(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 117015613 A
(43)申请公布日 2023.11.07

(21)申请号 202280022705.6
(22)申请日 2022.01.25
(30)优先权数据
FR2100708 2021.01.26 FR
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2023.09.19
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/FR2022/050133 2022.01.25
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2022/162303 FR 2022.08.04
(71)申请人 原子能和代替能源委员会
地址 法国巴黎
申请人 巴黎-萨克雷大学
(72)发明人 H·沃兰德 C·莫格特 T·纳斯
(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所 11105
专利代理师 张文辉
(51)Int.Cl.
C12Q 1/10(2006.01)

权利要求书2页 说明书51页 附图14页

(54)发明名称

检测β-内酰胺酶活性

(57)摘要

拥有高效、简单、快速和可运输的工具来可靠地鉴定对抗生素具有多重抗性的细菌，更具体地是肠杆菌科中最广泛的产生超广谱β-内酰胺酶(ESBL)的肠杆菌科至关重要。本发明通过其易用性和速度满足这一要求。本发明基于使用能够辨别β-内酰胺的β-内酰胺环的完整形式与其水解产物的抗体来检测β-内酰胺水解的酶活性。该抗体可以用于试剂盒和方法中，能够快速检测(在一小时内)菌落或样品中产生青霉素型、质粒介导的或过量产生的AmpC酶、ESBL或碳青霉烯酶的细菌的存在，而无需使用昂贵的设备(肉眼可见的小条)。

CN 117015613 A

1.用于检测样品中功能性、优选超广谱的β-内酰胺酶的存在的方法，所述方法使用至少一种特异性识别含有完整β-内酰胺环的抗生素分子的单克隆抗体，所述抗体不识别被水解时的相同的抗生素分子，并且含有完整β-内酰胺环的抗生素分子由所述抗体特异性识别。

2.根据权利要求1所述的方法，其包括以下步骤：

a)将所述样品与含有完整β-内酰胺环的所述抗生素分子接触，

b)将所述单克隆抗体与步骤a)结束时获得的样品接触，

c)检测所述单克隆抗体是否与所述完整抗生素复合。

3.根据权利要求1或2所述的方法，其依次包括以下步骤：

a)将待测样品与含有未标记的完整β-内酰胺环的所述抗生素分子接触，

b)将步骤a)后获得的样品与已预先固定化在固体支持物上的所述抗体接触，

c)将含有标记的完整β-内酰胺环的所述抗生素分子与所述抗体接触，或与含有所述抗体的步骤b)的样品接触，

d)检测所述抗体是否与步骤c)中添加的所述抗生素分子复合。

4.根据权利要求2所述的方法，其依次包括以下步骤：

a)将待测样品与含有未标记的完整β-内酰胺环的所述抗生素分子接触，

b)将步骤a)后获得的样品与已标记的所述抗体接触，

c)使步骤b)的溶液与已固定在固体支持物上的含有完整β-内酰胺环的所述抗生素分子接触，

d)检测所述标记抗体是否与步骤c)中接触的完整抗生素复合。

5.根据权利要求4所述的方法，其依次包括以下步骤：

a)将待测样品与含有未标记的完整β-内酰胺环的所述抗生素分子接触，

b)将步骤a)后获得的样品与所述抗体以及与至少一种特异性识别β-内酰胺酶的抗体接触，所述抗体已被标记，

c)将步骤b)的溶液与含有完整β-内酰胺环的所述抗生素分子以及与特异性识别β-内酰胺酶的抗体接触，所述抗体已固定化在固体支持物上，

d)检测所述标记的抗体是否与步骤c)中接触的完整抗生素和/或抗β-内酰胺酶抗体复合。

6.根据权利要求1至5中任一项所述的方法，其特征在于，所述样品含有细菌。

7.根据权利要求1至6中任一项所述的方法，其特征在于，所述固体支持物是条。

8.根据权利要求1至6中任一项所述的方法，其特征在于，所述抗体特异性识别β-内酰胺环完整的头孢噻肟或美罗培南。

9.条，其包含：

1)用于沉积样品的区域，其上已沉积有至少一种特异性识别含有完整β-内酰胺环的抗生素分子的抗体，所述抗体不识别被水解时的相同的抗生素分子，所述抗体已被预先标记，

2)反应区域，其包含：

-至少一条测试线，其上已固定化具有完整β-内酰胺环的抗生素，所述抗生素已用于产生沉积在沉积区域1)中的抗体中的至少一种，以及

-对照线，其上已固定化识别区域1)上存在的抗体的抗体，

和

3)促进抗体迁移的吸收区域,所述区域位于所述沉积区域1)的相对端。

10.权利要求9所述的条,其上还已沉积和/或固定化识别β-内酰胺酶的抗体,优选在所述沉积区域1)上和所述反应区域中的第二测试线上。

11.权利要求10的条,其包含:

-用于沉积所述样品的区域1),其上还已沉积识别β-内酰胺酶的抗体,所述抗体已被预先标记,

-所述反应区域2),进一步包括其上固定化识别β-内酰胺酶的抗体的至少一条测试线,

沉积在区域1)上的所述抗β-内酰胺酶抗体和固定化在所述反应区域2)上的所述抗β-内酰胺酶抗体,其优选地检测相同β-内酰胺酶的不同表位。

12.根据权利要求9、10或11中任一项所述的条,其特征在于,所述抗体特异性识别β-内酰胺环完整的头孢噻肟或美罗培南。

13.试剂盒,其包含:

-至少一个如权利要求9、10、11或12所述的条,以及

-含有具有完整β-内酰胺环的抗生素的单独容器,其已经用于获得固定化在所述条的沉积区域1)上的所述抗体,

-任选地,含有β-内酰胺酶和/或不含β-内酰胺酶的样品的单独容器。

14.特异性识别含有完整β-内酰胺环的抗生素分子的单克隆抗体用于检测样品中功能性、优选超广谱β-内酰胺酶的存在的用途,所述抗体不识别被水解时的相同的抗生素分子。

15.根据权利要求14的用途,其特征在于,所述抗体特异性识别选自β-内酰胺环完整的青霉素类、头孢菌素类、单环β-内酰胺类、碳青霉烯类和头霉素类的抗生素分子。

16.根据权利要求14或15的用途,其特征在于,所述抗体特异性识别选自β-内酰胺环完整的苄青霉素(青霉素G)、苯氧基甲基青霉素(青霉素V)、甲氧西林、双氯西林、氟氯西林、阿莫西林、氨苄西林、哌拉西林、替卡西林、阿洛西林、羧苄西林、头孢氨苄、头孢噻吩、头孢唑啉、头孢克洛、头孢呋辛、头孢孟多、头孢替坦、头孢西丁、头孢曲松、头孢克肟、头孢噻肟、头孢他啶、头孢吡肟、头孢洛林、头孢吡普、头孢匹罗、硫霉素、亚胺培南、美罗培南、厄他培南、多尼培南、氨曲南、头孢美唑和拉氧头孢。

17.根据权利要求14至16中任一项所述的用途,其特征在于,所述抗体特异性识别β-内酰胺环完整的头孢噻肟或美罗培南。

检测β-内酰胺酶活性

发明内容

[0001] 拥有高效、简单、快速和可运输的工具来可靠地鉴定对抗生素具有多重抗性的细菌,更具体地是肠杆菌科中最广泛的产生超广谱β-内酰胺酶(ESBL)的肠杆菌科至关重要。本发明通过其易用性和速度满足这一要求。本发明基于使用能够区分β-内酰胺的β-内酰胺环的完整形式与其水解产物的抗体来检测β-内酰胺水解的酶活性。该抗体可以用于试剂盒和方法中,能够()快速检测(在一小时内)菌落或样品中产生青霉素型、质粒介导的或过量产生的AmpC酶、ESBL或碳青霉烯酶的细菌的存在,而无需使用昂贵的设备(肉眼可见的小条)。

[0002] 现有技术的描述

[0003] 自1928年发现青霉素以来,其使用不断增长,大大降低了与感染性疾病相关的死亡率。然而,早在1940年,首次鉴定出对青霉素的抗性,这引发了对其针对某些细菌的有效性的质疑(Maugat,Berger-Carbonne,et Agence nationalede sécuritésanitaire de l'alimentation,de l'environnement et du travail(ANSES),《Consommation d'antibiotiques et résistance aux antibiotiques en France:une infectionévitée,c'est un antibiotique préservé!》2018)。一般来说,这种现象发生在新抗生素推出几年后,因为随着时间的推移,它在人和动物健康中大量且重复的使用产生了抗性的增加(Iredell,Brown,et Tagg,《Antibiotic Resistance in Enterobacteriaceae》,2016)。事实上,抗生素不仅作用于引起待治疗的负责感染的细菌,还作用于构成各种人类、动物和环境微生物群的所有细菌。因此,除了一些细菌天然具有抗性之外,所有细菌均能够通过染色体突变或者通过获得新的抗性机制来发展对抗生素的抗性((Maugat,Berger-Carbonne,et Agence nationalede sécuritésanitaire de l'alimentation,de l'environnement et du travail(ANSES),《Consommation d'antibiotiques et résistance aux antibiotiques en France:une infectionévitée,c'est un antibiotique préservé!》,2018)。此类抗性的出现与突现并不令人惊讶,因为大多数抗生素直接或间接衍生自天然微生物产物(Iredell,Brown,et Tagg,《Antibiotic Resistance in Enterobacteriaceae》,2016)。

[0004] 20世纪80年代初,第三代头孢菌素(3GC)的开发使得能够有效对抗肠细菌。然而,早在1983年,欧洲就观察到第一例抗性病例,除了已知的窄谱青霉素酶和头孢菌素酶外,还出现超广谱β-内酰胺酶细菌(以下简称"ESBL"细菌)。β-内酰胺酶导致β-内酰胺环的酰胺键打开,使抗生素剂无效并且细菌对其有害作用具有抗性。产生ESBL的细菌能够水解β-内酰胺类如青霉素以及各类头孢菌素(1GC、2GC、3GC、4GC、5GC)中存在的β-内酰胺环。它们主要由革兰氏阴性菌表达,并且特别是在肠杆菌中表达,这是抗生素抗性的主要来源(Bonomo,《β-Lactamases》,2017)。20世纪90年代,新的CTX-M型ESBL突现并迅速成为肠细菌临床分离株中最广泛的β-内酰胺酶。目前它们主要存在于大肠杆菌和肺炎克雷伯菌(Klebsiella pneumoniae)中(Cattoir,《Les nouvellesβ-lactamasesàspectreétendu(BLSE)》,2008)。

[0005] 这些产生ESBL的细菌构成了真正的公共卫生问题。更具体地说,这些细菌越来越

频繁地被分离出来,并且需要基于最后资源的抗生素(碳青霉烯类)进行严重感染的治疗,这导致通过碳青霉烯酶出现对碳青霉烯类药物的抗性(Perez et al.,《The Continuing Challenge of ESBLs》)。抗生素抗性的发展导致越来越多的治疗绝路,因此,如果不采取任何措施,从2050年起,感染性疾病将成为导致死亡的主要原因之一。

[0006] 目前对严重的产生ESBL的肠细菌感染的治疗依赖于碳青霉烯类或某些新型β-内酰胺酶抑制剂(阿维巴坦(avibactam)、雷巴坦(relebactam)、沃博巴坦(vaborbactam)),因为ESBL不具有水解这些分子的能力。然而,这些抗生素被用作最后的手段,以限制对它们具有抗性的株的出现。基于头孢菌素的抗生素治疗通常被作为第一响应,但如果感染细菌产生ESBL,则其证明是无效的。因此,有必要根据每种类型的感染性细菌的抗菌谱来调整对其的抗生素疗法,并且尽快进行以具有最佳治疗和高治疗成功率(Maugat,Berger-Carbonne,et Agence nationalede sécuritésanitaire de l'alimentation,de l'environnement et du travail(ANSES),《Consommation d'antibiotiques et résistance aux antibiotiques en France:une infectionévitée,c'est un antibiotique préservé!》)。

[0007] 为此,需要拥有强大、简单、快速和可运输的工具,以可靠地鉴定抗生素抗性细菌,特别是水解3GC且需要抗生素治疗的最终手段的细菌。

[0008] 在过去几年中,已经开发各种基因型和表型方法来检测和鉴定具有β-内酰胺酶活性并因此能够抵抗β-内酰胺类的细菌。这些方法中的每一种都包含大量测试,以满足不同的需求和目标。没有一种测试在所有情况下都是理想的,这解释了开发这些诊断测试的动机(Aguirre-Quiñonero et Martínez-Martínez,2017)。

[0009] 具体而言,专利文献中描述了以下方法:

[0010] -WO2008/114001

[0011] 该国际专利申请描述了一种用于检测ESBL细菌的试剂盒,其由含有杀伤革兰氏阳性菌的抗生素、抗真菌化合物、杀死非ESBL革兰氏阴性菌的抗生素和有色指示剂的培养基组成。通过将待测试的样品在36-37℃下放置在所述支持物上18-24小时并通过检测pH指示剂的颜色变化来检测ESBL细菌的存在,该变化是由于与ESBL细菌的生长相关的培养基的酸化造成的。这种比色法使用简单,但对颜色变化的解释是主观的。此外,这种颜色变化是由细菌生长缓冲的培养基的酸化引起的。因此,需要相对长的温育时间(16-24小时)才能揭示所寻找的细菌的存在。

[0012] -WO2011/154517

[0013] 该国际专利申请中描述的方法需要将细菌悬浮液与适当的底物(β-内酰胺类抗生素或β-内酰胺的定制衍生物)接触若干小时,然后用质谱仪(MALDI-TOF)测量与抗生素的水解产物对应的峰的出现(如果细菌含有β-内酰胺酶)。在活性β-内酰胺酶存在下,底物的分子量发生改变;水解产物的峰出现,而完整底物的峰减少。该方法具有缺点,如设备昂贵、具备资格的劳动力、缺乏自动解释质谱的软件(以确定峰和预期的精确质量)、现场不适应性以及有时方案的标准化模糊(不同的温育时间、使用的底物、质谱仪的校准、细菌裂解条件等)

[0014] -WO2011/107703

[0015] 该申请中描述的检测方法依赖于使用β-内酰胺酶的发色或荧光底物,从而使ESBL

细菌的存在能够被检测。为了实施该检测方法，有必要：a)浓缩生物样品中存在的微生物，任选地在培养微生物的步骤之后；b)将步骤a)中浓缩的微生物悬浮于包含至少一种β-内酰胺酶的发色或荧光底物的溶液中，所述发色或荧光底物在被待检测的β-内酰胺酶水解后能够释放发色团或荧光团；c)检测步骤b)中获得的发色团或荧光团的可能释放，检测到发色团或荧光团的释放指示β-内酰胺酶的存在以及因此指示ESBL细菌的存在。底物的水解导致培养基中出现有色或荧光信号。然而，对于具有弱酶促活性的酶来说，温育时间可能相对较长。此外，一些不太明显的着色可能难以解释，并且荧光底物需要读取装置。此外，这些底物可能对光敏感，如果必须在现场进行测试，这会带来问题。

[0016] -WO2013/72494

[0017] 该申请中描述的方法旨在检测产生超广谱β-内酰胺酶(水解头孢菌素的超广谱β-内酰胺酶)的细菌。该方法包括以下步骤：a)对样品进行细胞裂解；b)使步骤a)中获得的悬浮液的一部分与试剂盒反应，所述试剂盒包含：i)超广谱β-内酰胺酶底物，其选自由头孢菌素、氨曲南和头霉素组成的组，和ii)pH指示剂，该pH指示剂于溶液的pH在6.4至8.4之间时变色。这种pH的变化是由培养基中存在的导致羧酸功能的出现的头孢菌素水解引起。步骤b)中颜色的变化指示样品中产生超广谱β-内酰胺酶的细菌的存在。这种量热法使用简单，但是与WO2008/114001一样，对颜色变化的解释是主观的。此外，这种颜色变化是由细菌生长缓冲的培养基的酸化引起的。因此，需要相对长的温育时间(16-24小时)才能揭示所寻找的细菌的存在。

[0018] -WO2016/156605

[0019] 这种电化学方法可以通过使用仪器可见的电化学特性来确定ESBL细菌的存在。该技术的使用成本较高(昂贵的设备和具备资质的人员)。

[0020] -US2018/156796

[0021] 该美国专利申请描述了通过将样品与特异性识别含有水解β-内酰胺环的分子的抗体接触来检测样品中对具有β-内酰胺环的抗生素具有抗性的细菌的存在的方法。水解形式的抗生素固定化在支持物上，例如固定化在条(strip)上。在这些方法中，将水解抗生素的特异性的标记抗体与样品中的细菌接触，然后将混合物沉积在固定化有水解抗生素的条上。如果样品含有抗生素抗性细菌(“阳性”结果)，则标记抗体会被样品中大量存在的水解抗生素饱和，并因此将不与条上的固定化抗生素结合：那么条的测试区域上就没有信号。在相反的情况下，即如果样品含有非ESBL细菌(“阴性”结果)，则引入样品中的抗体将保持自由以与固定化在条上的水解抗生素结合，并且测试区域上的信号变强。在检测到所要检测的酶反应产物(即抗生素的水解形式)的出现时，样品中活性酶的存在因此通过信号的减少而显现。

[0022] 选择检测策略时，需要考虑若干因素，如：成本、获得结果所需的时间、测试的性能以及通过测试收集的信息。抗生素抗性的鉴定需要尽可能快速且准确，以便以最佳方式且尽快调整受感染患者的疗法，并通过鉴定受感染或定植的患者来最大限度地限制抗性株的传播。因此，这些测试对于卫生专业人员以及参与当地和国家层面预防细菌感染的人员来说非常重要(Lecour,《Détection des carbapenemases chez les entérobactéries》; Lutgring et Limbago,《The Problem of Carbapenemase-Producing-Carbapenem-Resistant-Enterobacteriaceae Detection》,2016)。

[0023] 本发明通过其易用性和速度满足这一要求。其基于酶促β-内酰胺水解活性的检测，使用特异性识别抗生素β-内酰胺环完整形式的抗体。然后将该抗体用于免疫层析试剂盒和测试中，以便获得非常快速的结果(不到一小时)，而无需使用昂贵的设备(肉眼可读的条)。这种抗体的使用使得可以将样品中活性酶或ESBL细菌的存在(“阳性”结果)与信号的出现关联，而不是如现有技术的许多文献所提出的相反。事实上，通过本发明的抗体(识别具有完整β-内酰胺环的抗生素)，可以通过测量信号的出现(这比观察信号的减少更容易)以可靠的、特异性的且可重复的方式测量底物(引入样品中的完整抗生素)的消失。

[0024] 因此，本发明的测试极其可靠：在40分钟内检测许多测试细菌中的头孢菌素酶活性(头孢噻肟水解的酶促活性)，获得了100％的灵敏度和100％的特异性(参见下面的例子)。

[0025] 作为本发明的发明目的的检测试剂盒和检测方法可以：

[0026] -便于能够水解β-内酰胺的细菌的检测(有色信号与阳性同义)

[0027] -任选地，确定检测到的细菌表达什么类型的酶，

[0028] -减少检测能够水解β-内酰胺的细菌的时间(现在需要不超过40分钟来获得结果)，

[0029] -检测所有产生β-内酰胺酶的细菌，无论是已知的还是未知的(即使在出现新突变的情况下也可以得出结论)

[0030] -使用免疫层析法，其在快速、成本、简单和灵敏度方面具有许多优点。

[0031] 发明描述

[0032] 本发明涉及用于检测β-内酰胺水解并由此揭示样品中产生β-内酰胺酶的细菌的存在的新方法。这些新方法基于使用发明人专门开发的抗体，以识别具有完整β-内酰胺环的抗生素(而不是其水解产物)。该抗体可以有利地用于下述检测试剂盒和检测方法中。非常有利地，这些试剂盒含有条(这也是本发明本身的方面)，本发明的抗体已经在条上沉积并干燥。

[0033] 在本发明的上下文中，已经产生并选择单克隆抗体用于特异性识别β-内酰胺型抗生素的完整形式(即，包含β-内酰胺核心)(参见实施例1和实施例2)。为了实现这一目标，设计并实施了免疫原(含有完整的β-内酰胺环)和选择测试。下面呈现的本申请的实施例1和实施例2描述了如何设计和产生这些免疫原，以及具有高度辨别力的抗体是如何能够被选择的。这些实施例中使用的抗生素是头孢噻肟，一种第三代头孢菌素(实施例1)，和美罗培南，一种被称为“碳青霉烯酶”的某些ESBL酶水解的新一代抗生素(实施例2)。

[0034] 如下面实施例中详细解释的，这些单克隆抗体是通过以下步骤获得的：

[0035] A)将含有完整β-内酰胺环的抗生素与远离β-内酰胺核心的大免疫原性分子(BSA或血蓝蛋白类型)偶联。这种偶联是通过对抗生素进行乙酰氯活化，然后将硫醇官能团接枝到大分子上，然后将两个活化的分子接触来进行的(该偶联步骤也可以通过本领域技术人员已知的各种常规化学方法来进行)。

[0036] B)通过给动物注射足够量(例如50μg)的完整抗生素和大的免疫原性分子来免疫小鼠。

[0037] C)对免疫动物产生的抗体进行取样，并鉴定识别完整β-内酰胺环的抗体(参见图1中呈现的测试)。

[0038] D)产生产生所选抗体的杂交瘤(来自与鼠类骨髓瘤细胞融合的免疫小鼠的脾细胞)。

[0039] E)分离孔中产生的每个杂交瘤并确认产生的单克隆抗体识别β-内酰胺环完整的抗生素(参见图1的测试和图9的测试1)。

[0040] F)鉴定并选择产生完全不识别β-内酰胺环被水解的抗生素的抗体的杂交瘤(图2和图9的测试2中的阴性抗体)。

[0041] G)使用不同浓度的完整的抗生素和水解的抗生素确定每种选定的抗体对于具有完整β-内酰胺环的抗生素的特异性(图2和图9的测试3和测试4)。

[0042] 通过使用该方案,发明人已经制备了许多产生不同的具有辨别力的抗体的杂交瘤,其对完整形式的β-内酰胺环具有非常强的亲和力(图2和图9的测试3中存在抑制剂下的信号较弱,在图2和图9的测试4中存在抑制剂下的信号没有减少)。这些抗体对完整形式的抗生素非常具有特异性(未观察到与水解形式的交叉反应;参见图3)。

[0043] 根据本发明的其他具有辨别力的抗体可以通过从另一种抗生素开始重复这些步骤来生成。

[0044] 本发明的抗体

[0045] 因此,在第一方面,本发明涉及特异性识别含有完整β-内酰胺环的抗生素分子的单克隆抗体,该抗体不识别水解时,即,该抗生素分子的β-内酰胺环已经例如被β-内酰胺酶水解时的相同的抗生素分子。因此,本发明的抗体能够独特地结合β-内酰胺环完整的抗生素。它因此可以辨别抗生素的两种形式,因为它将会在与完整形式的抗生素接触时复合,但在其以水解形式存在时保持游离。那么为了了解抗生素是完整形式还是水解形式,检测这些复合物的存在就足够了。这就是为什么本发明的单克隆抗体在下文中将被称为本发明的“具有辨别力的抗体”。

[0046] 在本发明的含义内,术语“完整的”与“非水解的”同义。因此,“完整的”β-内酰胺环是闭合的β-内酰胺环,因为它没有经历β-内酰胺酶的水解。推而广之,“完整”或“非水解”抗生素是β-内酰胺环闭合并因此具有功能的抗生素(更具体地,该环提供抗生素的抗菌作用)。另一方面,术语“水解的”表示β-内酰胺环开放的抗生素,因为它已经被β-内酰胺酶天然地(在天然样品中)或人工地(例如通过合成酶)水解。“水解”抗生素通常是无功能的,即它具有很少或没有抗菌作用。

[0047] 如本文所用,术语“单克隆抗体”是指来自同质抗体群体的抗体。更具体地,单克隆抗体群体中的各个抗体是相同的。换句话说,单克隆抗体由起源于单细胞克隆(例如杂交瘤、用编码同质抗体的DNA分子转染的宿主真核细胞、用编码抗体的DNA分子转染的宿主原核细胞,等)生长的同质抗体群组成。一般以重链和轻链为特征。单克隆抗体具有高度特异性,并针对单一抗原。“抗原”是预定的分子,在其上抗体可以选择性地结合到被称为表位的区域。在本发明的上下文中,靶表位包括抗生素的β-内酰胺环。

[0048] 在此,术语“特异性识别”是指本发明的单克隆抗体对完整靶抗生素具有非常强的亲和力,而对已经被例如β-内酰胺酶水解的抗生素具有非常弱的亲和力。优选地,其对于靶抗生素的解离常数K_d在大约10nM和大约1pM之间。更优选地,所述K_d在大约10pM和大约40pM之间。表述“K_d”是指给定抗体-抗原复合物的解离常数。$K_d = k_{off}/k_{on}$,其中k_{off}由抗体-抗原复合物的抗体解离的“解离速率”常数组成,k_{on}是抗体与抗原结合的水平(Chen Y.等,1999

年，分子生物学杂志，293:865-881)。还可以通过测量其缔合常数K_a来测量本发明的抗体与其靶标的亲和力，K_a对应于K_d的倒数。优选地，本发明的抗体对靶抗生素(具有完整的β-内酰胺环)的缔合常数K_a大于约10^9M^{-1}，更优选地大于$10^{11}M^{-1}$，并且还更优选地大于$10^{12}M^{-1}$。

[0049] 对靶标具有弱亲和力的抗体通常缓慢地与该靶标结合并且具有容易解离的倾向，而对靶标具有高亲和力的抗体通常与该靶标快速结合并且具有与其保持结合较长时间的倾向。本领域已知多种用于测量键亲和力的方法(例如通过平衡透析，或通过荧光，或用Biacore分析)，其中任何一种都可用于本发明的目的。例如，也可以使用图2和图9中所示的测试。

[0050] 本发明还靶向那些有功能的单克隆抗体片段(即，其特异性识别β-内酰胺环完整的抗生素分子，但在其水解时不识别)。该片段可以例如选自片段Fv、Fab、$(Fab')_2$、Fab′、scFv、scFv-Fc和双抗体。

[0051] 本发明的单克隆抗体可以通过常规手段使用任何能够通过培养细胞系产生抗体分子的已知技术来产生和分离。用于产生单克隆抗体的技术包括但不限于杂交瘤技术、人B细胞杂交瘤技术和EBV杂交瘤技术。

[0052] 本申请的实施例描述了如何获得根据本发明的特异性识别头孢噻肟或美罗培南作为靶抗生素的抗体。可以使用其他靶抗生素。

[0053] 在本发明的含义内，术语“靶抗生素”指任何已知在其化学式中含有β-内酰胺环的抗生素。也称为“beta-内酰胺抗生素”或“β-内酰胺抗生素”，可以选自分子结构中均含有β-内酰胺核心的青霉素类、头孢菌素类、单环β-内酰胺类和碳青霉烯类。

[0054] 具体地，靶抗生素可以是选自苄青霉素(青霉素G)、苯氧基甲基青霉素(青霉素V)、甲氧西林、双氯西林、氟氯西林、阿莫西林、氨苄西林、哌拉西林、替卡西林、阿洛西林和羧苄西林的青霉素。

[0055] 具体地，靶抗生素可以是选自头孢氨苄、头孢噻吩、头孢唑啉、头孢克洛、头孢呋辛、头孢孟多、头孢替坦、头孢西丁、头孢曲松、头孢克肟、头孢噻肟、头孢他啶、头孢吡肟、头孢匹罗、头孢洛林和头孢吡普的头孢菌素。

[0056] 具体地，靶抗生素可以是选自硫霉素、亚胺培南、美罗培南、厄他培南、比阿培南、替比培南和多尼培南的碳青霉烯类。这些新一代抗生素不会被所有的ESBL水解，而只能被某些称为“碳青霉烯酶”的ESBL酶水解。用这种类型的分子对动物进行免疫接种可能是有利的，以便产生辨别其完整形式和水解形式，并能够检测样品中碳青霉烯酶的存在的抗体。

[0057] 具体地，靶抗生素可以是单环β-内酰胺类，例如氨曲南。

[0058] 具体地，靶抗生素可以是选自头孢美唑和拉氧头孢的头霉素。

[0059] 在优选的实施方案中，本发明的具有辨别力的抗体特征在于，其特异性识别选自β-内酰胺环完整的青霉素类、头孢菌素类、单环β-内酰胺类、碳青霉烯类和头霉素类的抗生素分子。

[0060] 在一个更优选的实施方案中，本发明的抗体的特征在于，其特异性识别选自由以下组成的组的抗生素分子：β-内酰胺环完整的苄青霉素(青霉素G)、苯氧基甲基青霉素(青霉素V)、甲氧西林、双氯西林、氟氯西林、阿莫西林、氨苄西林、哌拉西林、替卡西林、阿洛西林、羧苄西林、头孢氨苄、头孢噻吩、头孢唑啉、头孢克洛、头孢呋辛、头孢孟多、头孢替坦、头孢西丁、头孢曲松、头孢克肟、头孢噻肟、头孢他啶、头孢吡肟、头孢匹罗、头孢洛林、头孢吡

普、硫霉素、亚胺培南、美罗培南、厄他培南、比阿培南、替比培南、多尼培南、氨曲南、头孢美唑和拉氧头孢。

[0061] 在另一个更优选的实施方案中，本发明的抗体的特征在于，其特异性识别选自由硫霉素、亚胺培南、美罗培南、厄他培南和多尼培南组成的组的抗生素分子。

[0062] 相反，当β-内酰胺环例如通过β-内酰胺酶的作用而被水解时，所述抗体不识别这些抗生素分子(或对其具有差的亲和力)。

[0063] 在本发明的上下文中，术语“β-内酰胺酶”是指以下酶：青霉素酶(例如TEM-1、SHV-1...)、头孢菌素酶(例如AmpC)、超广谱β-内酰胺酶(例如TEM、SHV、CTX-M...的衍生物)以及碳青霉烯酶。

[0064] 这里，“超广谱β-内酰胺酶”或“ESBL”是指具有青霉素酶谱的酶，其相对于第三代头孢菌素拓宽了其谱，并且保持被克拉维酸抑制。

[0065] “超广谱β-内酰胺酶”(或“ESBL”)是庞大且非常异质的细菌酶家族，于20世纪80年代先后在法国和德国被发现。它们由质粒(常见)或由编码SHVβ-内酰胺酶的克雷伯菌属天然基因组突变诱导。这两种机制使受影响的细菌能够水解多种青霉素和头孢菌素。大多数ESBL是天然β-内酰胺酶，尤其是TEM-1、TEM-2和SHV-1，基因突变的结果。它们对青霉素非常有效，对第一代头孢菌素具有中等活性。ESBL起源的基因突变扩展了这些酶的谱，并且还影响第三代头孢菌素类(头孢他啶和头孢噻肟)和单环β-内酰胺类(氨曲南)。

[0066] 下面的实施例解释了如何通过使用完整的抗生素分子(此处为头孢噻肟或美罗培南)或通过水解相关抗生素的酶(此处为CTXM-2酶或肺炎克雷伯菌碳青霉烯酶)水解的抗生素分子来鉴定本发明的抗体的存在。

[0067] 本发明的抗体对水解形式的抗生素的亲和力非常低。例如，其使得解离常数K_d远大于完整抗生素的解离常数(例如大100倍)或者其缔合常数K_a远小于完整抗生素的解离常数(例如小100倍)。

[0068] 本申请的实施例表明了如何获得特异性识别完整靶抗生素(头孢噻肟或美罗培南)的抗体。当头孢噻肟/美罗培南被β-内酰胺酶水解时，这些抗体无法识别。图2和图9中所示的测试使得选择可以用于在本发明的方法中检测ESBL细菌的合适的抗体成为可能。

[0069] 在下文呈现的某些实施方案中，以可检测形式可获得的本发明的抗体可以是有利的。这就是为什么本发明的抗体优选被可检测地标记，例如其与荧光染料、放射性离子、造影剂、金属离子、发色团、酶或肉眼可见或可通过成像检测的任何其他标志物偶联。

[0070] 本发明的抗体用于检测水解3GC的β-内酰胺酶的用途

[0071] 本发明还涉及本发明的具有辨别力的抗体(如上所述)在用于快速且非常可靠地检测任何样品中β-内酰胺酶的酶促活性，并因此检测具有β-内酰胺酶活性的细菌(也被称为“β-内酰胺抗性抗生素”)的存在的测试中的用途。更确切地，本发明的抗体可以用于快速且可靠地检测样品中具有超广谱β-内酰胺酶(ESBL)活性的细菌的存在。本领域从未提出使用抗体来检测此类细菌的存在。

[0072] 因此，在第二方面，本发明涵盖了如上所述的本发明的具有辨别力的抗体用于检测样品中功能性β-内酰胺酶、优选超广谱β-内酰胺酶的存在的用途。

[0073] 在本发明的上下文中，术语“样品”是指能够含有如上所述的β-内酰胺酶或表达此类酶的细菌的任何固态或液态的、生物或环境级分，所述酶能够具有功能。例如，它可以涉

及环境样品，或者另外是人、动物或植物生物流体。

[0074] 优选地，本发明方法中使用的样品含有细菌。

[0075] 如本文所用，术语“生物流体”是指从个体人、动物或植物获得的并且是流体或粘性的任何样品。例如，它可以是人或动物产生的生物液体，如尿液、脑脊液、胸膜液、滑液、腹膜液、羊水、胃液、血液、血清、血浆、淋巴液、间质液、唾液、生理分泌物、泪液、粘液、汗液、乳汁、精子、精液、阴道分泌物、溃疡和其他表面疹、水泡、粪便或脓肿的流体。其可以替代性地是由植物生成(或其已与植物接触)的流体，例如汁液、径流水或露水。

[0076] 在一个优选的实施方案中，所述样品，无论它是什么，都含有细菌。

[0077] 本发明的抗体可以用于任何免疫学测试，当其与样品接触时，能够明确检测到完整抗生素的量的减少。这种减少是由于样品中存在的β-内酰胺酶的作用，因此本发明的抗体将能够揭示它们的存在。

[0078] 本发明的抗体优选用于通过竞争性生物测试，即通过可检测信号的出现(而不是减少)来揭示β-内酰胺酶的存在的测试。在此类竞争性测试中，本发明的抗体将被标记或固定化，并且将放置与具有其特异性识别的完整环的本身将被标记或固定化的抗生素接触。在优选的实施方案中，所述测试涉及本发明的标记的(但可移动的)抗体和固定化的完整抗生素。在另一个优选的实施方案中，所述测试涉及本发明的固定化抗体、未标记的和标记的(但可移动的)完整抗生素。在另一个优选的实施方案中，所述测试完全在液相中进行，并且涉及使用本发明的抗体和相关抗生素，其已通过各种可检测标志物进行标记。如果使用不同的荧光团，则可以使用FRET技术测量抗体/抗生素的共定位。

[0079] 例如，可以通过比较在以下条件下获得的信号来检测活化的β-内酰胺酶的存在：

[0080] -在标记的完整抗生素(具有生物素或任何其他标志物)存在下，当样品在与孔中或支持物上的固定化的本发明抗体接触之前在完整抗生素存在下温育；

[0081] -当本发明的抗体在未与样品接触或与不含水解抗生素的酶的样品接触的情况下与完整抗生素接触时，然后与标记的完整抗生素接触(此时信号最小)。

[0082] -替代性地，本发明的抗体在与纯化的β-内酰胺酶温育后与完整抗生素接触，然后与标记的完整抗生素接触(此时信号最大)。

[0083] 当然，为了进行这样的实验，所使用的抗生素(完整形式)需要被本发明的抗体特异性识别。

[0084] 在某些优选的实施方案中，还可以使用能够检测某些CTX-M酶或碳青霉烯酶的抗体，以便表征哪种类型的酶负责使用本发明中描述的抗体和方法检测到ESBL。在给定的测试中，可以同时进行所涉及酶的活性检测和鉴定。

[0085] 本发明的方法和试剂盒

[0086] 在特定的方面，本发明涉及使用本发明的抗体和它们特异性识别的抗生素来检测产生功能性β-内酰胺酶的细菌的方法。

[0087] 当如上所述具有完整形式且任选标记的具有β-内酰胺环的抗生素与任选标记的抗体一起用于特异性检测(因为是如上所述使用所述抗生素作为免疫原性试剂产生的)，所述方法可以有利地包括以下步骤，依次为：

[0088] a)将待测样品与所述完整抗生素接触，

[0089] b)将所述抗体添加到样品中，

[0090] c)检测所述抗体是否与完整抗生素复合。

[0091] 然后可以将获得的信号与抗体和完整抗生素未与样品接触时(当它们与不含水解抗生素的酶的样品接触时)产生的信号进行比较,或者与在与抗体接触之前已被β-内酰胺酶水解的完整的抗生素接触时产生的信号进行比较。

[0092] 更准确地说,可以通过在以下条件下比较使用固定化抗体、完整抗生素和标记抗生素获得的信号来检测β-内酰胺酶活性的存在:

[0093] -当含有水解抗生素的酶的样品在与本发明的固定化抗体(在孔中或在支持物上)接触之前在完整抗生素存在下温育时,之后添加标记的抗生素(此时信号最大);

[0094] -当完整抗生素在未与样品接触,或与不含水解抗生素的酶的样品接触的情况下与本发明的抗体接触时,然后添加标记的抗生素(信号是最小值)。

[0095] 这些方法的设计目的是为了使步骤d)中检测到的信号与样品中存在的β-内酰胺酶的数量成比例。测试样品中酶的浓度越高,完整抗生素的水解速度越快,并且添加到样品中的抗体将保持游离以与随后接触的完整抗生素复合。在稍后检测完整抗生素与本发明抗体的结合时,样品中最初存在的酶浓度越高,信号强度越强。这些方法非常有利,因为检测信号的出现比检测信号的减少更容易且更可靠。

[0096] 在特定实施方案中,本发明旨在用于检测产生功能性、优选超广谱β-内酰胺酶的细菌的存在的方法,所述方法使用至少一种如本发明所定义的抗体和含有由所述抗体特异性识别的完整β-内酰胺环的抗生素分子。

[0097] 更具体地,所述方法使用i)具有完整β-内酰胺环的抗生素,如上所述,以标记形式和/或以未标记形式,和ii)至少一种特异地使得可以检测该完整抗生素的抗体,如上所述,通过使用所述抗生素或完整类似物如免疫原性剂产生,所述抗体固定化在固体支持物上或易于检测。

[0098] 除了特定的完整抗体之外,该方法还可以用于识别细菌表达的水解酶的已知捕获抗体。如果样品中的细菌具有ESBL活性,则此步骤可以确定哪种酶负责此活性,并根据此参数对细菌进行分类(或检测由于未知类型的酶而产生的活性)。特别地,为了完成所研究的样品含有ESBL细菌的信息,可以使用本领域已知的抗CTX-M或抗碳青霉烯酶抗体(例如在Bernabeu et al.,2020;Boutal et al.,2018中描述的那些)。

[0099] 本发明还涉及用于实施此类方法的试剂盒。该试剂盒至少含有本发明的抗体并且可能含有用于产生它的抗生素。任选地,它进一步含有用于标记抗生素和/或抗体以便能够检测其的装置。在特定试剂盒中,抗体和/或抗生素被固定化在固体支持物(例如条)上,或者已经被标记。

[0100] 本发明的方法,例如,依次包括以下步骤:

[0101] a)将待测样品与含有未标记的完整β-内酰胺环的所述抗生素接触,

[0102] b)将样品与已固定化在固体支持物上(或可检测的)的所述抗体接触,

[0103] c)将含有标记的完整β-内酰胺环的抗生素与所述抗体或含有所述抗体的步骤b)的样品接触,

[0104] d)检测所述抗体是否与步骤c)中接触的标记的完整抗生素复合,

[0105] 如果样品中不存在β-内酰胺酶,则添加到样品中的(未标记的)抗生素(步骤a)保持完整形式,本发明的抗体将与该完整抗生素结合并且将不能结合步骤c)中标记的完整抗

生素。相反，如果样品中存在酶，则(未标记的)抗生素将在步骤a)中被水解，并且本发明的抗体将保持游离以结合在步骤c)中标记的完整抗生素上。因此，当标记的抗生素结合在本发明的抗体上时，步骤d)中检测到的信号与样品中酶的存在成比例(样品中酶越多，信号增加，因为所施加的竞争是针对在未标记抗生素之后添加的标记抗生素的损害)。

[0106] 然后可以有利地将在样品存在下获得的信号与当抗体和完整抗生素没有与样品(或与不含有水解抗生素的酶的样品)接触时，或者当完整抗生素在与抗体接触之前已被β-内酰胺酶水解(阴性和阳性对照)生成的信号进行比较。

[0107] 也可以不使用标记的和未标记的抗生素，而使用以不同方式标记且可以彼此区分开的抗生素。

[0108] 如果抗体是固定化的，则可以在抗体固定化的地方观察到信号的出现。如果抗体以可检测的方式标记，则可以观察两个抗体/抗生素标记的共定位，例如通过荧光共振能量转移(FRET)。

[0109] 在用户希望鉴定哪些β-内酰胺酶或ESBL酶由细菌表达并且由于本发明的测试而证明具有活性的的情况下，所述用户还可以将含有细菌的样品与特异性地识别这些酶(例如抗CTX-M或碳青霉烯酶)的已知抗体接触，这些抗体已被标记和/或已固定化以用于更好的后续检测。

[0110] 本发明还涉及用于实施此类方法的试剂盒。该试剂盒至少含有本发明的抗体和任选地用于产生它的抗生素。它还任选地含有用于标记抗生素以便能够检测它的手段和/或用于检测β-内酰胺酶的已知抗体。在特定试剂盒中，提供已固定化在固体支持物(例如条)上或已标记的抗体。

[0111] 在另一个特定实施方案中，本发明涉及用于检测产生功能性β-内酰胺酶的细菌的方法，所述方法至少使用i)具有完整形式的β-内酰胺环的抗生素，如上所述，和ii)用于特异性检测该完整抗生素的抗体，其如上所述通过使用所述抗生素作为免疫原性剂而产生，所述抗体被标记以便可检测。

[0112] 根据本发明的方法，例如，其依次包括以下步骤：

[0113] a)将待测样品与含有完整β-内酰胺的抗生素接触

[0114] b)将步骤a)后的样品与已标记的抗体接触，

[0115] c)将步骤b)后获得的抗体与已固定化在固相支持物上的含有完整β-内酰胺环的抗生素接触，或添加与抗体分开标记的完整抗生素，

[0116] d)检测所述标记抗体是否与步骤c)中接触的完整抗生素复合。

[0117] 如果样品中不存在β-内酰胺酶，则添加到样品中的抗生素(步骤a后未标记)将保持完整形式，本发明的抗体将与该完整抗生素结合并且将不能结合在步骤c)中标记的完整抗生素。相反，如果样品中存在酶，则步骤a)中添加的(未标记的)抗生素将被水解，并且在步骤c)期间，步骤b)中的本发明的标记抗体将保持游离以结合在固定化的或标记的完整抗生素上。因此，当固定化抗生素结合在本发明的标记抗体上时，步骤d)中检测到的信号与样品中酶的存在成比例(样品中酶越多，信号增加得越多，因为所施加的竞争是对固定化抗生素的损害)。

[0118] 如前所述，可以有利地将在样品存在时获得的信号与当抗体和完整抗生素没有与样品(或与不含有水解抗生素的酶的样品)接触时，或者当完整的抗生素在与抗体接触之前

已被β-内酰胺酶水解时(阴性和阳性对照)生成的信号进行比较。

[0119] 如果抗生素是固定化的,则可以在抗生素固定化的地方观察到信号的出现。如果抗生素被标记,则可以例如通过荧光共振能量转移(FRET)来观察与本发明的抗体的共定位。

[0120] 如上所述,在用户希望鉴定哪些是β-内酰胺酶或ESBL酶的情况下,他还可以将含有细菌的样品与特异性识别这些酶的已知抗体(例如抗CTX-M或碳青霉烯酶)接触,这些抗体已被标记和/或已固定化以用于更好的后续检测。

[0121] 在该特定实施方案中,本发明的方法,例如,包括以下步骤:

[0122] a)将待测样品与含有未标记的完整β-内酰胺环的抗生素分子接触,

[0123] b)将步骤a)后获得的样品与本发明的抗体(其特异性识别步骤a)中添加的抗生素的完整形式)以及与至少一种特异性识别β-内酰胺酶(例如CTX-M或碳青霉烯酶)的抗体接触,所述抗体已预先标记,

[0124] c)将步骤b)的溶液与所述包含完整β-内酰胺环的抗生素分子和特异性识别β-内酰胺酶(例如CTX-M或碳青霉烯酶)的抗体接触,所述抗体已固定化在固体支持物上,

[0125] d)检测所述标记抗体是否与步骤c)中接触的完整抗生素和/或与抗β-内酰胺酶复合的抗β-内酰胺酶抗体复合。

[0126] 本发明还涉及用于实施此类方法的试剂盒。该试剂盒至少含有本发明的抗体和任选地用于产生它的抗生素。它还任选地含有用于标记抗体以便能够检测它的手段和/或用于检测β-内酰胺酶的已知抗体。在特定试剂盒中,抗生素以游离形式(对于步骤a))提供,也以固定化在固体支持物(例如条)上的形式提供,或者已经标记。

[0127] 通过使用本发明的具有辨别力的抗体以及用于获得它的抗生素,可以开发其他或多或少复杂的测试。

[0128] 本发明的所有试剂盒还可以含有β-内酰胺酶,其能够用于验证本发明的抗体的特异性。

[0129] 本发明的所有试剂盒还可以含有不含β-内酰胺酶的对照样品。

[0130] 本发明的所有试剂盒还可以包含用于检测本发明的标记抗体的工具(例如,识别小鼠免疫球蛋白恒定部分的抗体)。

[0131] 最后,本发明的所有试剂盒可以包含用于向用户解释要进行的实验的细节的说明书,以便以快速且有效的方式检测产生功能性β-内酰胺酶的细菌。

[0132] 本发明的条

[0133] 在特定实施方案中,本发明的免疫学测试是具有检测“条”作为支持物的免疫层析测试。在这种情况下,本发明的测试被称为“条测试”并且本发明的方法中使用的固体支持物是条。该条构成了本发明的一个特别重要的方面。

[0134] 事实上,本发明人已经证明本发明的抗体可以有利地用于条测试。因此,本发明的抗体优选偶联至荧光染料或发色团,或偶联至肉眼可见的任何其他标志物,例如胶体金。

[0135] “条测试”是一种简单、快速且廉价的检测系统,非专业人员也可以在现场使用。条通常由三个不同的区域形成,这些区域固定在通常为塑料的支持物上:1)促进迁移的吸收区域,2)反应区域(通常为硝化纤维素膜形成)和3)沉积区域,其中待测样品沉积在吸收区域的另一端(参见图5)。将抗体沉积在吸收区域上并干燥,抗体由于针对待检测的靶标并与

能够获得一般比色法或荧光信号的分子结合，也称为“示踪剂”抗体。在本发明的上下文中，所述“示踪剂”抗体将是如上所述的本发明的具有辨别力的抗体。

[0136] 反应区域中通常存在两条线。这些线中的第一个被称为“测试”线(TL)，将由带有β-内酰胺环的抗生素构成。在此测试线上获得的信号将表明样品中是否存在β-内酰胺酶。第二条线，称为“对照”线(CL)，将由针对本发明抗体的抗体组成。

[0137] 有利地，识别β-内酰胺酶的抗体也可以固定化在本发明的条上，如图10所示。优选地，这些抗体被标记并沉积在沉积区域上，并且还固定化在一条或多条测试线上，但可以与含有固定化抗生素的那些相区别。

[0138] 在这种情况下，本发明的条可以包含多条测试线和一条对照线。一条测试线将对应与已固定化有与BSA或另一种携带结构(例如酪蛋白、葡聚糖或聚赖氨酸)偶联的完整抗生素的区域，而其他测试线将对应于已固定化有抗β-内酰胺酶抗体的区域。在这种情况下，沉积区将有利地含有本发明的抗体以及抗β-内酰胺酶抗体，全部以可检测的方式标记(所使用的标志物是不同的或相同的)。

[0139] 在该特定实施方案中，优选在沉积区域上沉积抗β-内酰胺酶抗体，该抗β-内酰胺酶抗体识别靶酶的表位，该表位与固定化在专用测试线上的抗β-内酰胺酶抗体所识别的表位不同(因此，这两个抗体群识别相同的β-内酰胺酶)。因此，检测靶酶的存在将更加可靠。

[0140] 如果样品中的细菌表达可被沉积区域上存在的标记抗体识别的β-内酰胺酶，则这些细菌将与β-内酰胺酶结合，并且该酶也将能够结合在固定化在测试区的抗-β-内酰胺酶抗体上。因此，与这些抗体相对应的测试线上的标记将是可见的，并且可以推断具有ESBL活性的细菌是否表达被固定化在该线上的抗体所识别的酶。

[0141] 反应区域还可以包含多个测试线，其上固定化有各种抗生素。在这种情况下，多种单克隆抗体、这些抗生素之一的特异性示踪剂将有利地存在于沉积区域中。例如，反应区域可以包含结合有具有完整β-内酰胺环的抗生素A的测试线，以及结合有具有完整β-内酰胺环的抗生素B的测试线，B与A不同。在沉积区域中，有利地沉积了辨别完整抗生素A和B以及水解抗生素A和B的单克隆抗体，使得如果测试样品中存在β-内酰胺酶，则信号将出现在两条线上。

[0142] 在这种背景中，沉积辨别碳青霉烯类的完整形式和水解形式的抗体也是有利的，这些新一代抗生素已知对除了碳青霉烯酶之外的ESBL酶具有抗性。下面的实施例2准确地描述了如何获得此类抗体，其可用于本发明的方法和试剂盒中。

[0143] 在该特定实施方案中，区分碳青霉烯的完整形式和水解形式的抗体沉积在沉积区域上，并且完整的碳青霉烯抗生素固定化在测试线上。本发明的测试可以鉴定样品中碳青霉烯酶的存在，并因此鉴定潜在的表达这些酶的细菌的存在。

[0144] 在更优选的实施方案中，本发明的条包含至少两条测试线，其上分别固定化有完整形式的非碳青霉烯类抗生素(例如头孢菌素)和完整形式的碳青霉烯类抗生素，以便鉴定样品中是否存在除碳青霉烯酶(例如头孢菌素酶等)以外的ESBL酶和碳青霉烯酶。被标记(可能用不同标志物)的各个具有辨别力的抗体本身沉积在沉积区域上。如上所述，本发明的条在其反应区域中还可以包含其他已经固定化有抗β-内酰胺酶抗体的测试线。

[0145] 如果样品中不存在酶，则添加到样品中的抗生素将保持完整形式，本发明的抗体将结合该完整抗生素并且将不再能够结合TL的完整抗生素。相反，如果样品中存在酶，则添

加的抗生素将被水解，并且本发明的抗体将保持自由结合在TL上固定化的完整抗生素上。在这两种情况下，游离抗体，即那些没有固定化在测试线上的抗体，将在对照线上被本发明的抗体捕获。

[0146] 本发明的测试条被设计成测试线处的信号随着样品中存在的β-内酰胺酶的量而增加。测试样品中酶的浓度越高，抗生素的水解速度越快，抗体与添加的抗生素形成的复合物越少，并且与TL的结合越多：TL上的信号强度因此会随该浓度增加。

[0147] 此外，本发明的测试条非常可靠，因为它将信号的出现(而不是信号的消失)与酶的量联系起来。无论如何，众所周知检测信号的出现比检测信号的减少更容易且更可靠。

[0148] 在该优选实施例中，本发明的条可以通过以下方式制备：

[0149] -优选标记的本发明抗体沉积在沉积区域上，例如干燥，

[0150] -任选地，优选标记的抗β-内酰胺酶抗体也沉积在沉积区域上。

[0151] -具有完整β-内酰胺环的抗生素固定化在TL上的反应区域(例如，使用BSA抗生素系统，可以将抗生素固定化在硝化纤维素上，同时允许其与标记抗体相互作用)。

[0152] -任选地，抗β-内酰胺酶抗体也固定化在反应区域的另一条线上，

[0153] -识别沉积在条的沉积区域上的抗体的抗体(本发明的抗体和任选的抗β-内酰胺酶抗体)例如通过吸附被固定化在与TL相对的CL上。

[0154] 因此，在特定方面，本发明涉及条，其包含(参见图5和图10)：

[0155] 1)用于沉积样品的区域，其上已经标记、沉积并干燥了如上定义的抗体，以及任选地标记的抗β-内酰胺酶抗体，

[0156] 2)反应区域，包括：

[0157] -至少一条测试线，其上已固定化有具有完整β-内酰胺环的抗生素，该抗生素已用于产生沉积在沉积区1)中的至少一种抗体，并且

[0158] -任选地至少一条其上已固定化有抗β-内酰胺酶抗体的测试线，

[0159] -对照线，其上已固定化有识别区域1)上存在的抗体的抗体，以及

[0160] 3)促进抗体迁移的吸收区域，所述吸收区域位于与沉积区域1)相对的一端。

[0161] 标记的抗体沉积并储存在条的表面上，优选通过干燥。它们也可以在样品沉积在条上之前添加到样品中。

[0162] 反应区域优选由硝化纤维素或PVDF、纤维素或玻璃纤维制成。

[0163] 抗生素在TL上的固定化优选通过吸附与BSA或另一载体分子(例如酪蛋白、葡聚糖或聚赖氨酸)偶联的抗生素来实现，这使得有可能使必须捕获向吸收区域迁移的本发明抗体的β-内酰胺环保持可接近。还可以吸收与生物素偶联的抗生素复合的BSA-链霉亲和素，或者将抗生素与直径大于用于反应区域的膜的孔隙率的珠偶联。可以使用本领域已知的用于固定化小分子的其他结合技术。

[0164] 在对照线上，识别本发明条上使用的抗体的抗体是，例如，抗鼠类免疫球蛋白恒定部分抗体的蛋白A、蛋白G，或识别鼠类抗体的任何其他系统。

[0165] 与常规的竞争测试一样，需要严格控制固定化或标记的抗体和抗生素或底物的数量。抗体数量太大需要高浓度的底物才能占据所有键合位点，因此需要更高浓度的β-内酰胺酶才能显著减少这些位点的占据。同样，太高浓度的标记或固定化抗生素会导致抗体与底物的结合产生非常高的竞争，即使在没有β-内酰胺酶或使用过量的底物以维持该相同底

物对抗体的键合位点的完全占据的情况下也会引起信号的出现。过量的底物会导致灵敏度大幅降低或温育期更长。

[0166] 下面给出了说明这些优化步骤的实例。从表5中可以看出，能够使信号完全消失的底物浓度并不相同，这取决于针对每种抗体进行优化的标记或固定化抗体和抗生素的量。因此，能够占据所有键合位点(这通过条上的信号消失来体现)的抗体2的底物浓度更高。

[0167] 本领域技术人员在监测本发明中提及的指标时理解，根据所使用的发色团和分析物调整这些参数是重要的。本领域技术人员能够使用现有技术和下面实施例中提供的解释来鉴定对于其识别的完整抗生素具有给定亲和力的抗体的每种分析物的最佳量。特别理解的是，沉积在沉积区域上的抗体的量必须使得其能够饱和与本发明的方法中或条上使用的完整抗生素结合的所有位点。此外，明白最小量是指能够在含有抗生素的测试线上获得最大信号的量。

[0168] 对于用胶体金标记的头孢噻肟(实施例1)，沉积在沉积区域上的抗体的最佳量是沉积10μL相对于胶体金吸光度-DO-介于0.1和10之间的溶液。此外，固定化在TL线上的抗生素的最佳量(1μL/cm)理想地在1μg至1mg/mL之间。例如，当使用BSA-抗生素偶联时，约0.1mg/mL的浓度产生优异的结果。

[0169] 一般而言，对于对其特异性识别的完整抗生素具有强亲和力的其他抗体(K_d在1pM至约10nM之间)，有利的是通过以在10μg与1mg/mL之间、50μg与1mg/mL之间、100μg与1mg/mL之间、或50μg与0.5mg/mL之间的浓度每cm沉积1μL溶液来在条的TL线上固定化一定量的完整抗生素，以及用过使用10μL具有介于0.1和10之间的DO(如果用胶体金标记)的溶液以在沉积区域沉积一定量的抗体。

[0170] 为了便于使用本发明的条，可以将本发明的条插入塑料盒中。

[0171] 含有本发明的条的本发明的试剂盒

[0172] 在沉积到沉积区上之前，需要将具有完整β-内酰胺环的抗生素添加到待测试的样品中，然后将其与本发明的条接触。

[0173] 在第三方面，本发明还涉及一种试剂盒，除了本发明的条之外，还含有具有完整β-内酰胺环的抗生素，该抗生素已用于获得本发明的抗体，并且其固定化在条的沉积区域1)上。该抗生素优选地包含在与条隔离的单独容器中。

[0174] 例如，如果本发明的抗体是通过用抗生素头孢噻肟免疫动物而产生的(参见下面的实施例1)，那么本发明的试剂盒将含有其上沉积有所述完整抗头孢噻肟抗体的条，并且所述完整抗生素被固定化，以及含有完整头孢噻肟抗生素的小瓶或管。

[0175] 例如，如果本发明的抗体是通过用类似物碳青霉烯类免疫动物而产生的(参见下面的实施例2)，则本发明的试剂盒将含有其上沉积有所述完整抗碳青霉烯类抗体的条，并且所述完整抗生素被固定化，以及含有完整碳青霉烯类抗生素的小瓶或管。

[0176] 因此，用户将拥有用于实施本发明的测试的所有元件，并且可以向待测试的样品临时添加试剂(抗生素)，这将使得可以实施本发明的测试(参见下文)。

[0177] 为了检查测试条是否具有适当的特异性，本发明的试剂盒还可以包括含有功能性β-内酰胺酶的容器。因此，用户可以例如比较待测样品中(即，当可能存在内源性β-内酰胺酶时)或添加外源性酶时获得的信号差异。此步骤可以用于检查测试是否正常运行。

[0178] 如上所述，该试剂盒还可以含有不含β-内酰胺酶的对照样品、用于检测本发明的

标记抗体的手段(例如,识别小鼠免疫球蛋白恒定部分的抗体)和/或用于向用户解释要实施的实验的详细信息以便快速且高效地检测产生功能性β-内酰胺酶的细菌的说明书。

[0179] 因此,本发明更具体地涉及试剂盒,其包含:

[0180] -至少一个本发明的条,以及

[0181] -含有具有完整β-内酰胺环的抗生素的单独容器,用于获得固定化在条沉积区域1)上的抗体,

[0182] -任选地,含有β-内酰胺酶和/或不含β-内酰胺酶的样品的单独容器。

[0183] 使用本发明的条的本发明的方法

[0184] 在最后一个方面,本发明涉及用于检测能够含有β-内酰胺酶的样品中的β-内酰胺酶的方法。上面已经描述了所述样品。

[0185] 在优选的实施方案中,所述方法使用的条或含有该条的本发明的试剂盒,如上所述。

[0186] 该方法执行以下步骤:

[0187] a)将具有完整β-内酰胺环的抗生素与待测样品接触,所述抗生素被本发明的抗体特异性识别,标记并沉积在条上,并固定化在条的TL线上。

[0188] b)温育足够的时间,使得样品中任选存在的酶可以水解抗生素的完整β-内酰胺环,

[0189] c)在该温育之后,将样品(例如100μL)沉积在条的沉积区域上,或将条浸泡在样品中并使其反应足够的时间,

[0190] d)读取条的测试线上的结果。

[0191] 对于使用TL(例如TL:完整抗生素)进行检测(图5),会出现两种情况,具体取决于待测样品中有效含有的细菌或酶(图6):

[0192] 情况1:待测样品中含有不产生β-内酰胺酶的细菌。温育时间后,样品(含有完整的抗生素和细菌)沉积在条的沉积区域上。抗生素没有被水解(因为样品中没有活化的β-内酰胺酶),其与本发明的抗体之间形成复合物。迁移到测试线后,以这种方式复合的抗体不能与固定化在那里的抗生素结合。相反,抗体将被本发明的抗抗体抗体固定化在对照线(CL)上。因此只有CL可见。测试将为阴性,并且可以得出待测样品中不存在产生β-内酰胺酶的细菌的结论。

[0193] 情况2:待测样品含有产生β-内酰胺酶的细菌。温育一段时间后,样品不再含有完整的抗生素,因为β-内酰胺酶已将其水解。当其沉积在条的沉积区上时,水解的抗生素和本发明的抗体之间不形成复合物。本发明的抗体(其键合位点是游离的)向测试线迁移,在测试线处它可以与固定化在测试线上的完整抗生素结合。本发明的过量抗体本身被抗抗体抗体固定化在对照线(CL)上。在这种情况下,两条线(测试线和对照线)是可见的。该测试被宣布为阳性,表明样品中存在产生β-内酰胺酶(ESBL或其他β-内酰胺酶)的细菌。

[0194] 对于使用两个TL(例如,TL1:完整抗生素;TL2:抗CTX-M)的检测(图10),会出现四种情况,具体取决于存在的细菌产生的β-内酰胺酶(图11):

[0195] 情况1:待测样品中含有不产生β-内酰胺酶的细菌。温育时间后,样品(含有完整的抗生素和细菌)沉积在条的沉积区域上。抗生素没有被水解(因为样品中没有活化的β-内酰胺酶),其与本发明的抗体之间形成复合物。标记的抗CTX-M抗体不结合酶CTX-M。迁移至测

试线1(TL1)后,由此复合的本发明的抗体将不能将其自身结合到固定化在那里的抗生素上。标记的抗CTX-M抗体不与酶复合,它们将不能被测试线2(TL2)上的第二抗CTXM抗体结合。相反,抗体将被抗抗体抗体固定化在对照线(CL)上。因此,只有CL可见。测试将为阴性,并且可以得出待测样品中不存在产生β-内酰胺酶的细菌的结论。

[0196] 情况2:待测样品含有产生β-内酰胺酶的细菌,但不含CTX-M酶。温育一段时间后,样品不再含有完整的抗生素,因为β-内酰胺酶已将其水解。当样品沉积在条的沉积区上时,水解的抗生素和本发明的抗体之间没有形成复合物。标记的抗CTX-M抗体不结合CTX-M酶。本发明的抗体,其结合位点是游离的,向测试线迁移,在测试线处它可以结合在测试线1(LT1)处固定化的完整抗生素。标记的抗CTX-M抗体不与酶复合,它们将不能被测试线2(TL2)上的第二抗CTXM抗体结合。抗CTX-M抗体和过量的本发明抗体本身被抗抗体抗体固定化在对照线(CL)上。在这种情况下,测试线1和对照线是可见的。该测试被宣布为阳性,得出结论存在产生β-内酰胺酶(ESBL或其他β-内酰胺酶)的细菌,但该酶不是能够水解样品中抗生素的CTX-M酶。

[0197] 案例3:待测样品中含有产生CTX-M型β-内酰胺酶的细菌。温育一段时间后,样品不再含有完整的抗生素,因为β-内酰胺酶已将其水解。当样品沉积在条的沉积区上时,水解的抗生素和本发明的抗体之间没有形成复合物。抗CTX-M抗体结合存在的酶CTX-M。本发明的抗体,其结合位点是游离的,向测试线迁移,在此它可以结合在测试线1(TL1)处固定化的完整抗生素。测试线2(TL2)上存在的抗CTX-M抗体结合与标记的抗CTXM抗体复合的CTX-M酶。抗CTX-M抗体和过量的本发明抗体被抗抗体抗体固定化在对照线(CL)上。在这种情况下,测试1、测试2和对照线可见。该测试被宣布为阳性,得出结论存在产生CTX-M型β-内酰胺酶(ESBL或其他β-内酰胺酶)的细菌,能够水解样品中的抗生素。

[0198] 在该方法的步骤a)中,将完整形式的抗生素(或“底物”)添加到待测试的样品中。可以调整完整抗生素的量以使测试的灵敏度达到最佳。为了使本发明的测试起作用,添加到样品中的底物的量需要能够占据使用的抗体的所有结合位点,但不要过量。因此,当底物的量不再足以占据本发明抗体的所有结合位点时,将出现信号。过量的底物不允许检测到低浓度的酶,或者需要较长的温育时间,这与快速和简单的测试不相容。

[0199] 本领域技术人员通过监测本发明(特别是实施例中)提及的指示将能够确定在该方法的初始步骤中添加到样品中的完整抗生素的量,以便能够占据所用抗体的所有结合位点,而不会过量。

[0200] 当使用本发明的抗头孢噻肟抗体时(参见下面的实施例1),可以在初始样品中添加例如10ng/mL至50ng/mL之间的头孢噻肟抗生素。

[0201] 更一般地,对于对其特异性识别的完整抗生素具有强亲和力的其他抗体(K_D在1pM到大约10nM之间),可以在初始样品(包含产生或不产生β-内酰胺酶的细菌)中添加浓度在1ng/mL到1μg/mL之间、10ng/mL到1μg/mL之间、50ng/mL到1μg/mL之间、100ng/mL到1μg/mL之间或100ng/mL到0.5μg/mL之间的完整抗生素。

[0202] 温育步骤b)可以在环境温度下进行。

[0203] 可以调整该步骤的持续时间,以使测试的灵敏度达到最佳。当使用头孢噻肟时(参见下面的实施例1),该温育步骤可以持续10分钟到1小时。在测试条件下,持续30分钟即可获得良好的结果。

[0204] 一般来说，对于对其特异性识别的完整抗生素具有强亲和力的其他抗体(K_D在1pM至约10nM之间)，最佳温育时间为10分钟至1小时。

[0205] 一旦样品与沉积区域接触，在步骤c)开始时，应允许抗体有时间迁移到测试线和对照线。此迁移步骤可能持续5到30分钟。当使用头孢噻肟时(参见下面的实施例1)，在测试条件下，持续时间为10至20分钟就获得了良好的结果。

[0206] 因此，在使用头孢噻肟的情况下，可以在将样品和抗生素接触后约40分钟执行读取结果的步骤d)。

[0207] 一般来说，对于对其特异性识别的完整抗生素具有强亲和力的其他抗体(K_D在1pM到大约10nM之间)，将样品与条接触后大约10分钟到1小时(优选20分钟到40分钟)即可读取结果。

[0208] 该方法的所有步骤都可以在环境温度下进行。

[0209] 为了可利用，本发明的方法需要能够在最短时间内、理想地在不到一小时内给出可靠的结果。

[0210] 发明人已经能够证明，在下面实施例中使用的条件下，本发明的测试具有优异的100％的特异性和100％的灵敏度。

[0211] 在使用本发明的条之前制备待测试的样品可能是有利的，特别是如果样品是固体的话。

[0212] 如果样品是固体(例如土壤)，则可以在进行将其与抗生素接触的步骤之前通过添加缓冲液来稀释样品。该缓冲液可能含有例如NaCl、已知可减少非特异性相互作用的分子(PVP、PVA、BSA)和去污剂(Tween 20)。其pH优选为8。NaCl的浓度优选接近150mM。

[0213] 优选地，进行细胞裂解以释放样品细菌中可能含有的β-内酰胺酶并使其活性更快可见。可以使用常规的裂解缓冲液(参见下面的实例)。

[0214] 如果样品是液体(例如生物流体)，则可以通过在进行将其与抗生素接触的步骤之前添加缓冲液来稀释样品。该缓冲液可能含有例如NaCl、已知可减少非特异性相互作用的蛋白质(PVP、PVA、BSA)和去污剂(Tween 20)。其pH优选为8。NaCl的浓度优选接近150mM。

[0215] 本领域技术人员知道如何获得此类可利用的样品。与现有技术的其他测试不同，细菌浓度没有上限。

[0216] 这些制备步骤不得影响样品中可能存在的β-内酰胺酶的活性。

[0217] 附图

[0218] 图1描述了在选择可用于本发明系统的感兴趣抗体中使用的免疫酶促测试1的原理。该测试涉及非水解的头孢噻肟-生物素(NH)、来自杂交瘤或使用头孢噻肟和链霉亲和素-乙酰胆碱酯酶(G4)免疫的小鼠血浆的抗体。乙酰胆碱酯酶与色原反应以产生有色产物。

[0219] 图2描述了用于选择可用于本发明的系统的感兴趣抗体的三种其他感兴趣的免疫酶促测试的原理。

[0220] 测试2使用：水解头孢噻肟-生物素(H)+杂交瘤抗体或用头孢噻肟+链霉亲和素-G4免疫的小鼠血浆

[0221] 试验3使用：非水解头孢噻肟-生物素(NH)+非水解头孢噻肟(NH)+杂交瘤抗体或头孢噻肟+链霉亲和素-G4免疫的小鼠血浆

[0222] 测试4使用：非水解头孢噻肟-生物素(NH)+水解头孢噻肟(H)+杂交瘤抗体或用头

孢噻肟+链霉亲和素-G4免疫的小鼠血浆

[0223] 图3A和图3B代表用水解或非水解头孢噻肟以及所考虑的各种单克隆抗体获得的竞争曲线(实线:非水解头孢噻肟;虚线:水解头孢噻肟)。A:三种抗体与非水解头孢噻肟(实线)和水解头孢噻肟(虚线)获得的不相同的竞争曲线。B:五种抗体与非水解头孢噻肟(实线)和水解头孢噻肟(虚线)获得的相似竞争曲线。

[0224] 图4显示了用水解或非水解的头孢噻肟与未选择的单克隆抗体之一获得的竞争曲线。

[0225] 图5显示了构成用于分析物检测的常规条的各种元件。

[0226] 图6描述了样品含有(阳性测试)或不含有(阴性测试)ESBL细菌或β-内酰胺酶时预期的两种情况。

[0227] 图7描述了可以用于保护本发明的条的塑料盒。

[0228] 图8描述了实施例2(B)中使用的碳青霉烯化合物的结构。

[0229] 图9显示了实施例2(C)中描述的测试1至4的原理。

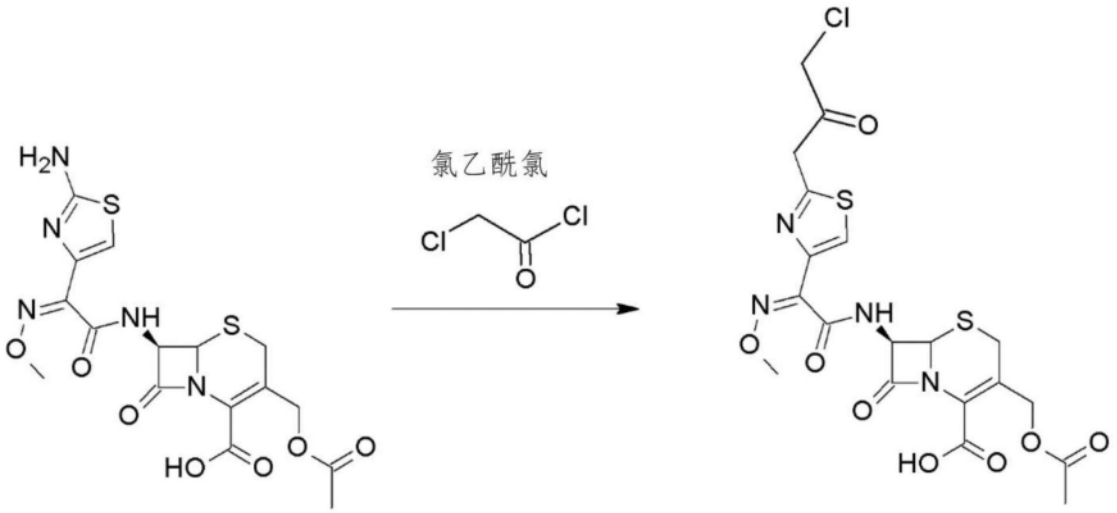
[0230] 图10显示出了根据本发明的条,其含有两条测试线和一条对照线。第一测试线对应于其中已固定化头孢噻肟-BSA的区域,并且第二测试线对应于其中已固定化抗CTX-M抗体的区域。对照线对应于其中已固定化识别本发明中使用的其他标记抗体的二抗的区域。在沉积区域中,已沉积有本发明的抗头孢噻肟抗体和抗CTX-M抗体,全部用胶体金标记。

[0231] 图11描述了当样品不含有具有ESBL或β-内酰胺酶的细菌(阴性测试),或含有除CTX-M之外的ESBL细菌或β-内酰胺酶(一条线上的阳性测试),或含有ESBL菌或CTX-M型β-内酰胺酶(两条线上的阳性测试)时预期的三种情况。

[0232] 实施例1:头孢噻肟抗性菌的检测

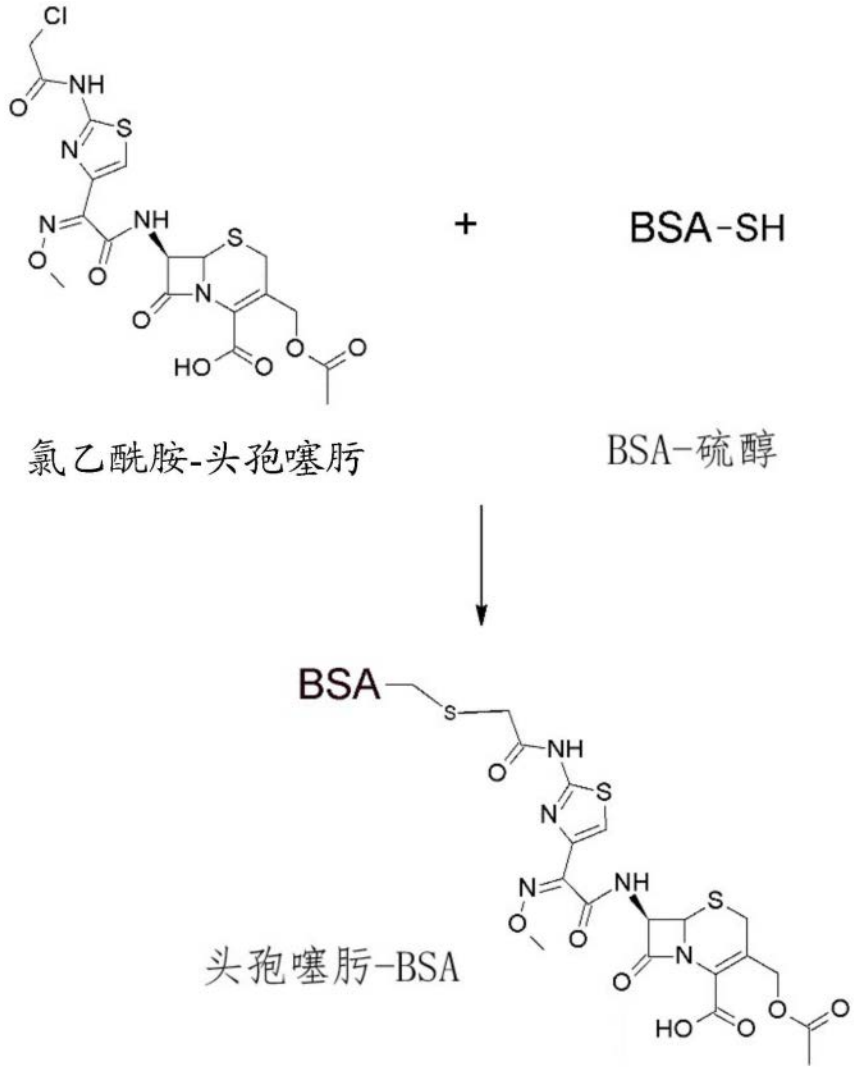
[0233] A.免疫原的设计和产生

[0234] 头孢噻肟是无法诱导免疫应答的小分子,而免疫应答对于获得抗体至关重要。因此,有必要将这种抗生素与更大的免疫原性分子牛血清白蛋白(BSA)偶联。由于本发明的抗体的识别的差异应发生在β-内酰胺核心处,因此设计了特定的免疫原,其使得β-内酰胺核心能够最佳地暴露于免疫系统。因此,与BSA的偶联是在NH_2官能团处进行的,这是距离β-内酰胺核心最远的官能团。头孢噻肟用氯乙酰氯活化(Rodriguez,《An improved Method for preparation of cefpodoxime proxetil》,2003)。为此,将头孢噻肟(500mg,1.09mmol,1eq.)溶解在2mlDMA中的悬浮液在5℃-10℃下添加至氯乙酰氯(128μl,1.65mmol,1.5eq.)中。然后将混合物在环境温度下搅拌1小时30分钟。操作完成后,将溶液倒入冰中。通过过滤收集沉淀物并依次用H_2O、乙醇和乙醚清洗,然后干燥以获得灰白色粉末形式的期望产物(349mg,0.66mmol,60%)。该反应导致形成氯乙酰胺基官能团,其特别可以与硫醇官能团反应。

[0235] 

[0236] 并行地，将35mg牛血清白蛋白(BSA)溶解在1ml 0.1M、pH 7.4磷酸钠缓冲液中。添加50μl 122mg/ml N-琥珀酰亚胺基-s-乙酰硫代乙酸酯(SATA)的DMF溶液(SATA/BSA摩尔比＝50)。在4℃反应16小时后，使用Sephadex G25介质柱通过分子筛层析法纯化产物。然后，通过在20℃下加入100μl 1M、pH 7羟胺达30分钟来去除硫醇官能团的保护。通过与DTNB反应测定硫醇浓度(SH/BSA＝20.7)。然后该产物可以与修饰的头孢噻肟的氯乙酰胺基官能团反应。

[0237] 为此，将以6mg/ml于DMSO中的2.34mg的氯乙酰胺头孢噻肟添加到2.76mg BSA-SH中(氯乙酰胺-头孢噻肟/SH的摩尔比＝5)。20℃反应1小时30分钟后，添加50μl 1M、pH9.0的硼酸盐缓冲液，并温育1小时30分钟。使用3500MWCO的透析盒进行透析。然后通过BCA反应测定BSA-头孢噻肟的浓度。



[0238]

[0239] 头孢噻肟-BSA用于免疫小鼠。为了进行免疫,每三周皮下注射50μg头孢噻肟-BSA/小鼠,持续三个月(总共4次免疫)。小鼠休息2个月后,对所述小鼠静脉内进行新的头孢噻肟-BSA注射:50μg产品/小鼠,每天一次,持续三天。休息两天后,将小鼠脾脏细胞与NS1小鼠骨髓瘤细胞融合,并通过免疫酶促测试来检测骨髓瘤培养物上清液中的抗头孢噻肟特异性抗体。

[0240] B.各种形式头孢噻肟的产生和纯化

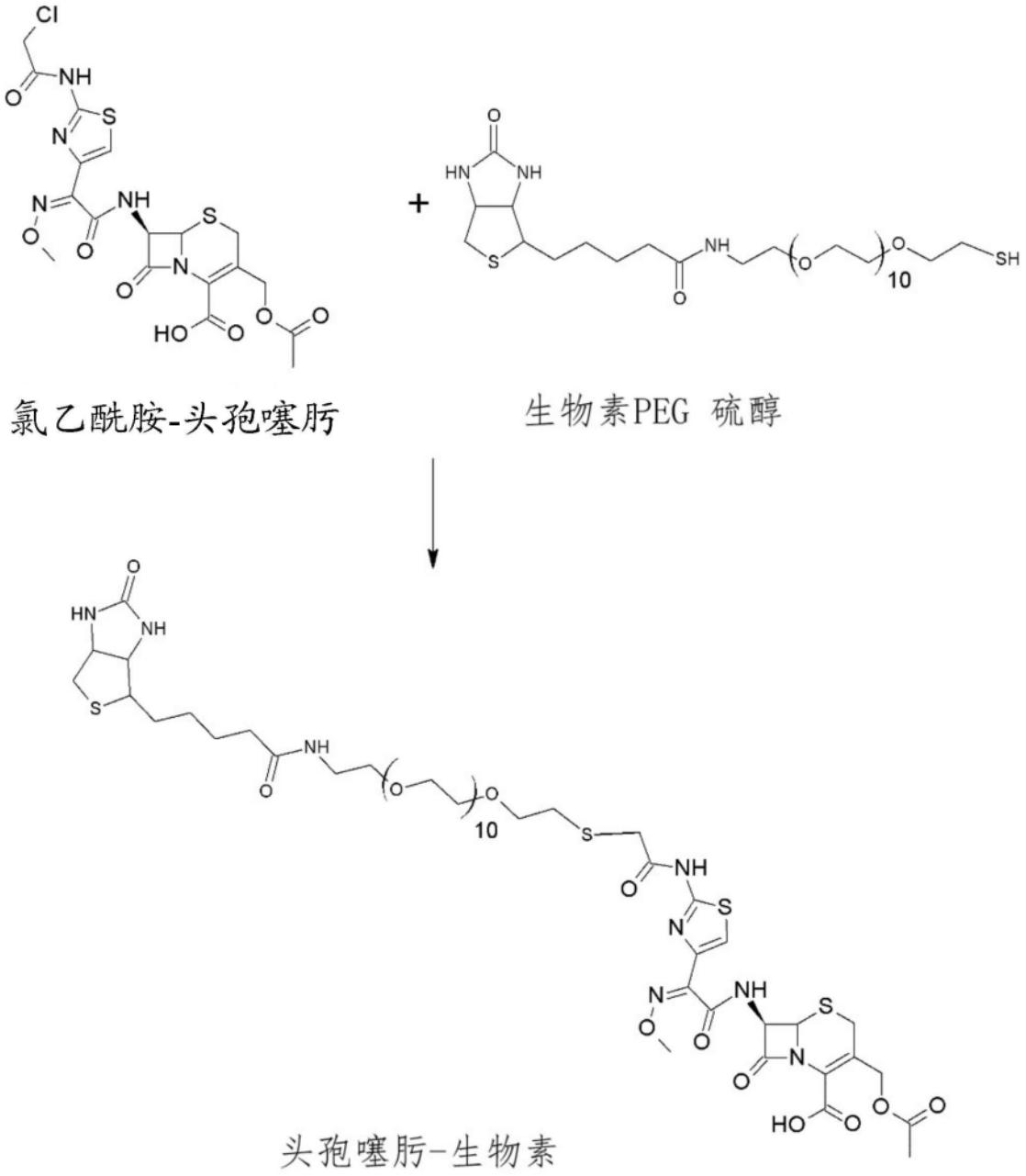
[0241] 为了正确实施本发明,至关重要的是本发明的抗体对完整形式和水解形式的抗生素的亲和力差异是最大的。为此,需要具有非水解头孢噻肟和水解头孢噻肟。另一方面,还需要具有能够检测特定抗体的可用的"示踪剂"分子,即非水解头孢噻肟-生物素和水解头孢噻肟-生物素。这些分子可以通过与乙酰胆碱酯酶-链霉亲和素(G4)反应来检测。乙酰胆碱酯酶与色原反应产生有色底物。

[0242] 非水解和水解头孢噻肟-生物素的产生

[0243] 通过使用上述免疫原的规程,将氯乙酰胺-头孢噻肟和生物素偶联到聚乙二醇(PEG)臂和硫醇官能团(生物素-PEGx-硫醇)上,获得非水解的头孢噻肟-生物素。将氯乙酰胺-头孢噻肟(31.6mg,0.06mmol,1eq.)和生物素-PEGx-硫醇(94mg,0.119mmol,2eq.)溶解在0.5ml DMF和2μl三乙胺中,然后在氩气下加入到混合物中。将反应搅拌3天。反应完成后,

将混合物减压蒸发。然后，通过反相层析法在0至40％的水/乙腈梯度上纯化产物(在26％乙腈处分离返峰)。通过质谱法检查该示踪剂的分子量，其中在C18柱上进行15分钟的纯化循环，然后在四极杆上电离样品。

[0244] 水解的头孢噻肟-生物素通过使用与KPC-2(肺炎克雷伯菌碳青霉烯酶)偶联的珠进行酶促反应获得，KPC-2是重组β-内酰胺酶。为此，用0.1M，pH 9.5的硼酸盐缓冲液清洗5mg珠(Dynabeads M-280Tosylactivated)。将100μg重组蛋白KPC-2添加到体积为150μl的珠中。然后，添加100μl的0.1M pH 9.5硼酸盐缓冲液+3M硫酸铵。37℃反应16小时后，加入1ml的0.1M pH 7.4磷酸钠缓冲液+0.15M氯化钠+0.5％ BSA。在37℃反应1小时后，用0.1M pH 7.4磷酸钠缓冲液+0.15M氯化钠+0.1％ BSA清洗偶联产物并浓缩至20mg/ml的珠。本产品的酶促活性用硝基头孢菌素(nitrocefin)进行测试。为此，将20μl 0.5mM硝基头孢菌素添加到10μg/ml Beads-KPC-2溶液中，在50mM pH7.4磷酸钠缓冲液稀释，总体积为200μl。20℃反应30分钟后，在492nm处测量吸光度。随后，从非水解的头孢噻肟生物素开始，将50μl的20mg/ml Billes-KPC-2溶液添加到1ml的2mg/ml非水解头孢噻肟-生物素溶液中。在25℃反应16小时后，使用磁铁除去Beads-KPC-2。回收上清液并通过反相层析法在0至40％的水/乙腈梯度上纯化(在23％乙腈处分离的峰)。通过质谱法检查该示踪剂的分子量，其中在C18柱上进行15分钟的纯化循环，然后在四极杆上电离样品。



[0245]

[0246] 非水解和水解头孢噻肟的产生

[0247] 然后通过反相层析法在0至20％的水/乙腈梯度上纯化非水解的头孢噻肟(Sigma-Aldrich)(在8.5％乙腈处分离的峰)。通过质谱法检查该产物的分子量,其中在C18柱上进行15分钟的纯化循环,然后在四极杆上电离样品。

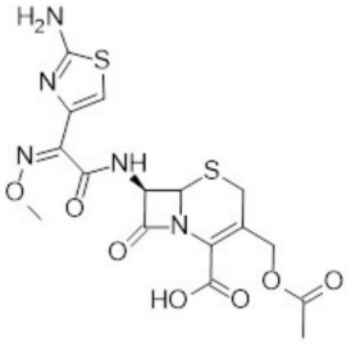
[0248] 水解的头孢噻肟也通过使用与KPC-2偶联的珠进行酶促反应获得。进行与上文引用的相同的珠-KPC-2偶联方案。然后,从非水解的头孢噻肟开始,将50μl 20mg/ml的Beads-KPC-2溶液添加到1ml的2mg/ml的非水解的头孢噻肟溶液中。在25℃反应16小时后,使用磁铁除去Beads-KPC-2,并通过反相层析法在0至20％的水/乙腈梯度上纯化溶液(在2.5％乙腈处分离的峰)。通过质谱法检查该示踪剂的分子量,其中在C18柱上进行15分钟的纯化循环,然后在四极杆上电离样品。

[0249] 各种形式头孢噻肟的纯化

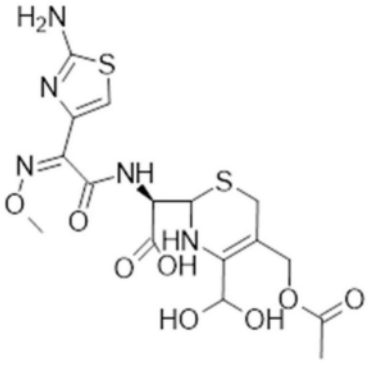
[0250] 所有溶液均通过反相层析法在1ml/ml的水/乙腈梯度上纯化。对于非水解的头孢

噻肟,分离峰位于8.5%乙腈处。对于水解的头孢噻肟,峰位于2.5%处。对于非水解的头孢噻肟-生物素,其为26%,而对于水解的头孢噻肟-生物素,分离峰为23.5%。所有这4种化合物均通过质谱进行表征。为此,它们在C18柱(水/乙腈梯度)上进行15分钟的循环纯化,然后在四极杆上电离。确定了每种化合物的分子量:非水解头孢噻肟的m/z=456;水解头孢噻肟的m/z=414;非水解头孢噻肟-生物素的m/z=1241.5;水解头孢噻肟-生物素的m/z=1283.5。获得以下化合物:

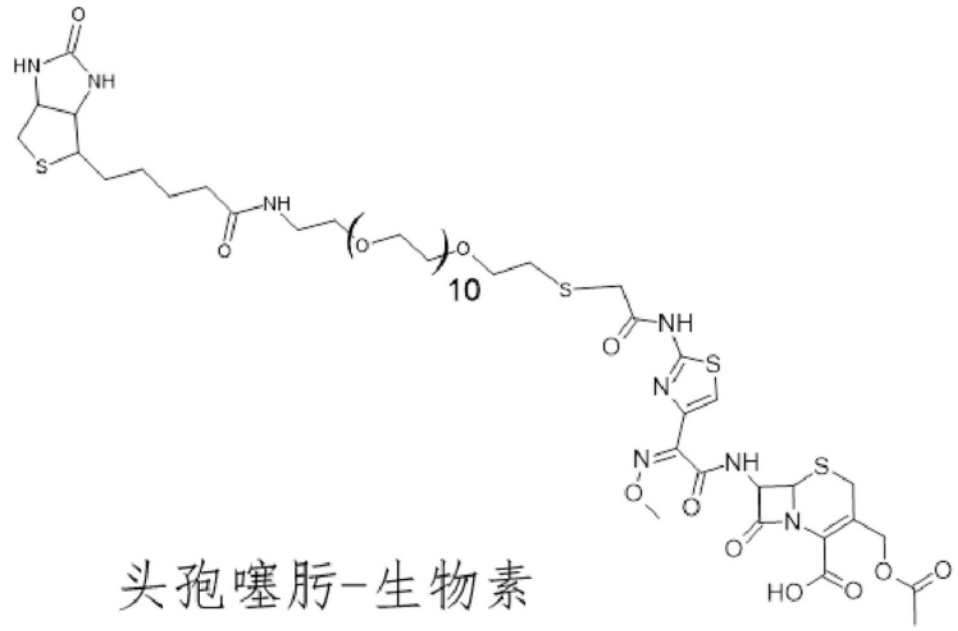
[0251]



头孢噻肟

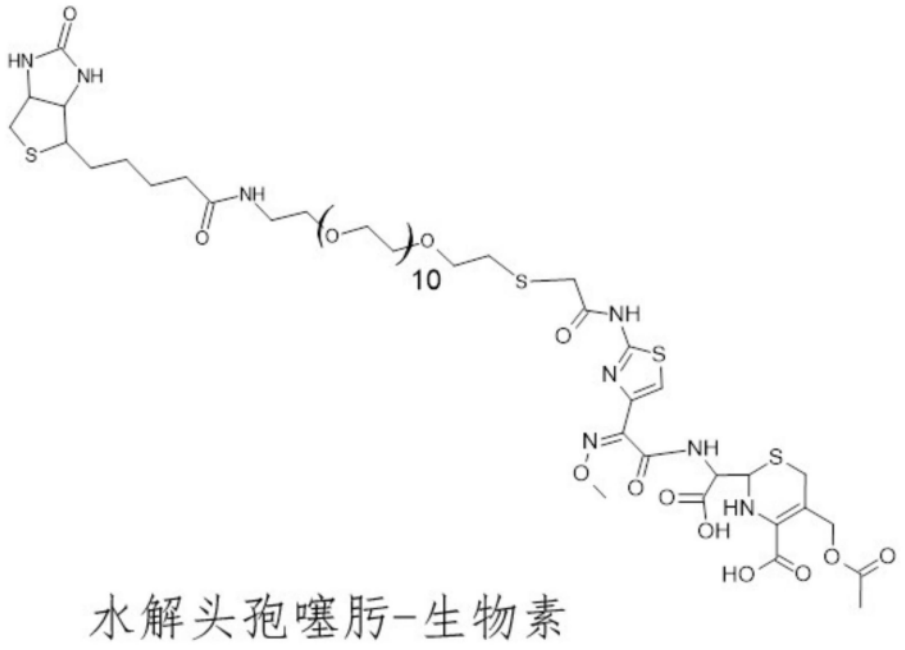


水解头孢噻肟



头孢噻肟-生物素

[0252]



水解头孢噻肟-生物素

[0253] C.感兴趣抗体的产生和选择

[0254] 用头孢噻肟-BSA免疫四只小鼠。为此,每三周皮下注射50μg头孢噻肟-BSA/小鼠,持续三个月(总共4次免疫)。小鼠休息3个月后,为了选择具有最佳免疫应答的小鼠,对它们的抗体进行了第一次测试分析。在此测试中,免疫方案期间采集的鼠类抗体由固定化在微量滴定板的孔壁上的第一鼠类抗抗体抗体(AffiniPure山羊抗小鼠IgG+IgM(H+L);杰克逊免疫研究实验室)捕获。每孔中添加100μl 100ng/ml的非水解头孢噻肟-生物素。在4℃温育过夜并清洗后,添加100μl 1EU/ml的链霉亲和素-G4,以揭示与生物素偶联的完整头孢噻肟的存在,并因此揭示非水解的抗头孢噻肟抗体的存在。乙酰胆碱酯酶(G4)活性通过Ellman方法(Ellman等人,1961年)测量。Ellman培养基包含7.5 10^{-4}M乙酰硫代胆碱碘化物(酶底物)和于0.1M pH 7.4磷酸盐缓冲液中的2.5 10^{-4}M 5,5′-二硫代双(2-硝基苯甲酸)(DTNB)(用于硫醇量热测量的试剂)的混合物。酶活性以埃尔曼单位(EU)表示。1EU定义为在1ml培

养基中1分钟内吸光度增加1个单位的酶量,对于1cm的光程:它相当于大约8ng的酶。

[0255] 在环境温度下温育一小时并清洗后,将200μl Ellman培养基试剂添加到孔中。30分钟和/或一小时后,测量信号强度。在此测试期间获得的信号强度与非水解的头孢噻肟特异性抗体的数量成比例。具有最佳免疫应答(较高浓度的特异性抗体)的小鼠随后接受新的头孢噻肟-BSA注射。为此,将产品静脉内施用于具有最佳应答的小鼠:每只小鼠50μg产品,每天一次,持续三天。休息两天后,将其处死,将其脾细胞(脾脏细胞)与NS1小鼠骨髓瘤细胞杂交,以获得杂交瘤(抗体和永生细胞的产生者)(Grassi,J.,Frobert,Y.,Lamourette,P.and Lagoutte,B.,1988."Screening of monoclonal antibodies using antigens labeled with acetylcholinesterase:application to the peripheral proteins of photosystem 1".Anal.Biochem.168,436)。

[0256] 融合结束时,将所有细胞分配到10个微量滴定板的孔中。一周后,使用测试1(图1)分析每个孔中识别头孢噻肟的抗体的存在。本试验可以选择并保存107个孔的细胞。为了改进这种选择并仅保留产生仅识别非水解头孢噻肟的抗体的杂交瘤,使用4种不同的测试(图1和图2:测试1至4)对所选孔的培养物上清液进行了分析:

[0257] 测试1:在该测试中,培养物上清液中存在的抗体由固定化在微量滴定板的孔壁上的第一鼠类抗抗体抗体捕获。将非水解的头孢噻肟-生物素添加到每个孔中。在4℃温育过夜并清洗后,添加链霉亲和素-G4,以揭示与生物素偶联的非水解头孢噻肟的存在,并因此揭示非水解抗头孢噻肟抗体的存在。

[0258] 测试2:在该测试中,培养物上清液中存在的抗体由固定化在微量滴定板的孔壁上的第一鼠类抗抗体抗体捕获。将水解的头孢噻肟-生物素添加到每个孔中。在4℃温育过夜并清洗后,添加链霉亲和素-G4,以揭示与生物素偶联的水解的头孢噻肟的存在,并因此揭示水解的抗头孢噻肟抗体的存在。

[0259] 测试3:在该测试中,非水解头孢噻肟-生物素与非水解头孢噻肟竞争培养物上清液中存在的特异性抗体的识别。在4℃温育过夜并清洗后,添加链霉亲和素-G4,以揭示与生物素偶联的完整头孢噻肟的存在。

[0260] 测试4:在该测试中,将非水解头孢噻肟-生物素与测试3中使用的与非水解头孢噻肟相同浓度的水解头孢噻肟竞争培养物上清液中存在的特异性抗体的识别。在4℃温育过夜并清洗后,添加链霉亲和素-G4,以揭示与生物素偶联的完整头孢噻肟的存在。

[0261] 对于测试1和测试2,孔中信号的出现分别表明存在非水解的抗头孢噻肟抗体和水解的抗头孢噻肟抗体。

[0262] 对于测试3和测试4,与抑制剂浓度成比例的信号减少表明存在识别以下抑制剂的抗体:非水解头孢噻肟(测试3)或水解头孢噻肟(测试4)。另一方面,这些测试使得有可能评价抗体对于非水解头孢噻肟和水解头孢噻肟的相对特异性。因此,如果两种形式的头孢噻肟的信号减少相似,则抗体对这两种分子具有相同的亲和力。如果对于两种形式的头孢噻肟之一的信号减少较弱,则抗体对该形式的头孢噻肟亲和力较弱。

[0263] 选择测试1获得信号而测试2没有信号、测试3的信号中最大信号减少而测试4信号没有减少的孔。在选择过程结束时,18个杂交瘤被保存以产生单克隆抗体。

[0264] D.单克隆抗体的表征

[0265] 为了评价每种单克隆抗体的特异性,使用不同浓度的非水解头孢噻肟和作为竞争

剂的水解头孢噻肟进行测试3和测试4。通过计算两种形式的头孢噻肟之间的交叉反应百分比来确定特异性。为了进行该计算，将非水解的头孢噻肟的浓度除以引起相同信号减少的水解头孢噻肟的浓度。例如，如果由1nmol/ml的非水解头孢噻肟和100nmol/ml的水解头孢噻肟诱导信号减少，则交叉反应的百分比为:1/100＝0.01，因此为1％。

[0266] 为了进行这些测试，以下所有溶液均在缓冲液中制备，其组成为:0.1M pH 7.4磷酸钾缓冲液+0.1％ PVP+0.15M NaCl+0.01％叠氮化钠。使用0.3pmol/ml的完整头孢噻肟-生物素。对于非水解头孢噻肟和水解头孢噻肟，制备了一系列浓度:210pmol/ml、21pmol/ml、2.1pmol/ml、0.21pmol/ml和0pmol/ml。

[0267] 以25μl标志物(完整的头孢噻肟-生物素)和25μl竞争剂(非水解或水解头孢噻肟)的水平将溶液沉积在96孔微孔板上，其壁上预先固定化小鼠抗抗体抗体(与选择抗体的实验中使用的抗体相同)。然后添加50μl抗体溶液。将微孔板在4℃下温育过夜，然后清洗后，在环境温度以及在搅拌下加入100μl链霉亲和素-G4达1小时。清洗孔后，沉积200μl色原(Ellman培养基)。搅拌温育1小时后，用分光光度计在414nm处读取吸光度。获得的图表为f([头孢噻肟])＝％B/Bo。信号Bo对应于在没有竞争者的情况下获得的吸光度(最大吸光度)。信号B是竞争剂和标志物与抗体相互作用的培养基中的吸光度。为了使该图可读，仅显示了几种抗体获得的结果(图3A和图3B)。

[0268] 对于16种抗体，在最强浓度的水解头孢噻肟(210pmol/ml)下未观察到信号的减少。因此，交叉反应低于0.1％(诱导信号减少的非水解头孢噻肟的最小浓度/210pmol/ml，乘以100)。对于其他两种抗体，观察到信号略有减少，获得的交叉反应仅为0.008％和0.045％。

[0269] 从图3A中可以看出，用非水解头孢噻肟与各种抗体获得的竞争曲线并不相同。然而，对于其他抗体，使用非水解头孢噻肟获得的竞争曲线相似(图3B)。

[0270] 因此可以看出，用非水解头孢噻肟与各种抗体获得的竞争曲线并不相同。这意味着所涉及的抗体是不同的。因此，本发明的抗体的特异性与这些抗体的结合位点的特定蛋白质序列无关。免疫原的设计和所选的选择策略使得选择此类抗体成为可能。

[0271] 在这18种抗体中，选择对非水解头孢噻肟具有最大亲和力的抗体(抗体3)用于开发活化头孢菌素酶检测试验。

[0272] 还分析了选择结束时未保留的抗体的特异性。图4显示，对于这种未保留的抗体，水解的头孢噻肟的信号比非水解的头孢噻肟的信号有更大的减少，这意味着后一种形式不太容易被未保留的抗体识别。

[0273] E.本发明的β-内酰胺酶活性检测试验

[0274] 然后通过竞争将选定的抗体(抗体1、2、3、4和5)用于测试条上。

[0275] 如上所述，条由四个不同的部分组成:

[0276] 1)用于沉积样品的样品纸(SP)。

[0277] 2)干燥标记抗体(也称为示踪剂)的缀合纸(CP)。在使用液体形式的示踪剂抗体的情况下，该纸可以作为附件。在这种情况下，在沉积到条上之前，将10μl示踪剂抗体添加到100μl样品中。

[0278] 3)具有两条线(测试线(TL):BSA-完整头孢噻肟;对照线(CL):抗抗体抗体示踪剂)的硝化纤维素膜(MbNC)。

[0279] 4)吸收纸(AP),用于使样品能够迁移通过条。

[0280] 测试条的参数

[0281] 以下所有溶液均在缓冲液条中制备,其组成为:0.1M pH8 Tris缓冲液/HCL+0.15M NaCl+0.5%Tween 20+1%chaps+0.01%叠氮化钠。它能够裂解细菌并释放其内容物(例如酶)。

[0282] 优化了以下三个参数:

[0283] -示踪剂的量:将所选抗体与胶体金(有色标志物)偶联,可在530nm处测量其吸光度。因此,在结果中,使用相对于胶体金的术语吸光度(DO)。因此测试了几种DO。目的是确定在样品沉积到条上10分钟后能够观察到显著信号的示踪剂的最小量。

[0284] -TL上BSA完整头孢噻肟的量:固定抗体中的DO后,测试TL上BSA-完整头孢噻肟的若干浓度(1μL/cm)。目的是固定TL处观察到的信号的非限制性最低浓度。

[0285] 针对所选的五种抗体对这两个参数进行了优化。然而,为了简化图,仅报告了用抗体3获得的结果。

[0286] -添加到样品中的非水解头孢噻肟的量:一旦确定了前面的两个参数,目标是固定在TL上观察不到信号的完整头孢噻肟的最小浓度。并行地,添加水解的头孢噻肟以检查抗体确实对非水解形式具有特异性。为此,用缓冲液条制备了一系列非水解头孢噻肟和一系列水解头孢噻肟:1000ng/ml、100ng/ml、10ng/ml、1ng/ml。

[0287] 对于所有这三个参数,使用颜色强度标度来评价在测试条上获得的结果。该等级定义为1到10,其中每个值都是信号强度增加的特征。

[0288] 所有这些测试均使用96孔微孔板。为了开始测试,将10μl液体形式的示踪剂添加到100μl含有或不含头孢噻肟的缓冲液中。然后,将由样品纸、硝化纤维素膜和吸收纸构成的条沉积在孔中。进行10分钟的温育,然后用颜色强度标度评价信号强度。

[0289] 结果

[0290] 首先对示踪剂的DO进行了优化。默认浓度为1mg/ml的BSA-完整头孢噻肟沉积在TL上。测试结果如表1所示。

[0291]

使用的 DO	信号强度
DO:8	10
DO:4	10
DO:2	9
DO:1	8.5
DO:0.5	7.5

[0292] 表1:示踪剂的DO的优化。

[0293] 为了获得足够的信号强度,选择DO:1,因为它位于强度标度8.5/9内。

[0294] 然后将不同浓度的BSA-非水解头孢噻肟沉积在TL上(1μL/cm)。已使用先前为示踪剂选择的浓度DO:1。

[0295]

BSA-完整头孢噻肟的浓度	信号强度
	DO:1
1 mg/ml	9.5
0.6 mg/ml	10
0.3 mg/ml	10
0.1 mg/ml	9
0.03 mg/ml	8

[0296] 表2:TL上BSA-头孢噻肟的浓度的优化。

[0297] BSA-头孢噻肟浓度超过0.1mg/ml时,信号强度仅非常微弱地增加。这就是选择这个浓度的原因。为了更精确地调整参数,用该量的BSA-头孢噻肟测试了不同量的示踪剂。

[0298]

BSA-完整头孢噻肟的浓度	信号强度
DO:1	9.5
DO:0.5	8.5

[0299]

DO:0.25	7.5
DO:0.125	5.5

[0300] 表1:示踪剂DO的二次优化。

[0301] 鉴于这些结果,保持TL上BSA-头孢噻肟的浓度为0.1mg/ml且示踪剂DO为0.5,因为获得的信号在8.5左右。

[0302] 然后测定样品中使用的非水解头孢噻肟的浓度。制备对照(条件为0ng/ml),以便观察TL上可以获得的最大信号(表4)。

[0303]

头孢噻肟浓度	信号强度	
	非水解头孢噻肟	水解头孢噻肟
1000 ng/ml	Ø	8
100 ng/ml	Ø	9
10 ng/ml	Ø	9
1 ng/ml	4	9
0 ng/ml	9	9

[0304] 表4:待添加到样品中的完整头孢噻肟的浓度的优化。Ø:TL上未观察到信号。

[0305] 对于非水解的头孢噻肟,TL上可见信号的浓度为1ng/ml。因此,能够使信号完全消失(示踪剂抗体的所有识别位点均被占用)的最低浓度为10ng/ml。

[0306] 对于水解的头孢噻肟,信号与对照等同(示踪剂将自身结合在TL上)。正如预期的那样,水解的头孢噻肟不会被示踪剂抗体识别,其结合位点可以自由地与TL的头孢噻肟整合。

[0307] 然后使用浓度为10ng/ml的BSA-头孢噻肟来研究头孢噻肟水解动力学。对于相同浓度的水解头孢噻肟,没有观察到信号减少。因此,样品孔中头孢噻肟的水解导致TL信号增加。

[0308] 举例来说,测试了其他抗体。抗体使用条件如下:抗体1,DO 0.5,0.3mg/mlBSA-头孢噻肟;抗体2,DO1,0.3mg/ml BSA-头孢噻肟;抗体3,DO0.5,0.1mg/ml BSA-头孢噻肟;抗体4,DO0.5,0.3mg/ml BSA-头孢噻肟;抗体5,DO0.5,0.3mg/ml BSA-头孢噻肟(表5)。

[0309]

抑制	抗体 1		抗体 2		抗体 3		抗体 4		抗体 5	

[0310]

	NH 头孢噻肟	H 头孢噻肟	NH 头孢噻肟	H 头孢噻肟	NH 头孢噻肟	H 头孢噻肟	NH 头孢噻肟	H 头孢噻肟	NH 头孢噻肟	H 头孢噻肟
1000ng/ml	Ø	7.5	Ø	8.5	Ø	8	Ø	7	Ø	7.5
100 ng/ml	Ø	9	Ø	8.5	Ø	9	Ø	9	Ø	9
10 ng/ml	Ø	9	4	8.5	Ø	9	Ø	9	Ø	9
1 ng/ml	5	9	8	8.5	4	9	4.5	9	5	9
0 ng/ml	9		8.5		9		9		9	

[0311] 表5:针对不同抗体添加到样品中的完整头孢噻肟浓度的优化。Ø:TL上未观察到信号。

[0312] 鉴于这些结果,抗体3在条格式下显示出最佳表现,因为它使得检测最弱浓度的酶的酶活性成为可能。然而,该结果表明其他抗体也可以用于该方法的背景中。对于其余的开发和优化,仅使用了抗体3。

[0313] 重组酶的水解动力学。

[0314] 一旦确定了测试条的参数,就可以实现水解动力学。在这项研究中,使用了CTXM-2酶(一种来自大肠杆菌的ESBL)。这些动力学的目标是尽快在尽可能低的酶浓度下成功获得阳性信号“+”(TL上可见的信号)。

[0315] 为了进行这些测试,在缓冲液条中制备了以下所有溶液,其组成为:0.1M pH8 Tris缓冲液/HCL+0.15M NaCl+0.5% Tween 20+1%chaps+0.01%叠氮化钠。它能够裂解细菌并释放其内容物。

[0316] 使用的浓度为:10ng/ml、3ng/ml、1ng/ml、0.3ng/ml、0.1ng/ml酶,并与完整的头孢噻肟在环境温度下温育。还产生了两个对照,其含有仅完整头孢噻肟(在TL上不应观察到信号,因为所有示踪剂结合位点都被占据),或仅缓冲液条(能够在TL上获得最大信号,因为所有示踪剂结合位点都是游离的)。

[0317] 在本研究中,第一步以液体形式添加示踪剂(在DO:0.5下将10μl添加到100μl酶溶液中),然后在第二步中以干燥形式添加到缀合纸上(10μl,在DO:0.9下)。然后将缀合纸插

入样品纸和硝化纤维素膜之间的条上。因此，使用了具有或不具有缀合纸(CP)的两种类型的条。对于每个实验，都表明使用了哪种类型的条。硝化纤维素膜上的TL由0.1mg/ml的BSA-非水解头孢噻肟构成。准备各种条件，然后在环境温度下温育。温育时间结束后，对100μl溶液进行取样并沉积在微孔板孔中或塑料盒的沉积孔中。

[0318] 在温育后的第0分钟、15分钟、30分钟、45分钟、60分钟对样品进行测试。迁移10分钟后在测试条上读取读数。TL上的信号被视为“P”。TL上没有信号被定义为“N”。第一个水解动力学是在环境温度下产生的。测试在96孔微孔板上进行，具有100μl样品+10μl液体形式的示踪剂。将不含CP的条沉积在孔中。完整头孢噻肟的浓度为10ng/ml，示踪剂DO为0.5(表6)。

[0319]

CTXM-2的浓度	0分钟	15分钟	30分钟	45分钟	60分钟
10ng/ml	N	P	P	P	P
3ng/ml	N	N	N	P	P
1ng/ml	N	N	N	N	N
0.3ng/ml	N	N	N	N	N
0.1ng/ml	N	N	N	N	N
对照	0分钟	15分钟	30分钟	45分钟	60分钟
10ng/ml完整头孢噻肟	N	N	N	N	N
1X提取缓冲液	P	P	P	P	P

[0320] 表6:头孢噻肟在环境温度下通过CTXM-2酶、液体示踪剂的水解动力学(N:阴性测试在TL处没有信号;P:阳性测试，在TL处可见信号)。

[0321] 10ng/ml酶温育15分钟后信号可见，3ng/ml酶温育45分钟后信号可见。进行了相同的实验，但这次在37℃下温育(表7)。

[0322]

CTXM-2 的浓度	0 分钟	15 分钟	30 分钟	45 分钟	60 分钟
10 ng/ml	N	P	P	P	P
3 ng/ml	N	N	N	P	P
1 ng/ml	N	N	N	N	N
0.3 ng/ml	N	N	N	N	N
0.1 ng/ml	N	N	N	N	N
对照	0 分钟	15 分钟	30 分钟	45 分钟	60 分钟
10 ng/ml 完整头孢噻肟	N	N	N	N	N
1X 提取缓冲液	P	P	P	P	P

[0323] 表7:完整头孢噻肟在37℃下通过CTXM-2、液体示踪剂的水解动力学。

[0324] 由表7可见，37℃温育对结果没有影响。这就是选择在环境温度下温育的原因。

[0325] 为了限制处理量并从而方便测试的使用，示踪剂在CP上干燥。据观察，重新溶解

后，部分示踪剂抗体被CP吸收。为了补偿这种吸收，需要增加示踪剂的用量。第一次测试中CP上的最终示踪剂DO为0.9。测试在96孔微孔板上进行，样品为100μl。非水解的头孢噻肟的浓度为10ng/ml。用该方案产生了新的水解动力学(表8)。

[0326]

CTXM-2 的浓度	0 分钟	15 分钟	30 分钟	45 分钟	60 分钟
10 ng/ml	N	P	P	P	P
3 ng/ml	N	P	P	P	P
1 ng/ml	N	N	N	P	P
0.3 ng/ml	N	N	N	N	N
0.1 ng/ml	N	N	N	N	N
对照	0 分钟	15 分钟	30 分钟	45 分钟	60 分钟
10 ng/ml 完整头孢噻肟	N	N	N	N	N
1X 提取缓冲液	P	P	P	P	P

[0327] 表8:未由CTXM-2水解的头孢噻肟在AT下的水解动力学。

[0328] 3ng/ml的酶在15分钟后观察到信号，并且1ng/ml的酶在45分钟后观察到信号。将示踪剂改为干燥形式并增加DO有可能降低为在TL上看到可见信号所需的酶浓度。

[0329] 为了始终提高测试性能，产生了另外两种水解动力学，其中增加了CP中示踪剂的量，即DO:1时为10μl(表9)，或DO:1.5时为10μl(表10)。在本研究中，将条插入塑料盒中，并将100μl样品沉积在沉积孔中。非水解的头孢噻肟的浓度为10ng/ml。结果如下。

[0330]

CTXM-2 的浓度	0 分钟	15 分钟	30 分钟	45 分钟	60 分钟
10 ng/ml	N	P	P	P	P
3 ng/ml	N	P	P	P	P
1 ng/ml	N	N	P	P	P
0.3 ng/ml	N	N	N	N	N
0.1 ng/ml	N	N	N	N	N

[0331]

对照	0 分钟	15 分钟	30 分钟	45 分钟	60 分钟
10 ng/ml 完整头孢噻肟	N	N	N	N	N
1X 提取缓冲液	P	P	P	P	P

[0332] 表9:完整头孢噻肟通过酶CTXM-2的水解动力学(DO:1)。

[0333]

CTXM-2 的浓度	0 分钟	15 分钟	30 分钟	45 分钟	60 分钟
10 ng/ml	N	P	P	P	P
3 ng/ml	N	P	P	P	P
1 ng/ml	N	P	P	P	P
0.3 ng/ml	N	N	N	N	N
0.1 ng/ml	N	N	N	N	N
对照	0 分钟	15 分钟	30 分钟	45 分钟	60 分钟
10 ng/ml 完整头孢噻肟	N	N	N	N	N
1X 提取缓冲液	P	P	P	P	P

[0334] 表10:未由CTXM-2水解的头孢噻肟的水解动力学(DO1.5)。

[0335] 示踪剂中DO的增加使得可能降低为了TL上信号可见所需的酶浓度。1ng/ml时DO1.5在15分钟后检测显示出更好的结果。

[0336] 获得的结果表明,在15分钟温育后,DO1.5能够实现CTXM-2酶1ng/ml的检测限。

[0337] 最终确定测试条的适应性并在细菌菌落上验证

[0338] 为了最终确定测试条的适应性并在细菌菌落上进行其验证,执行了两个步骤:

[0339] -鉴定非水解头孢噻肟与细菌菌落的温育时间,以鉴定ESBL型细菌抗性。

[0340] 为了进行这些测试,以下所有溶液均已在缓冲液条中制备,其组成为:0.1M pH8 Tris/HCl缓冲液+0.15M NaCl+0.5% Tween 20+1% Chaps+0.01%叠氮化钠,这使得裂解细菌并释放其内容物成为可能。

[0341] 缓冲液条中非水解的头孢噻肟的浓度为10ng/ml。还产生了两个对照,其或者仅含有非水解的头孢噻肟,或者仅含有缓冲液条。示踪剂在CP上干燥。TL由0.1mg/ml的BSA-非水解头孢噻肟构成。迁移是通过塑料盒进行的。

[0342] 将150µl非水解的头孢噻肟溶液取样并沉积在Eppendorf管中。从剂量为1µl的LB琼脂中取样细菌菌落,然后将其沉积于先前准备的Eppendorf管中。将管涡旋五秒,然后在环境温度下温育所需的温育时间。在温育5分钟、10分钟、20分钟、30分钟后对样品进行测试。温育完成后,取样100µl并将其沉积在条上。迁移10分钟后进行读数。TL上的信号被视为“P”。TL上没有信号被定义为“N”。

[0343] 获得的结果显示在表11中。已定义三组:ESBL组、碳青霉烯酶组(也降解完整的头孢噻肟)和对头孢噻肟不具有抗性的细菌组。

[0344]

酶	种	5’	10’	20’	30’
ESBL					
CTX-M-1	弗劳地氏枸橼酸杆菌(*C. freundii*)	P	P	P	P
CTX-M-2	大肠杆菌	P	P	P	P
CTX-M-8	大肠杆菌	N	N	P (低)	P
CTX-M-14	产酸克雷伯菌(*K. oxytoca*)	N	P	P	P
CTX-M-15	大肠杆菌	P	P	P	P
CTX-M-27	大肠杆菌	P	P	P	P
CTX-M-32	大肠杆菌	P	P	P	P
CTX-M-57	大肠杆	P	P	P	P

[0345]

	菌				
CTX-M-94	大肠杆菌	P	P	P	P
碳青霉烯酶					
KPC-2	肺炎克雷伯菌	N	P	P	P
NDM-7	大肠杆菌	P	P	P	P
IMP-1	大肠杆菌	P	P	P	P
VIM-1	大肠杆菌	P	P	P	P
OXA-48	弗劳地氏枸橼酸杆菌	N	N	P (低)	P
OXA-163	阴沟肠杆菌	P	P	P	P
敏感细菌					
WT	大肠杆菌	N	N	N	N
WT	大肠杆菌	N	N	N	N

[0346] 表11:头孢噻肟在环境温度下与细菌菌落的温育时间的测定。N:阴性结果;P:阳性结果

[0347] 温育30分钟后,非抗性菌组的TL上未见任何信号。对于ESBL和碳青霉烯酶组,在温育20分钟后,除了TL上显示弱信号的两个细菌菌落之外,检测到所有细菌菌落。在30分钟时,所有所谓的抗性菌落在我们的测试中均呈阳性。

[0348] 鉴于所获得的结果,选择温育时间为30分钟。应用该温育时间后,所有抗性菌落均为阳性,非抗性菌落均为阴性。因此,该测试条非常适合用于细菌菌落。

[0349] -测试条在对第三代头孢菌素(3GC)敏感或具有抗性的细菌株上的验证。

[0350] 为了验证细菌菌落测试条的临床用途,使用了对头孢菌素具有抗性的细菌株。

[0351] 为了进行这些测试,在缓冲液条中制备了以下所有溶液,其组成为:0.1M pH8

Tris缓冲液/HCL+0.15M NaCl+0.5% Tween 20+1%chaps+0.01%叠氮化钠。缓冲液条中所用非水解头孢噻肟的浓度为25ng/ml。示踪剂在CP上呈干燥形式。TL由0.1mg/ml的BSA-非水解头孢噻肟构成。产生了CL。它由抗示踪剂抗体组成。迁移在塑料盒中进行。

[0352] 为了进行测试,将150μl非水解的头孢噻肟溶液转移至Eppendorf管中。从剂量为1μl的URI-4琼脂中取样细菌菌落,然后将其沉积于先前准备的Eppendorf管中。将管涡旋5秒,然后在环境温度下温育30分钟。温育完成后,取样100μl并将其沉积在测试条上。迁移10分钟后进行读数。TL上的信号被视为"P"。TL上没有信号被定义为"N"。

[0353] 为了分析结果,将细菌分为两组:不水解头孢噻肟的β-内酰胺酶产生者和水解头孢噻肟的β-内酰胺酶产生者(表12)。

[0354]

	种	分离株编号	β-内酰胺酶含量	测试结果	
不能水解头孢噻肟的株	大肠杆菌	1	N/A	N	P
	大肠杆菌	1	MCR-1	N	P
	大肠杆菌	1	MCR-2	N	P
	大肠杆菌	1	MCR-5	N	P
	大肠杆菌	1	CTX-M-93	N	P
	奇异变形杆菌(*P. mirabilis*)	1	N/A	N	P
	奇异变形杆菌	1	OXA-23	N	P
	奇异变形杆菌	1	OXA-58	N	P
	弗劳地氏枸橼酸杆菌	1	N/A	N	P
	阴沟肠杆菌(*E. cloacae*)	2	N/A	N	P
	阴沟肠杆菌	1	IMI-1	N	P
	阿氏肠杆菌(*E.*	2	IMI-2	N	P

[0355]

	asburiae)				
	阿氏肠杆菌	1	IMI-17	N	P
	沙门氏菌属(*Salmonella*)种	1	N/A	N	P
	沙门氏菌属种	1	MCR-1	N	P
	沙门氏菌属种	1	MCR-4	N	P
	沙门氏菌属种	1	MCR-5	N	P
	粘质沙雷氏菌(*S. marcescens*)	1	SME-1	N	P
	粘质沙雷氏菌	1	SME-4	N	P
	铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*)	2	N/A	N	P
	铜绿假单胞菌	1	Mex C/D-OprJ	N	P
	铜绿假单胞菌	1	Mex A/B-OprM	N	P
	铜绿假单胞菌	1	OprD 缺陷	N	P
	铜绿假单胞菌	1	CARBA-4	N	P
	铜绿假单胞菌	1	OXA-32	N	P
	铜绿假单胞菌	1	PME-1	N	P
	铜绿假单胞菌	1	AIM-1	N	P
	铜绿假单胞菌	1	OXA-198	N	P
	恶臭假单胞菌(*P. putida*)	1	N/A	N	P
	施氏假单胞菌(*P. stutzeri*)	1	N/A	N	P
	鲍曼不动杆菌(*A. baumannii*)	2	N/A	N	P
	鲍曼不动杆菌	1	RTG-4	N	P
	鲍曼不动杆菌	1	OXA-13	N	P
	鲍曼不动杆菌	1	OXA-21	N	P
能够水解头孢噻肟的株	大肠杆菌	1	过表达 AmpC	N	P
	大肠杆菌	1	DHA-1	N	P
	大肠杆菌	1	ACC-1	N	P
	大肠杆菌	1	CMY-136	N	P
	大肠杆菌	1	SHV-2a	N	P
	大肠杆菌	1	TEM-52	N	P
	大肠杆菌	3	CTX-M-1	N	P

[0356]

	大肠杆菌	3	CTX-M-2	N	P
	大肠杆菌	1	CTX-M-3	N	P
	大肠杆菌	1	CTX-M-8	N	P
	大肠杆菌	1	CTX-M-10	N	P
	大肠杆菌	2	CTX-M-14	N	P
	大肠杆菌	5	CTX-M-15	N	P
	大肠杆菌	1	CTX-M-17	N	P
	大肠杆菌	2	CTX-M-24	N	P
	大肠杆菌	2	CTX-M-27	N	P
	大肠杆菌	1	CTX-M-32	N	P
	大肠杆菌	1	CTX-M-37	N	P
	大肠杆菌	2	CTX-M-55	N	P
	大肠杆菌	1	CTX-M-57	N	P
	大肠杆菌	2	CTX-M-65	N	P
	大肠杆菌	1	CTX-M-71	N	P
	大肠杆菌	1	CTX-M-82	N	P
	大肠杆菌	1	CTX-M-100	N	P
	大肠杆菌	1	CTX-M-101	N	P
	大肠杆菌	1	CTX-M-182	N	P
	大肠杆菌	1	KPC-2	N	P
	大肠杆菌	1	KPC-3	N	P
	大肠杆菌	1	KPC-5	N	P
	大肠杆菌	1	KPC-6	N	P
	大肠杆菌	1	KPC-7	N	P
	大肠杆菌	1	KPC-14	N	P
	大肠杆菌	1	KPC-28	N	P
	大肠杆菌	1	KPC-31	N	P
	大肠杆菌	1	KPC-33	N	P
	大肠杆菌	1	NDM-7	N	P
	大肠杆菌	1	NDM-19	N	P
	大肠杆菌	1	IMP-1	N	P
	大肠杆菌	1	IMP-14	N	P
	大肠杆菌	2	OXA-181	N	P
	大肠杆菌	2	OXA-244	N	P
	大肠杆菌	1	OXA-484	N	P

[0357]

	大肠杆菌	1	ESBL + 突变 PmrB (G160E)	N	P
	大肠杆菌	1	ESBL + MCR-1	N	P
	大肠杆菌	1	TEM-1 + OXA-244	N	P
	大肠杆菌	1	CMY + VIM-4	N	P
	大肠杆菌	1	CMY-13 + VIM-1	N	P
	大肠杆菌	1	CMY-2 + OXA-244	N	P
	大肠杆菌	1	SHV + DHA	N	P
	大肠杆菌	1	SHV-12 + IMP-8	N	P
	大肠杆菌	1	CTX-M + MCR-3.2	N	P
	大肠杆菌	1	CTX-M-2 + MCR-1	N	P
	大肠杆菌	1	CTX-M-13 + CMY	N	P
	大肠杆菌	1	CTX-M + NDM-19	N	P
	大肠杆菌	1	CTX-M-15 + OXA-48	N	P
	大肠杆菌	1	NDM-1 + MCR-1	N	P
	大肠杆菌	2	OXA-48 + MCR-1	N	P
	大肠杆菌	1	NDM-1 + VIM-2	N	P
	大肠杆菌	1	MCR-1 + OXA-48 + KPC-28	N	P
	大肠杆菌	1	TEM-1 + KPC-2 + OXA-9	N	P
	大肠杆菌	1	TEM-1 + NDM-9 + OXA-1	N	P
	大肠杆菌	1	CTX-M-9 + TEM-1 + KPC-2	N	P
	大肠杆菌	1	CTX-M-15 + CMY-6 + NDM-4	N	P
	大肠杆菌	1	CTX-M-15 + CMY-4 + OXA-204	N	P
	大肠杆菌	1	CTX-M + NDM-5 + OXA-181	N	P
	大肠杆菌	1	CTX-M-15 + NDM-6 + OXA-1	N	P
	大肠杆菌	1	CTX-M-15 + OXA-232 + OXA-1	N	P
	大肠杆菌	1	CTX-M-15 + CMY-2 + OXA-204 + OXA-1	N	P
	大肠杆菌	1	CTX-M-15 + CMY-4 + OXA-204 + OXA-1	N	P
	大肠杆菌	1	CTX-M-15 + TEM-1 + CMY + NDM-1	N	P
	大肠杆菌	1	CTX-M + SHV + NDM-1 + OXA-48	N	P
	大肠杆菌	1	TEM-1 + CMY-16 + NDM-1 + OXA-1 + OXA-10	N	P
	肺炎克雷伯菌	1	DHA-2	N	P
	肺炎克雷伯菌	1	SHV-2a	N	P
	肺炎克雷伯菌	1	SHV-11	N	P
	肺炎克雷伯菌	1	SHV-38	N	P

[0358]

	肺炎克雷伯菌	1	TEM-3	N	P
	肺炎克雷伯菌	1	GES-1	N	P
	肺炎克雷伯菌	1	CTX-M-2	N	P
	肺炎克雷伯菌	1	CTX-M-3	N	P
	肺炎克雷伯菌	1	CTX-M-8	N	P
	肺炎克雷伯菌	1	CTX-M-15	N	P
	肺炎克雷伯菌	1	CTX-M-18	N	P
	肺炎克雷伯菌	1	CTX-M-19	N	P
	肺炎克雷伯菌	1	KPC-3	N	P
	肺炎克雷伯菌	1	NDM-1	N	P
	肺炎克雷伯菌	1	IMP-8	N	P
	肺炎克雷伯菌	1	OXA-48	N	P
	肺炎克雷伯菌	2	OXA-163	N	P
	肺炎克雷伯菌	1	OXA-517	N	P
	肺炎克雷伯菌	1	CMY-4 + OXA-204	N	P
	肺炎克雷伯菌	1	SHV-36 + TEM-1	N	P
	肺炎克雷伯菌	2	SHV-5 + VIM-1	N	P
	肺炎克雷伯菌	1	SHV-5 + IMP-1	N	P
	肺炎克雷伯菌	1	SHV-12 + IMP-8	N	P
	肺炎克雷伯菌	1	SHV-11 + OXA-48	N	P
	肺炎克雷伯菌	2	CTX-M + MCR-1	N	P
	肺炎克雷伯菌	1	CTX-M-15 + SHV-1	N	P
	肺炎克雷伯菌	1	CTX-M-15 + SHV-11	N	P
	肺炎克雷伯菌	1	CTX-M-15 + TEM	N	P
	肺炎克雷伯菌	1	CTX-M + KPC-3	N	P
	肺炎克雷伯菌	1	CTX-M + OXA-370	N	P
	肺炎克雷伯菌	1	CTX-M + OXA-519	N	P
	肺炎克雷伯菌	1	KPC-4 + NDM-7	N	P
	肺炎克雷伯菌	1	KPC + VIM	N	P
	肺炎克雷伯菌	1	CTX-M-15 + SHV-1 + TEM-1	N	P
	肺炎克雷伯菌	1	CTX-M-14 + SHV-11 + TEM-1	N	P
	肺炎克雷伯菌	1	CTX-M-15 + SHV-99 + TEM-1	N	P
	肺炎克雷伯菌	1	CTX-M + SHV-12 + GES-5	N	P
	肺炎克雷伯菌	1	CTX-M-15 + TEM-1 + OXA-48	N	P
	肺炎克雷伯菌	1	CTX-M + NDM-1 + OXA-232	N	P

[0359]

肺炎克雷伯菌	1	CTX-M + NDM-5 + OXA-232	N	P
肺炎克雷伯菌	1	CTX-M + NDM-4 + KPC-2	N	P
肺炎克雷伯菌	1	NDM-5 + VIM-1 + OXA-181	N	P
肺炎克雷伯菌	1	MCR-1 + SHV-2 + SHV-106 +在开放阅读框中由 IS5 截短的 mgrB	N	P
肺炎克雷伯菌	1	SHV-11 + TEM-1 + KPC-3 + OXA-9	N	P
肺炎克雷伯菌	1	CTX-M-3 + SHV-1 + TEM-1 + VIM-19	N	P
肺炎克雷伯菌	1	CTX-M + SHV-11 + TEM-1 + OXA-162	N	P
肺炎克雷伯菌	1	CTX-M-15 + SHV-28 + TEM-1 + CMY + OXA-204	N	P
肺炎克雷伯菌	1	CTX-M-15 + SHV-11 + TEM-1 + NDM-1 + OXA-1	N	P
肺炎克雷伯菌	1	CTX-M-15 + SHV-1 + TEM-1 + OXA-232 + OXA-1	N	P
肺炎克雷伯菌	1	CTX-M-15 + SHV-11 + TEM-1 + NDM-1 + OXA-1 + OXA-181	N	P
肺炎克雷伯菌	1	CTX-M-15 + SHV-27 + TEM-1 + NDM-1 + OXA-1 + OXA-181	N	P
产酸克雷伯菌(*K. oxytoca*)	2	CTX-M-15	N	P
产酸克雷伯菌	1	DHA-1 + SHV-75	N	P
奇异变形杆菌(*P. mirabilis*)	1	ACC-1	N	P
奇异变形杆菌	1	TEM-52	N	P
奇异变形杆菌	1	CTX-M-71	N	P
弗劳地氏枸橼酸杆菌	1	SHV-12	N	P
弗劳地氏枸橼酸杆菌	1	CTX-M-1	N	P
弗劳地氏枸橼酸杆菌	1	CTX-M-15	N	P
弗劳地氏枸橼酸杆菌	1	CMY-150 + LMB-1	N	P
弗劳地氏枸橼酸杆菌	2	TEM-3 +过表达 AmpC	N	P
弗劳地氏枸橼酸杆菌	1	TEM-1 + KPC-2	N	P
弗劳地氏枸橼酸杆菌	1	TEM-1 + VIM-2	N	P
弗劳地氏枸橼酸杆菌	1	SHV-12 + TEM-1 + OXA-48	N	P
弗劳地氏枸橼酸杆菌	1	CTX-M + VIM + OXA-48	N	P
弗劳地氏枸橼酸杆菌	1	CTX-M-15 + TEM-1 + CMY-48 + OXA-4样	N	P
弗劳地氏枸橼酸杆菌	1	CMY-135 + MOX-9 + OXA-372 + OXA-10	N	P

[0360]

	弗劳地氏枸橼酸杆菌	1	TEM-1 + VIM-2 + OXA-9 + OXA-10	N	P
	科泽氏枸橼酸杆菌(*C. koserii*)	1	CTX-M-1	N	P
	科泽氏枸橼酸杆菌	1	TEM-1 + OXA-48	N	P
	阴沟肠杆菌(*E. cloacae*)	7	过表达 AmpC	N	P
	阴沟肠杆菌	1	TEM-3	N	P
	阴沟肠杆菌	1	GES-6	N	P
	阴沟肠杆菌	1	CTX-M-9	N	P
	阴沟肠杆菌	1	TMB-1	N	P
	阴沟肠杆菌	1	GIM-1	N	P
	阴沟肠杆菌	1	FRI-1	N	P
	阴沟肠杆菌	1	IMI-3 + 过表达 AmpC	N	P
	阴沟肠杆菌	1	NmcA + 过表达 AmpC	N	P
	阴沟肠杆菌	1	SHV + GES-5	N	P
	阴沟肠杆菌	1	CTX-M-15 + 过表达 AmpC	N	P
	阴沟肠杆菌	1	SHV-5 + OXA-48	N	P
	阴沟肠杆菌	1	SHV-12 + IMP-8	N	P
	阴沟肠杆菌	1	SHV-70 + VIM-1	N	P
	阴沟肠杆菌	1	SHV + OXA-163	N	P
	阴沟肠杆菌	1	TEM-1 + KPC-2	N	P
	阴沟肠杆菌	1	VIM-4 + OXA-48	N	P
	阴沟肠杆菌	1	TEM-1 + KPC-2 + OXA-1	N	P
	产气肠杆菌(*E. aerogenes*)	2	TEM-24	N	P
	粘质沙雷氏菌	1	OXA-405	N	P
	粘质沙雷氏菌	1	过表达 AmpC + 青霉素酶	N	P
	粘质沙雷氏菌	1	ESBL + SME-2	N	P
	粘质沙雷氏菌	1	SHV-12 + IMP-10	N	P
	粘质沙雷氏菌	1	TEM-1 + KPC-2	N	P
	摩氏摩根氏菌(*M. morganii*)	1	过表达 AmpC	N	P
	摩氏摩根氏菌	1	CTX-M-15	N	P
	肠道沙门氏菌(*S. enterica*)	1	CTX-M-15 + TEM-1 + OXA-1 + OXA-9 + OXA-10 + NDM-1	N	P
	蜂房哈夫尼菌(*H. alvei*)	2	过表达 AmpC	N	P
	铜绿假单胞菌	1	SHV-2a	N	P

[0361]

	铜绿假单胞菌	1	SHV-5	N	P
	铜绿假单胞菌	1	TEM-4	N	P
	铜绿假单胞菌	1	GES-2	N	P
	铜绿假单胞菌	1	GES-5	N	P
	铜绿假单胞菌	1	GES-9	N	P
	铜绿假单胞菌	1	PER-1	N	P
	铜绿假单胞菌	1	PER-2	N	P
	铜绿假单胞菌	1	CTX-M-2	N	P
	铜绿假单胞菌	1	BEL	N	P
	铜绿假单胞菌	1	VEB-1	N	P
	铜绿假单胞菌	1	SPM-1	N	P
	铜绿假单胞菌	4	KPC-2	N	P
	铜绿假单胞菌	2	NDM-1	N	P
	铜绿假单胞菌	1	VIM-1	N	P
	铜绿假单胞菌	2	VIM-2	N	P
	铜绿假单胞菌	3	VIM-4	N	P
	铜绿假单胞菌	1	IMP-1	N	P
	铜绿假单胞菌	2	IMP-2	N	P
	铜绿假单胞菌	1	IMP-7	N	P
	铜绿假单胞菌	2	IMP-13	N	P
	铜绿假单胞菌	1	IMP-15	N	P
	铜绿假单胞菌	1	IMP-19	N	P
	铜绿假单胞菌	1	IMP-26	N	P
	铜绿假单胞菌	1	IMP-29	N	P
	铜绿假单胞菌	1	IMP-31	N	P
	铜绿假单胞菌	1	IMP-39	N	P
	铜绿假单胞菌	1	IMP-56	N	P
	铜绿假单胞菌	1	IMP-63	N	P
	铜绿假单胞菌	1	IMP-71	N	P
	铜绿假单胞菌	1	GIM-1 + OXA-2 + OXA 395	N	P
	铜绿假单胞菌	1	过表达 AmpC + OprD 缺陷 + MexA/B-OprM	N	P
	铜绿假单胞菌	1	过表达 AmpC + OprD 缺陷 + MexA/B-OprM + MexX/Y-OprM	N	P
	铜绿假单胞菌	1	过表达 AmpC + OprD 缺陷+ MexA/B-OprM + MexC/D-OprJ	N	P

[0362]

	荧光假单胞菌(*P. fluorescens*)	1	VIM-2	N	P
	恶臭假单胞菌(*P. putida*)	1	IMP-1	N	P
	恶臭假单胞菌	1	IMP-46	N	P
	恶臭假单胞菌	1	VIM-2	N	P
	施氏假单胞菌	1	DIM-1	N	P
	施氏假单胞菌	1	IMP-1	N	P
	施氏假单胞菌	1	VIM-2	N	P
	鲍曼不动杆菌	1	SHV-5	N	P
	鲍曼不动杆菌	1	TEM	N	P
	鲍曼不动杆菌	1	GES-11	N	P
	鲍曼不动杆菌	1	GES-12	N	P
	鲍曼不动杆菌	3	GES-14	N	P
	鲍曼不动杆菌	1	PER-1	N	P
	鲍曼不动杆菌	1	CTX-M-15	N	P
	鲍曼不动杆菌	1	SCO-1	N	P
	鲍曼不动杆菌	1	SIM-1	N	P
	鲍曼不动杆菌	1	VEB-1	N	P
	鲍曼不动杆菌	1	NDM	N	P
	鲍曼不动杆菌	2	NDM-1	N	P
	鲍曼不动杆菌	1	NDM-2	N	P
	鲍曼不动杆菌	2	IMP-1	N	P
	鲍曼不动杆菌	1	IMP-4	N	P
	鲍曼不动杆菌	1	OXA-14	N	P
	鲍曼不动杆菌	4	OXA-23	N	P
	鲍曼不动杆菌	1	OXA-51	N	P
	鲍曼不动杆菌	1	OXA-58	N	P
	鲍曼不动杆菌	1	OXA-66	N	P
	鲍曼不动杆菌	1	OXA-72	N	P
	鲍曼不动杆菌	1	OXA-97	N	P
	鲍曼不动杆菌	1	OXA-143	N	P
	鲍曼不动杆菌	1	OXA-253	N	P
	鲍曼不动杆菌	1	过表达 AmpC + OXA-23	N	P
	鲍曼不动杆菌	1	SHV-5 + OXA-51	N	P

[0363]

	鲍曼不动杆菌	1	GES-11 + OXA-23	N	P
	鲍曼不动杆菌	1	GES-11 + OXA-64	N	P
	鲍曼不动杆菌	1	GES-11 + OXA-98	N	P
	鲍曼不动杆菌	3	GES-12 + OXA-51	N	P
	鲍曼不动杆菌	1	GES-14 + OXA 23	N	P
	鲍曼不动杆菌	5	NDM-1 + OXA 23	N	P
	鲍曼不动杆菌	1	NDM-1 + OXA-51	N	P
	鲍曼不动杆菌	1	OXA-18 + OXA-20	N	P
	鲍曼不动杆菌	1	OXA-24 + OXA-40	N	P
	鲍曼不动杆菌	1	VEB-1 + OXA-10 + OXA-69	N	P
	木糖氧化无色杆菌(*A. xylosoxidan*)	1	VIM-1	N	P
	*A.*基因种(*A. genomospecies*)	1	VIM-4	N	P

[0364] 表12:快速检测在细菌菌落上的验证

[0365] 38株不能水解头孢噻肟的株测试为阴性。因此不存在假阳性。300株可以水解头孢噻肟的株中,所有株在TL上均发出信号。

[0366] 结论

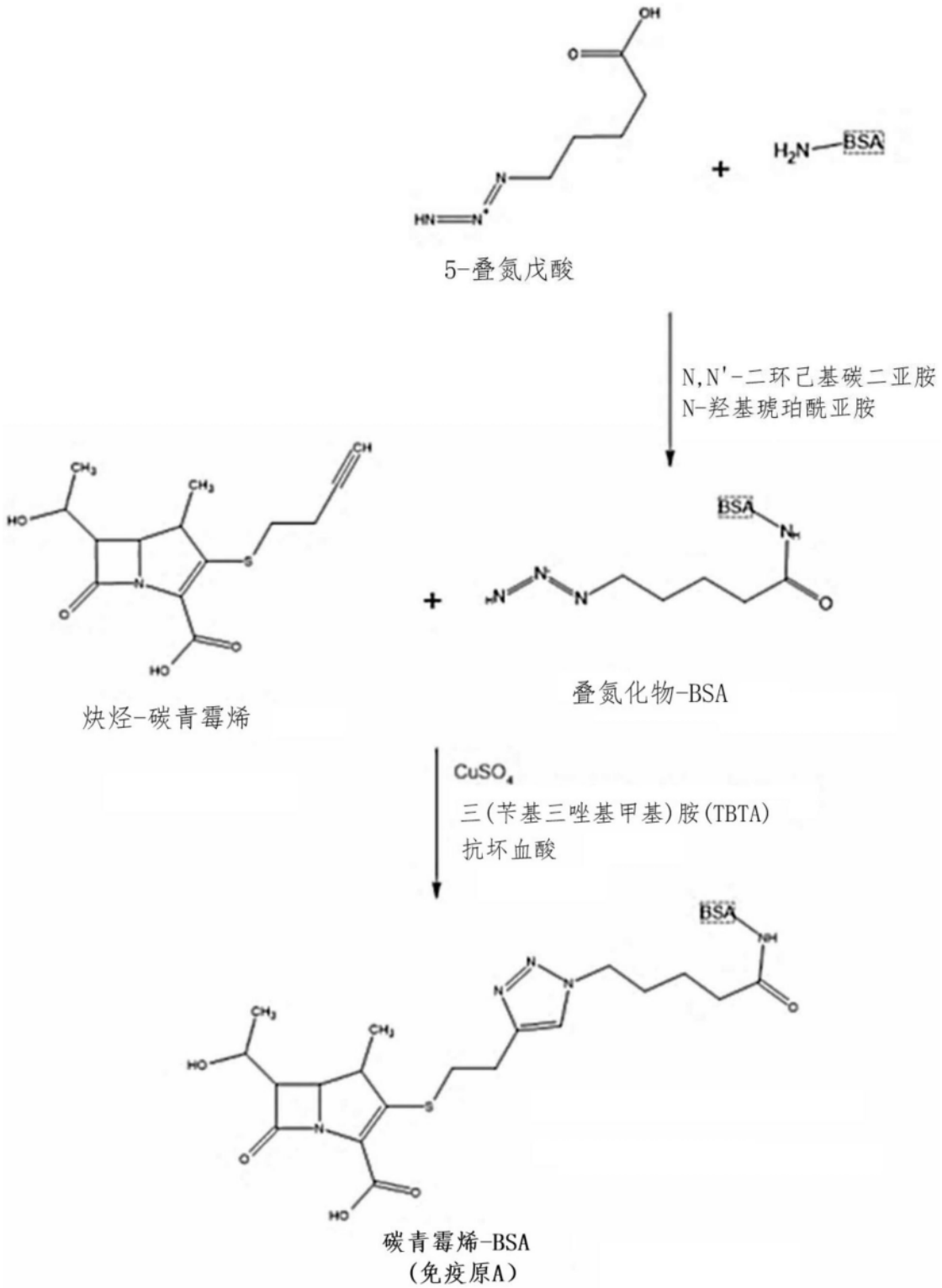
[0367] 在测试的条件下,本发明的条测试能够在40分钟内(温育+迁移)获得100％％的灵敏度和100％的特异性来检测头孢菌素酶活性。这种性能非常适合用于临床和兽医诊断以及环境评估。

[0368] 实施例2:对碳青霉烯类具有抗性的细菌的检测

[0369] A.免疫原的设计和产生

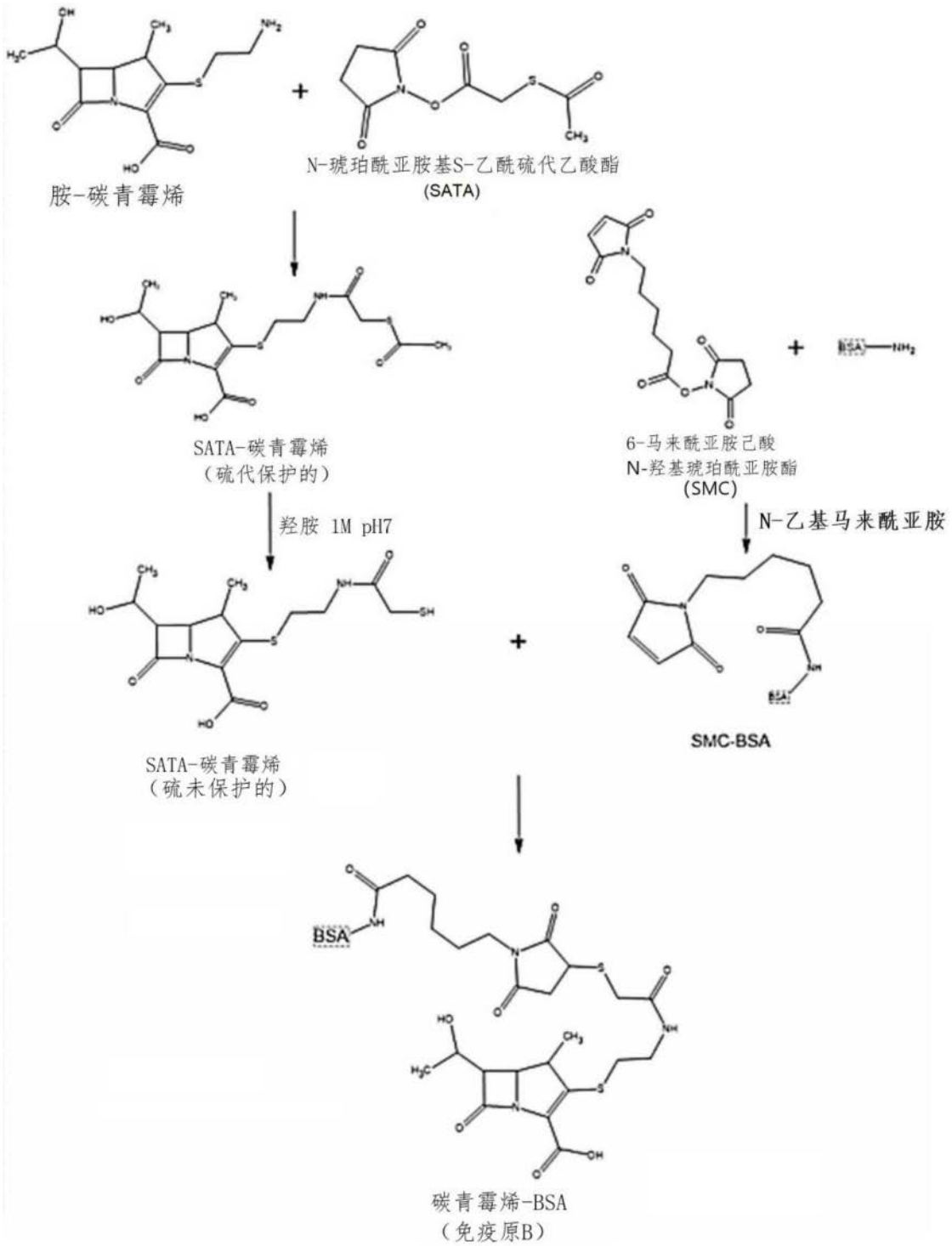
[0370] 1)炔碳青霉烯(S.Saidjalolov,Chem.Eur.J.,2021)是一种小分子,无法诱导对于获得抗体至关重要的免疫应答。因此,有必要将这种抗生素与更大的免疫原性分子牛血清白蛋白(BSA)偶联。免疫原(碳青霉烯-BSA)(称为免疫原A)的产生分两步进行:步骤1a由产生BSA叠氮化物组成,然后步骤2a将BSA叠氮化物与炔碳青霉烯偶联。

[0371]



[0372] 2)并行地,通过其他化学反应产生了另一种免疫原(碳青霉烯-BSA),称为免疫原B。该第二免疫原的产生分三个步骤进行:步骤1a由产生SMC-BSA组成,然后步骤2a将胺-碳青霉烯(Iannazzo L et al,2016)与SATA(N-琥珀酰亚胺基S-乙酰硫代乙酸酯)偶联,以及步骤3a将SMC-BSA与SATA-碳青霉烯偶联。

[0373]



[0374] 3)使用免疫原A来免疫小鼠。为了进行免疫,实施每三周皮下注射50μg免疫原A/小鼠,持续三个月(总共4次免疫)。小鼠休息2个月后,对所述小鼠静脉内进行新的免疫原A注射:50μg产品/小鼠,每天一次,持续三天。休息两天后,将小鼠脾脏细胞与NS1小鼠骨髓瘤细胞融合,利用免疫酶促测试来检测骨髓瘤培养物上清液中的抗碳青霉烯类特异性抗体。

[0375] B.各种形式碳青霉烯的产生和纯化

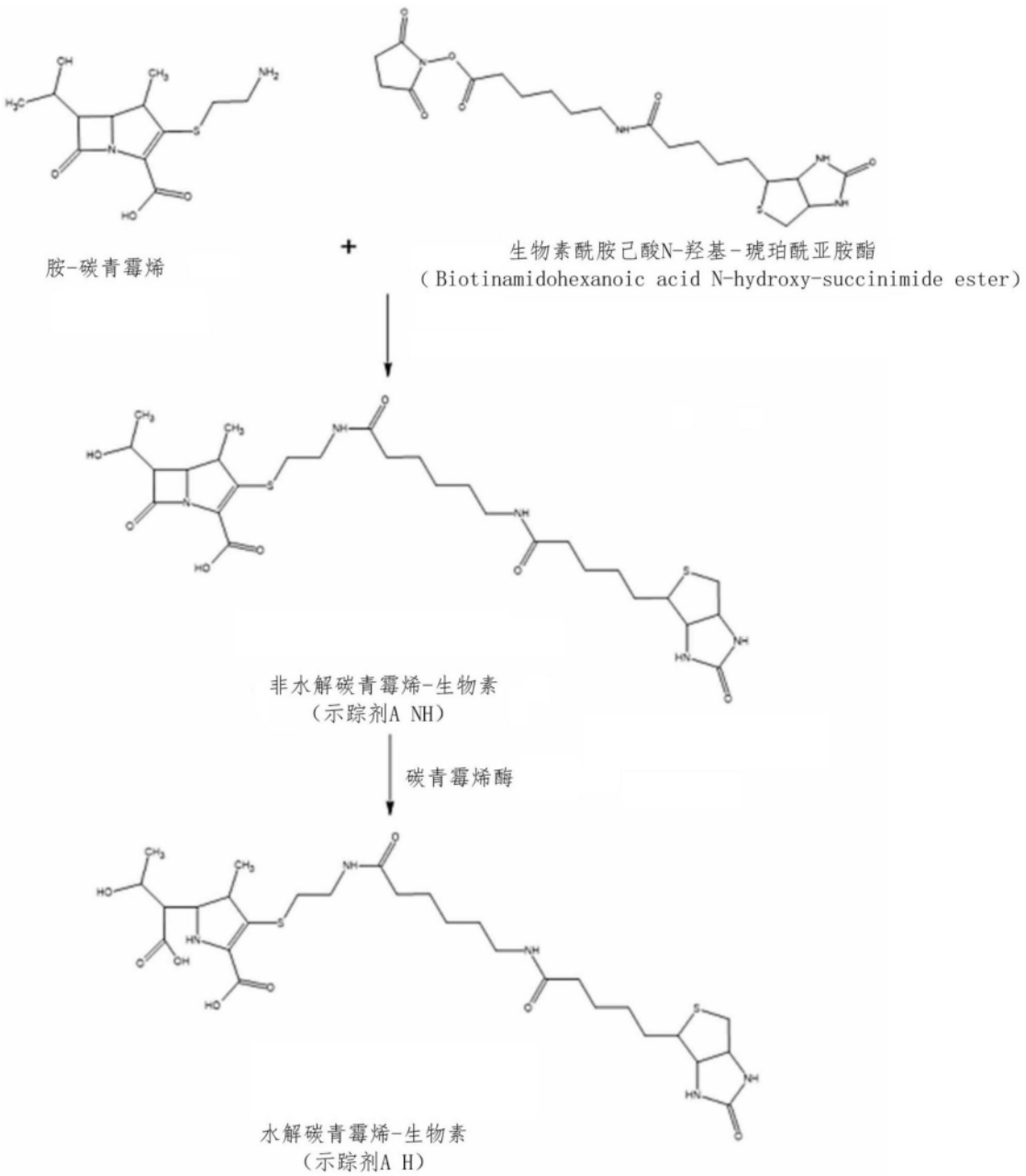
[0376] 为了正确实施本发明,至关重要的是本发明的抗体对完整形式和水解形式的抗生素的亲和力差异是最大的。为此,需要具有可用的非水解碳青霉烯和水解碳青霉烯。

[0377] 非水解和水解碳青霉烯-生物素的产生

[0378] 1)通过胺-碳青霉烯与生物素酰胺己酸N-羟基-琥珀酰亚胺酯(NHS-LC-生物素)偶联得到非水解碳青霉烯-生物素。化学反应在胺碳青霉烯的NH_2基团和生物素的N-羟基琥珀酰亚胺基团之间产生。所得产物称为示踪剂A。

[0379] 2)水解碳青霉烯生物素(示踪剂AH)通过使用与KPC-2(肺炎克雷伯菌碳青霉烯酶)偶联的珠进行酶促反应获得,KPC-2是重组β-内酰胺酶。为此,将50μl 20mg/ml的Beads-KPC-2溶液添加到1ml 2mg/ml的示踪剂ANH溶液中。在25℃反应16小时后,使用磁铁除去Beads-KPC-2。回收含有示踪剂AH的上清液并通过反相层析法纯化。该示踪剂的分子量通过质谱法验证。

[0380]

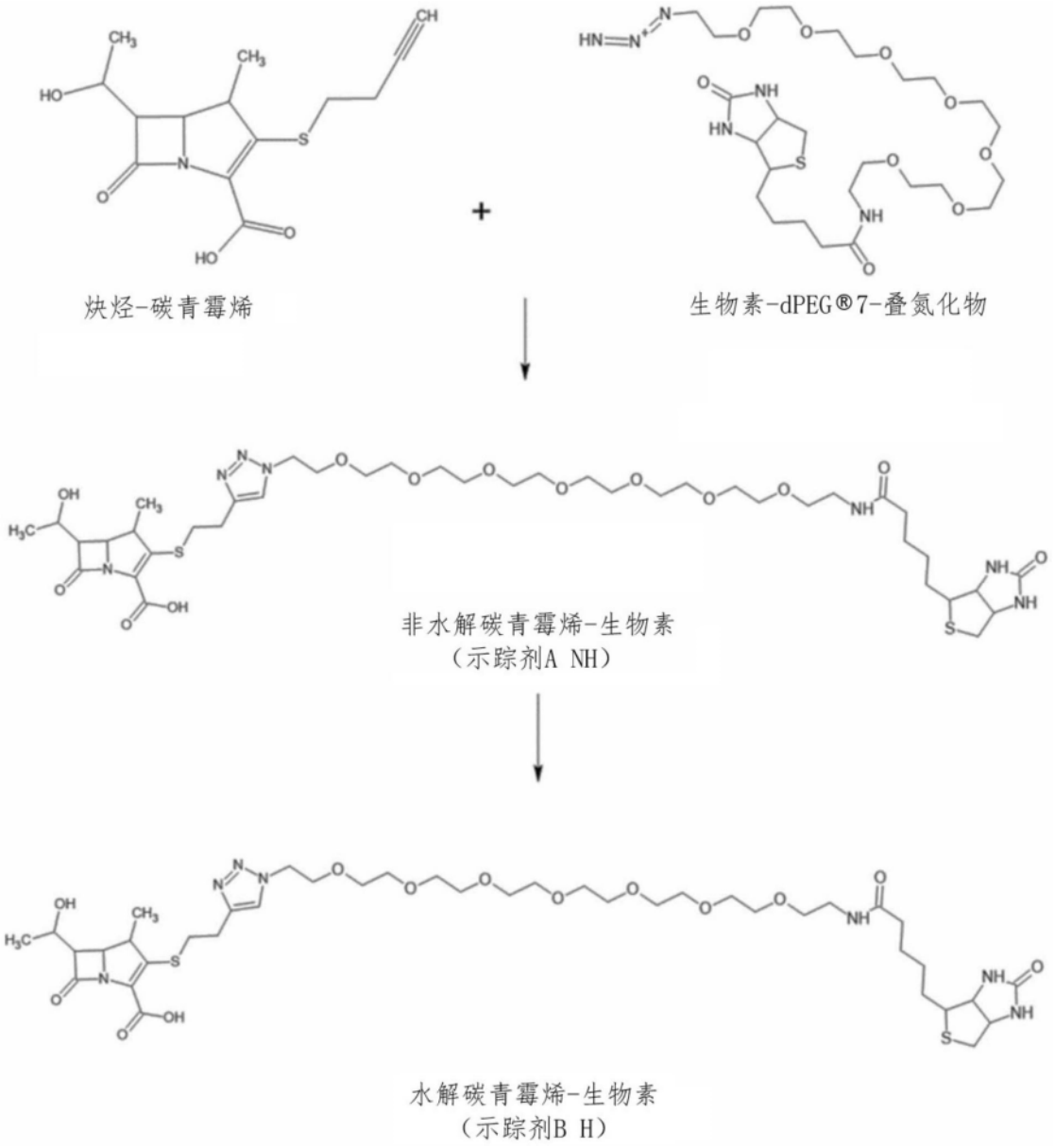


[0381] 3)并行地,通过另一种化学工艺产生了第二种非水解碳青霉烯-生物素。它是通过将炔烃-碳青霉烯和与聚乙二醇(PEG)臂和叠氮化物官能团偶联的生物素(生物素-dPEG®7-叠氮化物)偶联而产生的。所得产物称为示踪剂B NH。

[0382] 4)水解碳青霉烯-生物素(示踪剂B H)通过使用与KPC-2(肺炎克雷伯菌碳青霉烯

酶)偶联的珠进行酶促反应获得,KPC-2是重组β-内酰胺酶。为此,将50μl 20mg/ml的Beads-KPC-2溶液添加到1ml 2mg/ml的示踪剂ANH溶液中。在25℃反应16小时后,使用磁铁除去Beads-KPC-2。回收含有示踪剂B H的上清液并通过反相层析法纯化。该示踪剂的分子量通过质谱法验证。

[0383]



[0384] 非水解和水解碳青霉烯类的产生

[0385] 1)用于抗体选择的非水解碳青霉烯是美罗培南(Sigma-Aldrich)。非水解的美罗培南通过反相层析法在0至20%的水/乙腈梯度下纯化(在7.8%乙腈处分离的峰)。

[0386] 2)水解美罗培南也通过使用与KPC-2偶联的珠进行酶促反应获得。通过质谱法验证所得分子的分子量,

[0387] 3)对其他四种碳青霉烯类(厄他培南、替比培南、多尼培南和亚胺培南)进行相同的规程。

[0388] 4)使用图8中描述的化合物。

[0389] C.感兴趣抗体的产生和选择

[0390] 用免疫原A免疫4只小鼠。为此，每三周进行50μg免疫原A/小鼠的皮下注射，持续三个月(总共4次免疫)。小鼠休息3个月后，为了选择具有最佳免疫应答的小鼠，对它们的抗体进行了第一次测试分析。在此测试中，免疫方案期间采集的鼠类抗体，通过进行在环境温度下温和搅拌温育4小时，由固定化在微量滴定板的孔壁上的第一鼠类抗抗体抗体(AffiniPure山羊抗小鼠IgG+IgM(H+L)；杰克逊免疫研究实验室)捕获。清洗后，向每个孔中添加100μL50ng/ml的示踪剂ANH，并在4℃下温育过夜。清洗后，添加100μL 1EU/mL的链霉亲和素-G4，以揭示示踪剂A NH的存在，并因此揭示非水解的抗碳青霉烯抗体的存在。乙酰胆碱酯酶(G4)活性通过Ellman方法(Ellman等人，1961)测量。Ellman培养基包含7.5 10^{-4}M乙酰硫代胆碱碘化物(酶底物)和0.1M pH7.4磷酸盐缓冲液中的2.5 10^{-4}M 5,5′-二硫代双(2-硝基苯甲酸)(DTNB)(用于硫醇量热测量的试剂)的混合物。酶活性以埃尔曼单位(EU)表示。1EU定义为在1ml培养基中1分钟内吸光度增加1个单位的酶量，对于1cm的光程：它相当于大约8ng的酶。

[0391] 在环境温度下温育一小时并清洗后，将200μl Ellman培养基试剂添加到孔中。一小时后测量信号强度。在此测试期间获得的信号强度与示踪剂A NH特异性抗体的数量成正比。具有最佳免疫应答(最大浓度的特异性抗体)的小鼠接受新的免疫原A静脉内注射：50μg产品/小鼠，每天一次，持续三天。休息两天后处死，将其脾细胞(脾脏细胞)与NS1小鼠骨髓瘤细胞杂交，以获得杂交瘤。

[0392] 融合结束时，将所有细胞分配到10个微量滴定板的孔中。一周后，使用测试1分析每个孔中识别示踪剂A NH的抗体的存在(图6)。该测试使得从93个产生非水解抗碳青霉烯抗体的孔中选择和保存细胞成为可能。为了完善这种选择并保持杂交瘤产生针对非水解美罗培南的特异性抗体，使用4种不同的测试对所选孔的培养物上清液进行了分析(图6)：

[0393] 测试1：在该测试中，培养物上清液中存在的抗体由固定化在微量滴定板的孔壁上的第一鼠类抗抗体抗体捕获。在搅拌下在环境温度下进行温育4小时。清洗后，将示踪剂ANH-生物素添加到每个孔中。4℃温育过夜并清洗后，添加链霉亲和素-G4，以揭示示踪剂ANH的存在，并因此揭示非水解的抗头孢噻肟抗体。

[0394] 测试2：在该测试中，培养物上清液中存在的抗体由固定化在微量滴定板的孔壁上的第一鼠类抗抗体抗体捕获。在搅拌下在环境温度下进行温育4小时。清洗后，将示踪剂A H添加到每个孔中。在4℃温育过夜并清洗后，添加链霉亲和素-G4，以揭示示踪剂A H的存在，并因此揭示水解的抗头孢噻肟抗体的存在。

[0395] 测试3：在该测试中，示踪剂A NH与非水解的美罗培南竞争培养物上清液中存在的特异性抗体的识别。为此，培养物上清液中存在的抗体由固定化在微量滴定板孔壁上的第一鼠类抗抗体抗体捕获。在搅拌下在环境温度下温育4小时。清洗后，将示踪剂A NH和非水解的美罗培南添加到每个孔中。4℃温育过夜并清洗后，添加链霉亲和素-G4以揭示示踪剂ANH的存在。

[0396] 测试4：在该测试中，示踪剂A NH与测试3中使用的非水解美罗培南相同浓度的水解美罗培南竞争培养物上清液中存在的特异性抗体的识别。为此，培养物上清液中存在的抗体由固定化在微量滴定板孔壁上的第一鼠类抗抗体抗体捕获。在搅拌下在环境温度下温育4小时。清洗后，将示踪剂A NH和水解美罗培南添加到每个孔中。4℃温育过夜并清洗后，添加链霉亲和素-G4以揭示示踪剂A NH的存在。

[0397] 对于测试1和测试2,孔中信号的出现分别表明存在非水解的抗碳青霉烯抗体和水解的抗碳青霉烯抗体(参见图9)。

[0398] 对于测试3和测试4,与抑制剂浓度成比例的信号减少表明存在识别抑制剂的抗体:非水解美罗培南(测试3)或水解美罗培南(测试4)。这些测试使得可以评估抗体对非水解美罗培南和水解美罗培南的相对特异性。因此,如果两种形式的美罗培南的信号减少相似,则抗体对这两种分子具有相同的亲和力。如果对于两种形式的美罗培南之一的信号减少较弱,则抗体对该形式的亲和力较弱(图9)。

[0399] 选择测试1获得信号且测试2没有信号、测试3的信号中最大信号减少且测试4的信号没有减少的孔。在选择过程结束时,保留了20个杂交瘤以产生单克隆抗体。

[0400] 参考文献

[0401] Aguirre-Quiñonero,A.,and Martínez-Martínez,L.(2017).Non-molecular detection of carbapenemases in Enterobacteriaceae clinical isolates.J.Infect.Chemother.23,1-11.

[0402] Bernabeu S,Ratnam KC,Boutal H,Gonzalez C,Vogel A,Devilliers K,Plaisance M,Oueslati S,Malhotra-Kumar S,Dortet L,Fortineau N,Simon S,Volland H,Naas T.(2020).A Lateral Flow Immunoassay for the Rapid Identification of CTX-M-Producing Enterobacterales from Culture Plates and Positive Blood Cultures.Diagnostics(Basel)10.

[0403] Bonomo,R.A.(2017).β-Lactamases:A Focus on Current Challenges.Cold Spring Harb Perspect Med 7.

[0404] Boutal H,Vogel A,Bernabeu S,Devilliers K,Creton E,Cotellon G,Plaisance M,Oueslati S,Dortet L,Jousset A,Simon S,Naas T,Volland H.(2018).A multiplex lateral flow immunoassay for the rapid identification of NDM-,KPC-,IMP-and VIM-type and OXA-48-like carbapenemase-producing Enterobacteriaceae.J Antimicrob Chemother 73:909-915.

[0405] Cattoir,V.(2008).Les nouvellesβ-lactamasesàspectreétendu(BLSE).Pathologie infectieuse en réanimation 203-209.

[0406] Ellman L,Courtney D,Andres V,Featherstone R(1961)A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinestare activity Biochemical Pharmacology 7(2)91-95

[0407] Iannazzo L,Soroka D,TribouleS,Fonvielle M,Compain F,.Dubée,J-Mainardi L,HugonneJ-E,Braud E,Arthur M,Etheve-Quelquejeu M,(2016)Routes of synthesis of carbapenems for optimizing both the inactivation of L,D-transpeptidase LdtMt1 of Mycobacterium tuberculosis and the stability towards hydrolysis by β-lactamase BlaC.J.Med.Chem.,59,7,3427-3438

[0408] Iredell,J.,Brown,J.,and Tagg,K.(2016).Antibiotic resistance in Enterobacteriaceae:mechanisms and clinical implications.BMJ 352,h6420.

[0409] Lecour,A.(2017).Détection des carbapenemases chez les entérobactéries:revue de la littérature etévaluation des techniques phé

notypiques.exercice.UniversitéToulouse lll-Paul Sabatier.

[0410] Lutgring,J.D.,and Limbago,B.M.(2016).The Problem of Carbapenemase-Producing-Carbapenem-Resistant-Enterobacteriaceae Detection.J.Clin.Microbiol.54,529-534.

[0411] Maugat,S.,Berger-Carbonne,A.,and Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation,de l'environnement et du travail(ANSES)(2018).Consommation d'antibiotiques et résistance aux antibiotiques en France:une infectionévitée,c'est un antibiotique préservé!

[0412] Perez,F.,Endimiani,A.,Hujer,K.M.,and Bonomo,R.A.(2007).The continuing challenge of ESBLs.Curr Opin Pharmacol 7,459-469.

[0413] Public Health England(2019).Contained and controlled:the UK's 20-year vision for antimicrobial resistance.

[0414] S.Saidjalolov,E.Braud,Z.Edoo,L.Iannazzo,F.Rusconi,M.Riomet,A.Sallustrau,F.Taran,M.Arthur,M.Fonvielle,M.Etheve-Quelquejeu(2021)Click and Release Chemistry for Activity-based Purification ofβ-lactam targets.Chem.Eur.J.,2021

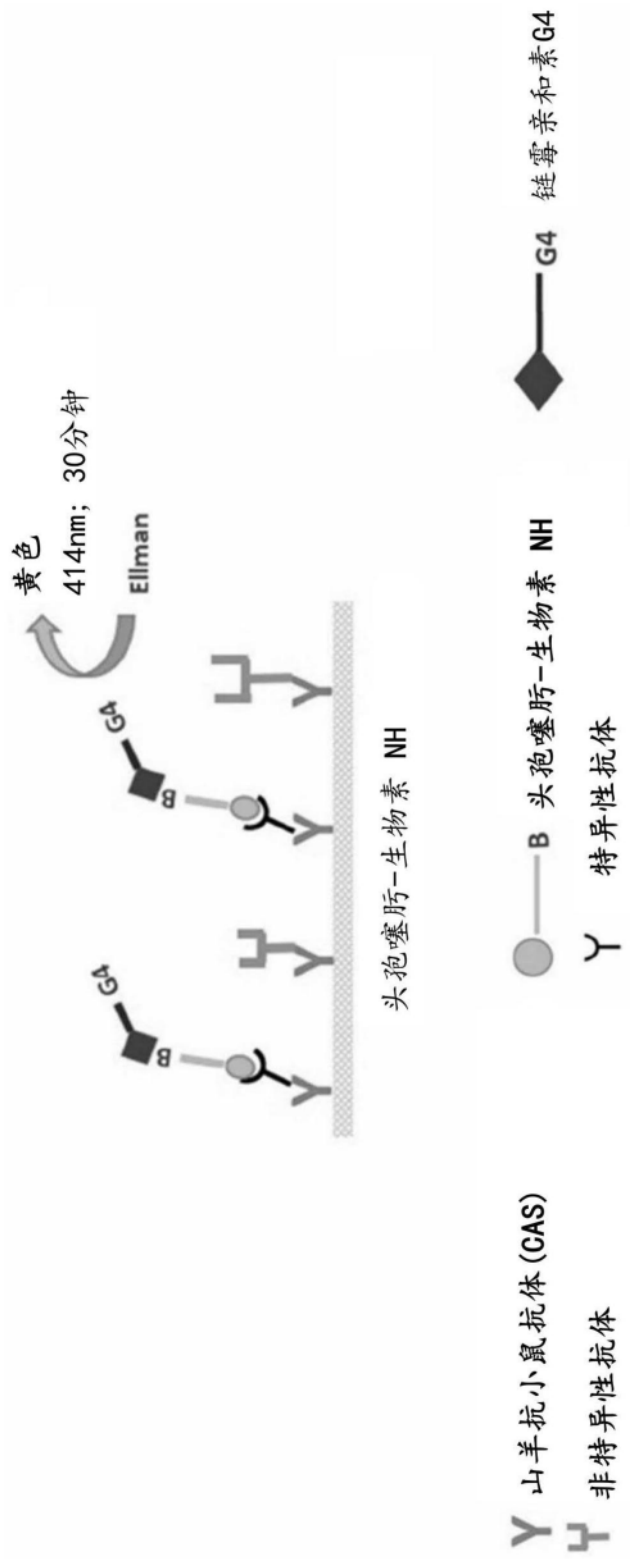

黄色
414nm; 30分钟
Ellman
头孢噻肟-生物素 NH
山羊抗小鼠抗体(CAS)
非特异性抗体
B 头孢噻肟-生物素 NH
特异性抗体
G4 链霉亲和素G4

图1

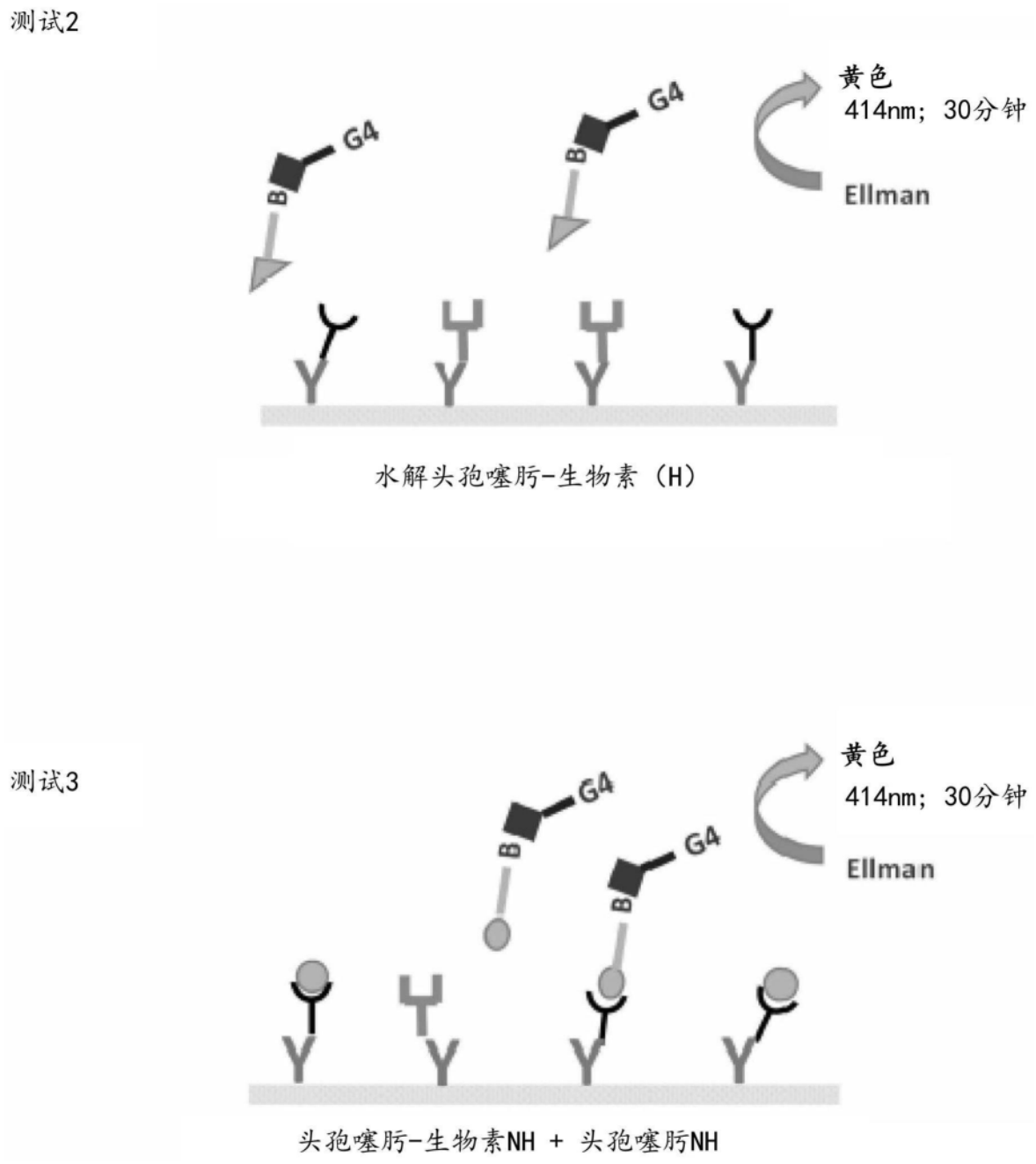

测试2
G4
B
G4
B
黄色
414nm；30分钟
Ellman
水解头孢噻肟-生物素（H）
测试3
G4
B
G4
B
黄色
414nm；30分钟
Ellman
头孢噻肟-生物素NH + 头孢噻肟NH

图2

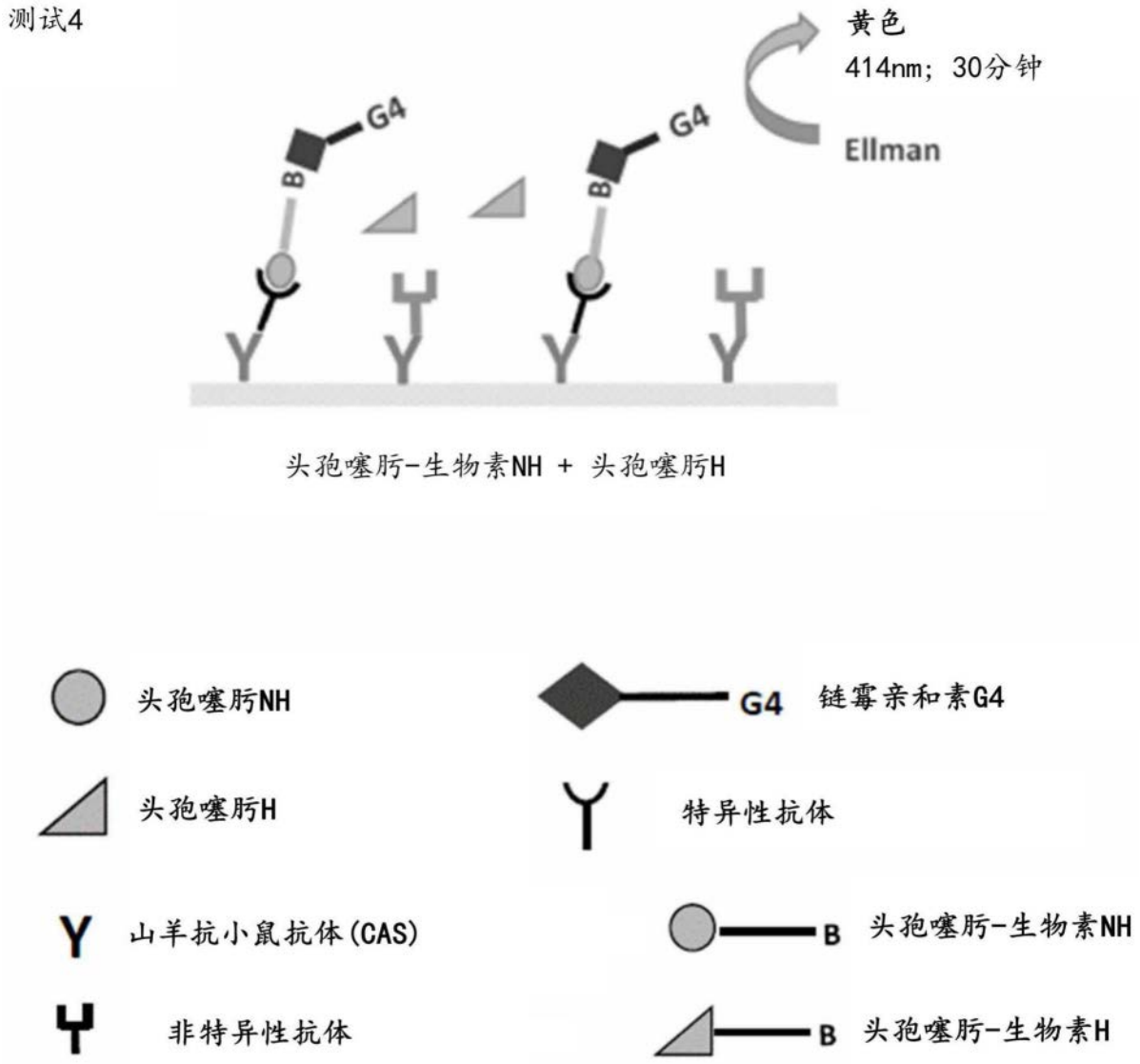

测试4
黄色
414nm；30分钟
Ellman
G4
B
头孢噻肟-生物素NH + 头孢噻肟H
头孢噻肟NH
G4
链霉亲和素G4
头孢噻肟H
特异性抗体
山羊抗小鼠抗体(CAS)
B
头孢噻肟-生物素NH
非特异性抗体
B
头孢噻肟-生物素H

图2(续)

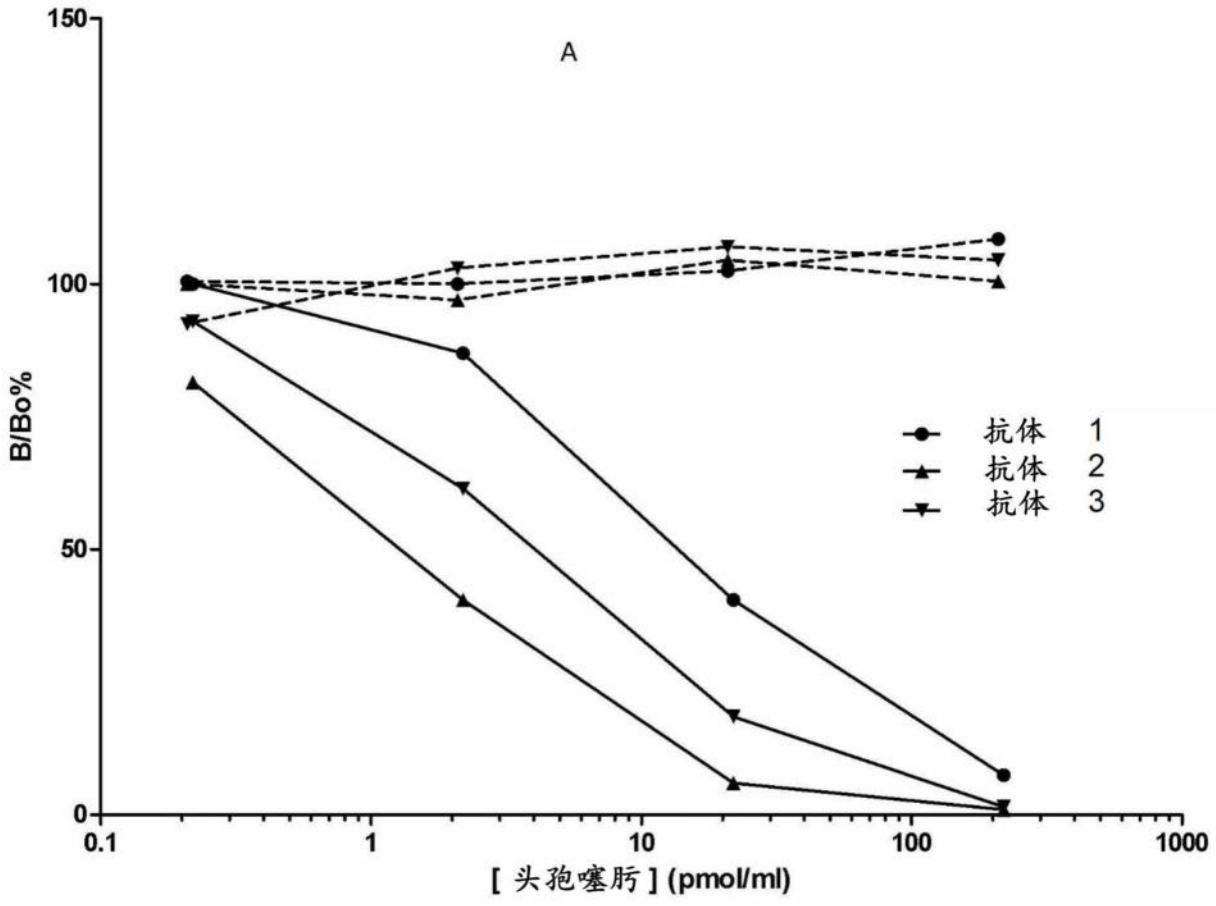


图3

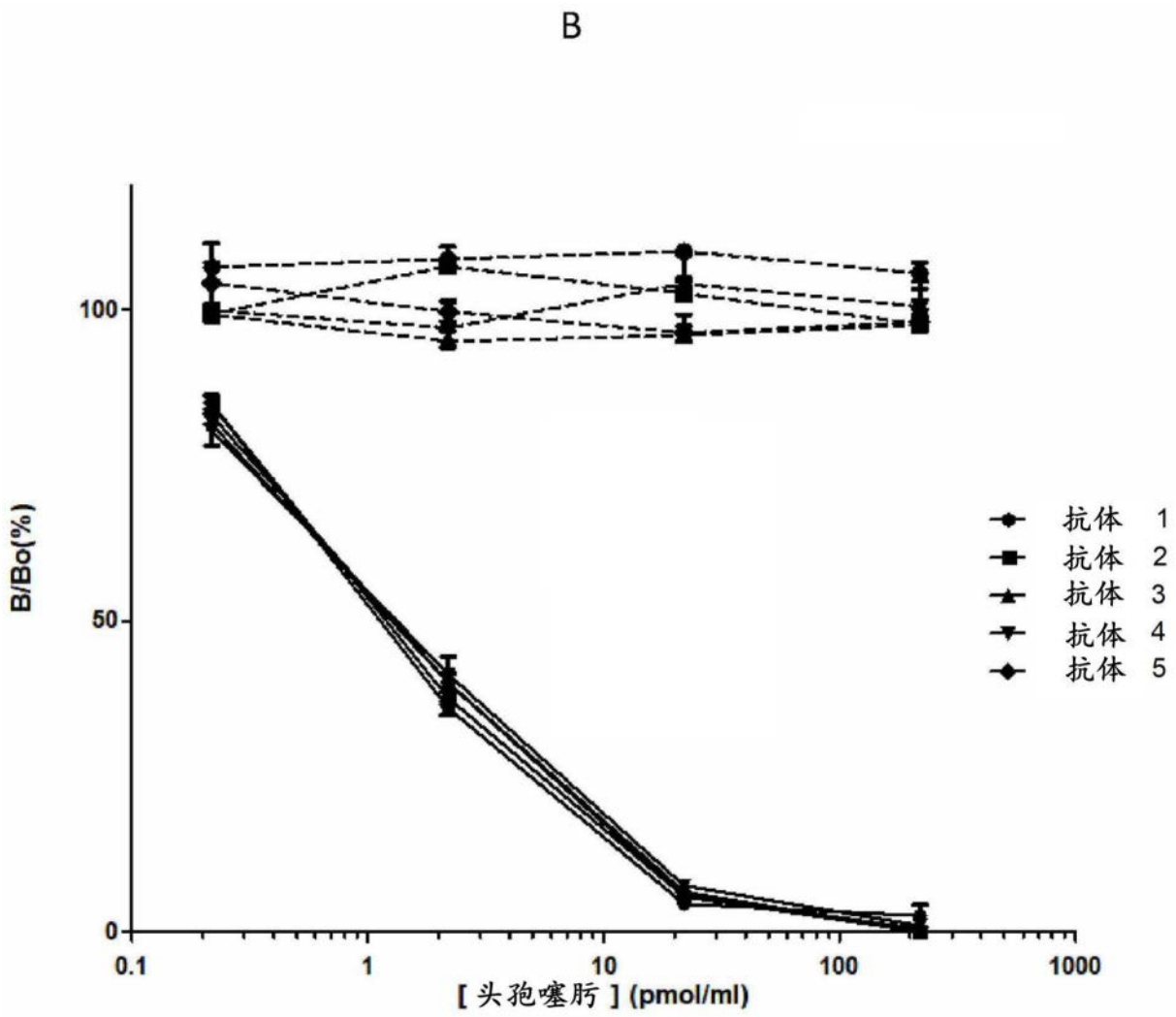


图3(续)

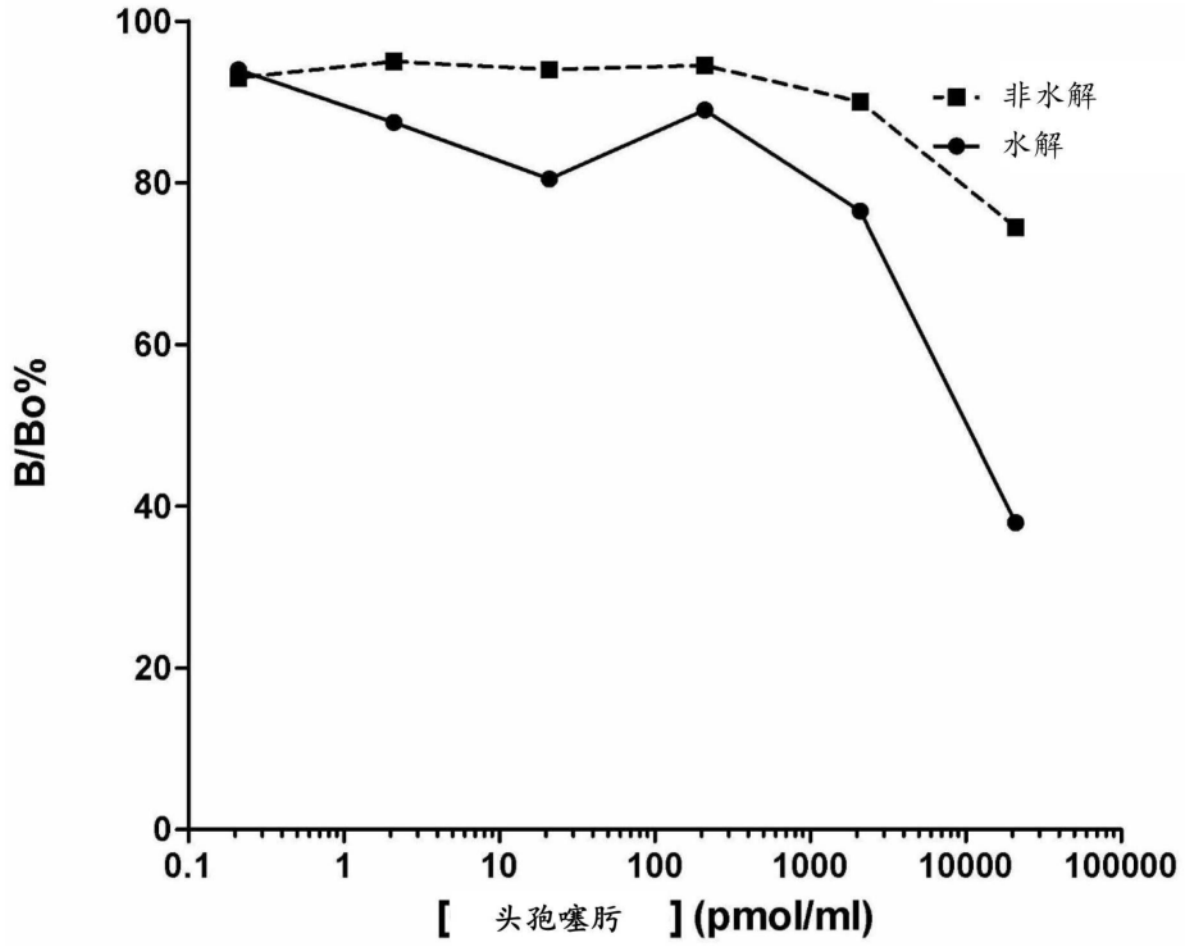

100
80
60
40
20
0
B/Bo%
非水解
水解
0.1
1
10
100
1000
10000
100000
[头孢噻肟] (pmol/ml)

图4

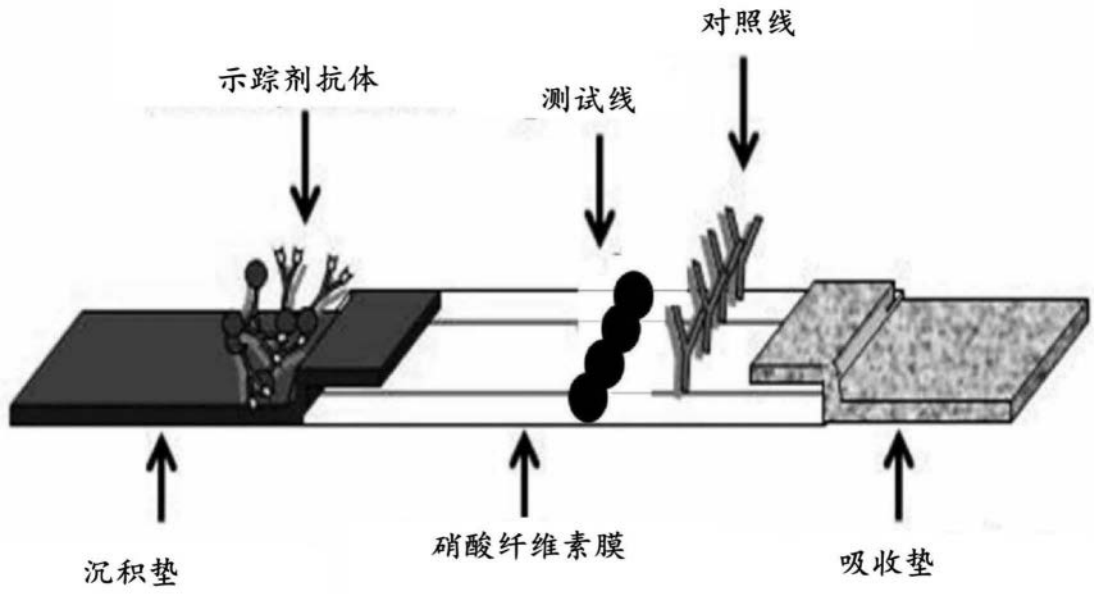

对照线
示踪剂抗体
测试线
沉积垫
硝酸纤维素膜
吸收垫

图5

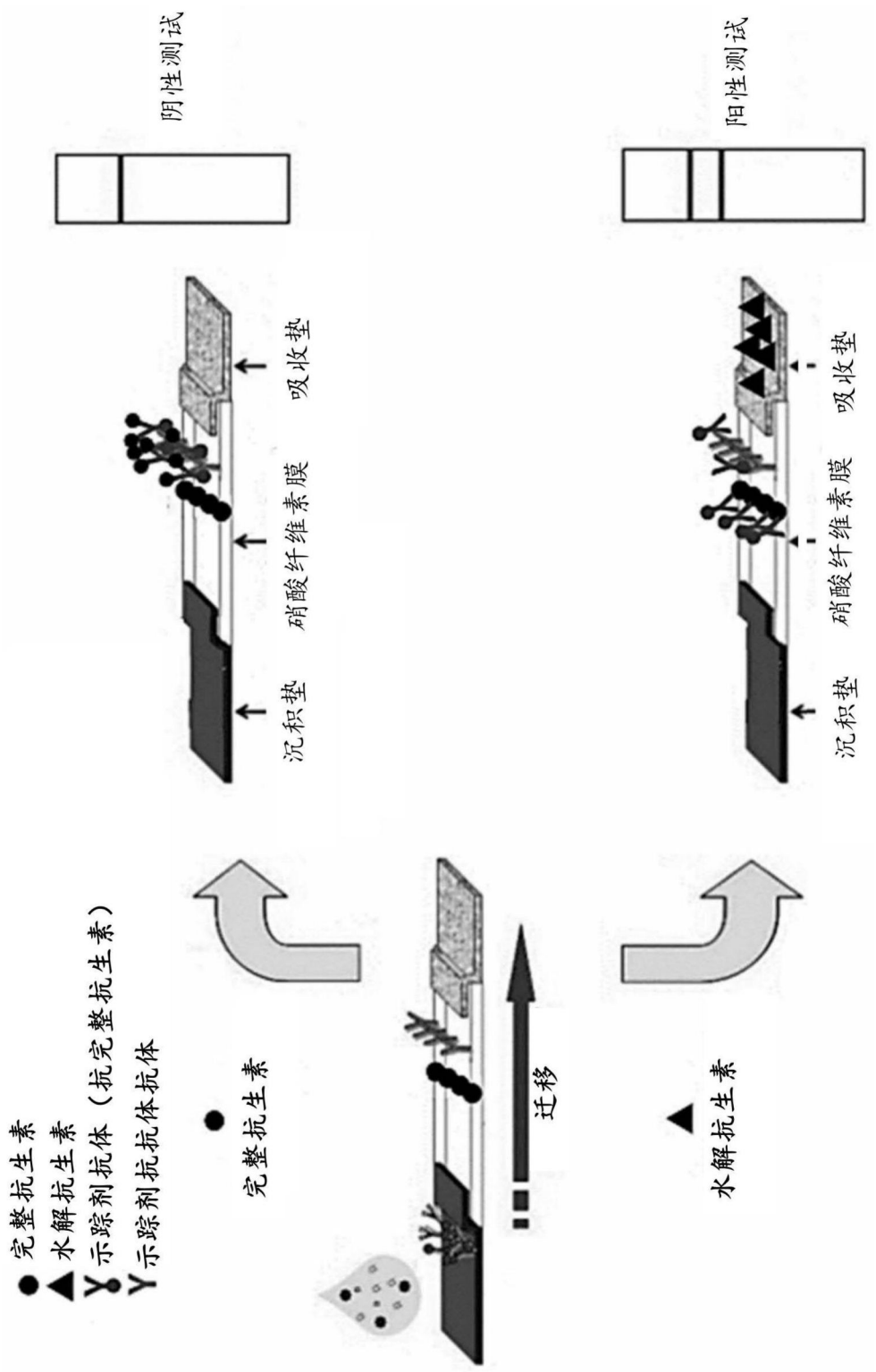

阴性测试
阳性测试
沉积垫
硝酸纤维素膜
吸收垫
沉积垫
硝酸纤维素膜
吸收垫
迁移
完整抗生素
水解抗生素
完整抗生素
水解抗生素
示踪剂抗体（抗完整抗生素）
示踪剂抗体抗体

图6

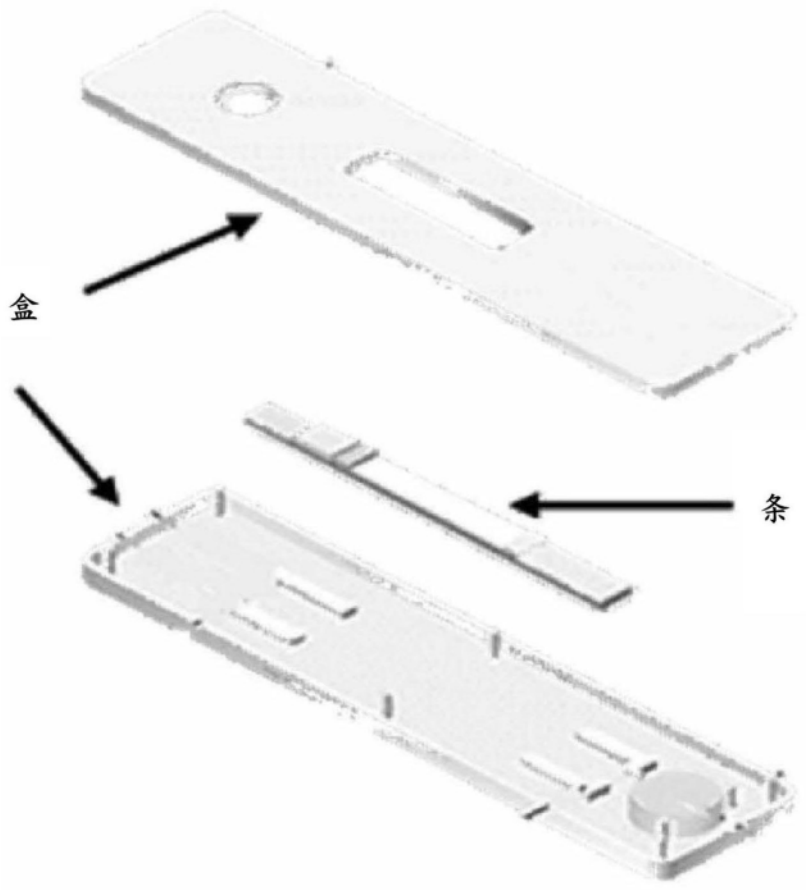
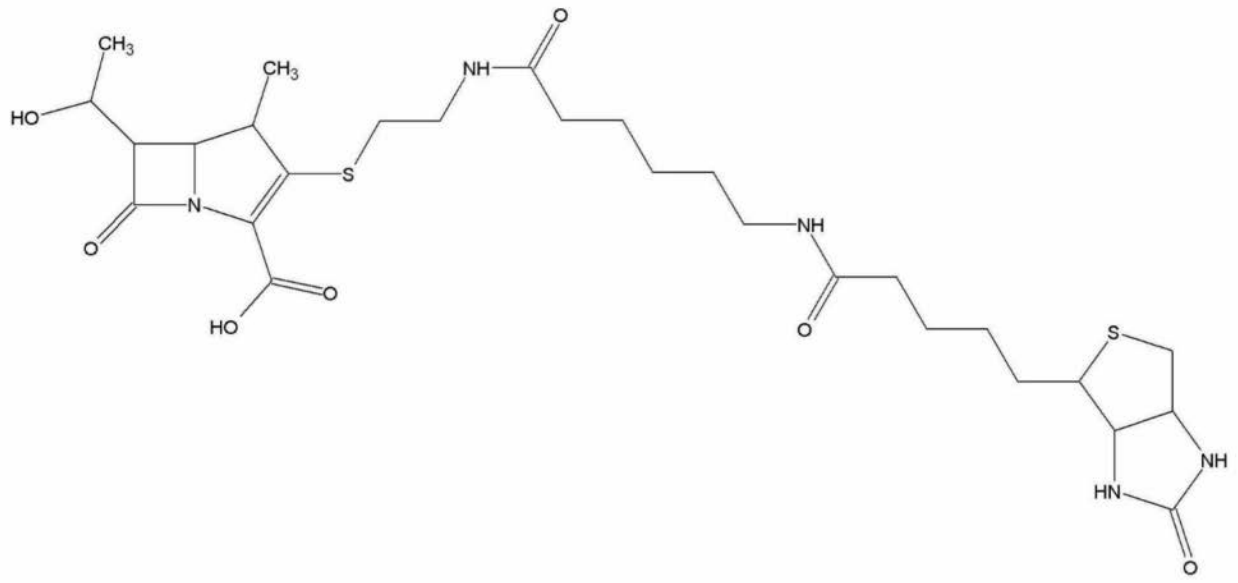


图7

示踪剂

(胺-碳青霉烯 + NHS-LC-生物素)

非水解的



水解的:形式1

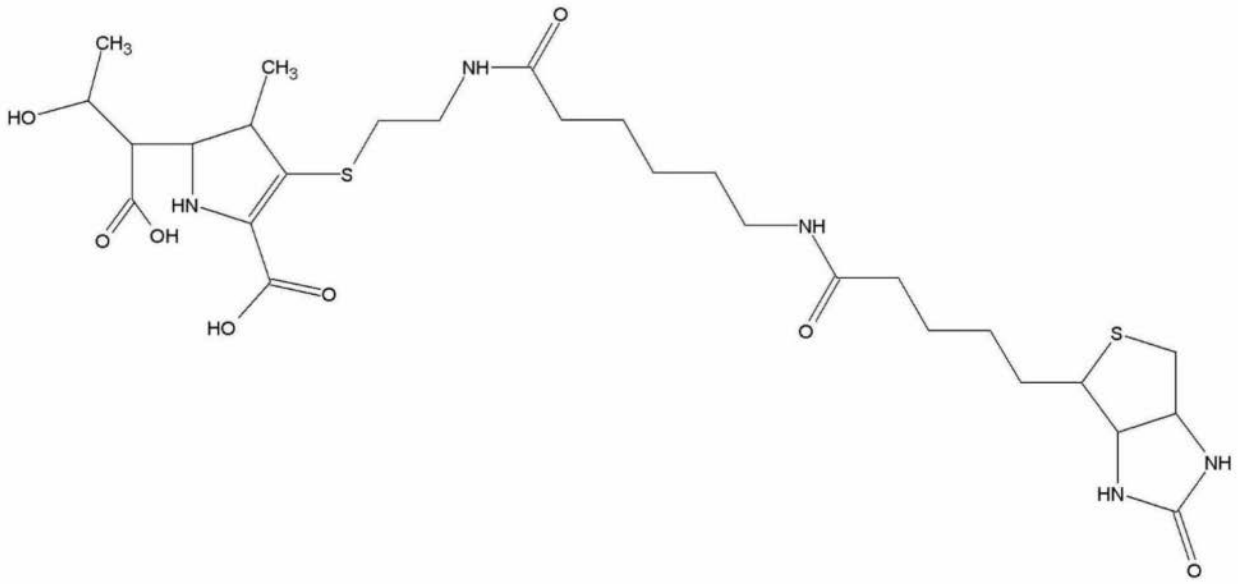
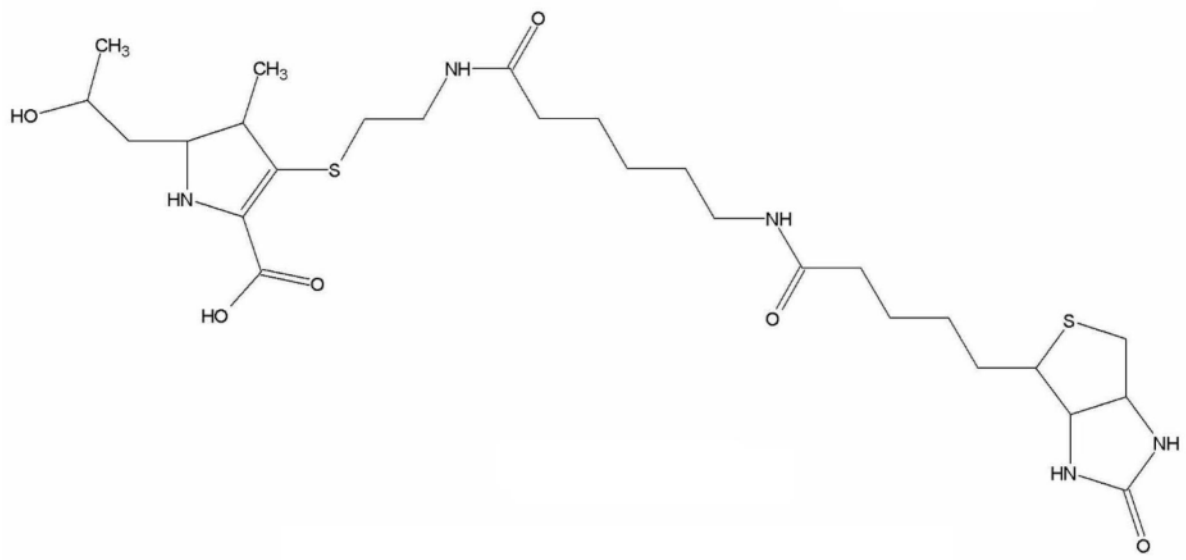


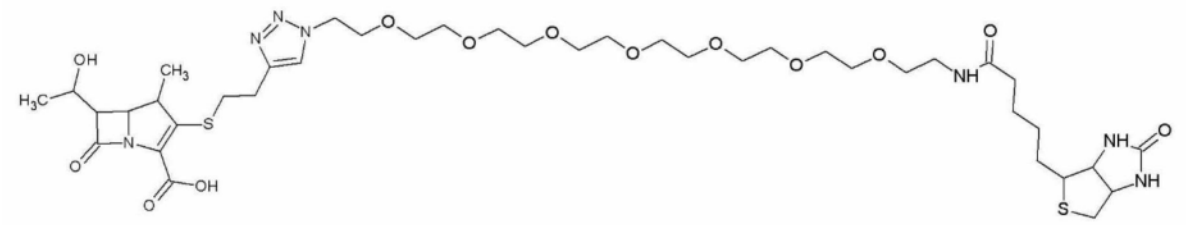
图8

水解的:形式2



示踪剂
(炔烃-碳青霉烯+生物素-dPEG®7-叠氮化物)

非水解的



水解的:形式1

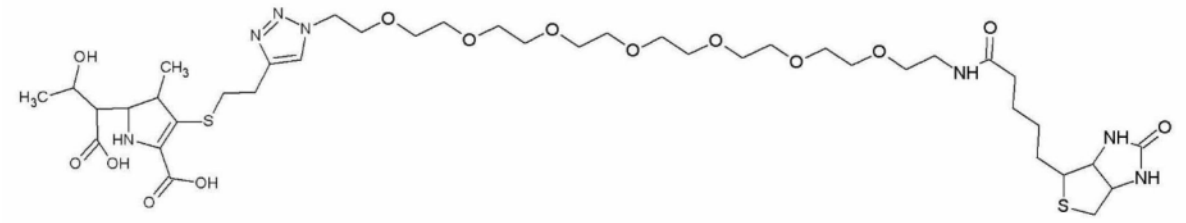


图8(续)

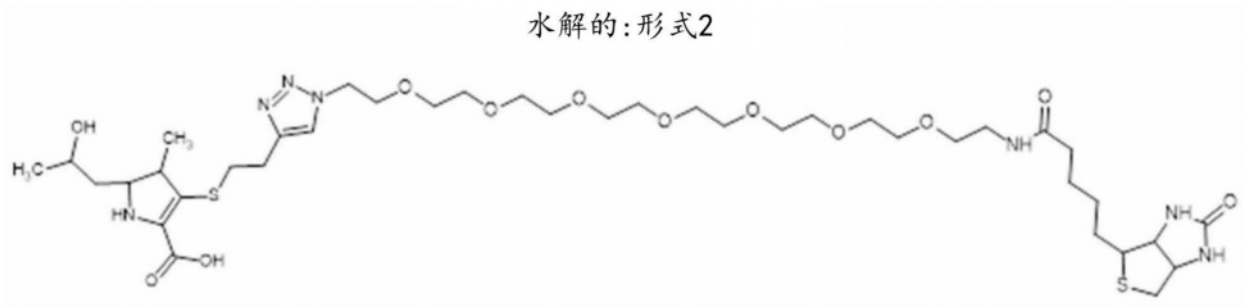

水解的:形式2

图8(续)

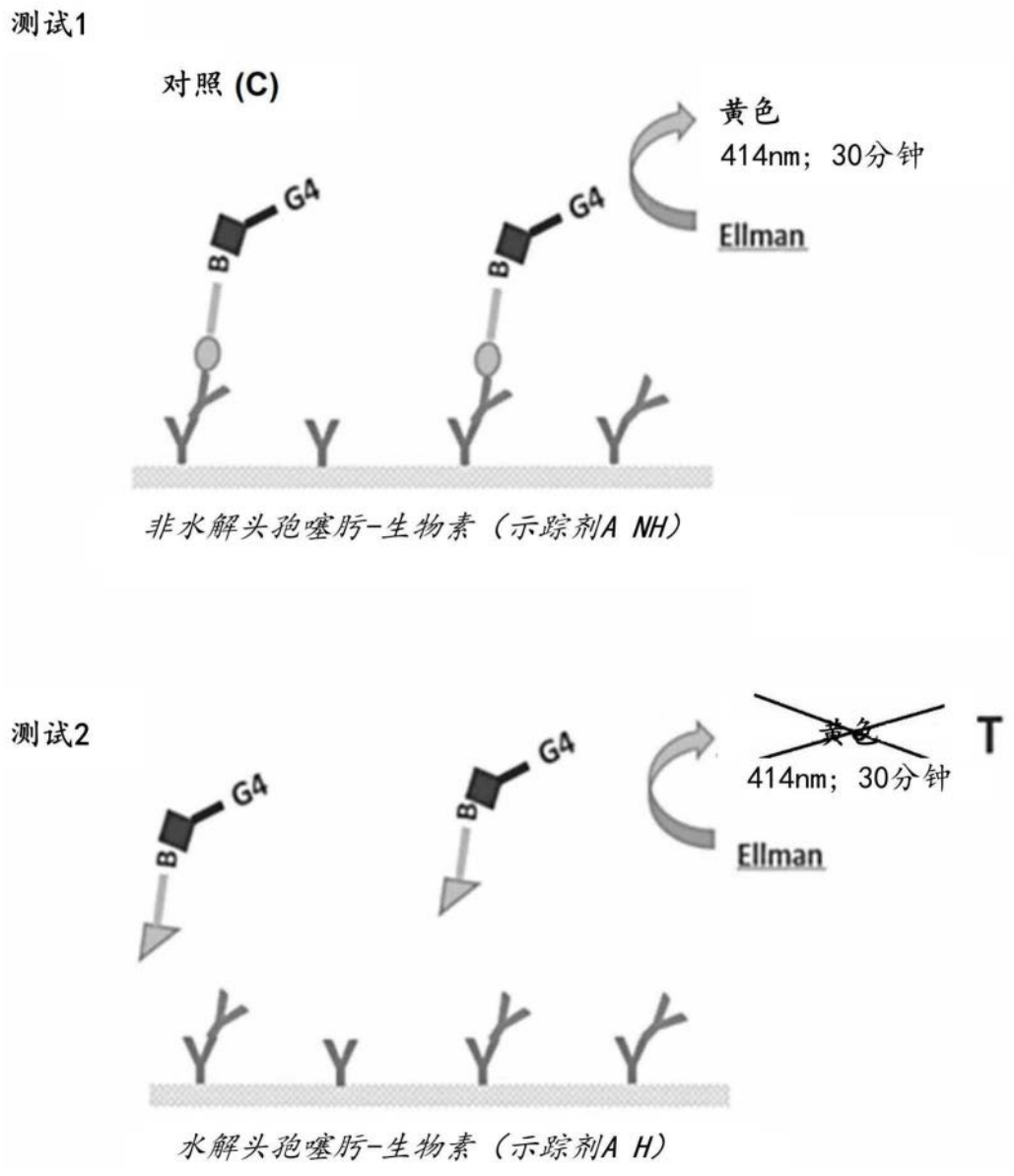

测试1
对照 (C)
黄色
414nm; 30分钟
Ellman
G4
B
非水解头孢噻肟-生物素 (示踪剂A NH)
测试2
T
黄色
414nm; 30分钟
Ellman
G4
B
水解头孢噻肟-生物素 (示踪剂A H)

图9

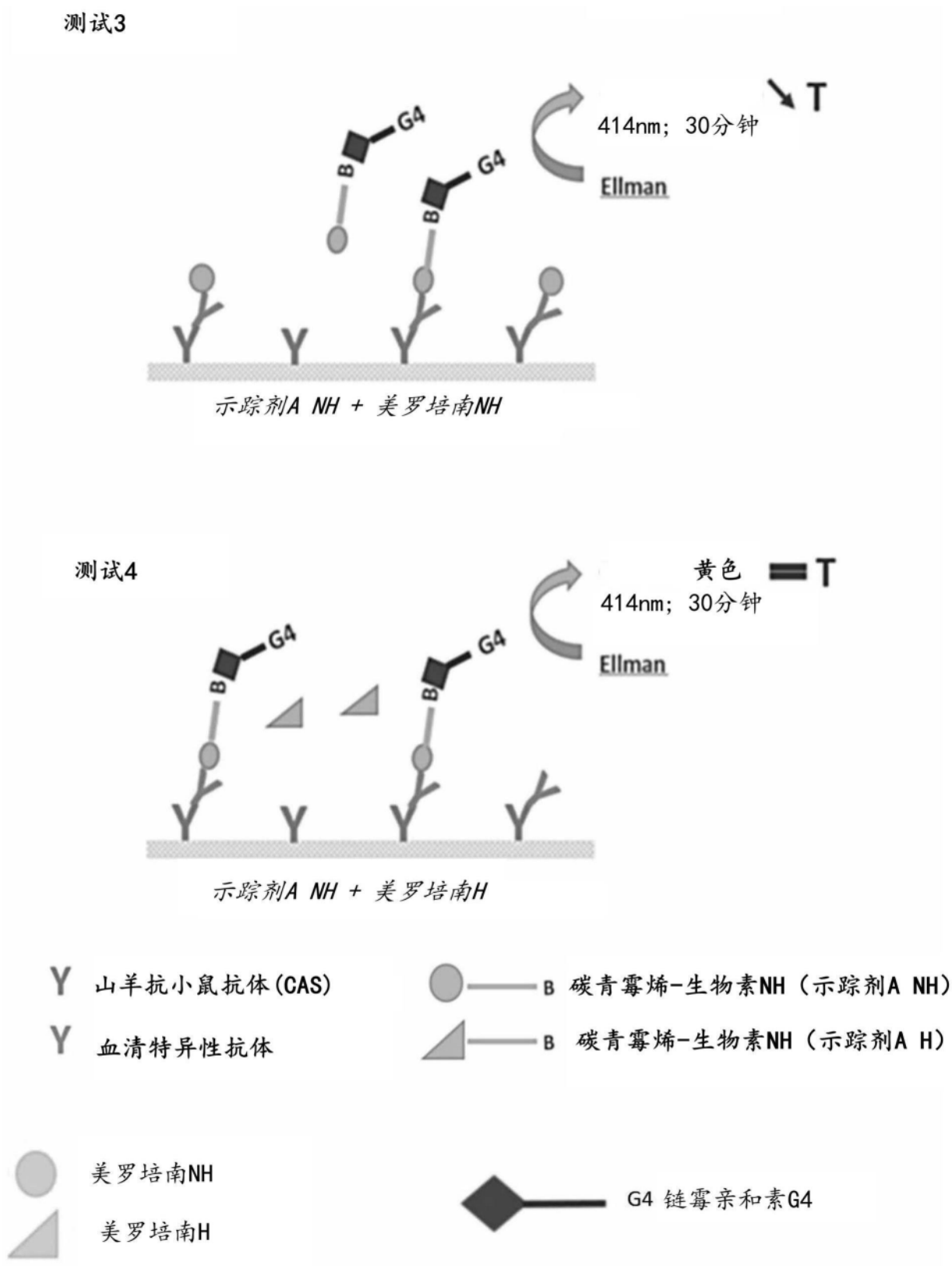

测试3
414nm；30分钟
Ellman
T
G4
B
示踪剂A NH + 美罗培南NH
测试4
黄色
414nm；30分钟
Ellman
T
G4
B
示踪剂A NH + 美罗培南H
山羊抗小鼠抗体(CAS)
血清特异性抗体
碳青霉烯-生物素NH（示踪剂A NH）
碳青霉烯-生物素NH（示踪剂A H）
美罗培南NH
美罗培南H
G4 链霉亲和素G4

图9(续)

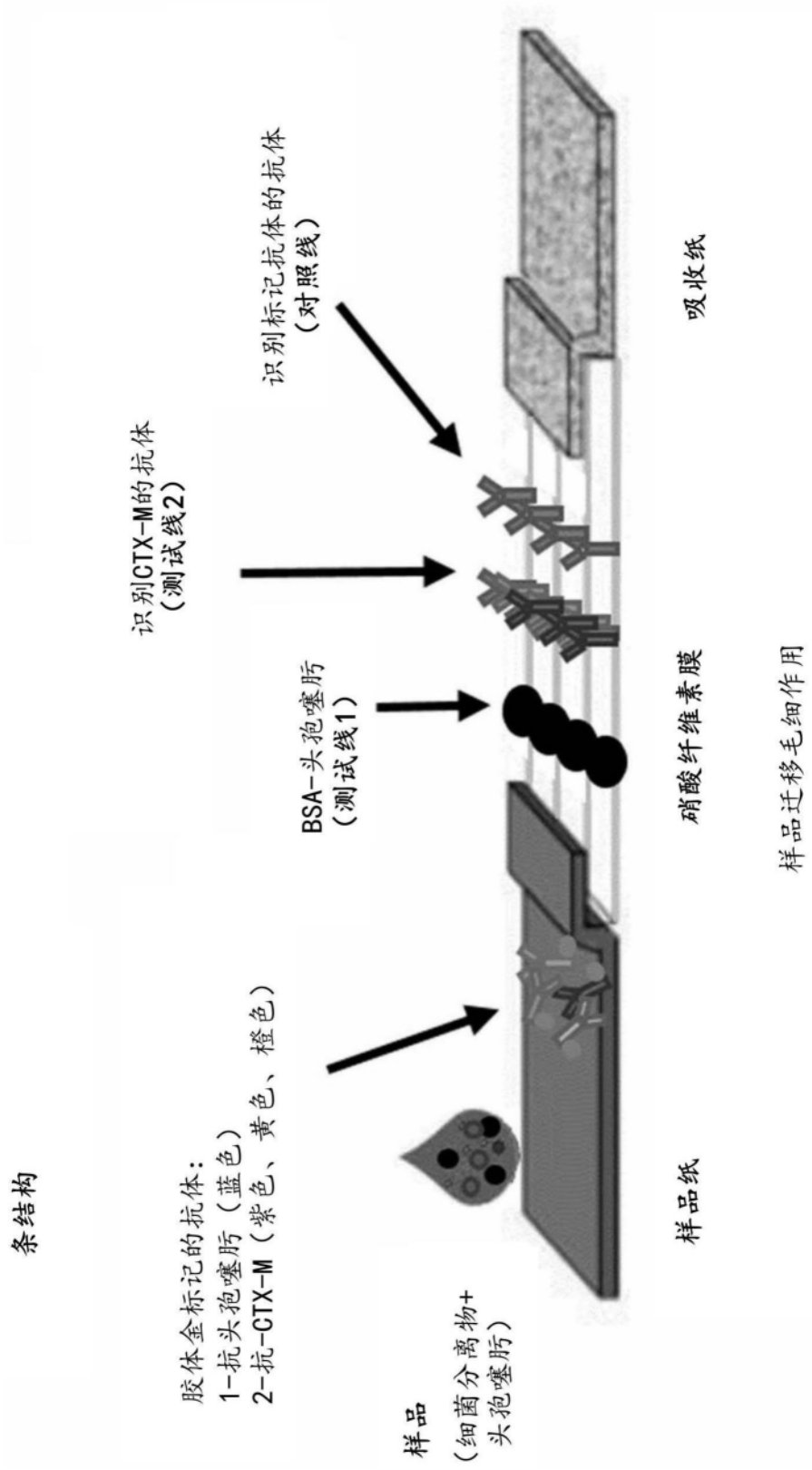

条结构
胶体金标记的抗体：
1-抗头孢噻肟（蓝色）
2-抗-CTX-M（紫色、黄色、橙色）
样品
（细菌分离物+
头孢噻肟）
识别CTX-M的抗体
（测试线2）
BSA-头孢噻肟
（测试线1）
识别标记抗体的抗体
（对照线）
样品纸
硝酸纤维素膜
吸收纸
样品迁移毛细作用

图10

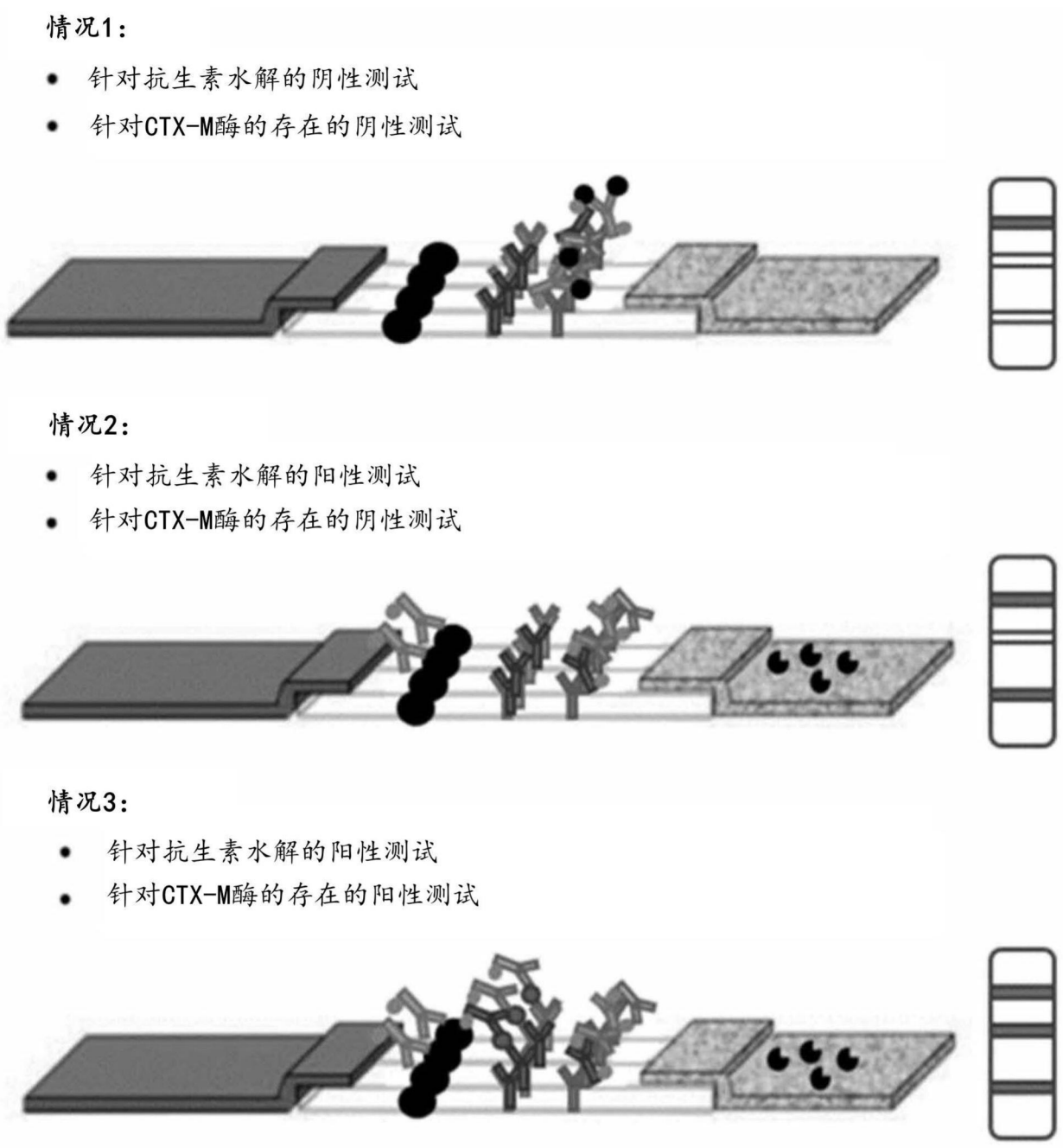

情况1：
针对抗生素水解的阴性测试
针对CTX-M酶的存在的阴性测试
情况2：
针对抗生素水解的阳性测试
针对CTX-M酶的存在的阴性测试
情况3：
针对抗生素水解的阳性测试
针对CTX-M酶的存在的阳性测试

图11