAGATTG
ATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCTGAAACAGTTGGACTGATCAGGACAGCAAAGACAGCACCTA
CAGCATGAGCAGCACCCCTCACGTTGACCAAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACCTGTGAG
GCCACTCACAAAGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTCT (SEQ ID NO:
9)

>CL0001 Z1 01321 重链(DNA)

GACGTGCAGGTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTG
CAGTCTCTGGATTCACTTTCAGTAGTTATCACATGTCTTGGGTTCCGCCAGACTCCGGCGAAGAGGCT
GGAGTGGGTCGCAACCATTAGTGGTGGTGGTGGTAACACCTACTATCCAGACAGTGTGAAGGGCCGA
TTCACCACTCTCCAGAGACAATGCCAAGAACACCCTGTTCCCTGCAAATGAGCAGTCTGAGGTCTGAGG
ACACGGCCTTGTATTACTGTGCAAGACATGAGGGTCTTACTACTCCTTCGATGTCTGGGGCACAGG
GACCACGGTCACCGTCTCTTCAGCCAAAACGACACCCCCATCTGTCTATCCACTGGCCCCTGGATCT
GCTGCCCAAATAACTCCATGGTGACCCTGGGATGCCTGGTCAAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGA
CAGTGACCTGGAACCTCTGGATCCCTGTCCAGCGGTGTGCACACCTTCCCAGCTGTCTGCAGTCTGA
CCTCTACACTCTGAGCAGCTCAGTACTGTCCCCTCCAGCACCTGGCCCAGCGAGACCGTCACCTGC
AACGTTGCCACCCGGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTGTGCCAGGGATTGTTCATC
ACCATCACCATCAC (SEQ ID NO: 11)

>CL0001 Z1 01321 轻链

DIVMSQSPSSLAVSVGETVTMSCKSSQTLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDR
FTGSGSGTDFLTITSSVKAEDLAVYYCQYYDYPLTFGAGTKLELKRADAAPTIVSIFPPSSEQLTSG
GASVVCFLNRFYPKDIVKWKIDGSERQNGVLNSWIDQDSKSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCE
ATHKTSTSPIVKSFNRNES (SEQ ID NO: 10)

>CL0001 Z1 01321 重链

DVQVVESSGGGLVKPGGSLKLSCAVSGFTFSSYHMSWVRQTPAKRLEWVATISGGGGNTIYPDSVKGR
FTISRDNKNTLFLQMSLRSEDTALYYCARHEGPYYSFVDVWGTTVTVSSAKTTPPSVYPLAPGS
AAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWVPSSTWV
NVAHPASSTIKVDKKIVPRDCHHHHHHH (SEQ ID NO: 12)

图 6

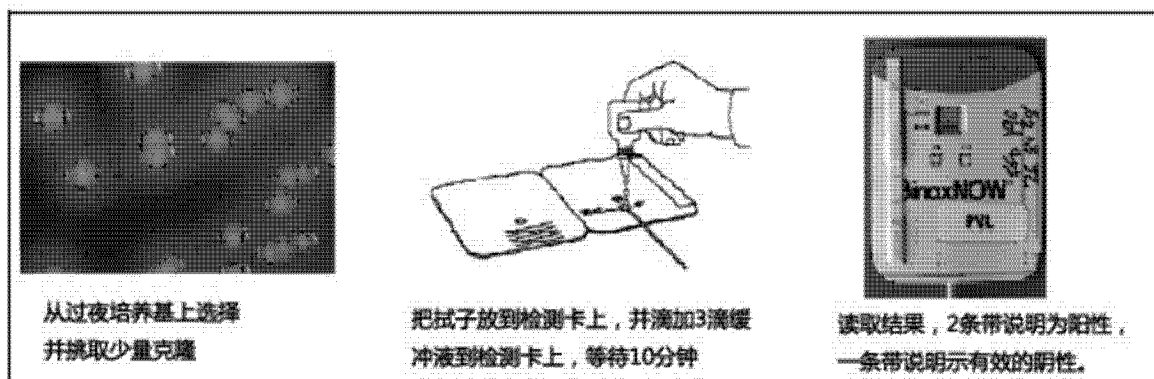


图 7

分离物	收集的菌落	菌株的隶属关系	基于抗体芯片测定的种类	横向流测定
05V1343	A20	CC121-MSSA [PVL+]	高水平(.4,500 NG/ML)	阳性/有效
06V15104	X54	CC22-MSSA [PVL+]	高水平(.4,500 NG/ML)	阳性/有效
AUSTR-03-16790	Z112	ST93-MRSA-IV [PVL+], 昆士兰克隆	高水平(.4,500 NG/ML)	阳性/有效
AUSTR-06-RBH-14	Z492	ST93-MRSA-IV [PVL+], 昆士兰克隆	高水平(.4,500 NG/ML)	阳性/有效
AUSTR-9529120L	Z487	ST93-MSSA [PVL+]	高水平(.4,500 NG/ML)	阳性/有效
USA300-FPR3757	Z330	ST8-MRSA-IV, USA300	高水平(.4,500 NG/ML)	D 阳性/有效
05V08535	O36	CC96/154-MSSA [PVL+]	低水平 (<450 ng/mL)	阳性/有效
05V12517	A52	CC5-MSSA [PVL+]	低水平 (<450 ng/mL)	阳性/有效
08V10386	X120	CC30-MSSA [PVL+]	低水平 (<450 ng/mL)	阳性/有效
08V34589	A124	CC22-MSSA [PVL+]	低水平 (<450 ng/mL)	阳性/有效
ATCC25923-Saarbrücken	R67	CC30-MSSA [PVL+]	低水平 (<450 ng/mL)	阳性/有效
SARI-MRSA-0723	Z362	ST22-MRSA-IV [PVL+]	低水平 (<450 ng/mL)	阳性/有效
JENA-FLI-04-TGD-1787-816	V571	CC133-MSSA	牛杀细胞毒素(lukM/lukF-PV-P83)	阳性/有效
JENA-FLI-KS-01-22	V572	CC151-MSSA	牛杀细胞毒素(lukM/lukF-PV-P83)	阳性/有效
JENA-FLI-KS-02-141	V573	CC151-MSSA	牛杀细胞毒素(lukM/lukF-PV-P83)	阳性/有效
JENA-FLI-KS-05-159	V574	CC479-MSSA	牛杀细胞毒素(lukM/lukF-PV-P83)	阳性/有效
JENA-FLI-KS-06-234	V575	CC479-MSSA	牛杀细胞毒素(lukM/lukF-PV-P83)	阳性/有效
JENA-FLI-Ziege-16B	V136	CC133-MSSA	牛杀细胞毒素(lukM/lukF-PV-P83)	阳性/有效
COL	R11	CC8-MRSA-1	PVL 阴性	阴性/有效
MSSA476	R20	CC1-MSSA	PVL 阴性	阴性/有效
Mu50	R4	CC5-MRSA-II	PVL 阴性	阴性/有效
N315	R17	CC5-MRSA-II	PVL 阴性	阴性/有效
NCTC8325	R15	CC8-MSSA	PVL-NEGATIVES PVL 阴性	假阳性/有效
ATCC35984/NARSA 101	R21	<i>Staph. epidermis!</i>	PVL-NEGATIVES PVL 阴性	阴性/有效

图 8A

分离物	菌株收集物	菌株的从属关系	抗体芯片测定的种类	横向流测定
05V08535	O36	CC96/154-MSSA [PVL+]	低水平 (<450 ng/mL)	阳性/有效
08V10386	X120	CC30-MSSA [PVL+]	低水平 (<450 ng/mL)	阳性/有效
AUSTR-03-16790	Z112	ST93-MRSA-IV [PVL+], 昆士兰克隆	高水平 (>4,500 ng/mL)	阳性/有效
USA300-FPR3757	Z330	ST8-MRSA-IV, USA300	高水平 (>4,500 ng/mL)	阳性/有效
JENA-FLI-ZIEGE-16B	V136	CC133-MSSA	牛杀白细胞毒素 (lukM/lukF-PV-P83)	阳性/有效
JENA-FLI-KS-01-22	V572	CC151-MSSA	牛杀白细胞毒素 (lukM/lukF-PV-P83)	阳性/有效
COL	R11	CC8-MRSA-I	PVL 阴性	阴性/有效
NCTC 8325	R13	CC8-MSSA	PVL 阴性	阴性/有效
NCTC 8325	R15	CC8-MSSA	PVL 阴性	阴性/有效

图 8B

分离物/菌株	菌株的从属关系	高/低水平生产者	培养基	横向流测定
USA300-FPR3757_Z330	ST8-MRSA-IV USA300	高水平 (>4,500 ng/mL)	Agar 琼脂	阳性/有效
			Mueller Hinton	阳性/有效
			MRSA ID (BioMer)	阳性/有效
			哥伦比亚血	阳性/有效
			加血的 Mueller Hinton	阳性/有效
			C.A.P.	阳性/有效
			“巧克力”	阳性/有效
SARI-MRSA-0723_Z362	ST22-MRSA-IV [PVL+]	低水平 (<450 ng/mL)	琼脂	阳性/有效
			Mueller Hinton	阳性/有效
			MRSA ID (Bio Mer)	阳性/有效
			哥伦比亚血	阳性/有效
			加血的 Mueller Hinton	阳性/有效
			C.A.P.	阳性/有效
			“巧克力”	阳性/有效

图 9

分离物/菌株	菌株的从属关系	高/低水平生产者	培养基	横向流测定
AUSTR-03-167900_Z112	ST93-MRSA-IV [PVL+], 昆士兰克隆	高水平 (>4,500 ng/mL)	葡萄糖	阳性/有效
			脑心浸液	阳性/有效
08V10386_X120	CC30-MSSA [PVL+]	低水平 (<450 ng/mL)	葡萄糖	阳性/有效
			脑心浸液	阳性/有效
Mu50	CC5-MRSA-II	阴性	葡萄糖	阴性/有效
			脑心浸液	阴性/有效

图 10

真阳性	301
假阴性	1
假阴性	5
真阴性	293
敏感性 TP / (TP + FN)	99.7%
特异性 TN / (FP + TN)	98.93%
PPV TN / (TP + FP)	98.4%
NPV TN / (FN + TN)	99.7%

图 11

检测到的阳性分离物

- 297 个分离物和 5 个参考菌株 MW2-USA-400, USA300-FPR3757, ATCC25923, 昆士兰 caMRSA (ST93-MRSA-IV)。孟加拉海湾 caMRSA (ST772-MRSA-V) 是 PVL 阳性。
- 通过芯片杂交, 它们被分配到 21 个不同的克隆物, CC1 (包括 ST772), CC5, CC8 (包括 ST72), CC15, CC22, CC25, CC30, CC45, CC49, CC59, CC80, CC88, CC93, CC96, CC121, CC152, CC188, CC398 and 和 3 个未鉴定菌系。
- 最常分离到的 PVL 阳性菌系是:
 - CC8 (46 个分离物包括来自 Trinidad 和多巴哥岛的 MSSA 以及来自各个区域的“USA300”)
 - CC30 (46 个具有 SCCmec IV 元件的 MSSA 和 MRSA 分离物)
 - CC93 (42 个 MSSA 和 ST93-MRSA-IV 分离物, 昆士兰 caMRSA 克隆, 仅来自澳大利亚)
- 化验也检测 *lukM lukF-p83* (在动物菌株 CC133, CC151, CC479 中)

图 12A

检测到的阴性分离物

- 287 个 PVL 阴性检测分离物和 7 个参考菌株(Sanger MSSA476, Mu50 和 N315, NCTC8325, COL. West Australian (WA) MRSA-8 (ST75-MRSA-IV) and WA-MRSA-59 (一个 CC12-MRSA))。
- 分配到 31 个不同的克隆物: CC1, CC5, CC6, CC7, CC8 (包括 ST72 和 ST239), CC9 (ST834), CC12, CC15, CC20, CC22, CC25, CC30 (包括 ST34), CC45, CC50, CC59, CC75, CC80, CC88, CC96, CC97, CC101, CC121, CC140, CC188, CC398, CC425, CC509, CC707 和 CC1021 和一个未知物。

图 12B

检测到的阳性分离物

- 297 个分离物和 5 个参考菌株 MW2-USA-400, USA300-FPR3757, ATCC25923, 昆士兰 caMRSA (ST93-MRSA-IV)。孟加拉海湾 caMRSA (ST772-MRSA-V) 是 PVL 阳性。
- 通过芯片杂交, 它们被分配到 21 个不同的克隆物, CC1 (包括 ST772), CC5, CC8 (包括 ST72), CC15, CC22, CC25, CC30, CC45, CC49, CC59, CC80, CC88, CC93, CC96, CC121, CC152, CC188, CC398 and 和 3 个未鉴定菌系。
- 最常分离到的 PVL 阳性菌系是:
 - CC8 (46 个分离物包括来自 Trinidad 和多巴哥岛的 MSSA 以及来自各个区域的“USA300”)
 - CC30 (46 个具有 SCCmec IV 元件的 MSSA 和 MRSA 分离物)
 - CC93 (42 个 MSSA 和 ST93-MRSA-IV 分离物, 昆士兰 caMRSA 克隆, 仅来自澳大利亚)
- 化验也检测 *lukM lukF-p83* (在动物菌株 CC133, CC151, CC479 中)

图 12A

检测到的阴性分离物

- 287 个 PVL 阴性检测分离物和 7 个参考菌株(Sanger MSSA476, Mu50 和 N315, NCTC8325, COL. West Australian (WA) MRSA-8 (ST75-MRSA-IV) and WA-MRSA-59 (一个 CC12-MRSA))。
- 分配到 31 个不同的克隆物: CC1, CC5, CC6, CC7, CC8 (包括 ST72 和 ST239), CC9 (ST834), CC12, CC15, CC20, CC22, CC25, CC30 (包括 ST34), CC45, CC50, CC59, CC75, CC80, CC88, CC96, CC97, CC101, CC121, CC140, CC188, CC398, CC425, CC509, CC707 和 CC1021 和一个未知物。

图 12B

图 13: 所检测的菌株, 它们的地域来源和检测结果。横向流测定的假阳性结果用“(1)”标出。

CC	菌株 (基于杂合的系列而命名)	总数	横向流测定 PVL 阴性	横向流测定 PVL 阳性	德国	沙特阿拉伯	西班牙	瑞典	特立尼达和多巴哥共和	乌干达	英国伦敦	英国阿里斯塔	参考菌株	
CC1	CC1MSSA	7	-	7				3	1	2	1			
	CC1MSSA [PVL+]	6	6	-	1		1	2				1		
	CC1MSSA-SCC _{III}	8	-	8	2	1	1				2	1	1	
	CC1MSSA-SCC _{III} [PVL+]	7	7	-	4						3			
	CC1MRSA-IV, WA-MRSA-J/57	1	-	1							1			
	CC1MRSA-IV [PVL+], USA400	3	3	-	1								1	
	CC1MRSA-IV & SCC _{III} , WA-1/45	1	-	1					1					
	ST5731/772-MSSA [PVL+]	2	2	-	2									
	ST1772-MRSA-V [PVL+], 孟加拉海湾克隆 /WA-60	4	4	-								2	1	1
	CC2-MSSA	10	-	10		1	1	1	1	1	2			
CC5	CC2-MSSA [PVL+]	8	8	-	1			1	5			1		
	CC2-MRSA-II, UK-3/Rhine-Hesse/纽约日本	3	-	3	1								2	
	CC2-MRSA-IV, 小儿克隆	1	-	1						1				
	CC2-MRSA-IV, <i>padina4+7</i> , WA-65	1	-	1	1									
	QC2-MRSA-IV, 小儿克隆 [PVL+]	5	5	-		2					3			
CC6	QC2-MRSA-IV var, "马尔济斯克隆"	1	-	1		1								
	CC3-MRSA-V [PVL+]	1	1	-								1		
	CC6-MSSA	3	-	3		1			2					
	CC7-MSSA	9	-	9	1	1	1	1	2					
CC7	CC7-MRSA-IV	1	-	1		1								
	CC8-MSSA	41	3(1)	38	2	6	1	1	3	5	2	2	1	
CC8	CC1-MSSA [PVL+]	23	23	-			2	1	18			2		

图 13

CC	菌株(基于杂合的系列而命名)	总 数	横向往测定中 PVL-阴 性	横向往测定中 PVL-阴 性	澳大利 亚	德 国	沙 特阿 拉伯	西 班 牙	瑞 典	特 立 尼 达	乌 干 达	英 国 伦 敦	英 国 阿 伯 丁 敦	参 考 菌
CC8 (菌株)	CC8-MSSA-SCC7as	1	-	1								1		
	ST250-MRSA-I, 早期古代 MRSA	1	-	1										1
	CC8-MRSA-IV, WA-62	2	2	-						2				
	ST8-MRSA-IV [PVL+]/ACME-I, USA300	10	10	-		2	1			3				1
	ST8-MRSA-IV [PVL+]/ACME-I	10	10	-				10						
CC8 (ST72)	ST72-MSSA	13	-	13		2	1	1		7	2			
	ST72-MSSA [PVL+]	1	1	-										
CC8 (ST139)	ST239-MRSA-III, 维也纳/匈牙利/巴西克隆	13	-	13			5			6	1	1		
	ST334-MSSA	2	-	2							2			
98ST8240	ST834-MRSA-VI	1	-	1			1							
	CC12-MSSA	8	-	8						5	1	2		
CC12	CC12-MRSA, W.A-59	1	-	1										1
	CC15-MSSA	29	1(1)	28		2	1	3	1	18	2	2		
CC15	CC15-MSSA [PVL+]	2	2	-						1				
	CC20-MSSA	3	-	3						3				
CC20	CC22-MSSA	6	4(1)	5		3	1	1		1				
	CC22-MSSA [PVL+]	19	19	-		2	2	5						10
CC22	CC22-MSSA-SCC7as [PVL+]	5	5	-										5
	CC22-MRSA-IV, UK-EMRSA-15/Barnim EMRSA	4	-	4		1	1	1						1
CC25	CC22-MRSA-IV [PVL+]	5	5	-		2	1					2		
	CC25-MSSA	10	-	10				3			6	1		
CC25	CC25-MSSA [PVL+]	2	2	-										
	CC30-MSSA	20	-	20		1	8	3		7		1		
CC30	CC30-MSSA [PVL+]	35	34	1(1)		3	4	4	6	4	10	1		2
	CC30-MRSA-IV [PVL+], 西南太平洋克隆	11	11	-		5	1	1				4		
CC30 (ST34)	ST34-MSSA	5	-	5		1		1	1					2

图 13 (续)

CC	菌株(基于聚合的系列而命名)	总数	偏向流型 征中 PVL 阳性	偏向流型 征中 PVL 阴性	英国阿里斯塔	英国伦敦	乌干达	特立尼达和多 巴哥共和国	瑞典	西班牙	沙特阿拉伯	德国	澳大利亚	偏向流型 征中 PVL 阳性	偏向流型 征中 PVL 阴性	参考菌株
CC45	CC45-MSSA	33	-	-					1							
CC45	CC45-MSSA [PVL+]	2	2	-												
CC45	CC45-MRSA-IV, 柏林 EMRSA	1	-	1								1				
CC49	ST45-MSSA [PVL+]	1	1	-						1						
CC50	CC50-MSSA	3	-	3					3							
CC50	CC50-MSSA	1	-	1												1
CC50	CC50-MSSA [PVL+]	1	1	-												
CC50	CC50-MRSA-V	1	-	1												1
CC50	CC50-MRSA-V [PVL+]	1	1	-												
CC50	ST59/ST92-MRSA-V(T) [PVL+], "台湾克 隆"	3	3	-									2			
CC75	CC59-MRSA-V&SCC75	2	-	2												
CC75	MSSA, related to ST1123	2	-	2				2								
CC75	MSSA, related to ST1667	2	-	2				2								
CC75	ST75-MRSA-IV, WA-MRSA-079	2	-	2				1			1					1
CC80	CC80-MSSA [PVL+]	5	5	-						1	1	2				
CC80	CC80 MRSA IV	2	-	2							2					
CC80	CC80-MRSA-IV [PVL+], 欧洲 CA-MRSA 克隆	13	13	-							11					2
CC88	CC88-MSSA	2	-	2												
CC88	CC88 MSSA [PVL+]	2	2	-												
CC88	CC88-MRSA-IV [PVL+]	2	2	-							2					
CC93	ST93-MSSA [PVL+]	9	9	-									9			
CC93	ST93-MRSA-IV [PVL+], 瑞士克隆	33	33	-								1	30			
CC96	CC96/154-MSSA	1	-	1												
CC96	CC96/154-MSSA [PVL+]	1	1	-												
CC97	CC97-MSSA	8	-	8							1					7

图 13 (续)

CC	菌株(基于杂合的系列而命名)	总数	横向往流型 定中PVL 阳性	横向往流型 定中PVL 阴性	澳大利亚	德国	沙特阿拉伯	西班牙	瑞典	特立尼达和多巴 哥共和国	乌干达	英国伦敦	英国阿里斯塔	参考菌株
CC101	CC101-MSSA	3	-	3		1			1	1				
CC121	CC121-MSSA	16	-	16				2	8	4	1	1		
	CC121-MSSA [PVL+]	50	50	-	15	8		4	3		17	2	1	
CC140	CC140-MRSA-IV	2	-	2							2			
CC152	CC152-MSSA [PVL+]	8	8	-				2	1	2		1	2	
	CC152-MRSA-V [PVL+]	1	1	-		1								
CC188	CC188-MSSA	6	-	6	1			1	2	2				
	CC188-MSSA [PVL+]	2	2	-	1			1						
CC398	ICC398-MSSA	1	-	1		1								
	CC398-MSSA [PVL+]	1	1	-		1								
CC398 (ST391/813)	ST291/813-MSSA	1	-	1			1							
	ST291/813-MSSA [PVL+]	1	1	-			1							
CC425	ST425-MRSA-XI	1	-	1								1		
CC509	CC509-MSSA	1	-	1						1				
CC707	ST707-MSSA	1	-	1								1		
CC1021	CC1021-MSSA	1	-	1						1				
CC1290	CC1290/ST2481-MSSA	1	-	1										
ST2479	ST2479-MSSA [PVL+]	1	1	-						1				
ST2482	ST2482-MSSA [PVL+]	4	4	-			3			1				
未鉴定	agr IV/capsule 5 MSSA	1	-	1							1			

图 13(续)

国家（分离物的总数）	PVL 阴性 MSSA	PVL 阴性 MRSA	PVL 阳性 MSSA	PVL 阴性 MRSA
澳大利亚 (n=90)	14 (15.6%)	2 (2.2%)	37 (41.1%)	37 (41.1%)
德国 (n=50)	26 (52.0%)	4 (8.0%)	17 (34.0%)	3 (6.0%)
沙特阿拉伯 (n=53)	21 (39.6%)	8 (15.1%)	11 (20.8%)	13 (24.5%)
西班牙 (n=44)	11 (25.0%)	0 (0%)	23 (52.3%)	10 (22.7%)
瑞典 (n=114)	95 (83.3%)	0 (0%)	19 (16.7%)	0 (0%)
特立尼达和多巴哥共和国 (n=80)	32 (40.0%)	8 (10.0%)	35 (43.8%)	5 (6.2%)
乌干达 (n=62)	39 (62.9%)	4 (6.5%)	19 (30.6%)	0 (0%)

注：3 个澳大利亚，6 个德国，8 个沙特阿拉伯和所有英国的菌株从图 13 中的参考菌株中分离出来的用来作为此次分析，当被包括到此次研究中，因为 PVL 的状态为已知的

图 14

专利名称(译)	检测杀细胞的毒素(PVL)的装置和方法		
公开(公告)号	CN104185790A	公开(公告)日	2014-12-03
申请号	CN201280055383.1	申请日	2012-11-09
[标]申请(专利权)人(译)	美艾利尔圣地亚哥有限公司		
申请(专利权)人(译)	美艾利尔圣地亚哥公司		
当前申请(专利权)人(译)	美艾利尔圣地亚哥公司		
[标]发明人	R易瑞特 S莫列克 JJ瑞嘉麦 J布鲁且尔		
发明人	R·易瑞特 S·莫列克 J·J·瑞嘉麦 J·布鲁且尔		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	C07K16/1271 G01N33/56938 G01N33/53		
优先权	61/617974 2012-03-30 US 61/714649 2012-10-16 US 61/561767 2011-11-18 US 61/558848 2011-11-11 US		
其他公开文献	CN104185790B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供检测生物样本中生物分子，例如PVL,PBP2a和SPA的方法和装置。

培养参数	
接种物	来自冷库的一个珠子
培养基	Kato&Noda肉汤培养基
培养时间	18小时