

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：a6144207

※ 申請日期：a6.11.71

※IPC 分類：C12Q^{1/64} (2006.01)

G01N^{33/52} (2006.01)

G01N^{33/53} (2006.01)

G01N^{33/569} (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

捕捉細菌完整細胞之方法及分析細菌樣品之方法 C12R^{1/445} (2006.01)

METHODS OF CAPTURING BACTERIAL WHOLE CELLS AND
METHODS OF ANALYZING SAMPLES FOR BACTERIA

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

美商3M新設資產公司

3M INNOVATIVE PROPERTIES COMPANY

代表人：(中文/英文)

羅伯特 W 史普拉格

SPRAGUE, ROBERT W.

住居所或營業所地址：(中文/英文)

美國明尼蘇答州聖保羅市3M中心

3M CENTER, SAINT PAUL, MINNESOTA 55133-3427, U.S.A.

國 籍：(中文/英文)

美國 U.S.A.

三、發明人：(共 6 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 派翠克 艾倫 馬奇
MACH, PATRICK ALAN
2. 史瑞哈 維卡特瑞曼 達薩拉瑟
DASARATHA, SRIDHAR VENKATARAMAN
3. 傑森 威廉 畢瓊克
BJORK, JASON WILLIAM
4. 馬拉 S 瑞夫-維那
REIF-WENNER, MARA S.
5. 郭春梅
GUO, CHUNMEI
6. 希瑟 M 偉柏
WEBB, HEATHER M.

國 籍：(中文/英文)

1. 美國 U.S.A.
2. 美國 U.S.A.
3. 美國 U.S.A.
4. 美國 U.S.A.
5. 美國 U.S.A.
6. 美國 U.S.A.

四、聲明事項：

☐ 主張專利法第二十二條第二項 ☐ 第一款或 ☐ 第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

☒ 申請前已向下列國家(地區)申請專利：

【格式請依：受理國家(地區)、申請日、申請案號 順序註記】

☒ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 美國；2006年11月22日；60/867,016

2. 美國；2006年11月22日；60/867,098

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1.

2.

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

☒ 主張專利法第三十條生物材料：

☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

☒ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

【先前技術】

對常用抗生素具有抗性細菌之出現係一個嚴重影響受感染個體之治療之日益遞增的問題。因此，日益重要在初期階段且以相對快速之方式判定該等細菌之存在以達成對該等細菌之較好控制。此亦適用於各種其他微生物。

顯著關注之一種如此之微生物為金黃色葡萄球菌 ("*S. aureus*"). 此為一種引起廣泛感染之病原體，該等感染包括：表面病變，諸如小皮膚潰瘍及創傷感染；全身性及危急生命之病狀，諸如心內膜炎、肺炎及敗血症；以及中毒，諸如食物中毒及中毒性休克症候群。一些菌株(例如，二甲氧苯青黴素抗性金黃色葡萄球菌(Methicillin-Resistant *S. aureus*))對所有(除了少數)所選抗生素均有抗性。

當前用於偵測微生物、尤其抗生素抗性細菌之技術通常費時且通常包括培養純形式之細菌。一種用於鑑別與急性感染相關之病原性葡萄球菌，亦即人類及動物體內之金黃色葡萄球菌及動物體內之中間葡萄球菌(*S. intermedius*)及豬葡萄球菌(*S. hyicus*)之技術係基於微生物凝結血漿之能力。已描述至少兩種不同之凝固酶測試：用於游離凝固酶之試管測試及用於"細胞結合凝固酶"或凝集因子之載片測試。該試管凝固酶測試通常包括將腦心浸出物肉湯中之隔夜培養物與復原血漿混合，將混合物培養4小時且藉由緩慢傾斜試管以便形成凝塊來觀察用於凝塊形成之試管。對

於金黃色葡萄球菌推薦培養測試隔夜，因為少量菌株可能需要超過4小時來形成凝塊。該玻片凝固酶試驗通常更快且更經濟；然而，10%至15%之金黃色葡萄球菌菌株可能產生負面結果，此需要藉由試管測試復查分離物。

儘管偵測金黃色葡萄球菌以及其他微生物之方法已在此項技術中描述，但改良偵測方法仍存在優點。

【發明內容】

在特定實施例中，本發明提供用於捕捉完整細菌細胞之方法。該等方法包括使用兩種或多種對兩種或多種表示特定細菌之特徵之不同分析物具有抗原特異性的抗體。該兩種或多種抗體較佳在其結合特徵方面協作。亦即，其能夠同時與靶分析物之不同區結合或最佳地發現具有互補結合，藉此不同分析物之結合藉由結合另一抗體而增強。

在一個如此之實施例中，本發明提供捕捉表示特定細菌之特徵之分析物的方法，其中該等方法包括：提供懷疑包括包含一或多種表示該特定細菌之特徵之分析物之靶完整細胞的樣品；提供兩種或多種對兩種或多種表示特定細菌之特徵之不同分析物具有抗原特異性的抗體，其中該等抗體包含至少一種單株抗體；提供固體支撐物質；及提供在有效捕捉具有一或多種表示特定細菌之特徵之分析物(若存在)之靶完整細胞的條件下該樣品、該固體支撐物質及該兩種或多種抗體之間的接觸。

在一較佳實施例中，兩種或多種抗體連接於固體支撐物質形成分析物結合物質，且該方法包括在有效捕捉具有一

或多種表示特定細菌之特徵之分析物(若存在)之完整細胞的條件下提供樣品與分析物結合物質之間的接觸。提供樣品與分析物結合物質之間的接觸可包括樣品與兩種或多種抗體之間的同時及/或依序、較佳同時接觸。

在另一較佳實施例中，提供樣品、固體支撐物質及兩種或多種抗體之間的接觸包括提供兩種或多種抗體與樣品之間的接觸以形成抗體結合完整細胞，且隨後提供抗體結合完整細胞與固體支撐物質之間的接觸。

在特定實施例中，本發明提供分析所關注微生物樣品之方法。詳言之，該等方法適用於偵測一或多種表示所關注微生物之特徵的分析物，諸如表示微生物、尤其金黃色葡萄球菌之特徵之細胞壁的組份。

在一實施例中，本發明提供一種分析表示金黃色葡萄球菌之特徵之分析物的方法，其中該方法包括：提供懷疑包括具有一或多種表示金黃色葡萄球菌之特徵之分析物之靶完整細胞的樣品；提供兩種或多種對兩種或多種表示金黃色葡萄球菌之特徵之不同分析物具有抗原特異性的抗體，其中該等抗體包括至少一種單株抗體；提供包括磁性粒子之固體支撐物質；提供在有效捕捉具有一或多種表示金黃色葡萄球菌之特徵之分析物(若存在)之靶完整細胞的條件下該樣品、該固體支撐物質及該兩種或多種抗體之間的接觸；其中該等抗體係選自由MAb-76、MAb-107、親和力純化RxC1f40、親和力純化GxC1f40、MAb 12-9、其片段及其組合組成之群；及分析該等經捕捉之靶完整細胞存在或不

存在一或多種表示金黃色葡萄球菌之特徵之分析物。

在一實施例中，本發明提供一種分析細菌樣品之方法。該方法包括：提供懷疑包括一或多種表示特定細菌之特徵之分析物的樣品；提供兩種或多種對兩種或多種表示該特定細菌之特徵之不同分析物具有抗原特異性的經固定抗體；提供兩種或多種對兩種或多種表示特定細菌之特徵之不同分析物具有抗原特異性的經標記抗體，其中該等抗體可經直接或間接酶標記而標記；提供樣品、經固定抗體及經標記抗體之間的接觸以在經標記抗體與經固定抗體之間結合該或該等分析物；其中對於存在之每一分析物而言，經固定抗體及經標記抗體包含兩種或多種抗原結合對；及分析特定細菌之存在或不存在。

在特定實施例中，提供樣品、經固定抗體及經標記抗體之間的接觸包括：在有效捕捉一或多種表示特定細菌之特徵之分析物(若樣品中存在)的條件下使樣品與經固定抗體接觸，以形成一或多種經捕捉分析物；及在有效引起該或該等經捕捉分析物與經標記抗體之間結合之條件下使該或該等經捕捉分析物(若存在)與經標記抗體接觸。或者，提供樣品、經固定抗體及經標記抗體之間的接觸包括：在有效引起一或多種表示特定細菌之特徵之分析物(若樣品中存在)與經標記抗體之間相互作用之條件下使樣品與經標記抗體接觸；及在有效引起經標記抗體、該或該等分析物及經固定抗體之間結合之條件下使經固定抗體與含有經標記抗體之樣品接觸。

較佳地，使樣品與經固定抗體接觸包括提供樣品與各經固定抗體之間的同時接觸。較佳地，使該或該等經捕捉分析物(若存在)與經標記抗體接觸包括提供經捕捉分析物與各經標記抗體之間的同時接觸。

該等抗體可為單株抗體、多株抗體或其組合。較佳地，其係選自由MAb-76、MAb-107、親和力純化RxClf40、親和力純化GxCIf40、MAb 12-9、其片段及其組合組成之群。

較佳地，經固定抗體與諸如微粒物質或例如微孔培養盤之表面之固體支撐物質結合。

抗體可經直接標記(亦即酶)或間接標記(亦即經酶標記之二次抗體，或用於諸如抗生蛋白鏈菌素結合酶之酶結合物的中間物識別化學物，諸如生物素)標記。在特定實施例中，抗體經生物素，較佳經由聚氧化乙烯連接子連接之生物素間接標記。若抗體包括諸如生物素之間接標記，則該方法可進一步包括在使該或該等經捕捉分析物(若存在)與經標記抗體組合接觸之前、期間或之後使經標記抗體與酶結合物反應之步驟。

該分析可包括用比色法分析，較佳使用例如在與經由生物素與經標記抗體結合之酶相互作用後產生變色之產色酶受質。

特定細菌之存在或不存在的分析可包括量化存在之分析物之總量(及藉此量化存在之細菌之量)。

在特定實施例中，本發明提供包括使用聲-機械感應器

之方法。在一實施例中，本發明提供分析細菌樣品之方法，其中該方法包括：提供懷疑包括一或多種表示特定細菌之特徵之分析物的樣品；提供兩種或多種對兩種或多種表示該特定細菌之特徵之不同分析物具有抗原特異性的粒子-抗體結合物；提供一包含一聲-機械感應器之系統，該感應器包含一偵測表面，該表面包含兩種或多種對兩種或多種表示特定細菌之特徵之不同分析物具有抗原特異性的經固定抗體；提供該樣品、該聲-機械感應器之偵測表面上之該等經固定抗體及該等粒子-抗體結合物之間的接觸以在粒子-抗體結合物與經固定抗體之間結合該或該等分析物；其中對於存在之每一分析物而言，經固定抗體及粒子-抗體結合物包含兩種或多種抗原結合對；及分析特定細菌之存在或不存在。

在特定該等方法中，提供樣品、聲-機械感應器之偵測表面上之經固定抗體及粒子-抗體結合物之間的接觸包括：在有效引起一或多種表示特定細菌之特徵之分析物(若樣品中存在)與粒子-抗體結合物之間相互作用之條件下使樣品與粒子-抗體結合物接觸；及在有效引起粒子-抗體結合物、該或該等分析物及經固定抗體之間結合之條件下使聲-機械感應器之偵測表面與含有粒子-抗體結合物之樣品接觸。

或者，提供樣品、聲-機械感應器之偵測表面上之經固定抗體及粒子-抗體結合物之間的接觸可包括：在有效捕捉一或多種表示特定細菌之特徵之分析物(若樣品中存在)

的條件下使樣品與經固定抗體接觸，以形成一或多種經捕捉分析物；及在有效引起該或該等經捕捉分析物與粒子-抗體結合物之間結合之條件下使該或該等經捕捉分析物(若存在)與粒子-抗體結合物接觸。

在尤其較佳之實施例中，本發明提供一種在粒子-抗體結合物中利用磁性粒子之方法，且進一步包括：提供一能夠提供最接近偵測表面之磁場的磁場產生器，該磁場使具有連接之磁性粒子之靶分析物吸引至感應器之偵測表面；將具有連接之磁性粒子之靶生物學分析物選擇性附著於該偵測表面；使該磁場發生器無能力以大體上減小最接近偵測表面之磁場；及操作聲-機械感應器以偵測附著之靶生物學分析物，同時將偵測表面浸沒於液體中。在特定實施例中，使磁場產生器無能力包括將磁場產生器移開一個足以大體上減小最接近偵測表面之磁場之距離。

特定細菌之存在或不存在的分析可包括量化存在之分析物之總量(及藉此量化存在之細菌之量)。

本發明亦提供一種分析物結合物質，其包括：固體支撐物質；安置於該固體支撐物上之抗體MAb-76、MAb-107、親和力純化RxClf40、親和力純化GxCIf40、MAb 12-9、其片段或其組合；及視情況可偵測標記物。固體支撐物質可包括微粒物質。在特定實施例中，微粒物質之各粒子具有至少兩種安置於其上之結合不同分析物之抗體。固體支撐物質可為微孔培養盤之表面。在特定實施例中，微孔培養盤之孔具有固定於其中之抗體混合物。較佳地，該微孔培

養盤具有至少兩種安置於其上之與不同分析物結合之抗體。

定義

"完整細胞"意謂在自其他生物學物質分離期間保留其結構，但未必需要能夠複製之生物學活性細菌細胞。

術語"分析物"及"抗原"可互換使用且係指各種分子(例如蛋白質A)或分子之抗原決定基(例如蛋白質A之不同結合位點)或微生物之完整細胞，其表示所關注微生物之特徵。此等包括細胞壁之組份(例如細胞壁蛋白質，諸如蛋白質A，及凝集因子，其為金黃色葡萄球菌上發現之細胞壁相關血纖維蛋白原受體)、外部細胞組份(例如，鞘膜多醣及細胞壁碳水化合物)等。

"磁性粒子"意謂包含鐵磁性粒子、順磁性粒子或超順磁性粒子之粒子或粒子聚結物，包括該等粒子於聚合物珠粒中之分散液。

"粒子-抗體結合物"係指經微粒物質標記之抗體或經一或多種抗體標記之微粒物質。

術語"基於酶"意謂一種包括用於偵測之酶，例如存在於酶聯免疫吸附檢定(ELISA)中之酶之方法。

詞"較佳"及"較佳地"係指可在特定情況下得到特定益處之本發明之實施例。然而，在相同或其他情況下，其他實施例亦可為較佳的。此外，列舉一或多個較佳實施例並不表示其他實施例不適用，且並不意欲自本發明之範疇排除其他實施例。

術語"包含"及其變型並不具有此等術語出現於本說明書及申請專利範圍中之限制意義。

如本文所使用，"一"、"該"、"至少一種"及"一或多種"可互換使用。因此，舉例而言，包含"一種"抗體之分析物結合物質可解釋為意謂該分析物結合物質包括"一或多種"結合不同分析物之抗體。

術語"及/或"意謂所列要素之一者或全部或所列要素之任何兩者或兩者以上之組合。

又在本文中，藉由端點列舉數值範圍包括彼範圍內包含之所有數字(例如，1至5包括1、1.5、2、2.75、3、3.80、4、5等)。

本發明之以上概述並不意欲描述本發明之各所揭示之實施例或每一實施例。更特定言之，以下描述例示說明性實施例。在整個申請案之若干處，經由實例之清單提供指導，該等實例可以不同組合使用。在各情況下，所列清單僅用作代表性組且應不解釋為排他性清單。

【實施方式】

I. 完整細胞捕捉

本發明係針對基於使用兩種或多種表示所關注細菌之特徵的分析物自樣品捕捉所關注細菌之完整細胞的各種方法。具體而言，本發明之捕捉方法包括使用兩種或多種對兩種或多種表示特定細菌之特徵之不同分析物具有抗原特異性的抗體。該兩種或多種抗體較佳在其結合特徵方面協作。亦即，其能夠同時與靶分析物之不同區結合或最佳地

發現具有互補結合，藉此不同分析物之結合藉由結合另一抗體而增強。

用於完整細菌細胞之捕捉方法可藉由包括偵測表示所關注細菌之特徵之完整細胞上的分析物之存在，且在特定實施例中量化所關注細菌的方法來執行。適用於本發明之方法之分析完整細胞的技術可為熟習此項技術者已知之各種習知技術中之一者。舉例而言，該等方法可包括ELISA(例如，比色ELISA)或聲-機械感應器，其中較佳實施例在下文更詳細討論。

亦可將經捕捉之完整細胞溶胞且用於偵測蛋白質、鞘膜及細胞壁多醣、DNA、RNA及靶細胞之其他特定組份。該方法之優點在於其選擇性濃縮細胞且可提供較好敏感性及特異性。其亦除去可能存在於複合物樣品中之抑制劑。舉例而言，美國專利申請公開案第2004/0241824號討論使用抗蛋白質A抗體自樣品吸附金黃色葡萄球菌，分離已附著有金黃色葡萄球菌之抗體，使金黃色葡萄球菌溶胞以提取DNA，接著為基於聚合酶鏈反應(PCR)偵測DNA之檢定。

在完整細胞捕捉為偵測或進一步使用(例如分析)前之樣品製備步驟中之部分的許多情形下本發明為有利的。已知靶蛋白質之表現對於特定細菌菌株可顯著不同。在此等情形下，抵抗靶向細菌之單一抗原之單一抗體可產生一些顯示弱捕捉效率或根本未經捕捉之細菌菌株。對於此等菌株而言，樣品製備步驟將導致細菌對於偵測之可用性大大降低。因此，此將增加偵測技術之假陰性之數目且此亦對檢

定之偵測限度具有不利作用。藉由具有塗有不同抗體之粒子混合物或具有塗於同一粒子上之不同抗體，有可能增加顯示由單一抗體之弱捕捉或無捕捉之細菌菌株的捕捉效率。因此，使用完整細胞捕捉之檢定之檢定敏感性以及偵測限度可藉由使用本發明之方法改良。亦已發現，此可在不負面影響由單一抗體技術良好捕捉之彼等菌株之捕捉的情況下達成。

較佳地，可使用相對小體積之測試樣品。儘管可利用顯著大於2毫升(mL)之測試樣品體積，但大約500微升(μ L)之測試樣品對於本發明之方法通常足夠，雖然更小樣品尺寸可能可行。

較佳地，使用本發明之方法可相對縮短捕捉時間。舉例而言，該捕捉時間可小於30分鐘，小於15分鐘，小於5分鐘，小於60秒，且甚至短至30秒。

尤其關注之細菌包括革蘭氏陽性細菌(Gram positive bacteria)及革蘭氏陰性細菌(Gram negative bacteria)。尤其相關之生物包括以下各族之成員：腸內菌科(*Enterobacteriaceae*)或微球菌科(*Micrococcaceae*)或葡萄球菌屬(*Staphylococcus* spp.)、鏈球菌屬(*Streptococcus* spp.)、假單胞菌屬(*Pseudomonas* spp.)、腸球菌屬(*Enterococcus* spp.)、沙門氏菌屬(*Salmonella* spp.)、軍團菌屬(*Legionella* spp.)、志賀桿菌屬(*Shigella* spp.)、耶爾森氏菌屬(*Yersinia* spp.)、腸桿菌屬(*Enterobacter* spp.)、埃希氏菌屬(*Escherichia* spp.)、芽胞桿菌屬(*Bacillus*

spp.)、李氏菌屬 (*Listeria* spp.)、弧菌屬 (*Vibrio* spp.)、棒狀桿菌 (*Corynebacteria* spp.)，以及疱疹病毒 (herpes virus)、麴黴屬 (*Aspergillus* spp.)、鐮菌屬 (*Fusarium* spp.) 及念珠菌屬 (*Candida* spp.)。尤其致病性生物包括金黃色葡萄球菌 (包括抗性菌株，諸如二甲氧苯青黴素抗性金黃色葡萄球菌 (MRSA))、表皮葡萄球菌 (*S. epidermidis*)、肺炎鏈球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)、無乳鏈球菌 (*S. agalactiae*)、化膿性鏈球菌 (*S. pyogenes*)、糞腸球菌 (*Enterococcus faecalis*)、萬古黴素抗性腸球菌 (Vancomycin Resistant *Enterococcus*, VRE)、萬古黴素抗性金黃色葡萄球菌 (VRSA)、萬古黴素中度抗性金黃色葡萄球菌 (VISA)、炭疽桿菌 (*Bacillus anthracis*)、綠膿桿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、大腸桿菌 (*Escherichia coli*)、黑麴黴 (*Aspergillus niger*)、煙麴黴 (*A. fumigatus*)、棒麴黴 (*A. clavatus*)、腐皮鐮孢菌 (*Fusarium solani*)、尖鐮孢菌 (*F. oxysporum*)、厚孢鐮刀菌 (*F. chlamydosporum*)、單核細胞增多性李氏菌 (*Listeria monocytogenes*)、伊氏李氏菌 (*Listeria ivanovii*)、霍亂弧菌 (*Vibrio cholera*)、副溶血性弧菌 (*V. parahemolyticus*)、豬霍亂沙門菌 (*Salmonella choleraesuis*)、傷寒沙門菌 (*S. typhi*)、鼠傷寒沙門氏菌 (*S. typhimurium*)、白色念珠菌 (*Candida albicans*)、光滑念珠菌 (*C. glabrata*)、克柔念珠菌 (*C. krusei*)、阪崎腸桿菌 (*Enterobacter sakazakii*)、大腸桿菌 (*E. coli*) O157 及多耐藥性革蘭氏陰性棒 (MDR)。

尤其關注革蘭氏陽性細菌，諸如金黃色葡萄球菌。通常，此等細菌可藉由偵測表示細菌之特徵之細胞壁組份(諸如細胞壁蛋白質)的存在來偵測。又，尤其關注抗生素抗性微生物，包括MRSA、VRSA、VISA、VRE及MDR。通常，此等細菌可藉由另外偵測造成抗生素抗性之諸如膜蛋白、轉運蛋白、酶等之內部細胞組份的存在來偵測。

本發明之方法可用於使用獨立分子(例如，類似用於分析金黃色葡萄球菌之蛋白質A及凝集因子之分子)或同一分子(例如蛋白質)之兩種不同抗原決定基而自樣品捕捉完整細菌細胞。該等分析物包括(例如)細胞壁蛋白質，諸如蛋白質A；及識別黏性基質分子之微生物表面組份(MSCRAMM)，諸如血纖維蛋白原結合蛋白(例如凝集因子)、纖維結合蛋白結合蛋白、膠原蛋白結合蛋白、肝素相關多醣結合蛋白及其類似物。蛋白質A及諸如血纖維蛋白原結合因子及凝集因子A、B及Efb之凝集因子亦尤其適用於偵測金黃色葡萄球菌之存在之方法。其他所關注細胞壁組份包括鞘膜多醣及細胞壁碳水化合物(例如，磷壁酸及脂胞壁酸)。

可在可能源自各種來源之測試樣品中分析所關注物種，該等來源諸如生理流體，例如血液、唾液、視覺晶狀體流體、滑液、腦脊髓液、膿液、汗液、滲出液、尿、黏液、黏膜組織(例如，頰、齒齦、鼻、眼睛、氣管、支氣管、腸胃、直腸、尿道、輸尿管、陰道、子宮頸及子宮黏膜)、乳汁、糞便或其類似物。此外，測試樣品可源自身

體部位，例如傷口、皮膚、前鼻孔、鼻咽腔、鼻腔、前鼻前庭、頭皮、指甲、外耳、中耳、口、直腸、陰道、腋窩、會陰、肛門、直腸或其他類似部位。

除生理流體外，其他測試樣品可包括其他液體以及溶解於液體介質中之固體。所關注樣品可包括製程物流、水、土壤、植物或其他植被、空氣、表面(例如受污染之表面)及其類似物。

此項技術描述用於偵測諸如金黃色葡萄球菌之細菌之各種患者取樣技術。該等取樣技術亦適合於本發明之方法。舉例而言，通常自藉由用無菌藥簽或取樣裝置拭抹來擦拭患者之鼻孔(例如患者之前鼻孔)而獲得樣品。舉例而言，每一受檢者使用一個藥簽取樣，亦即兩個鼻孔用一個藥簽。可例如藉由將乾燥或用適當溶液預濕潤之藥簽插入受檢者之鼻孔之前端且沿鼻孔黏膜表面旋轉藥簽兩次完整周轉來執行取樣。

各種藥簽或其他樣品收集裝置為市售的，例如可以商業名稱PURE-WRAPs購自Puritan Medical Products Co. LLC, Guilford, ME或以商業名稱microRheologics nylon flocked swab及ESwab Collection與Transport System購自Copan Diagnostics, Inc., Murrietta, CA。需要時，亦可使用諸如(例如)美國專利第5,879,635號(Nason)中所揭示之樣品收集方式。藥簽可具有各種材料，包括棉花、人造纖維、海藻酸鈣、達克綸(Dacron)、聚酯、耐綸(nylon)、聚胺基甲酸酯及其類似物。

接著如上文對於完整細胞捕捉所討論，樣品收集裝置(例如藥簽)可直接培養，直接分析或用適當溶液提取(例如，藉由洗滌，藉由渦動溶離)。該等提取(亦即溶離)溶液通常包括水且可視情況包括緩衝劑及至少一種界面活性劑。溶離緩衝劑之實例包括(例如)磷酸鹽緩衝生理食鹽水(PBS)，其可例如與TWEEN 20(聚氧化乙烯脫水山梨糖醇月桂酸酯，可得自Sigma-Aldrich Corp.)或PLURONIC L64(聚(氧化乙烯-共-氧化丙烯)嵌段共聚物，可得自BASF Corp.)組合使用。其他提取溶液用以在自樣品收集部位至樣品分析部位運輸期間保持試樣穩定性。此等類型之提取溶液之實例包括Amies氏及斯圖亞特氏(Stuart's)運輸介質。

在進一步分析之前可使測試樣品(例如液體)經受處理。此處理包括濃縮、沈澱、過濾、離心、蒸餾、透析、稀釋、使天然組份失活、添加試劑、化學處理等。

使樣品與用於結合分析物之適當反應物分子(例如，包括細菌識別試劑之分析物結合物質)接觸。該等反應物分子包括抗體及視情況其他反應物分子，諸如外源凝集素、酶及受體及其他結合對技術，以及識別代謝副產物(例如，pH值變化、可偵測之酶產生)之其他反應物分子。舉例而言，在一實施例中，可使樣品與一或多種抗體接觸。該等抗體可連接於微粒物質、膜或其他固體支撐物質。該等分析物結合物質在本文中更詳細描述。尤其較佳之反應物分子為能夠直接與靶完整細胞相互作用之反應物分子，

尤其完整細胞表面抗原之抗體、外源凝集素及已知與完整細胞表面相互作用之其他蛋白質。

適用於本發明之方法之用於捕捉靶分析物(例如靶完整細胞)的分析物結合物質通常包括藉由與結合靶分析物之支撐物反應物分子偶合(非共價或共價)而得到的固體支撐物質。使含有靶分析物(例如靶完整細胞)之混合物與所得之支撐物接觸以使靶分析物與生物學活性物質結合，且將未結合之殘餘混合物自支撐物移除。可將結合之細胞自支撐物溶離以獲得經純化之靶分析物或經處理同時連接於固體支撐物質者。

如上文所提及，完整細胞上之靶分析物可由反應物分子(例如金黃色葡萄球菌反應物分子或用於金黃色葡萄球菌之細菌識別試劑)來偵測。在一些實施例中，使用諸如金黃色葡萄球菌抗體之一或多種抗體作為金黃色葡萄球菌反應物。"金黃色葡萄球菌抗體"係指具有特異性結合特定抗原之能力的免疫球蛋白，包括其抗原結合片段。術語"抗體"意欲包括來自例如哺乳動物物種之脊椎動物之亦與例如蛋白質之外來化合物特異性反應的各種同型之完整抗體(例如，IgG、IgA、IgM、IgE等)及其片段。

該等抗體可為單株抗體、多株抗體或其組合。可使用習知技術對抗體分段且篩選以與完整抗體相同之方式使用之片段。因此，該術語包括抗體分子之能夠與特定蛋白質選擇性反應之蛋白分解裂解或重組製備部分的區段。該等蛋白水解及/或重組片段之非限制性實例包括Fab、F(ab')₂、

Fv及含有藉由肽連接子連接之VL及/或VH域之單鏈抗體(scFv)。scFv可共價或非共價連接以形成具有兩個或兩個以上結合位點之抗體。抗體可經熟習此項技術者已知之各種可偵測部分(亦即可偵測標記物)標記。在一些態樣中，與吾人希望量測之分析物結合之抗體(初級抗體)未經標記，而藉由結合與初級抗體特異性結合之經標記二次抗體或其他試劑而間接偵測。

各種金黃色葡萄球菌抗體在此項技術中已知。舉例而言，金黃色葡萄球菌抗體可購自Sigma-Aldrich及Accurate Chemical。此外，諸如單株抗體Mab 12-9之其他金黃色葡萄球菌抗體係在美國專利第6,979,446號中描述。在特定較佳實施例中，抗體係選自本文中所述之抗體(例如選自由MAb-76、MAb-107、親和力純化RxC1f40、親和力純化GxC1f40、MAb 12-9組成之群)、其片段及其組合。該等抗體亦在以下專利中揭示：2006年11月22日申請之美國專利申請案第11/562,759號及PCT申請案第US 07/84,736號，兩者標題皆為"ANTIBODY WITH PROTEIN A SELECTIVITY"；及2006年11月22日申請之美國專利申請案第11/562,747號及PCT申請案第US 07/84,739號，兩者標題皆為"ANTIBODY WITH PROTEIN A SELECTIVITY"；及2006年11月22日申請之美國專利申請案第60/867,089號及同一日期申請之美國專利申請案第____號(代理人案號62611US005)，兩者標題皆為"SPECIFIC ANTIBODY SELECTION BY SELECTIVE ELUTION CONDITIONS"。

較佳抗體為單株抗體。尤其較佳為與金黃色葡萄球菌之蛋白質A結合之單株抗體。

更特定言之，在一實施例中，合適之單株抗體及其抗原結合片段為顯示由融合瘤細胞株358A76.1產生之單株抗體76之免疫性結合特徵的單株抗體及其抗原結合片段。鼠類單株抗體76為自用蛋白質A免疫之小鼠分離之鼠類IgG2A， κ 抗體。根據布達佩斯條約(Budapest Treaty)，產生單株抗體76之融合瘤358A76.1於2006年10月18日寄存於美國菌種保藏中心(American Type Culture Collection，ATCC)庫，10801 University Boulevard，Manassas，VA 20110-2209，且給予特許寄存編號PTA-7938(本文中亦稱為寄存編號PTA-7938)。融合瘤358A76.1產生本文中稱為"Mab 76"之抗體。Mab 76在本文中亦稱為"Mab76"、"Mab-76"、"MAb-76"、"單株76"、"單株抗體76"、"76"、"M76"或"M 76"且在本文中所有均可互換使用以指由2006年10月18日寄存於美國菌種保藏中心(ATCC)且給予寄存編號PTA-7938之融合瘤細胞株358A76.1產生的免疫球蛋白。

在另一實施例中，合適之單株抗體及其抗原結合片段為顯示由融合瘤細胞株358A107.2產生之單株抗體107之免疫性結合特徵的單株抗體及其抗原結合片段。鼠類單株抗體107為自用蛋白質A免疫之小鼠分離之鼠類IgG2A， κ 抗體。根據布達佩斯條約，產生單株抗體107之融合瘤358A107.2於2006年10月18日寄存於美國菌種保藏中心

(ATCC)庫，10801 University Boulevard，Manassas，VA 20110-2209，且給予特許寄存編號PTA-7937(本文中亦稱為寄存編號PTA-7937)。融合瘤358A107.2產生本文中稱為"Mab 107"之抗體。Mab 107在本文中亦稱為"Mab107"、"Mab-107"、"MAb-107"、"單株107"、"單株抗體107"、"107"、"M107"或"M 107"且在本文中所有均可互換使用以指由2006年10月18日寄存於美國菌種保藏中心(ATCC)且給予寄存編號PTA-7937之融合瘤細胞株產生的免疫球蛋白。

合適之單株抗體亦為抑制單株抗體MAb-76與金黃色葡萄球菌之蛋白質A之結合的單株抗體。本發明可利用與金黃色葡萄球菌之蛋白質A之由單株抗體MAb-76識別的相同抗原決定基結合之單株抗體。用於判定單株抗體是否抑制單株抗體MAb-76與金黃色葡萄球菌之蛋白質A之結合及判定單株抗體是否與金黃色葡萄球菌之蛋白質A之由單株抗體MAb-76識別之相同抗原決定基結合的方法為熟習免疫學技術者所熟知。

合適之單株抗體亦為抑制單株抗體MAb-107與金黃色葡萄球菌之蛋白質A之結合的單株抗體。本發明可利用與金黃色葡萄球菌之蛋白質A之由單株抗體MAb-107識別的相同抗原決定基結合之單株抗體。用於判定單株抗體是否抑制單株抗體MAb-107與金黃色葡萄球菌之蛋白質A之結合及判定單株抗體是否與金黃色葡萄球菌之蛋白質A之由單株抗體MAb-107識別之相同抗原決定基結合的方法為熟習

免疫學技術者所熟知。

合適之單株抗體為由此融合瘤之子代或衍生物產生之單株抗體及由等效或類似融合瘤產生之單株抗體。

本發明亦包括各種抗體片段，亦稱為抗原結合片段，其僅包括完整抗體之一部分，通常包括完整抗體之抗原結合位點且因此保留結合抗原之能力。抗體片段之實例包括(例如)由蛋白水解消化及/或還原二硫橋產生之Fab、Fab'、Fd、Fd'、Fv、dAB及F(ab')₂片段及由Fab表現庫產生之片段。該等抗體片段可藉由此項技術中熟知之技術產生。

適用於本發明之單株抗體包括(但不限於)人化抗體、嵌合抗體、單鏈抗體、單鏈Fv(scFv)、二硫鍵連接之Fv(sdFv)、Fab片段、F(ab')片段、F(ab')₂片段、Fv片段、微型雙功能抗體、由Fab表現庫產生之線性抗體片段、包括VL或VH域之片段、細胞內產生之抗體(亦即內抗體(intrabody))及其抗原結合抗體片段。

適用於本發明之單株抗體可具有各種同型。適用於本發明之單株抗體可為(例如)鼠類IgM、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgA、IgD或IgE。適用於本發明之單株抗體可為(例如)人類IgM、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgD或IgE。在一些實施例中，單株抗體可為鼠類IgG2a、IgG1或IgG3。就本發明而言，特定重鏈可與κ或λ形式之輕鏈配對。

適用於本發明之單株抗體可由動物(包括(但不限於)人

類、小鼠、大鼠、兔子、倉鼠、山羊、馬、小雞或火雞)產生，化學合成，或重組表現。適用於本發明之單株抗體可藉由此項技術中已知用於純化免疫球蛋白分子之各種方法純化，例如藉由層析法(例如，離子交換、親和力及大小分級(sizing)管柱層析法)、離心、差示溶解性或藉由用於純化蛋白質之各種其他標準技術來純化。

合適之抗體亦包括高親和性抗金黃色葡萄球菌凝集因子蛋白多株抗體製劑，其偵測濃度為較佳至少1皮克/毫升(pg/mL)且更佳多達100 pg/mL之金黃色葡萄球菌之重組凝集因子(rClf40)蛋白。合適之抗體亦包括高親和性抗金黃色葡萄球菌凝集因子蛋白多株抗體製劑，其顯示與金黃色葡萄球菌凝集因子蛋白抗血清相比偵測敏感性增加至少4倍。

在特定實施例中，高親和性抗金黃色葡萄球菌凝集因子蛋白多株抗體製劑為適用的，其中藉由一方法製備該高親和性抗金黃色葡萄球菌凝集因子蛋白多株抗體製劑，該方法包括自用金黃色葡萄球菌之重組凝集因子(rClf40)蛋白免疫之動物獲得抗血清；使該抗血清與金黃色葡萄球菌凝集因子(Clf40)蛋白親和管柱結合；用具有0.5 M鹽及pH值4為之洗滌緩衝劑洗滌該管柱；及用pH值為2之溶離緩衝劑自管柱溶離高親和性抗金黃色葡萄球菌凝集因子蛋白多株抗體製劑。本文中，來自兔子及山羊之高親和性抗金黃色葡萄球菌凝集因子多株抗體製劑係分別稱為親和力純化RxClf40及親和力純化GxClf40。在一些實施例中，高親和

性抗金黃色葡萄球菌凝集因子蛋白多株抗體製劑可藉由一方法獲得，該方法進一步包括富集針對IgG類抗體之抗血清，隨後使該抗血清與金黃色葡萄球菌凝集因子(C1f40)蛋白親和管柱結合。該富集可自製劑除去非免疫球蛋白蛋白及/或在樣品內富集IgG類抗體。

如本文所使用，抗血清係指來自免疫宿主動物之血液，凝結蛋白及紅血球(RBC)已自該血液移除。靶抗原之抗血清可藉由使各種宿主動物免疫而獲得。可使用各種免疫方案。

抗體親和性係多株抗體製劑之功能親和力之量度。親和性為多重抗體/抗原相互作用之化合物親和力。亦即，親和性為抗原/抗體結合之表觀親和力，而非真實親和力。儘管大多數抗血清中親和力不均一，但吾人可藉由定義平均親和力(K_0)來表徵該等群體。

固體支撐物質可包括微粒物質、膜、凝膠(例如瓊脂糖)或其他固體支撐物質，諸如試管或培養盤之表面。例示性固體支撐物可包括以下物質，諸如硝化纖維、聚苯乙烯、聚丙烯、耐綸、鐵磁性物質、順磁性物質及超順磁性物質、金溶膠、聚碳酸酯、聚乙烯、纖維素、多醣及聚乙烯醇。對於特定實施例而言，微粒物質及膜為較佳。

較佳地，對於特定實施例而言，分析物結合物質為微粒物質(例如，平均粒度小於2微米且較佳在0.05微米至1微米範圍內之磁性珠粒)。舉例而言，用諸如羧基、胺及甲苯磺醯基之各種基團官能化之磁性珠粒可購自各種商業來

源，諸如 Invitrogen (Carlsbad, CA) 及 Ademtech (Pessac, France)。塗有抗生蛋白鏈菌素之粒子亦可得自若干來源，諸如 Invitrogen (Carlsbad, CA)、Ademtech (Pessac, France) 及 Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach, Germany)。

分析物結合物質較佳包括具有兩種或多種安置於固體支撐物上之抗體的固體支撐物質，較佳為微粒物質。在特定實施例中，微粒物質之各粒子具有至少兩種安置於其上結合不同分析物之抗體。舉例而言，在特定實施例中，分析物結合物質包括具有安置於其上之抗體 MAb-107 及親和力純化 GxC1f40 (較佳比率為 1:1) 的固體支撐物質 (較佳為微粒物質)。

抗體可經由共價連接或非共價連接而連接於支撐物質，較佳連接於微粒支撐物質。

抗體與固體支撐物質之非共價連接包括藉由例如離子相互作用或氫鍵結之連接。本發明中包括之非共價連接之一實例為熟知生物素-抗生物素蛋白系統。基於抗生物素蛋白-生物素親和力之技術已在生物學及生物技術之許多領域中得到廣泛應用。抗生物素蛋白與生物素之間的親和常數顯著較高 (解離常數， K_d 為約 10^{-15} M，參見 Green, Biochem. J., 89, 599 (1963)) 且當生物素與各種生物分子偶合時並不顯著減小。已鑑別出用於使生物分子與生物素偶合而生物分子之活性或其他所需特徵的損失最小或可忽略的許多化學物。生物素-抗生物素蛋白技術之評述可見於 Applications of Avidin-Biotin Technology to Affinity-

Based Separation, Bayer等人，J. of Chromatography，第3-11頁(1990)。

抗生蛋白鏈菌素及其功能同系物抗生物素蛋白為具有四個相同次單元之四聚蛋白。抗生蛋白鏈菌素由放線菌，鏈黴菌(*Streptomyces avidinii*)分泌。抗生蛋白鏈菌素或抗生物素蛋白之單體含有一個用於水溶性維生素生物素之高親和力結合位點且抗生蛋白鏈菌素或抗生物素蛋白四聚體結合四個生物素分子。

生物素，亦稱為維生素H或順-六氫-2-側氧基-1H-噻吩并-[3-4]-咪唑-4-戊酸為包括細菌及酵母之大多數生物必不可少的基礎維生素。生物素具有244道爾頓之分子量，比其結合搭配物抗生物素蛋白及抗生蛋白鏈菌素低得多。生物素亦為丙酮酸羧化酶、反羧化酶、乙醯基-CoA-羧化酶及β-甲基巴豆醯基-CoA羧化酶之酶輔因子，其一起使各種受質羧化。

抗生蛋白鏈菌素與抗生物素蛋白均展現與生物素極其緊密及高度特異性結合，此為蛋白與配位體之間的已知最強非共價相互作用之一，莫耳濃度解離常數為 10^{-15} 莫耳濃度(M)(Green, *Advances in Protein Chemistry*，第29卷，第85-133頁(1975))，且配位體解離之 $t_{1/2}$ 為89天(Green, N.M., *Advances in Protein Chemistry*，第29卷，第85-133頁(1975))。抗生物素蛋白-生物素鍵在血清及循環中穩定(Wei等人，*Experientia*，第27卷，第366-368頁(1970))。一旦形成，抗生物素蛋白-生物素複合物將不受pH值之最極

值、有機溶劑及變性條件影響。抗生蛋白鏈菌素與生物素之分離需要諸如 8 M 胍、pH 1.5 或於 121°C 下熱壓處理 10 分鐘(min)之條件。

可使用各種已知方法對抗體進行生物素標記。舉例而言，可以化學方法使用活化生物素類似物對抗體進行生物素標記，該等類似物諸如 N-羥基丁二醯亞胺生物素(NHS-生物素)，其可購自 Pierce Chemical Company, Rockford, IL，且需要抗體上存在游離一級胺基。

在本發明之一較佳方法中，可用抗生蛋白鏈菌素塗覆磁性粒子且使其與生物素標記抗體接觸。接著此等粒子可用於細菌捕捉。對於兩種或多種抗體，可進行同時或依序捕捉。另一選擇為可將生物素標記抗體與樣品混合以捕捉細菌且接著可於珠粒上捕捉抗體-細菌複合物(Dynal T1 MyOne抗生蛋白鏈菌素包裝插頁)。

對於特定實施例而言，生物素分子之數目與抗體之數目之比率可經最優化以避免特定粒子之聚結。舉例而言，對於 Ademtech 200-nm 塗有抗生蛋白鏈菌素之粒子，約 2:1 之比率為較佳。尤其大於 7:1 之較高比率顯示此等粒子出現聚結問題。

將抗體共價連接於微粒支撐物質之代表性方法包括利用由活化化合物(諸如戊二醛、碳化二醯亞胺、溴化氰)活化之支撐物質中之官能基(諸如羧基、胺、羥基、順丁烯二醯亞胺、醯肼)以與抗體中之另一反應性基團(諸如羥基、胺基、醯胺基或巰基)反應。此鍵可為(例如)二硫鍵、硫酯

鍵、醯胺鍵、硫醚鍵及其類似物。抗體亦可直接連接於經可直接與抗體上之官能基(諸如胺)反應之基團(諸如甲苯磺醯基、氯甲基)官能化的支撐物質。

可藉由此項技術中已知之各種方法使抗體與微粒支撐物質共價結合。舉例而言，用羧基衍生之珠粒為市售的。接著可經由藉由碳化二醯亞胺活化介導在抗體上之一級胺與珠粒表面上之羧基之間形成醯胺鍵來使抗體與此等珠粒偶合。

通常，對所關注系統最優化粒子濃度及抗體與粒子之比率以達成快速捕捉。通常，此具粒子依賴性。舉例而言，對於 Dynal 1- μm 粒子而言，粒子濃度較佳大於 0.04 mg/mL，更佳大於 0.1 mg/mL，且甚至更佳大於 0.16 mg/mL。對於相同粒子而言，抗體與粒子之比率較佳大於 1 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 粒子，更佳大於 10 $\mu\text{g}/\text{mg}$ ，且甚至更佳大於 40 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 粒子。

舉例而言，對於 Ademtech 200-nm 粒子而言，粒子濃度較佳大於 0.04 mg/mL，更佳大於 0.1 mg/mL，且甚至更佳大於 0.16 mg/mL。對於相同粒子而言，抗體與粒子之比率較佳為至少 0.01 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 粒子，更佳大於 0.1 $\mu\text{g}/\text{mg}$ ，且甚至更佳大於 1 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 粒子。對於相同粒子而言，抗體與粒子之比率較佳小於 10 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 粒子。

合適之粒子可能或可能不經阻斷以防止非特異性結合。該阻斷可在抗體連接之前或之後進行。舉例而言，購得經牛血清白蛋白(BSA)阻斷之特定磁性珠粒(例如，Dynal T1

MyOne 抗生蛋白鏈菌素珠粒)。如此項技術中眾所周知，可使用用於非特異性結合之其他合適之阻斷劑。

含有靶完整細胞之樣品與含有抗體之固體支撐物質之間的接觸時間(例如，混合時間)可不大於15分鐘，然而可使用低至30秒及高達30分鐘。該等組合物亦可包括緩衝劑，諸如視情況具有PLURONIC L-64界面活性劑、乙二胺四乙酸(EDTA)、BSA或其組合之PBS。儘管對於大小粒子皆可使用實體攪拌(或混合)，但小粒子亦可在不經混合下使用。

粒子可藉由沈降、離心或過濾自樣品分離。較佳地，使用磁性粒子且藉由使用磁場將其分離。該等經分離之粒子(其上具有完整細胞)可用各種緩衝劑洗滌，包括(例如)具有PLURONIC L-64或TWEEN 20、有或無BSA等之PBS。

顯著地，使用本發明之完整捕捉方法，較佳捕捉至少20%之靶完整細胞，更佳捕捉至少50%之靶完整細胞，且甚至更佳捕捉至少80%之靶完整細胞。

II 基於酶之分析方法

本發明提供各種基於使用酶法偵測檢定分析一或多種表示所關注細菌之特徵的分析物之針對所關注細菌分析樣品之基於酶之方法。該等方法可包括不僅偵測一或多種表示所關注細菌之特徵的分析物之存在，而且較佳鑑別該(等)分析物，此可導致鑑別以該(等)分析物為特徵之細菌。在特定實施例中，分析樣品包括量化表示所關注細菌之特徵的分析物之總量。

較佳地，本發明之基於酶之方法包括使用兩種或多種對兩種或多種表示特定細菌之特徵之不同分析物具有抗原特異性的經固定抗體，使用第二組兩種或多種對兩種或多種表示特定微生物之特徵之不同分析物具有抗原特異性的經標記抗體，其中對於存在之每一分析物而言，該等經固定抗體及該等經標記抗體包含兩種或多種抗原結合對。一組抗體可與另一組抗體相同，只要其能夠形成抗原結合對。

該等抗體較佳在其結合特徵方面協作。亦即，其能夠同時與靶分析物之不同區結合或最佳地發現具有互補結合，藉此其不同分析物由一個抗體組之結合藉由結合一或多個其他抗體組而增強。

本發明之基於酶之方法包括：提供懷疑包括一或多種表示特定細菌之特徵之分析物的樣品；提供兩種或多種對兩種或多種表示該特定細菌之特徵之不同分析物具有抗原特異性的經固定抗體；提供兩種或多種對兩種或多種表示特定細菌之特徵之不同分析物具有抗原特異性的經標記抗體，其中該等抗體可經直接或間接酶標記而標記；提供該樣品、該等經固定抗體及該等經標記抗體之間的接觸以在經標記抗體與經固定抗體之間結合一或多種分析物(亦即，"三明治")；其中對於存在之每一分析物而言，經固定抗體及經標記抗體包含兩種或多種抗原結合對；及分析特定細菌之存在或不存在。

兩種或多種不同分析物可為獨立分子，諸如蛋白質A及凝集因子，或同一分子之兩種不同抗原決定基。經標記抗

體可包括固相標記(例如，粒子-抗體結合物)及/或可固定於固體支撐物質(例如，微粒物質)上。經固定抗體可固定於各種固體支撐物質上，諸如微粒物質、薄膜、固體表面(例如，微孔培養盤之表面)等。

本發明基於酶之方法包括免疫檢定，其包括使樣品與經固定抗體在可有效捕捉特定細菌之特徵之一或多種分析物(若樣品中存在)的條件下接觸，以形成一或多種捕捉之分析物；及使該一或多種捕捉之分析物(若存在)與經標記抗體在可有效引起該一或多種捕捉之分析物與經標記抗體之間結合之條件下接觸。或者，提供樣品、經固定抗體及經標記抗體之間接觸，包括：使樣品與經標記抗體在可有效引起特定細菌之特徵之一或多種分析物(若樣品中存在)與經標記抗體之間相互作用之條件下接觸；及使經固定抗體與含有經標記抗體之樣品在可有效引起經標記抗體、該一或多種分析物及經固定抗體之間結合之條件下接觸。

捕捉之條件及一或多種分析物結合於經標記抗體與經固定抗體之間(及形成一個"三明治"檢定)之條件可由熟習此項技術者輕易地決定。

在某些較佳實施例中，使樣品與經固定抗體接觸包括提供樣品與各經固定抗體之間的同時接觸，儘管亦可使用依序接觸。類似地，在某些較佳實施例中，使一或多種捕捉之分析物(若存在)與經標記抗體接觸包括提供捕捉之分析物與各經標記抗體之間的同時接觸，儘管亦可使用依序接觸。

通常，分析特定細菌之存在或不存在可經由一或多種分析物之存在或所有分析物之不存在來進行。若需要，該分析可包括定量所捕捉分析物之總量。此可使用熟習此項技術者熟知之標準曲線及方法進行。

本發明基於酶之方法包括酶聯免疫吸附檢定(ELISA)，尤其比色ELISA。由於獲得有用結果所需之時間、容易使用、效能(敏感性、特異性等)及保守性(包括廣泛物種)偵測等改良，本發明優於習知技術用於分析該等細菌樣品。

在該等方法中，顯著地，可使用相對小體積之測試樣品。儘管可利用高達2毫升(mL)之測試樣品體積，但有利地大約10微升(μ L)之測試樣品對於本發明之方法足夠，其中對於特定實施例而言50-100 μ L為較佳。

使用本發明之較佳方法可相對縮短初始捕捉時間。亦可相對縮短偵測時間。舉例而言，偵測時間可小於60分鐘，小於30分鐘，小於15分鐘，小於10分鐘，且甚至短至5分鐘。對於典型ELISA而言，偵測時間為2至4小時。

尤其關注之細菌包括如上文對於完整細胞捕捉所討論之革蘭氏陽性細菌及革蘭氏陰性細菌。尤其關注革蘭氏陽性細菌，諸如金黃色葡萄球菌。通常，此等細菌可藉由偵測表示細菌之特徵之細胞壁組份(諸如細胞壁蛋白質)的存在來偵測。又，尤其關注抗生素抗性微生物，包括MRSA、VRSA、VISA、VRE及MDR。通常，此等細菌可藉由另外偵測造成抗生素抗性之諸如膜蛋白、轉運蛋白、酶等之內部細胞組份之存在來偵測。

因為增強表示細菌之特徵之分析物(例如，外部細胞相關組份及/或來自細胞內部部分之細胞標記物)的信號，所以本發明相對於用於分析該等微生物樣品之習知技術為有利的。本發明之方法可用於針對獨立分子(例如，類似用於分析金黃色葡萄球菌之蛋白質A及凝集因子之分子)或同一分子(例如蛋白質)之兩種不同抗原決定基來分析樣品。如上文所討論，該等分析物可存在於細胞之片段或完整細胞上。

該等分析物包括(例如)諸如蛋白質A之細胞壁蛋白質及識別黏性基質分子之微生物表面組份(MSCRAMM)，諸如血纖維蛋白原結合蛋白(例如凝集因子)、纖維結合蛋白結合蛋白、膠原蛋白結合蛋白、肝素/肝素相關多醣結合蛋白及其類似物。蛋白質A及諸如血纖維蛋白原結合蛋白及凝集因子A、B及Efb之凝集因子亦尤其適用於偵測金黃色葡萄球菌之存在之方法。其他所關注外部細胞組份包括鞘膜多醣及細胞壁碳水化合物(例如，磷壁酸及脂胞壁酸)。

需要時，本發明之方法可進一步包括針對內部細胞組份分析樣品，該內部細胞組份作為所關注分析物可能或可能不與細胞膜相關。內部細胞組份尤其適用於分析抗生素抗性微生物，諸如MRSA、VRSA、VISA、VRE及MDR。可表示該等微生物之特徵之內部細胞組份包括膜蛋白。該等膜蛋白之實例包括細胞質膜蛋白、內膜蛋白、外膜蛋白及細胞膜蛋白。諸如青黴素結合蛋白(PBP)(例如，PBP2'或PBP2a)之細胞質膜蛋白可尤其表示抗生素抗性微生物之特

徵。舉例而言，細胞質膜蛋白PBP2'表示MRSA之特徵。

如上文對於完整細胞捕捉所討論，可在可源自各種來源之任一者的測試樣品(諸如生理流體)中分析所關注物種。此外，如上文對於完整細胞捕捉所討論，測試樣品可源自各種身體部位。

尤其關注之樣品包括含有黏液之樣品，諸如鼻樣品(來自(例如)鼻孔、鼻咽腔、鼻腔、前鼻前庭等)，以及來自外耳、中耳、口、直腸、陰道或其他類似組織之樣品。特定黏膜組織之實例包括頰、齒齦、鼻、眼睛、氣管、支氣管、腸胃、直腸、尿道、輸尿管、陰道、子宮頸及子宮黏膜。

如上文對於完整細胞捕捉所討論，除生理流體外，其他測試樣品可包括其他液體以及溶解於液體介質中之固體。樣品亦可包括經培養之細胞。

如上文對於完整細胞捕捉所討論，可使用各種患者取樣技術，以及各種藥簽或其他樣品收集裝置。

如上文對於完整細胞捕捉所討論，接著可將樣品收集裝置(例如藥簽)直接培養，直接分析，或用適當溶液提取。

在進一步分析之前可使測試樣品(例如液體)經受處理。此處理包括濃縮、沈澱、過濾、離心、蒸餾、透析、稀釋、使天然組份失活、添加試劑、化學處理等。

亦即，可使用熟習此項技術者熟知之各種方法製備測試樣品。舉例而言，可使用物理方法(例如，超音波處理、壓擠、煮沸或其他加熱方法、用玻璃珠渦動等)使樣品碎

裂以產生分析可用之表示所關注特定細菌之特徵的分析物。或者，可使用各種化學試劑使樣品碎裂以產生分析可用之表示所關注特定微生物之特徵的分析物，該等試劑可包括一或多種組份。

在特定實施例中，本發明之方法包括將細胞於測試樣品中溶胞，儘管分析常常需要完整細胞。在本發明之方法中，溶胞可包括使細胞與溶胞劑接觸或使細胞物理上溶胞。溶胞可根據習知條件進行，諸如於5°C至42°C(可能高達50°C)之溫度下，較佳於15°C至25°C之溫度下。顯著地，溶胞可使用未經培養之細胞，亦即直接測試樣品進行，儘管亦可使用經培養之細胞。

溶胞可在使細胞物理上溶胞後進行。物理溶胞可在用玻璃珠使測試樣品渦動、超音波處理、加熱及煮沸或使測試樣品經受高壓後進行，諸如在使用例如French壓機後進行。

溶胞亦可使用溶胞劑進行。合適之溶胞劑例如包括酶(例如，蛋白酶、糖苷酶、核酸酶)。例示性酶包括溶葡萄球菌素、胃蛋白酶、葡糖苷酶、半乳糖苷酶、溶菌酶、無色肽酶、肽鏈內切酶、N-乙酰基胞壁醯基-L-丙氨酸醯胺酶、內- β -N-乙酰基氨基葡糖苷酶、ALE-1、DNase及RNase。需要時，可使用酶之各種組合。溶葡萄球菌素尤其適用於偵測金黃色葡萄球菌之存在之方法。

其他溶胞劑包括鹽(例如，離液鹽)、增溶劑(例如，清潔劑)、還原劑(例如， β -巯基乙醇(BME)、二硫蘇糖醇

(DTT)、二硫赤蘚糖醇(DTE)、參(2-羧基乙基)膦鹽酸鹽(TCEP; Pierce Chemical Company, Rockford, IL)、半胱氨酸、n-乙醯基半胱氨酸)、酸(例如, HCl)及鹼(例如, NaOH)。該等溶胞劑可較於其他生物更適合於特定生物, 例如其可較於用於革蘭氏陽性細菌更適合用於革蘭氏陰性細菌。

需要時, 可使用溶胞劑及/或方法之各種組合。

溶胞方法在美國專利申請公開案第2005/0153370 A1號中進一步討論。詳言之, 該等溶胞方法包括偵測細胞壁之一或多種表示所關注物種(例如, 所關注微生物)之特徵的組份, 及視情況一或多種進一步表示所關注物種(例如, 所關注抗生素抗性微生物)之特徵的內部細胞組份。咸信所分析之細胞壁片段為細胞壁之固體碎片。亦即, 咸信其並不在溶胞後溶解; 而細胞壁僅破碎成為碎片。此外, 所分析之細胞壁組份仍為細胞壁片段之部分(亦即, 在其中或其上)。亦即, 其並不在溶胞後溶解。顯著地, 此增強細胞壁組份相對於未溶胞之細胞中之相同組份的信號。

另外, 需要時且樣品為含有黏液之樣品時, 其可在溶胞之前或之後用至少一種可包括黏液溶解劑之試劑進一步處理。用黏液溶解劑處理含有黏液之樣品可在分析期間減少由黏液之存在引起的干擾。

黏液溶解劑之實例包括酶(例如, 胃蛋白酶、DNase、RNase、葡糖苷酶、半乳糖苷酶、糖苷酶)、鹽(例如, 離液鹽)、增溶劑(例如, 界面活性劑、清潔劑)、還原劑(例

如， β -巯基乙醇(BME)、二硫蘇糖醇(DTT)、二硫赤蘚糖醇(DTE)、半胱胺酸、TCEP、n-乙醯基半胱胺酸)及酸(例如，HCl)。需要時，可使用該等黏液溶解劑之各種組合。熟習此項技術者將理解，溶胞劑與黏液溶解劑之間可存在重疊；例如，但並非所有溶胞劑均為黏液溶解劑。

在特定實施例中，若樣品為含有黏液之樣品，且黏液溶解劑為還原劑，則該還原劑可經酸化(例如，具有小於3之pH值)。還原劑可使用各種酸進行酸化，諸如無機酸(例如，HCl)或有機酸(例如，乳酸、檸檬酸)。或者，若以足夠高之濃度使用，則還原劑之pH值並不需要用酸調整。

通常，但視情況，在添加還原劑後，樣品製備包括使組合物中之還原劑失活。此可例如由提供競爭性受質(例如，對於n-乙醯基半胱胺酸而言為牛血清蛋白)來進行。使還原劑失活之試劑之其他實例包括稀釋劑，該稀釋劑包括中和緩衝劑。中和緩衝劑之代表性成份可包括(例如)緩衝劑(例如，磷酸鹽)、鹽(例如，NaCl)、蛋白質穩定劑(例如，BSA、酪蛋白、血清)、聚合物、醣及/或清潔劑或表面活性劑(例如，由商品名稱及通常可用來源列舉之以下試劑中之一或多者：NINATE 411(烷基苯磺酸胺，可得自Stepan Co., Northfield, IL)、ZONYL FSN 100(具有聚乙二醇之調聚物B單醚，可得自E.I. DuPont de Nemours Co.)、Aerosol OT 100%(二辛基磺基丁二酸鈉，可得自American Cyanamide Co.)、GEROPON T-77(N-油烯基-N-甲基牛磺酸鈉，可得自Rhodia Novacare)、BIO-TERGE AS-40(烯烴

(C₁₄-C₁₆)磺酸鈉，可得自 Stepan Co.)、STANDAPOL ES-1(聚氧化乙烯(1)月桂基硫酸鈉，可得自 Cognis Corp., Ambler, PA)、TETRONIC 1307(乙二胺烷氧基化物嵌段共聚物，可得自 BASF Corp.)、SURFYNOL 465、485及104 PG-50(全部可得自 Air Products and Chemicals, Inc.)、IGEPAL CA210(辛基酚乙氧基化物，可得自 Stepan Co.)、TRITON X-45、X-100及X-305(辛基苯氧基聚乙氧基乙醇，全部可得自 The Dow Chemical Co.)、SIL WET L-7600(聚二甲基矽氧烷甲基乙氧基化物，可得自 Momentive Performance Materials, Inc., Wilton, CT)、RHODASURF ON-870(聚乙氧基化(2)油醇，可得自 Rhodia Novacare)、CREMOPHOR EL(聚乙氧基化蓖麻油，可得自 BASF Corp.)、TWEEN 20及TWEEN 80(聚氧化乙烯脫水山梨糖醇單月桂酸酯及單油酸酯，兩者可得自 Sigma-Aldrich Corp.)、BRIJ 35(聚氧化乙烯(23)十二烷基醚，可得自 Sigma-Aldrich Corp.)、CHEMAL LA-9(聚氧化乙烯(9)月桂醇，可得自 PCC Chemax, Piedmont, SC)、PLURONIC L64(聚(氧化乙烯-共-氧化丙烯)嵌段共聚物，可得自 BASF Corp.)、界面活性劑10G(對壬基苯氧基聚(縮水甘油)，可得自 Arch Chemicals Inc., Norwalk, CT)、SPAN 60(脫水山梨糖醇單硬脂酸酯，可得自 Sigma-Aldrich Corp.)、CREMOPHOR EL(聚乙氧基化蓖麻油，可得自 Sigma-Aldrich Corp.))。需要時，亦可使用中和緩衝劑來調整樣品之pH值。

除還原劑外或替代還原劑，含有黏液之樣品之樣品製備可包括使用一或多種界面活性劑或清潔劑(例如，在樣品及酶促溶胞劑與黏液溶解劑組合之後或與其同時使用)。合適之界面活性劑可為非離子型、陰離子型、陽離子型或兩性離子型。合適之實例包括十二烷基硫酸鈉(SDS)及月桂基硫酸鈉(SLS)。需要時，可使用界面活性劑之各種組合。

視情況，樣品製備方法可包括隨後使界面活性劑失活。此可例如藉由提供競爭性受質來進行。使界面活性劑失活之其他實例包括使用試劑中和緩衝劑，諸如足以將黏液溶解測試樣品及界面活性劑之pH值調整至pH值為至少5的緩衝劑。較佳地，該緩衝劑足以將該pH值調整至不大於8。

此外，若樣品製備試劑中之一或多者為酸性試劑，則較佳將包括所關注分析物之隨後組合物中和至pH值為7至7.5或接近7.2。此可例如藉由提供緩衝劑及/或稀釋劑來進行。

在特定實施例中，使樣品與用於結合分析物之適當反應物分子(例如，包括細菌識別試劑之分析物結合物質)接觸。該等反應物分子通常包括抗體。該等抗體可連接於微粒物質、膜或其他固體支撐物質。

如上文對於完整細胞捕捉所提及，完整細胞上或溶胞物質中之靶分析物(亦即，所關注分析物或組份)可藉由反應物分子(例如，金黃色葡萄球菌反應物分子或用於金黃色葡萄球菌之細菌識別試劑)偵測。在一些實施例中，諸如

金黃色葡萄球菌抗體之一或多種抗體係用作金黃色葡萄球菌反應物。"金黃色葡萄球菌抗體"係指具有特異性結合特定抗原之能力的免疫球蛋白，包括其抗原結合片段。術語"抗體"意欲包括來自例如哺乳動物物種之脊椎動物亦與例如蛋白質之外來化合物特異性反應的任何同型之完整抗體(IgG、IgA、IgM、IgE等)及其片段。

對於本發明之分析方法(例如，包括捕捉及偵測)而言，如上文對於完整細胞捕捉所討論，抗體可為單株抗體、多株抗體或其組合。對於完整細胞捕捉之抗體討論同樣適用於對於完整細胞或溶胞細胞之分析方法，該等方法包括捕捉及偵測。用於分析方法之例示性抗體為上文對於完整細胞捕捉所討論之抗體，包括(例如)選自由MAb-76、MAb-107、親和力純化RxC1f40、親和力純化GxC1f40、MAb 12-9組成之群之抗體、其片段及其組合。較佳抗體為單株抗體。尤其較佳為與金黃色葡萄球菌之蛋白質A結合之單株抗體。

在本發明之分析方法之特定較佳實施例中，兩種或多種經固定抗體包括兩種(經分離)單株抗體，尤其MAb 12-9及MAb-76。在本發明之特定較佳實施例中，兩種或多種經標記抗體包括一種諸如MAb-107之單株抗體及一種諸如親和力純化RxC1f40之多株抗體。

經固定抗體較佳固定於固體支撐物質上。合適之固體支撐物質可包括微粒物質、膜、凝膠(例如，瓊脂糖、pvp)或其他固體支撐物質，諸如試管或培養盤(例如微孔培養盤)

之表面。例示性固體支撐物可包括以下物質，諸如硝化纖維、聚苯乙烯、聚丙烯、耐綸、金溶膠、乳膠及其類似物。對於特定實施例而言，微粒物質及膜為較佳。

分析物結合物質包括具有一或多種安置於固體支撐物上之抗體之固體支撐物質。在特定實施例中，該固體支撐物質(例如，各粒子或微孔培養盤之各孔)具有至少兩種結合其上所安置之不同分析物之抗體。舉例而言，在特定實施例中，分析物結合物質包括具有安置於其上之抗體MAb-76及MAb 12-9(較佳以1 $\mu\text{g/mL}$ MAb-76及7.5 $\mu\text{g/mL}$ MAb 12-9之濃組合形式)之固體支撐物質。視所需結果及所用抗體而定，經固定抗體之濃度及密度可由熟習此項技術者改變。

抗體可經由共價連接或者非共價連接而連接於固體支撐物質。

抗體非共價連接於固體支撐物質包括藉由例如被動吸附及/或吸附、離子相互作用或氫鍵結之連接。

用於抗體共價連接於微粒支撐物質之代表性方法包括化學交聯劑，諸如在抗體中之反應性基團(諸如羥基、胺基、醯胺基或巰基)與支撐物質中之其他反應性基團(具有類似性質)之間反應形成一鍵的異雙功能交聯化合物(亦即，"連接子")。此鍵可例如為肽鍵、二硫鍵、硫酯鍵、醯胺鍵、硫醚鍵及其類似物。

可藉由此項技術中已知方法之任一者使抗體與微粒支撐物質共價結合。舉例而言，戊二醛、醛-希夫鹼(Schiffs

base)、n-羥基丁二醯亞胺、吡內酯、溴化氰、順丁烯二酸酐等可用作連接化學物。

本發明中所包括之抗體之非共價標記的一個實例為熟知生物素-抗生物素蛋白系統。該系統亦可用於用於偵測之抗體之標記系統，尤其當酶法偵測系統用於ELISA中時。

基於抗生物素蛋白-生物素親和力之技術係在上文對於完整細胞捕捉更詳細討論。該討論同樣適用於本發明之分析方法。

適用於本發明之方法之分析技術包括用於ELISA(例如比色ELISA)中之標準技術。

較佳地，在本發明之檢定中，將經固定抗體物理吸附於固體支撐物質，諸如(例如)微孔培養盤之固體表面。較佳地，微孔培養盤之孔具有固定於其中之抗體混合物(例如，諸如MAb 12-9及MAb-76之兩種單株抗體之混合物，或多株抗體與經分離單株抗體之混合物)。

使樣品與兩種或多種經固定抗體接觸可同時及/或依序進行。類似地，使經捕捉分析物(若存在)與兩種或多種經標記抗體接觸可同時及/或依序進行。

在有效捕捉一或多種表示特定細菌之特徵之分析物(若樣品中存在)的條件下使樣品與經固定抗體接觸在形成一或多種經捕捉分析物之條件下進行。較佳地，該等條件包括已最優化以保證有效抗原：抗體結合，同時使非特異性結合降至最少之條件。類似地，在使一或多種經捕捉分析物(若存在)與經標記抗體接觸時，使用有效引起該或該等

經捕捉分析物與經標記抗體之間結合的條件。較佳地，該等條件包括已最優化以保證有效抗原：抗體結合，同時使非特異性結合降至最少之條件。

該等條件包括在允許結合對(亦即，抗原、抗體)之特異性相互作用，但使其他非特異性(亦即，離子及靜電)相互作用降至最少之程度下，使用選擇性試劑，諸如鹽、pH值調整劑、界面活性劑、載體蛋白(例如，白蛋白、酪蛋白、脫脂奶粉、血清等)及其類似物。

較佳地，在本發明之檢定中，經標記抗體可經通常用於偵測之各種化學物(常常稱為可偵測或報導體部分或標記物)標記，該偵測可包括直接偵測方法與間接偵測方法，其在此項技術中眾所周知。在一方法中，標記可為直接標記(例如酶，諸如辣根過氧化物酶、葡萄糖氧化酶、鹼性磷酸酶)，其可經由此項技術中已知之各種連接化學物連接，諸如在 P. Tijssen Practice and Theory of Enzyme Immunoassays, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, 第15卷, Elsevier Science Publishers, B.V. New York, NY (1985)中所揭示。

或者，標記可為間接標記，且可用於包括(例如)生物素之系統中，其可經由各種此項技術中已知之化學物與分析物特異性抗體結合。此包括接著與酶結合物(例如抗生蛋白鏈菌素結合酶或抗生物素蛋白結合酶，諸如抗生蛋白鏈菌素-鹼性磷酸酶結合物或抗生物素蛋白-鹼性磷酸酶結合物)一起使用之經生物素標記抗體的間接系統在此項技術

中眾所周知。如熟習此項技術者所已知，其他間接標記包括(例如)經酶標記二次抗體、半抗原或可使用經標記抗體偵測之其他抗原。

在特定實施例中，抗體經生物素，較佳經由聚氧化乙烯連接子連接之生物素間接標記。若抗體包括諸如此之間接標記，則該方法可進一步包括在使一或多種經捕捉分析物(若存在)與經標記抗體組合接觸之前、期間或之後使經標記抗體與酶結合物反應之步驟。

在例示性系統中，生物素可經由聚氧化乙烯連接子使用N-羥基丁二醯亞胺化學物連接於抗體，例如(例如，PEO₄-NHS)。在此實施例中，生物素係視作間接標記且該方法包括使經標記抗體與酶結合物(包括例如連接於抗生蛋白鏈菌素或抗生物素蛋白之酶)反應。該生物素-抗生物素蛋白系統為用於偵測之抗體之熟知標記系統，尤其當酶法偵測系統用於ELISA中時。酶可為各種已知用於ELISA之酶，包括(例如)鹼性磷酸酶、辣根過氧化物酶、葡萄糖氧化酶等，諸如在P. Tijssen Practice and Theory of Enzyme Immunoassays, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, 第15卷，Elsevier Science Publishers, B.V. New York, NY (1985)中所揭示之酶。

該酶可以比色法使用適當產色酶受質來偵測，諸如對於磷酸酶標記使用對硝基苯基磷酸鹽，對於過氧化酶使用四甲基聯苯胺或二胺基聯苯胺，且甲臍鹽為藉由葡萄糖氧化酶氧化葡萄糖之最終產物。

除比色偵測外，偵測之替代方法可包括例如螢光偵測、放射性標記偵測、拉曼光譜法(Raman spectroscopy)、磁性偵測、發光及電化學發光。該等偵測方法為熟習此項技術者所熟知。

用於該等方法之利用ELISA之技術通常為熟習此項技術者所熟知。然而，顯著地，使用兩種或多種對兩種或多種表示特定細菌之特徵之不同分析物具有抗原特異性的經固定抗體，使用第二組兩種或多種對兩種或多種表示特定微生物之特徵之不同分析物具有抗原特異性的經標記抗體(其中對於存在之每一分析物而言，經固定抗體及經標記抗體包含兩種或多種抗原結合對)提供相對於習知方法，尤其用於分析諸如金黃色葡萄球菌之細菌之方法的顯著優點。

顯著地，使用本發明之方法及裝置，相對於用於微生物、尤其諸如金黃色葡萄球菌之細菌之習知偵測方法可實現改良之敏感性(亦即，較低偵測量)及特異性。

III 聲-機械分析方法

本發明亦提供基於分析一或多種表示所關注細菌之特徵的分析物之分析所關注細菌之樣品的各種基於聲-機械之方法。如同基於酶之方法，該等方法可包括不僅偵測一或多種表示所關注細菌之特徵的分析物之存在，而且較佳鑑別該(等)分析物，此可導致鑑別以該(等)分析物為特徵之細菌。在特定實施例中，分析樣品包括量化表示所關注細菌之特徵的分析物之總量。

較佳地，本發明之基於聲-機械之方法包括使用兩種或多種對兩種或多種表示特定細菌之特徵之不同分析物具有抗原特異性的經固定抗體，使用第二組兩種或多種在粒子-抗體結合物中之抗體，其中該兩種或多種抗體對兩種或多種表示特定微生物之特徵之不同分析物具有抗原特異性，其中對於存在之每一分析物而言，經固定抗體及粒子-抗體結合物之抗體包含兩種或多種抗原結合對。一組抗體可與另一組抗體相同，只要其能夠形成抗原結合對。

該等抗體較佳在其結合特徵方面協作。亦即，其能夠同時與靶分析物之不同區結合或最佳地發現具有互補結合，藉此其不同分析物由一個抗體組之結合藉由結合一或多個其他抗體組而增強。

本發明之基於聲-機械之方法包括：提供懷疑包括一或多種表示特定細菌之特徵之分析物的樣品；提供兩種或多種對兩種或多種表示該特定細菌之特徵之不同分析物具有抗原特異性的粒子-抗體結合物；提供一包含一聲-機械感應器之系統，該感應器包括一包含兩種或多種對兩種或多種表示特定細菌之特徵之不同分析物具有抗原特異性之經固定抗體的偵測表面；提供該樣品、該聲-機械感應器之偵測表面上之該等經固定抗體及該等粒子-抗體結合物之間的接觸以在粒子-抗體結合物與經固定抗體之間結合該或該等分析物；其中對於存在之每一分析物而言，經固定抗體及粒子-抗體結合物包含兩種或多種抗原結合對；及分析特定細菌之存在或不存在。

如上文對於基於酶之檢定所討論，兩種或多種不同分析物可為獨立分子，諸如蛋白質A及凝集因子，或同一分子之兩種不同抗原決定基。抗體可包括固相標記(亦即，粒子)或抗體為粒子之標記。無論可偵測部分(亦即，標記)為哪一種，該等物質在本文中均稱為粒子-抗體結合物。

提供樣品、聲-機械感應器之偵測表面上之經固定抗體及粒子-抗體結合物之間的接觸可同時或以任何順序依序進行。舉例而言，一種方法包括在有效捕捉一或多種表示特定細菌之特徵之分析物(若樣品中存在)的條件下使樣品與經固定抗體(亦即，固定於聲-機械感應器之表面上之抗體)接觸，以形成一或多種經捕捉分析物；及在有效引起該或該等經捕捉分析物與粒子-抗體結合物之間結合的條件下使該或該等經捕捉分析物(若存在)與粒子-抗體結合物接觸。

或者，在該等方法之特定實施例中，提供樣品、聲-機械感應器之偵測表面上之經固定抗體及粒子-抗體結合物之間的接觸包括：在有效引起一或多種表示特定細菌之特徵之分析物(若樣品中存在)與粒子-抗體結合物之間相互作用的條件下使樣品與粒子-抗體結合物接觸；及在有效引起粒子-抗體結合物、該或該等分析物及經固定抗體之間結合之條件下使聲-機械感應器之偵測表面與含有粒子-抗體結合物之樣品接觸。

用於在經固定抗體與粒子-抗體結合物之間結合分析物之條件可藉由熟習此項技術者容易地判定。

在特定較佳實施例中，使樣品與經固定抗體接觸包括提供樣品與各經固定抗體之間的同時接觸，儘管亦可使用依序接觸。類似地，在特定較佳實施例中，使一或多種經捕捉分析物(若存在)與粒子-抗體結合物接觸包括提供經捕捉分析物與各粒子-抗體結合物之間的同時接觸，儘管亦可使用依序接觸，例如，若不同，則使不同抗體連接於不同粒子。

各種方法可用於獲得粒子-抗體結合物、一或多種分析物及聲-機械感應器之偵測表面上之經固定抗體之間的結合。在一實施例中，具有連接於其之分析物之粒子-抗體結合物可自樣品之剩餘部分分離，隨後使該樣品與聲-機械感應器之偵測表面接觸。

關於適當選擇之抗體及最優化系統，吾人可進行以下之任一者：將分析物添加至具有經固定抗體之聲-機械感應器(亦即，感應器)中，接著添加粒子-抗體結合物；將分析物添加至感應器中，接著添加抗體，接著添加具有特異性之粒子以"覆蓋"抗體；將分析物添加至粒子-抗體結合物中，接著將此添加至感應器中；將分析物添加至抗體中，接著將粒子添加至此混合物中，且接著將混合物添加至感應器中；將分析物添加至抗體中，將此添加至感應器中，且接著將粒子添加至感應器中。將直接/間接標記之抗體添加至感應器中可適宜用於降低本底或產生反應性較小之抗體(高Kd)，此為到達其靶抗原決定基之較好機會。進行依序添加之另一原因在於藉由添加更多相分離減少非特異

性結合。

通常，分析特定細菌之存在或不存在可經由一或多種分析物之存在或所有分析物之不存在來進行。需要時，該分析可包括量化經捕捉分析物之總量。此可使用熟習此項技術者熟知之標準曲線及方法進行。

由於改良之獲得適用結果所需之時間、容易使用、效能(敏感性、特異性等)及保守(覆蓋廣泛物種)偵測等，本發明相對於用於分析該等細菌樣品之習知技術為有利的。

在該等基於聲-機械之方法中，顯著地，可使用相對小體積之測試樣品。儘管可利用高達2毫升(mL)之測試樣品體積，但有利地大約100微升(μL)之測試樣品對於本發明之方法足夠。如同ELISA，可使用較小測試樣品，但小於10- μL 之樣品通常並不實用。

使用本發明之較佳基於聲-機械之方法，可相對縮短初始捕捉時間。亦可相對縮短偵測時間。舉例而言，偵測時間可小於60分鐘，小於30分鐘，小於15分鐘，小於10分鐘，且甚至短至5分鐘，此視體積及流速而定。

尤其關注之細菌包括如上文對於完整細胞捕捉及基於酶之方法所討論之革蘭氏陽性細菌及革蘭氏陰性細菌。尤其關注革蘭氏陽性細菌，諸如金黃色葡萄球菌。通常，此等細菌可藉由偵測表示細菌之特徵之細胞壁組份(諸如細胞壁蛋白質)的存在來偵測。又，尤其關注抗生素抗性微生物，包括MRSA、VRSA、VISA、VRE及MDR。通常，此等細菌可藉由另外偵測造成抗生素抗性之諸如膜蛋白、轉

運蛋白、酶等之內部細胞組份之存在來偵測。

因為增強表示細菌之特徵之分析物(例如，外部細胞相關組份及/或來自細胞內部部分之細胞標記物)的信號，所以本發明之基於聲-機械之方法相對於用於分析該等微生物樣品之習知技術為有利的。本發明之方法可用於針對獨立分子(例如，類似用於分析金黃色葡萄球菌之蛋白質A及凝集因子之分子)或同一分子(例如蛋白質)之兩種不同抗原決定基而分析樣品。如上文所討論，該等分析物可存在於細胞之片段或完整細胞上。

該等分析物與上文對於基於酶之方法所討論之分析物(例如，細胞壁蛋白質及內部細胞組份)相同。

如上文對於完整細胞捕捉及基於酶之分析方法所討論，可在可源自各種來源之任一者的測試樣品(諸如生理流體)中分析所關注物質。此外，如上文對於完整細胞捕捉及基於酶之分析方法所討論，測試樣品可源自各種身體部位。如上文對於基於酶之分析方法所討論，尤其關注之樣品包括含有黏液之樣品，尤其鼻樣品。

如上文對於完整細胞捕捉及基於酶之分析方法所討論，除生理流體外，其他測試樣品可包括其他液體以及溶解於液體介質中之固體。樣品亦可包括經培養之細胞。

如上文對於完整細胞捕捉及基於酶之分析方法所討論，可使用各種患者取樣技術、樣品收集裝置(例如藥簽)、樣品處理程序等。如上文對於基於酶之分析方法所討論，所關注樣品中之細胞可為完整細胞或溶胞細胞。如上文對於

基於酶之分析方法所討論，若樣品含有黏液(例如鼻樣品)，則其可用黏液溶解劑(及按需要之試劑，例如界面活性劑)處理。

在本發明之基於聲-機械之方法中，使樣品與適當反應物分子接觸以得到結合分析物(例如，包括細菌識別試劑之分析物結合物質)。該等反應物分子較佳包括兩種或多種抗體。將該等抗體連接於微粒物質，藉此形成粒子-抗體結合物，其中相同或不同抗體連接於聲-機械感應器之偵測表面。選擇感應器表面上之抗體以致其允許與微粒結合分析物複合物非競爭性結合。

上文對於完整細胞捕捉及基於酶之分析方法(例如，包括捕捉及標記)已討論合適之抗體。此等抗體包括(例如)單株抗體、多株抗體或其組合、其片段等。特定實例包括選自由MAb-76、MAb-107、親和力純化RxC1f40、親和力純化GxC1f40、MAb 12-9組成之群之抗體、其片段及其組合。較佳抗體為單株抗體。尤其較佳為與金黃色葡萄球菌之蛋白質A結合之單株抗體。在本發明之分析方法之特定較佳實施例中，兩種或多種經固定抗體包括兩種(經分離)單株抗體，尤其MAb 12-9及MAb-76。在本發明之特定較佳實施例中，粒子-抗體結合物中之兩種或多種抗體包括一種諸如MAb-107之單株抗體，及一種諸如親和力純化RxC1f40之多株抗體。

如上文對於完整細胞捕捉及基於酶之檢定所討論，可使用各種技術(例如，共價或非共價)將抗體連接於微粒物質

及固定於聲-機械感應器之偵測表面上。

粒子-抗體結合物之粒子以及聲-機械感應器之表面可具有一或多種安置於其上之抗體。舉例而言，一類抗體可安置於一類微粒物質上且另一類抗體可安置於相同或不同類型之微粒物質上，但安置於不同粒子上。在特定實施例中，固體支撐物質(例如，各粒子或感應器偵測表面)具有至少兩種安置於其上之結合不同分析物之抗體。舉例而言，在特定實施例中，粒子-抗體結合物包括具有安置於其上，較佳安置於微粒物質之各粒子上的抗體MAb-76及MAb 12-9的微粒物質。視所需結果及所用抗體而定，經固定抗體之濃度及密度可由熟習此項技術者改變。

使分析物(若存在)與兩種或多種經固定抗體接觸可同時及/或依序進行。類似地，使經捕捉分析物(若存在)與兩種或多種粒子-抗體結合物接觸可同時及/或依序進行。使用有效引起分析物、感應器偵測表面上之經固定抗體及粒子-抗體結合物之間結合之條件。較佳地，該等條件包括已最優化以保證有效抗原：抗體結合，同時使非特異性結合降至最少之條件。該等條件包括在允許結合對(亦即，抗原、抗體)之特異性相互作用，但使其他非特異性(亦即，離子及靜電)相互作用降至最少之程度下，使用選擇性試劑，諸如鹽、pH值調整劑、界面活性劑、載體蛋白(例如，白蛋白、酪蛋白、脫脂奶粉、血清等)及其類似物。

用於該等方法之利用聲-機械感應器之技術通常為熟習

此項技術者熟知。然而，顯著地，使用兩種或多種對兩種或多種表示特定細菌之特徵之不同分析物具有抗原特異性的經固定抗體，使用第二組兩種或多種在粒子-抗體結合物中之抗體，其中該等抗體對兩種或多種表示特定微生物之特徵之不同分析物具有抗原特異性，其中對於存在之每一分析物而言，經固定抗體及粒子-抗體結合物包含兩種或多種抗原結合對，提供相對於習知方法、尤其用於分析諸如金黃色葡萄球菌之細菌之方法的顯著優點。

顯著地，使用本發明之方法及裝置，可相對於用於微生物、尤其諸如金黃色葡萄球菌之細菌之習知偵測方法實現改良之敏感性(亦即，較低偵測量)及特異性。

在本發明之基於聲-機械之方法中，經由使用經量測或者感應以判定波衰減、相變、頻率變化及/或共振頻率變化之聲-機械能來偵測測試樣品中靶生物學分析物之存在。聲-機械能可使用例如基於壓電之表面聲波(SAW)裝置產生。如在例如美國專利第5,814,525號(Renschler等人)中所述，基於壓電之聲-機械裝置之種類可進一步再分成表面聲波(SAW)、聲板型(APM)或石英晶體微天平(QCM)裝置，此視其偵測方式而定。各種聲-機械感應器為已知的，且在2007年8月15日申請之PCT申請案第US2007/075948號以及下文參考之其他專利及公開案中描述。

在特定實施例中，本發明之基於聲-機械之方法包括捕捉磁性粒子之表面上之靶分析物且接著捕捉感應器表面上

之磁性粒子。使用磁性粒子增加可使用磁泳於感應器表面上捕捉之靶分析物之量。此外，磁性粒子(經由靶分析物)與感應器表面耦合可增強感應器反應。捕捉具有經塗覆磁性粒子之靶生物學分析物係在2007年8月15日申請之PCT申請案第US2007/075948號中揭示。

捕捉連接於感應器表面上之靶分析物之磁性粒子受若干因子影響，包括磁場之強度(如藉由磁鐵之強度及磁鐵與感應器之距離所測定)、在X-Y平面上磁場產生器相對於感應器表面之位置、磁場產生器之方向、磁性粒子之尺寸及組成及在捕捉及移動磁場產生器期間測試樣品相對於感應器之流速。舉例而言，吾人可將磁場產生器緊密相鄰感應器表面置放(例如，距離零毫米)且對於特定流速在感應器之前緣捕捉所有粒子。接著可將磁場產生器移除以釋放粒子叢集使其溢出感應器。或者，可將磁場產生器遠離感應器一些距離安置，而仍保持吸引磁性粒子之磁場，且使用適當流速，可以單步驟將粒子均勻地塗覆於感應器上。

在已於感應器表面捕捉感應器中之所有磁性粒子後，移除磁場產生器以向感應器提供與分析物濃度有關之信號。在一利用本文中所述之方法的實施例中，感應器可偵測樣品物質中低至每500微升1 ng之靶生物學分析物。

另外，當與SH-SAW感應器一起使用時，所用之磁性粒子的尺寸較佳小於1微米。在一較佳實施例中，磁性粒子之尺寸為250微米，且更佳為100微米。使用磁性粒子與靶分析物結合提供感應器表面上之靶分析物之捕捉效率的提

高。顯著地，可於感應器表面上捕捉較大量之靶分析物，例如，僅依靠擴散導致捕捉約0.1至1%之通過感應器之可得到靶分析物。然而，在將磁場產生器應用於與靶分析物結合之磁性粒子的情況下，使用磁泳使感應器表面上之靶分析物之捕捉效率高達100%成為可能。因為靶分析物與吸引至感應器表面之磁性粒子結合，所以靶分析物以比樣品之其他組分高得多之速率移至表面。因此，達成靶分析物優先附著於感應器表面。

本文中所述之方法利用聲感應器，且更具體而言，偵測至少一種物理特性變化且響應可偵測變化而產生信號之聲機械生物感應器。較佳地，本文中所用之聲機械生物感應器為表面聲波(SAW)生物感應器。在此等裝置中，自交錯傳感器(IDT)於壓電基板上以表面聲波或體聲波形式產生聲波。第二IDT可將聲波轉化回用於量測之電信號。此稱為延遲線。或者，該裝置可作為共振器。兩個IDT之間間距可用塗層改善，對於化學或生物感應應用而言該塗層可包括反應性分子。

基於壓電之SAW生物感應器通常基於其偵測質量或黏度之細微變化之能力而操作。如美國專利第5,814,525號中所述，基於壓電之聲機械生物感應器之種類可進一步再分成表面聲波(SAW)、聲板型(APM)或石英晶體微天平(QCM)裝置，此視其偵測質量變化之方式而定。

在一些實施例中，聲機械生物感應器包括將靶分析物附著於壓電聲機械生物感應器之表面之第二捕捉試劑或反應

物(例如，抗體)。表面波之傳播速度為能夠偵測諸如質量、彈性、黏彈性、傳導率及介電常數之變化的敏感性探針。因此，此等特性之任一者的變化產生表面聲波之可偵測變化。亦即，當物質與SAW裝置之表面塗層接觸，吸附於該表面塗層上或另外使得黏附於該表面塗層上時，產生相應反應。

亦可用與液體接觸之裝置操作APM。類似地，施加於QCM(通常為AT-切割石英)裝置上之兩個相反電極之交流電壓誘發厚度剪切波型，其共振頻率與塗層材料之質量變化成比例變化。

聲波傳播之方向(例如，在與波導平行之平面內或垂直於波導之平面)係藉由構造聲機械生物感應器之壓電材料之晶體切割來判定。具有大多數在平面內及平面外傳播之聲波(亦即，瑞雷波(Rayleigh wave)、大多數 λ 波)之SAW生物感應器通常不用於液體感應應用，因為存在過多來自與表面接觸之液體之聲阻尼。

對於液體樣品介質而言，較佳使用剪力水平表面聲波生物感應器(SH-SAW)，且其由具有允許波傳播以旋轉至水平剪切型(亦即在生物感應器波導之平面內)之晶體切割及方向之壓電材料構造，從而導致與生物感應器表面接觸之液體之聲阻尼損失減少。水平剪切聲波包括(包括)聲板型(APM)、掠面體波(surface skimming bulk wave, SSBW)、拉夫波(Love-wave)、漏溢聲波(leaky acoustic wave, LSAW)及布勒斯坦-古利亞耶夫(Bleustein-Gulyaev, BG)

波。

詳言之，拉夫型感應器由支持諸如ST石英之SSBW或 36° YXLiTaO₃之漏溢波之SH波型的基板組成。藉由應用薄導聲層或波導將此等波型轉化為拉夫波型。此等波具頻率依賴性且可在波導層之剪切波速度低於壓電基板之限制條件下產生。SiO₂已用作石英上之聲波導層。亦已利用其他熱塑性塑料及交聯聚合波導物質，諸如聚甲基丙烯酸甲酯、酚醛樹脂(例如，商品名稱NOVALAC)、聚醯亞胺及聚苯乙烯。

或者，QCM裝置亦可用於液體樣品介質，儘管使用此等裝置，聲波將受液體介質嚴重阻尼，從而產生通常敏感性較低之裝置。

利用聲機械方法之生物感應器及該等生物感應器之組件為已知的。參見，例如美國專利第5,076,094號；第5,117,146號；第5,235,235號；第5,151,110號；第5,763,283號；第5,814,525號；第5,836,203號；第6,232,139號。SH-SAW裝置可自各種製造商獲得，諸如Sandia National Laboratories, Albuquerque, NM。特定SH-SAW生物感應器亦在"Low-level detection of a *Bacillus anthracis* stimulant using Love-wave biosensors of 36° YXLiTaO₃,"Biosensors and Bioelectronics, 19, 849-859 (2004)中描述。SAW生物感應器以及偵測生物試劑之方法亦在2003年12月30日申請之美國專利申請案第60/533,169號中描述。

在一些實施例中，生物感應器之表面包括覆蓋於波導層上之第二捕捉試劑或反應物(例如，抗體)。在此實施例中，生物感應器通常偵測與第二捕捉試劑或反應物密切相關之黏度及/或質量之變化。對於此實施例而言，生物感應器較佳包括一固定層(覆蓋於波導層上)及可選黏結層。

用於驅動及監控諸如可與本發明聯合使用之彼等者的聲-機械感應器之技術之實例可見於例如美國專利第5,076,094號(Frye等人)；第5,117,146號(Martin等人)；第5,235,235號(Martin等人)；第5,151,110號(Bein等人)；第5,763,283號(Cernosek等人)；第5,814,525號(Renschler等人)；第5,836,203號(Martin等人)；及第6,232,139號(Casalnuovo等人)等中。其他實例可在例如Branch等人，"Low-level detection of a *Bacillus anthracis* simulant using Love-wave biosensors on 36°YXLiTaO₃"，"Biosensors and Bioelectronics, 19, 849-859 (2004)；以及2004年12月17日申請之PCT公開案第WO 2005/066622號中描述。

偵測設備可含於可描述為偵測濾筒之積體裝置中。例示性偵測濾筒在2004年12月17日申請之PCT公開案第WO 2005/075973號及2004年12月17日申請之PCT公開案第WO 2005/064349號中進一步描述，該等專利描述可與本發明聯合使用之偵測濾筒及/或模組之附加特徵。諸如流體監控器及用於傳遞各種物質之模組之感應器濾筒的其他可選特徵在PCT公開案第WO 2005/075973號中進一步描述。其他與各種偵測系統及組件(諸如包括生物感應器之偵測濾

簡)有關之討論可見於例如PCT公開案第WO 2005/075973號及第WO 2005/064349號中。

本發明之方法可與如下文標出之各種美國專利申請案中所述之各種物質、方法、系統、設備等組合使用。其包括美國專利申請公開案第2005-0142296-A1號；第2005-0107615-A1號；第2005-0112672-A1號；第2005-0106709-A1號；第2005-0227076-A1號；美國專利申請公開案第2005-0153370-A1號；第2006-0135718-A1號；第2006-0135783-A1號；PCT公開案第WO 2005/066622號；PCT公開案第WO 2005/066621號；PCT公開案第WO 2005/075973號；PCT公開案第WO 2005/064349號；及PCT公開案第WO 2005/066092號。

實例

本發明現參考由發明者預見之使描述能夠實行的若干特定實施例進行描述。包括目前尚未預見之修改的本發明之非實質性修改仍然可能構成其等效物。因此，本發明之範疇不應受本文中所述之詳情及結構限制，而僅受以下申請專利範圍及其等效物限制。

I.捕捉細菌完整細胞之方法

實例I-1

個別抗體-磁性粒子結合物之製備

A.1-微米粒子。

鼠類抗蛋白質A單株抗體，MAb-107係在2006年11月22日申請之美國專利申請案第11/562,747號及PCT申請案第

US 07/84,739號中描述，兩者標題皆為"ANTIBODY WITH PROTEIN A SELECTIVITY"。美國專利第6,979,446號中所述之鼠類抗葡萄球菌凝集因子單株抗體，MAb12-9係自Inhibitex, Inc.(Alpharetta, GA)獲得。親和力純化山羊抗凝集因子免疫血清係在2006年11月22日申請之美國專利申請案第60/867,089號及與其同一日期申請之美國專利申請案第_____號(代理人案號62611US005)，兩者標題皆為"SPECIFIC ANTIBODY SELECTION BY SELECTIVE ELUTION CONDITIONS"。

根據製造商之指導用來自Pierce之EZ-Link NHS-PEO4-生物素(產品編號21330)對所有抗體製劑進行生物素標記。塗有抗生蛋白鏈菌素之磁性粒子(1- μ m Dynal T1)係自Invitrogen, Inc.(Carlsbad, CA)獲得。除非另有說明，否則所有反應及洗滌均係於PBS L-64緩衝劑(具有0.2% w/v PLURONIC L64之磷酸鹽緩衝生理食鹽水)中執行。除非另有說明，否則洗滌步驟包括三次連續洗滌。洗滌過程由以下步驟組成：將磁鐵相鄰於試管置放以將粒子吸引至試管接近磁鐵之側面，自具有相鄰磁鐵之試管移除液體，及添加等體積新鮮緩衝劑以置換移除之液體。移除磁鐵以允許再懸浮及混合粒子。

將濃度為2.5毫克/毫升(mg/mL)之塗有抗生蛋白鏈菌素之磁性粒子與生物素標記抗體製劑於500微升(μ L)PBS L-64緩衝劑中混合。用於結合之抗體與粒子之質量比為40微克抗體/毫克粒子。於37°C下將所得混合物培養1小時(hr)。

隨後，將粒子於PBS L-64緩衝劑中洗滌以移除未結合之抗體。最後洗滌後，將粒子再懸浮至2.5 mg/mL之粒子濃度。

B. 奈米粒子。

塗有抗生素蛋白鏈菌素之200-nm粒子係自Ademtech(Pessac, France)獲得。根據上文所述之方法，將生物素標記之MAb-107抗體與塗有抗生素蛋白鏈菌素之粒子結合，例外之處在於抗體結合反應係在製造商(Ademtech)提供之專用固定緩衝劑中進行。對於Ademtech粒子而言，用於結合之抗體與粒子之質量比為1微克抗體/毫克粒子。洗滌粒子後，將抗體結合之粒子以5 mg/mL之粒子濃度再懸浮於固定緩衝劑中。

實例 I-2

含有多於一種抗原特異性之磁性粒子懸浮液之製備

A. 免疫多特異性磁性粒子之製備

如實例I-1A中所述，將塗有抗生素蛋白鏈菌素之Dyna1 T1磁性粒子之懸浮液(2.5 mg/mL)與親和力純化之GxC1f40-生物素與MAb107-生物素之混合物結合。

在此實例中，用於結合之各別抗體與粒子之質量比為20微克抗體/毫克粒子。洗滌粒子後，將其再懸浮於PBS L-64中至2.5 mg/mL之最終粒子濃度。此懸浮液稱為"混合物1"。

如實例I-1B中所述，將塗有抗生素蛋白鏈菌素之Ademtech 200-nm磁性粒子之懸浮液(2.5 mg/mL)與MAb107-生物素與

親和力純化之GxC1f40-生物素抗體之混合物結合，例外之處在於將結合反應中各抗體與粒子之質量比調整至1.0微克抗體/毫克粒子於固定緩衝劑中。洗滌後，將粒子以5 mg/mL之粒子濃度再懸浮於固定緩衝劑中。此懸浮液稱為"混合物2"。

B.塗有單特異性抗體之磁性粒子之混合物的製備。

將等體積之來自實例I-1A之MAb107及親和力純化GxC1f40抗體結合Dyna1 T1(1- μ m)粒子懸浮液混合以提供2.5 mg/mL之最終粒子濃度(1.25 mg/mL之MAb-107結合物及1.25 mg/mL之親和力純化GxC1f40結合物)。所得懸浮液稱為"混合物3"。

實例I-3

使用塗有抗體之1- μ m磁性粒子捕捉金黃色葡萄球菌細胞。

A.方法。

用於細胞捕捉研究之金黃色葡萄球菌菌株列於表I-1中。菌株25923係自美國菌種保藏中心(Manassas, VA)獲得。金黃色葡萄球菌之其他菌株係自臨床試樣分離。使用於37°C下於胰蛋白酶大豆肉湯中生長之隔夜培養物製備細菌懸浮液。將培養物離心以收穫細胞且將細胞小球再懸浮於具有0.2% w/v PLURONIC L64之無菌磷酸鹽緩衝生理食鹽水中至約 5×10^8 cfu/mL之最終濃度。在實驗之前，將細菌洗滌三次且稀釋至約 5×10^3 。將三十二微升塗有抗體之(Dyna1)粒子懸浮液(2.5 mg/mL)與468微升金黃色葡萄球菌

懸浮液於聚丙烯2-mL小瓶中混合。將該小瓶手動搖動30秒(s)以混合細菌與粒子且接著於搖床(Reciprocating Barnstead/Thermolyne Varimix, 設置為約0.3周/秒)上攪拌15分鐘。使粒子吸引至小瓶之一側(用磁鐵, 如實例I-1中所述)歷時5分鐘。將含有未由粒子吸附之細菌細胞之上清液移除且於無菌PBS L-64中稀釋10倍。將小瓶自磁鐵移開, 添加500 μ L無菌PBS L-64緩衝劑, 且將小瓶手動攪拌30秒(s)以再懸浮粒子。將小瓶相鄰於磁鐵置放5分鐘且吸出洗滌溶液且於PBS L-64中稀釋10倍。將小瓶自磁鐵移開, 添加500 μ L緩衝劑, 且將小瓶手動攪拌30 s以再懸浮粒子。

藉由將各懸浮液之連續稀釋液置於PETRIFILM需氧計數盤(3M Company, St. Paul, MN)中來測定各別溶液(上清液、洗滌液及再懸浮粒子)之每一者中活細菌數目。

表I-1.細菌菌株。

菌株編號	來源
16	臨床試樣
207	臨床試樣
221	臨床試樣
271	臨床試樣
317	臨床試樣
329	臨床試樣
336	臨床試樣
25923	美國菌種保藏中心

B.用個別抗體結合磁性粒子捕捉金黃色葡萄球菌。

根據實例I-3A, 使用Dynal T1粒子之結合物(實例I-1A)捕捉葡萄球菌細胞及測定其數量。菌株25923產生蛋白質A

與凝集因子抗原。使用溶胞葡萄球菌細胞作為測試抗原之ELISA檢定，菌株317產生凝集因子，但並不產生可偵測量之蛋白質A。對各抗體進行重複試樣。結果在表I-2中展示。

表I-2.使用抗體結合粒子捕捉金黃色葡萄球菌菌株。

抗體	捕捉之金黃色葡萄球菌%			
	菌株 25923 重複 1	菌株 25923 重複 2	菌株 317 重複 1	菌株 317 重複 2
Mab 107	70.6	75.2	2.8	2.4
GxCIfa	76.4	81.2	82.8	84.2
Mab 12-9	74	77.9	72.5	72.2

資料表明，儘管兩種菌株由塗有抗凝集因子抗體之任一者之粒子有效捕捉，但菌株317並不由塗有抗蛋白質A抗體之粒子有效捕捉。

C.使用含有針對蛋白質A與凝集因子抗原之粒子懸浮液捕捉金黃色葡萄球菌菌株317。

如實例I-2A(混合物1)中所述製備Dynal T1粒子分別與Mab107及親和力純化GxCIf40抗體之結合物。根據實例I-2B(混合物3)製備Dynal T1粒子與Mab107及親和力純化GxCIf40抗體兩者之結合物。產生金黃色葡萄球菌菌株317之懸浮液，使其與磁性粒子懸浮液接觸，且如實例I-3A中所述量測細菌捕捉。結果概括於表I-3中。

表I-3：用Mab107、親和力純化GxCIf40抗體及其混合物捕捉金黃色葡萄球菌菌株317。

抗體	捕捉之金黃色葡萄球菌%	
	重複 1	重複 2
Mab 107	1.0	0.8
GxCIfa	82.9	80.6
混合物 1	80.2	79.5
混合物 3	56.1	57.1

如實例 I-3B 中所觀察到，由 MAb-07 抗體結合粒子極少捕捉到細胞且由親和力純化 GxCIf40 抗體結合粒子有效捕捉細胞。資料顯示，無論抗體共同與粒子結合，或其單獨與粒子結合，由具有兩種抗體特異性之粒子懸浮液有效捕捉金黃色葡萄球菌細胞。

用金黃色葡萄球菌之若干其他菌株重複類似捕捉實驗且結果在表 I-4 中展示。

表 I-4：用單特異性抗蛋白質 A(MAb-107)及多特異性抗蛋白質 A 及抗凝集因子(MAb-107+親和力純化 GxCIf40)粒子捕捉金黃色葡萄球菌。

菌株	Mab 107	混合物 1
317	09	79.8
207	1.4	21.9
221	23.0	69.5
336	62.9	60.8

塗有兩種抗體之粒子顯示顯著較好地捕捉表現極少蛋白質 A 或不表現蛋白質 A 之三種菌株。對於表現相對高含量之蛋白質 A 之第四種菌株(336)而言，單特異性粒子與多特異性粒子之細胞捕捉可相當。

實例 I-4

使用塗有抗體之 200-nm 磁性粒子捕捉金黃色葡萄球菌細

胞。

A. 用免疫單特異性(抗蛋白質A)粒子之捕捉。

如實例 I-3 中所述，使細菌懸浮液生長，將其收穫且洗滌。如實例 I-1B 中所述用 MAb-107 抗體塗覆 Ademtech 200-nm 磁性粒子。如實例 I-3 中所述執行細菌捕捉實驗，例外之處在於在此實例中，將 15.8 微升抗體結合粒子與 484 微升細菌懸浮液混合。此實例中使用五種不同細菌菌株。捕捉結果在表 I-5 中展示。

B. 用免疫多特異性(抗蛋白質A+抗凝集因子)粒子之捕捉。

如實例 I-3 中所述，使細菌懸浮液生長，將其收穫且洗滌。如實例 I-2A 中所述用 MAb-107 及親和力純化 GxC1f40 抗體塗覆 Ademtech 200-nm 磁性粒子。如實例 I-3 中所述執行細菌捕捉實驗，例外之處在於在此實例中，將 15.8 微升抗體結合粒子與 484 微升細菌懸浮液混合。此實例中使用五種不同細菌菌株。捕捉結果在表 I-5 中展示。

表 I-5：對於金黃色葡萄球菌之不同菌株使用 Ademtech 200-nm 粒子比較 MAb-07 抗體與 MAb-107+親和力純化 GxC1f40 雙重抗體系統。

菌株	Mab 107	混合物 2
16	75.2	77.9
207	0.9	22.8
221	18.4	54.0
271	41.8	53.0
329	94.7	94.9

如用較大(1- μ m)磁性粒子觀察，此等結果證明，塗有具有不同抗原特異性之抗體混合物之粒子更有效捕捉表現相

對低含量之蛋白質A之金黃色葡萄球菌細胞。

II. 使用ELISA分析細菌樣品之方法

實例 II-1

用於聯合蛋白質A/凝集因子酶聯免疫吸附檢定(ELISA)中之捕捉及成帽抗體之濃度的最優化。

A. 通用物質及方法。

用於檢定之抗體包括兩種抗金黃色葡萄球菌蛋白質A單株抗體(MAb-76及MAb-107，其在2006年11月22日申請之美國專利申請案第11/562,759號及PCT申請案第US 07/84,736號中揭示，兩者標題皆為"ANTIBODY WITH PROTEIN A SELECTIVITY"，或在2006年11月22日申請之美國專利申請案第11/562,747號及PCT申請案第US 07/84,739號中揭示，兩者標題皆為"ANTIBODY WITH PROTEIN A SELECTIVITY")、抗金黃色葡萄球菌凝集因子單株抗體MAb 12-9(Inhibitex, Alpharetta, GA，在美國專利第6,979,466號中描述)及RxC1f40(兔子抗Clf40抗血清，Inhibitex)。在用於ELISA檢定之前，根據2006年11月22日申請之美國專利申請案第60/867,089號及與其同一日期申請之美國專利申請案第_____號(代理人案號6261IUS005)中所述之方法將RxC1f40抗體親和力純化，兩個專利標題皆為"SPECIFIC ANTIBODY SELECTION BY SELECTIVE ELUTION CONDITIONS"。

在使用之前對所有成帽抗體進行生物素標記。根據製造商之說明書，使用來自Pierce (Rockford, IL)之EZ-Link

NHS-PEO4-生物素套組對抗體進行生物素標記。

用於此等實驗之磷酸鹽緩衝生理食鹽水(PBS，於10 mM 磷酸鹽緩衝劑中之137 mM NaCl及2.7 mM KCl, pH 7.50)係由自EMD Biosciences (San Diego, CA)獲得之10X濃度溶液製備。藉由將0.05% (v/v) TWEEN 20添加至PBS緩衝劑中來製備PBST試劑。Costar 96-孔高結合聚苯乙烯微量滴定盤係自Corning LifeSciences (Acton, MA)獲得。在使用之前過濾所有緩衝劑，洗滌緩衝劑除外。除非另外指定，否則所有程序均於室溫下執行。所有ELISA洗滌程序包括每孔200微升之五次依序洗滌體積且所有洗滌均係用PBST緩衝劑進行。鹼性磷酸酶產色受質，pNPP係自KPL (Gaithersburg, MD)獲得。

用於最優化實驗之抗原包括來自Zymed Laboratories (Invitrogen, Inc. Carlsbad, CA)之蛋白質A抗原、來自Inhibitex (Alpharetta, GA)之凝集因子抗原(rClf40，美國專利第6,008,341號)及金黃色葡萄球菌菌株25923之溶胞細胞。金黃色葡萄球菌25923係自美國菌種保藏中心(Manassas, VA)獲得。在於抗原稀釋緩衝劑中稀釋至3 $\mu\text{g/mL}$ 之經過濾溶胞溶液-溶葡萄球菌素(Sigma Aldrich, St. Louis, MO)中製備所有抗原。抗原稀釋緩衝劑由含有0.2% w/v PLURONIC L64 (BASF, Florham Park, NJ)及50 mM EDTA二鈉(pH 7.44)之PBS組成。

為製備金黃色葡萄球菌抗原，使菌株25923於37°C下於胰蛋白酶大豆肉湯(Hardy Diagnostics, Santa Maria, CA)中

生長隔夜至 5.0×10^8 cfu/mL 之估計濃度。將培養物洗滌兩次(於 4°C 下以 10,000 rpm 離心 10 分鐘)，接著再懸浮於 PBSL(含有 0.2% w/v PLURONIC L64 之 PBS, BASF, Florham Park, NJ)中。將經洗滌之細菌原料以 1:50 於 PBSL 中稀釋至 1.0×10^7 cfu/mL 之近似濃度。將此以 1:100 進一步稀釋至溶胞溶液中，最終樣品濃度為 1.0×10^5 cfu/mL。將未溶胞、經稀釋之細菌置於血瓊脂盤上以確定初始肉湯培養物之濃度。檢定結果反映實際起始細菌濃度。

B. ELISA 檢定條件。

此檢定使用一或兩種捕捉抗體。將該等抗體自其冷藏(4°C)儲存起始濃度以 PBS 稀釋至微孔塗覆濃度。將 100 微升塗覆溶液添加至微孔盤之孔中。將盤於 37°C 下培養 60 分鐘。在阻斷步驟之前移除塗覆溶液。

將所有微量滴定盤用 200 微升/孔之 StabilCoat 免疫檢定穩定劑(Surmodics, Eden Prairie, MN)阻斷，接著於 4°C 下培養隔夜。在抗原塗覆步驟之前移除阻斷溶液。

將 100 微升捕捉抗原之適當溶液添加至各孔中且將該等盤於 37°C 下培養 60 分鐘。隨後用 PBST 溶液洗滌該等盤。

此檢定使用兩種成帽抗體。將所有成帽抗體製劑於 blotto(於 PBST 中之 2% 脫脂乳粉)中稀釋。將 100 微升適當成帽抗體混合物添加至各孔中且將該等盤於 37°C 下培養 60 分鐘。

將抗生蛋白鏈菌素結合鹼性磷酸酶(抗生蛋白鏈菌素 AP, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove,

PA)於 blotto 中稀釋至 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 之濃度。洗滌微量滴定盤，且將100微升/孔之抗生蛋白鏈菌素 AP 添加至該等盤中。將該等盤於 37°C 下培養 60分鐘。

洗滌盤。隨後，將100微升/孔之 pNPP 受質添加至盤中。將盤於室溫下保持 15分鐘以觀察顏色之發展。藉由添加 100微升/孔之 5% (w/v) EDTA 二鈉將鹼性磷酸酶反應停止且將盤置於盤讀取器中，其中讀取於 405-nm 波長下之吸收率。

C. 用於偵測葡萄球菌抗原之捕捉抗體濃度及比率之最優化。

如上文所述設置 ELISA 檢定。此研究之目的在於判定何種濃度之捕捉抗體及成帽抗體提供與所有三種抗原製劑之最好結合(在 ELISA 檢定中讀取之最高吸收率)及同時提供最低本底(在 ELISA 檢定中讀取之最低吸收率)。用表 II-1 中所示之捕捉抗體組合塗覆 7 個 96 孔盤。

表 II-1. 用於最優化研究之捕捉抗體濃度。所有濃度均以 $\mu\text{g/mL}$ 列出。

管柱編號	MAb-76 抗蛋白質 A	MAb 12-9 抗凝集因子
1	7.5	0
2	7.5	7.5
3	3.75	7.5
4	1.88	7.5
5	0.93	7.5
6	0.47	7.5
7	0	7.5
8	3.5	3.5
9	7.5	3.75
10	7.5	1.88
11	7.5	0.93
12	7.5	0.47

在檢定中進行四種抗原：1)PBS(無抗原對照組)；2)於細胞溶液中稀釋至1 ng/mL之rClf40凝集因子蛋白質；3)於細胞溶液中稀釋至100 pg/mL之Zymed蛋白質A；及4)如上文所述製備之金黃色葡萄球菌菌株25923(ATCC, Manassas, VA)。如上文所述將100微升抗原等分試樣添加至該等盤中且培養。

製得7種聯合成帽抗體混合物，每一微量滴定盤使用一種混合物。該等成帽抗體混合物在表II-2中展示。

表II-2.用於最優化研究之成帽抗體濃度。所有濃度均以 $\mu\text{g/mL}$ 列出。

盤編號	MAb-107.生物素抗蛋白質 A	兔子抗凝集因子.生物素
1	2.5	0
2	0	2.5
3	2.5	2.5
4	1.25	2.5
5	2.5	1.25
6	2.5	0.625
7	0.625	2.5

表II-3展示代表性ELISA由用於研究之盤中之一者產生。所有實驗之資料表明，由0.93 $\mu\text{g/mL}$ MAb-76及7.5 $\mu\text{g/mL}$ MAb 12-9組成之捕捉抗體濃度之組合對於抗原產生最高結合活性且對於PBS對照組產生最低本底讀數。選擇此組合用於使成帽抗體混合物進一步最優化。

表II-3.偵測葡萄球菌凝集因子、蛋白質A及溶胞金黃色葡萄球菌之BLISA檢定結果。此研究中之成帽抗體為生物素標記之親和力純化之兔子抗凝集因子及生物素標記之MAb-107，兩者濃度皆為2.5 µg/mL。各種組合中各捕捉抗體(分別為MAb-76及Mab 12-9)之濃度係以µg/mL顯示。資料為於405 nm下之最少兩個雙重複孔的平均吸收率讀數。此表為來自所進行之許多實驗之代表資料。各實驗包括使用不同濃度之成帽抗體。

成帽抗體= 2.5 µg/mL RxClf40 + 2.5 µg/mL MAb-107													
[MAb-76]	7.5	7.5	3.75	1.88	0.93	0.47	0	3.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5
[MAb12-9]	0	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	3.5	3.75	1.88	0.93	0.47	0.47
0	0.344	0.261	0.179	0.144	0.120	0.108	0.095	0.178	0.277	0.279	0.310	0.281	0.281
ClfA	0.421	2.566	2.416	2.268	2.197	2.164	2.203	2.806	2.240	1.752	1.323	0.944	0.944
ProtA	1.032	0.917	0.815	0.701	0.634	0.582	0.116	0.825	0.886	0.896	0.939	0.930	0.930
25923	3.905	3.887	3.908	3.723	3.603	3.233	0.232	3.852	3.844	3.819	3.894	3.859	3.859

D.用於偵測葡萄球菌抗原之成帽抗體濃度之最優化。

此實驗類似於實例II-1C中所述之一者進行，例外之處在於捕捉抗體濃度保持1 $\mu\text{g/mL}$ (MAb-76)及7.5 $\mu\text{g/mL}$ (MAb 12-9)不變。來自此等實驗之代表資料在表II-4中展示。資料表明，由2.5 $\mu\text{g/mL}$ 之MAb-107及0.75 $\mu\text{g/mL}$ 之親和力純化RxCIf40組成之成帽抗體混合物導致偵測最低量之葡萄球菌抗原。

表II-4.偵測葡萄球菌凝集因子抗原之ELISA檢定結果。各成帽抗體之濃度係以 $\mu\text{g/mL}$ 報導。各測試中之抗原、葡萄球菌凝集因子之濃度係以 pg/mL 報導。資料為於405 nm下之最少至少兩個雙重複孔的平均吸收率讀數。

	Mab 107($\mu\text{g/mL}$) RxCIf($\mu\text{g/mL}$)	2.5 0.75	2.5 0.625	2.5 0.5	2.5 0.375
ClfA (pg/ml)	250.00	0.700	0.661	0.593	0.483
	125.00	0.388	0.360	0.320	0.273
	62.50	0.233	0.209	0.182	0.172
	31.25	0.152	0.144	0.131	0.107
	15.63	0.111	0.105	0.089	0.078
	7.81	0.089	0.079	0.068	0.062
	3.91	0.083	0.074	0.069	0.060
	0.00	0.071	0.075	0.068	0.058

進行偵測限度研究所選之抗體濃度之組合在表II-5中展示。

表II-5.用於使用ELISA測試偵測樣品中之葡萄球菌抗原的最優抗體組合。用於各別捕捉及成帽抗體之各抗體之最優量及比率由使用抗體量及比率之各種組合之實驗判定。選擇最優量之標準包括各抗原之最大偵測信號，結合無抗原存在於檢定中時之最低本底信號。

	MAb-76	MAb 12.9	MAb-107.生物素	親和力純化 RxC1f40.生物素
塗覆濃度	1 µg/mL	7.5 µg/mL	N/A	N/A
成帽濃度	N/A	N/A	2.5 µg/mL	0.75 µg/mL

實例 II-2

在聯合蛋白質 A/凝集因子酶聯免疫吸附檢定(ELISA)中測定對於蛋白質 A 及凝集因子抗原之偵測下限。

所有程序均如實例 II-1 中所述執行。在於抗原稀釋緩衝劑 - 含有 0.2% w/v PLURONIC L64 (BASF, Florham Park, NJ) 及 50 mM EDTA 二鈉 (pH 7.44) 之 PBS 中稀釋至 3 µg/mL 之經過濾之溶胞溶液 - 溶葡萄球菌素 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) 中製備抗原。

在檢定中進行三種抗原：1) 自 2 ng/mL 至 0.0019 ng/mL 藉由連續兩倍稀釋所稀釋之 C1f40 凝集因子蛋白質；2) 自 250 pg/mL 至 0.24 pg/mL 藉由連續兩倍稀釋所稀釋之 Zymed 蛋白質 A (SpA)；及 3) 如實例 II-1 中所製備之金黃色葡萄球菌菌株 25923，例外之處在於其以連續兩倍稀釋而稀釋至約 5×10^5 CFU/mL 至約 4.8×10^2 CFU/mL 之最終樣品濃度。盤中亦包括無抗原對照組 (如上文所述之溶胞溶液)。

對於各抗原之偵測下限為由選擇超過無抗原對照組之 3 個標準偏差之樣品濃度值來判定，在彼濃度點及以上點不斷增加吸收率值。對於聯合檢定而言，對於凝集因子抗原之偵測下限小於或等於 0.0019 ng/mL，且蛋白質 A 之偵測下限為 7.81 pg/mL。對於溶胞金黃色葡萄球菌菌株 25923 之偵測下限為 3,828 個細胞/毫升。此研究之結果在表 II-6 中展

示。

表 II-6. 在 ELISA 檢定中偵測葡萄球菌抗原。聯合檢定所示之值為來自最少至少兩個雙重複孔之平均吸收率 (405 nm) 讀數。

捕捉抗體：Mab 12-9(7.5 µg/mL)+ MAb-76(1 µg/mL)					
凝集因子		蛋白質 A		溶胞金黃色葡萄球菌	
Clf(ng/mL)	聯合	SpA(pg/mL)	聯合	金黃色葡萄球菌 (cfu/mL)	聯合
2.00000	4.679	250.00000	1.653	490,000	5.000
1.00000	3.022	125.00000	0.943	245,000	5.000
0.50000	1.789	62.50000	0.620	122,500	5.000
0.25000	1.065	31.25000	0.350	61,250	3.831
0.12500	0.646	15.62500	0.237	30,625	2.475
0.06250	0.430	7.81250	0.230	15,313	1.496
0.03125	0.321	3.90625	0.127	7,656	0.855
0.01563	0.276	1.95312	0.132	3,828	0.493
0.00781	0.247	0.97656	0.135	1,914	0.313
0.00391	0.242	0.48828	0.116	957	0.233
0.00195	0.234	0.24414	0.115	479	0.177
0.00000	0.221	0.00000	0.117	0	0.196
0 + 3 SD	0.221	0 + 3 SD	0.136	0 + 3 SD	0.435

實例 II-3

在聯合蛋白質 A/凝集因子酶聯免疫吸附檢定 (ELISA) 中測定對於溶胞及非溶胞金黃色葡萄球菌細菌之偵測下限。

所有程序均如實例 II-1 中所述執行，例外之處在於在此實例中，將金黃色葡萄球菌洗滌細胞分成兩種樣品 - 溶胞樣品及未溶胞樣品。如實例 II-1 中所述處理溶胞樣品。金黃色葡萄球菌菌株 222 為臨床分離物。

在於抗原稀釋緩衝劑 - 含有 0.2% w/v PLURONIC L64 (BASF, Florham Park, NJ) 及 50 mM EDTA 二鈉 (pH 7.44) 之 PBS 中稀釋至 3 µg/mL 之經過濾之溶胞溶液 - 溶葡萄球菌素

(Sigma Aldrich, St. Louis, MO)中製備除未溶胞金黃色葡萄球菌外之所有抗原及標準曲線。於實例II-1A中所述之抗原稀釋緩衝劑中製備未溶胞金黃色葡萄球菌。

用Clf40凝集因子蛋白質及Zymed蛋白質A製備標準曲線。自2.5 ng/mL至0.20 ng/mL以兩倍連續稀釋製備Clf40凝集因子蛋白質。自400 pg/mL至3.13 pg/mL以兩倍連續稀釋製備蛋白質A。盤上亦包括無抗原對照組。

使金黃色葡萄球菌菌株25923及222於37°C下於胰蛋白酶大豆肉湯(Hardy Diagnostics, Santa Maria, CA)中生長隔夜至 5.0×10^8 cfu/mL之估計濃度。將培養物洗滌兩次-於4°C下將肉湯培養物以10,000 rpm離心10分鐘，接著再懸浮於PBSL(含有0.2% w/v PLURONIC L64之PBSL)中。將各經洗滌之細菌原料以連續十倍稀釋於PBSL中稀釋至 1.0×10^8 cfu/mL至 1.0×10^3 cfu/mL之估計濃度(未溶胞細胞)。接著將此等經稀釋之樣品之等分試樣以1:10進一步稀釋為溶胞溶液，最終樣品濃度為 1.0×10^7 cfu/mL至 1.0×10^2 cfu/mL(溶胞細胞)，以及零細菌對照組。將未溶胞、經稀釋之細菌置於血瓊脂盤上以確定初始肉湯培養物之濃度。檢定結果反映實際起始細菌濃度。

將個別經穩定之微量滴定盤洗滌且用捕捉抗體溶液之一者塗覆：MAb 12-9、MAb-76或MAb 12-9與MAb-76之混合物。將抗原樣品(溶胞金黃色葡萄球菌之連續稀釋液、未溶胞金黃色葡萄球菌之連續稀釋液及溶胞溶液對照組)添加至每一塗覆盤之雙重複孔中。將凝集因子及蛋白質A之

標準曲線樣品添加至塗有彼等各別抗原之捕捉抗體之盤中。

製得三種成帽抗體製劑：1) 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 之MAb-107.生物素，2) 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 之親和力純化兔子抗凝集因子.生物素，及3)藉由混合等體積之5 $\mu\text{g/mL}$ 之MAb-107.生物素與1.5 $\mu\text{g/mL}$ 之親和力純化兔子抗凝集因子.生物素(最終濃度分別為2.5 $\mu\text{g/mL}$ 及0.75 $\mu\text{g/mL}$)製備之聯合成帽抗體混合物。將成帽抗體混合物添加至適當微量滴定盤中且完成ELISA檢定。

實驗之代表性結果在表II-7中展示。來自蛋白質A盤及聯合捕捉/成帽盤之資料展示，與完整細菌相比，對溶胞細菌之偵測更敏感。來自凝集因子盤之結果展示對於溶胞細菌及完整細菌之等效偵測。總體而言，當與使用單一捕捉抗體之檢定比較時，聯合塗覆/捕捉檢定偵測標準曲線上之最低含量之細菌。

表II-7.使用最優化ELISA檢定偵測完整細胞及溶胞金黃色葡萄球菌。資料展示在於每一條件下測試之至少雙重複孔中偵測到最低濃度之細菌。左行展示分別用於塗覆反應及成帽反應之抗體。在用於檢定之前對成帽抗體進行生物素標記。

盤特異性 (塗覆、成帽 Ab)	菌株 25923 (溶胞)	菌株 25923 (未溶胞)	菌株 222 (溶胞)	菌株 222 (未溶胞)
蛋白質 A (MAb-76、MAb-107)	1×10^7 cfu/mL	1×10^5 cfu/mL	1×10^6 cfu/mL	1×10^4 cfu/mL
凝集因子 (MAb 12-9、親和力純化 RxClf40)	1×10^6 cfu/mL	1×10^6 cfu/mL	1×10^6 cfu/mL	1×10^6 cfu/mL
聯合 (聯合塗覆、聯合成帽)	1×10^6 cfu/mL	1×10^4 cfu/mL	1×10^5 cfu/mL	1×10^4 cfu/mL

實例 II-4

在聯合蛋白質 A/凝集因子酶聯免疫吸附檢定(ELISA)中
測定藉由未中和之 N-乙醯基 L-半胱胺酸對 3M 金黃色葡萄
球菌菌株 222 之 ELISA 活性之抑制

A. 通用物質及方法

用於 ELISA 檢定之抗體包括兩種抗金黃色葡萄球菌蛋白質 A 單株抗體 (MAb-76 及 MAb-107、抗金黃色葡萄球菌凝集因子單株抗體、MAb 12-9)。在用於 ELISA 檢定之前，如實例 II-1 中所述將 RxC1f40 抗體親和力純化。在使用之前對所有成帽抗體進行生物素標記。根據製造商之說明書，使用來自 Pierce(Rockford, IL)之 EZ/Link NHS-PEO4-生物素套組對抗體進行生物素標記。

用於此等實驗之磷酸鹽緩衝生理食鹽水(PBS，於 10 mM 磷酸鹽緩衝劑中之 137 mM NaCl 及 2.7 mM KCl，pH 7.50)係由自 EMD Biosciences (San Diego, CA)獲得之 10X 濃度溶液製備。藉由將 0.05% (v/v) TWEEN 20 添加至 PBS 緩衝劑中來製備用於 ELISA 檢定之 PBST 試劑。Costar 96 孔高結合聚苯乙烯微量滴定盤係自 Corning LifeSciences (Acton, MA)獲得。在使用之前過濾所有緩衝劑，洗滌緩衝劑除外。所有 ELISA 洗滌程序包括每孔 200 微升之五次依序洗滌體積且所有洗滌係用 PBST 緩衝劑進行。鹼性磷酸酶產色受質，pNPP 係自 KPL(Gaithersburg, MD)獲得。

用於此等實驗之抗原為 3M 金黃色葡萄球菌菌株 222 之細胞。為製備金黃色葡萄球菌抗原，使菌株 222 於 37°C 下於

胰蛋白酶大豆肉湯(Hardy Diagnostics, Santa Maria, CA)中生長隔夜至 5.0×10^8 cfu/mL之估計濃度。將培養物洗滌兩次(於4℃下以10,000 rpm離心10分鐘)，接著再懸浮於PBS中。將經洗滌之細菌原料於PBS中稀釋至 2.0×10^5 cfu/mL。在抗原樣品製備期間將此以1:20進一步稀釋，最終樣品濃度為 1.0×10^4 cfu/mL。

用於此等實驗之N-乙醯基L-半胱胺酸(NAC)為Sigma級別且自Sigma-Aldrich(St. Louis, MO)獲得。為製備未中和之NAC，將NAC粉末添加至PBS中以產生4%(w/v)溶液，且接著於PBS中進行連續兩倍稀釋以產生2%及1%溶液。為製備中和之NAC，將對於4%溶液足夠之NAC粉末添加至減小體積之PBS中。用5 M NaOH將pH值調整至接近中性pH值，且接著添加其他PBS以使總體積達形成4%溶液之程度。於PBS中進行連續兩倍稀釋以產生2%及1%溶液。無NAC之PBS緩衝劑係用作0% NAC對照組。量測各溶液之pH值，接著用0.22 μ M過濾器對各溶液過濾滅菌。

表II-8.量測用於研究之中和及未中和之NAC溶液的pH值。

	中和	未中和
4%	7.18	1.58
2%	7.26	1.79
1%	7.35	2.05

用於此研究之溶葡萄球菌素自Sigma-Aldrich獲得。為製備溶葡萄球菌素，將溶葡萄球菌素原料於PBS中稀釋至200 μ g/mL，接著用0.22 μ M過濾器過濾滅菌。在抗原樣品製備期間將此以1:20進一步稀釋，最終樣品濃度為10 μ g/mL。

除非另外指定，否則所有程序均於室溫下執行。

B. ELISA檢定條件

兩種捕捉抗體用於該檢定：MAb 76及MAb 12-9。將抗體於PBS中自其冷藏(4°C)儲存起始濃度稀釋至MAb 76為2.0 µg/mL及MAb 12-9為15 µg/mL；接著將兩種抗體溶液以等體積組合至MAb 76為1.0 µg/mL及MAb 12-9為7.5 µg/mL之最終微孔塗覆濃度。將100微升塗覆溶液添加至微孔盤之孔中。將該等盤於37°C下培養60分鐘。在阻斷步驟之前藉由洗滌移除塗覆溶液。

將微量滴定盤用200微升/孔之StabilCoat免疫檢定穩定劑(Surmodies, Eden Prairie, MN)阻斷，接著於4°C下培養隔夜。在抗原塗覆步驟之前藉由洗滌移除阻斷溶液。

將100微升捕捉抗原之溶液添加至各孔中且將該等盤於37°C下培養60分鐘。隨後用PBST溶液洗滌該等盤。

兩種成帽抗體用於該檢定：生物素標記之MAb-107及生物素標記之RxC1f40。將抗體於blotto(於PBST中之2%脫脂乳奶粉)中自其冷藏(4°C)儲存起始濃度稀釋至MAb 107為5.0 µg/mL及RxC1f40為1.5 µg/mL。接著將兩種抗體溶液以等體積組合至MAb 107為2.5 µg/mL及RxC1f40為0.75 µg/mL之最終微孔塗覆濃度。將100微升成帽抗體混合物添加至各孔中且將該等盤於37°C下培養60分鐘。

將抗生蛋白鏈菌素結合鹼性磷酸酶(抗生蛋白鏈菌素AP, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA)於blotto中稀釋至0.5 µg/mL之濃度。洗滌微量滴定

盤，且將100微升/孔之抗生蛋白鏈菌素AP添加至該盤中。
將該盤於37°C下培養60分鐘。

洗滌該盤。隨後，將100微升/孔之pNPP受質添加至盤中。將盤於室溫下保持15分鐘以觀察顏色之發展。藉由添加100微升/孔之5% (w/v) EDTA二鈉將鹼性磷酸酶反應停止且將盤置於盤讀取器中，其中讀取於405-nm波長下之吸收率。

C.在聯合蛋白質A/凝集因子酶聯免疫吸附檢定(ELISA)中測定藉由未中和之N-乙醯基L-半胱胺酸對3M金黃色葡萄球菌菌株222之ELISA活性之抑制

如上設置ELISA檢定。此研究之目的在於測定3M金黃色葡萄球菌菌株222之抗原活性是否受未中和之N-乙醯基L-半胱胺酸(NAC)抑制。以不同順序組合金黃色葡萄球菌細胞、溶葡萄球菌素及中和或未中和之NAC且接著將其用作上文所述之聯合檢定中之抗原。

樣品製備：根據如下所示之程序將NAC、金黃色葡萄球菌細胞及溶葡萄球菌素以不同順序混合，且接著立即雙重複添加至微量滴定盤中。對於測試之各NAC溶液重複此實驗。

1.無細菌對照組：將11.25 μ L PBS及11.25 μ L溶葡萄球菌素添加至202.5 μ L NAC中且渦動30秒。

2. NAC +(金黃色葡萄球菌+溶葡萄球菌素)：混合等體積之金黃色葡萄球菌原料及溶葡萄球菌素；且渦動30秒。將22.5 μ L此混合物添加至202.5 μ L NAC中且再渦動30秒。

3. (NAC + 金黃色葡萄球菌)+溶葡萄球菌素：混合 11.25 μL 金黃色葡萄球菌原料及 202.5 μL NAC 且渦動 30 秒。添加 11.25 μL 溶葡萄球菌素且接著再渦動 30 秒。

4. (NAC + 溶葡萄球菌素)+金黃色葡萄球菌：混合 11.25 μL 溶葡萄球菌素及 202.5 μL NAC 且渦動 30 秒。添加 11.25 μL 金黃色葡萄球菌原料且再渦動 30 秒。

表 II-9 展示來自該研究之 ELISA 結果。資料表明，在此檢定中不管測試之溶液濃度或混合順序，未中和之 NAC 都消除金黃色葡萄球菌菌株 222 之任何 ELISA 活性。

表 II-9. ELISA 研究結果

	樣品製備程序	4% NAC	2% NAC	1% NAC
中和之 NAC	1. 無細菌對照組	0.097	0.1155	0.119
	2. NAC +(金黃色葡萄球菌+溶葡萄球菌素)	0.7785	0.697	0.6815
	3. (NAC + 金黃色葡萄球菌)+溶葡萄球菌素	0.9475	0.68	0.7625
	4. (NAC + 溶葡萄球菌素)+金黃色葡萄球菌	0.838	0.8585	0.9795
未中和之 NAC	1. 無細菌對照組	0.0785	0.084	0.087
	2. (NAC + 溶葡萄球菌素)+金黃色葡萄球菌	0.0785	0.0775	0.0845
	3. (NAC + 金黃色葡萄球菌)+溶葡萄球菌素	0.066	0.072	0.0805
	4. NAC +(金黃色葡萄球菌+溶葡萄球菌素)	0.0765	0.07	0.088
0%NAC 陽性對照組：[PBS +(金黃色葡萄球菌+溶葡萄球菌素)]：0.684				

額外對照組：

溶葡萄球菌素儲備溶液：0.095

PBS 稀釋劑：0.0925

III. 使用聲波感應器分析細菌樣品之方法

實例 III-1

Mab 107-生物素與磁性粒子之結合。

根據製造商之說明書使用EZ-Link NHS-PEO4-生物素套組(Pierce, Rockford, IL)對Mab 107 IgG、Mab 76 IgG、兔子抗 Clf40 IgG、山羊抗 Clf40 IgG、Mab 12-9 IgG (Inhjbitec, Alpharetta, GA)進行生物素標記。蛋白質A自Invitrogen獲得且於PBS中稀釋至所需測試濃度。將塗有抗生蛋白鏈菌素之磁性粒子及生物素標記之Mab 107 IgG、Mab 76 IgG、兔子抗 Clf40 IgG、山羊抗 Clf40 IgG、Mab 12-9 IgG抗體組合(兩者或兩者以上)以所需濃度混合在一起且於37°C下於PBSL緩衝劑中培養至少1 hr。接著於PBSL緩衝劑中將樣品洗滌三次以移除任何未結合之抗體。最後洗滌後，用1 mL於PBSL緩衝劑中之蛋白質A測試樣品置換上清液，且於37°C下培養至少30分鐘。

實例 III-2

製備感應器及執行偵測實驗之方法。

該等實驗中使用經波導(如2004年12月17日申請之標題為"Acoustic Sensors and Methods"之PCT公開案第WO 2005/066092號之實例W1中所述製備的甲基丙烯酸甲酯及甲基丙烯酸異冰片基酯之50:50共聚物)旋塗之剪力水平表面聲波(SH-SAW)感應器(由Com Dev (Cambridge, Ontario, Canada)或由Sandia National Laboratory (Albuquerque, New Mexico)提供)。用如2004年12月7日申請之標題為"Acoustic Sensors and Methods"之PCT公開案

第 WO 2005/066092 號的實例 MP26 中所述製備之包含於乙酸丁酯/乙腈 50/50 中製得之甲基丙烯酸異冰片基酯/甲基丙烯酸甲酯/糖精-甲基丙烯酸酯/丙烯醯基氧基二苯甲酮 35/35/30/0.5 之三聚物的固定化學物噴射塗覆該等感應器。

在一些情況下，將對蛋白質 A 具特異性之單株抗體 (Mab 107)、對蛋白質 A 具特異性之 Mab 76 IgG、兔子抗 Clf40 IgG、山羊抗 Clf40 IgG、Mab 12-9 IgG (具凝集因子蛋白質特異性；Inhibitex, Alpharetta, GA) 以 2 種或 2 種以上抗體之組合形式手動塗覆或噴射塗覆於兩種 (活性及參考) 感應器通道上。在其他情況下，將 Mab 107 IgG、Mab 76 IgG、兔子抗 Clf40 IgG、山羊抗 Clf40 IgG、Mab 12-9 IgG (Inhibitex, Alpharetta, GA) 或兔子抗金黃色葡萄球菌 (RaSa) (Accurate Chemical & Scientific Corporation, Westbury, NY) 以兩種或多種抗體之組合形式手動塗覆或噴射塗覆於一種感應器通道 (活性通道) 上且將非特異性小雞 IgY (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc, West Grove, PA) 手動塗覆或噴射塗覆於另一種通道 (參考通道) 上。

將經塗覆之感應器經由導電黏接劑 (各向異性導電薄膜黏接劑 7313, 3M Company, St. Paul, MN) 加熱黏合於可撓性電路上。將經黏合之感應器經由雙面黏接膜連接於溫度受控 flowpod。接著將感應器連接於由使用網路分析器寫入 LabVIEW 軟體之軟體程式驅動的電子量測板 (經由可撓

性電路)。LabVIEW軟體可自National Instruments (Austin, TX)獲得。可在整個實驗中收集所需頻率範圍內之衰減及相位特性。

為開始實驗，經由注射泵使PBSL流動緩衝劑(下文所述)以0.1 mL/min之平均流速溢出感應器且接著調整至所需流速。接著使用軟體程式起始實驗。將包含釹-鐵-硼(NdFeB)之稀土磁鐵升高至感應器下方之位置。足夠流動穩定後，經由噴射閥注射樣品且在軟體規定之時刻溢出感應器。

樣品到達且收集於感應器表面上後，將磁鐵移開("下降")足夠之距離(在軟體規定之時刻)以顯著降低感應器表面之磁場強度。通常，將磁鐵移開大於65 mm。然而，在小得多之距離時顯著降低場強度。

繼續流動足夠之時間直至相位及衰減信號穩定。(通常，藉由目測檢查顯示於電腦螢幕上之相位及衰減原始信號來判定此時間。當原始信號隨時間變化與磁鐵下降後預期之信號變化相比相對小時，認為信號為穩定的。)

使用時間閘控演算法(8753ET/ES Network Analyzers User's Guide, Agilent Technologies之第3-35頁及第3-36頁)處理來自實驗之原始相位及衰減資料。除非另外指定，否則資料收集之時間間隔單位為13秒且軟體開始資料收集時開始該時間。用於演算法之適當閘可根據所使用之特定感應器設計而指定。演算法可經由網路分析器直接應用以致自實驗獲得之資料已由時間閘控。或者，可收集原始資料

且可使用寫入 Matlab (The Mathworks, Natick, MA) 之軟體程式進行時間閘控。

進一步分析時間閘控資料以測定相位及衰減之位移。所有此資料處理均使用 Matlab 軟體進行。對於不存在參考通道之情況而言，藉由自磁鐵下降後信號已穩定之值減去剛好在磁鐵下降前之值來計算兩種通道中相位及衰減之信號位移。

對於具有活性通道與參考通道之感應器而言，藉由分別自活性通道之衰減及相位信號減去參考通道之衰減及相位信號來計算差異信號。藉由自磁鐵下降後獲得之穩定信號減去剛好在磁鐵下降前之值來計算此差異信號之位移。

本文中所引用之所有專利、專利申請案、公開案及核酸與蛋白質資料庫條目(包括例如 GenBank 寄存編號)之完整揭示內容係以引用的方式併入本文中，如同個別併入一般。在不脫離本發明之範疇及精神的情況下，本發明之各種修改及變化將對於熟習此項技術者顯而易見，且應瞭解本發明並不過度地限於本文中所述之說明性實施例。

五、中文發明摘要：

在某些實施例中，本發明係關於捕捉細菌完整細胞之方法，其包括使用兩種或多種對於特定細菌之特徵之兩種或多種不同分析物具有抗原特異性的抗體。在某些實施例中，本發明係關於分析所關注細菌樣品之方法。該等方法特別適用於偵測所關注細菌之特徵之一或多種分析物，諸如細菌，尤其金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 特徵之細胞壁的組份。

六、英文發明摘要：

In certain embodiments, the invention relates to methods of capturing bacterial whole cells that includes the use of two or more antibodies having antigenic specificities for two or more distinct analytes characteristic of the specific bacterium. In certain embodiments, the invention relates to methods of analyzing a sample for a bacterium of interest. In particular, the methods are useful for detecting one or more analytes characteristic of a bacterium of interest, such as components of cell walls that are characteristic of a bacterium, particularly *Staphylococcus aureus*.

十、申請專利範圍：

1. 一種捕捉特定細菌之特徵之分析物的方法，該方法包含：

提供一種懷疑包含特定細菌之特徵之一或多種分析物之靶完整細胞的樣品；

提供兩種或多種對於該特定細菌之特徵之兩種或多種不同分析物具有抗原特異性的抗體，其中該等抗體包含至少一種單株抗體；

提供固體支撐物質；及

提供該樣品、該固體支撐物質及該兩種或多種抗體之間在可有效捕捉具有特定細菌之特徵之一或多種分析物(若存在)之靶完整細胞的條件下接觸。

2. 如請求項1之方法，其中該兩種或多種抗體係連接於該固體支撐物質形成一種分析物結合物質，且該方法包括提供該樣品與該分析物結合物質之間在可有效捕捉具有特定細菌之特徵之一或多種分析物(若存在)之完整細胞的條件下接觸。

3. 如請求項2之方法，其中提供該樣品與該分析物結合物質之間的接觸包含該樣品與該兩種或多種抗體之間的同時接觸。

4. 如請求項1之方法，其中提供該樣品、該固體支撐物質及該兩種或多種抗體之間的接觸包含提供該兩種或多種抗體與該樣品之間的接觸以形成抗體結合完整細胞，且隨後提供該等抗體結合完整細胞與該固體支撐物質之間

的接觸。

5. 如請求項1至4中任一項之方法，其中該固體支撐物質包含微粒物質。
6. 如請求項5之方法，其中該微粒物質包含磁性粒子。
7. 如請求項1至6中任一項之方法，其中該抗體為單株抗體、多株抗體或其組合。
8. 如請求項7之方法，其中該抗體係選自由MAb-76、MAb-107、親和力純化之RxC1f40、親和力純化之GxC1f40、MAb 12-9、其片段及其組合組成之群。
9. 如請求項8之方法，其中該等抗體係選自由MAb-107、親和力純化之GxC1f40及其組合組成之群。
10. 如請求項1至9中任一項之方法，其中該特定細菌包含革蘭氏陽性細菌(Gram positive bacterium)。
11. 如請求項10之方法，其中該特定細菌包含金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)。
12. 如請求項1至11中任一項之方法，其中捕捉至少20%之該等靶完整細胞。
13. 如請求項12之方法，其中捕捉至少50%之該等靶完整細胞。
14. 如請求項13之方法，其中捕捉至少80%之該等靶完整細胞。
15. 如請求項1至14中任一項之方法，其中該固體支撐物質包含濃度大於0.04 mg/mL之粒子。
16. 如請求項1至15中任一項之方法，其中該固體支撐物質

包含粒子，且抗體與粒子之比率大於1 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 粒子。

17. 如請求項1至16中任一項之方法，其中該固體支撐物質包含粒子，且該抗體與粒子之比率為至少0.01 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 粒子。

18. 如請求項17之方法，其中該抗體與粒子之比率小於10 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 粒子。

19. 如請求項1至18中任一項之方法，其中該固體支撐物質包含粒子，且各粒子具有至少兩種結合不同分析物之抗體安置於其上。

20. 一種分析細菌樣品之方法，該方法包含：

提供一種懷疑包括特定細菌之特徵之一或多種分析物的樣品；

提供兩種或多種對於特定細菌之特徵之兩種或多種不同分析物具有抗原特異性的經固定抗體；

提供兩種或多種對於特定細菌之特徵之兩種或多種不同分析物具有抗原特異性的經標記抗體，其中該等抗體經一個直接或間接酶標記而標記；

提供該樣品、該等經固定抗體及該等經標記抗體之間接觸以使該一或多種分析物結合於該等經標記抗體與該等經固定抗體之間；

其中對於存在之每一分析物，該等經固定抗體及該等經標記抗體包含兩種或多種抗原結合對；及

分析該特定細菌之存在或不存在。

21. 如請求項20之方法，其中提供該樣品、該等經固定抗體

及該等經標記抗體之間接觸包含：

使該樣品與該等經固定抗體在可有效捕捉特定細菌之特徵之一或多種分析物(若該樣品中存在)的條件下接觸，以形成一或多種捕捉之分析物；及

使該一或多種捕捉之分析物(若存在)與該等經標記抗體在可有效引起該一或多種捕捉之分析物與該等經標記抗體之間結合的條件下接觸。

22. 如請求項21之方法，其中使該樣品與該等經固定抗體接觸包含提供該樣品與各經固定抗體之間的同時接觸。

23. 如請求項21或22之方法，其中使該一或多種捕捉之分析物(若存在)與該等經標記抗體接觸包含提供該等捕捉之分析物與各經標記抗體之間的同時接觸。

24. 如請求項20之方法，其中提供該樣品、該等經固定抗體及該等經標記抗體之間接觸包含：

使該樣品與該等經標記抗體在可有效引起該特定細菌之特徵之一或多種分析物(若該樣品中存在)與該等經標記抗體之間相互作用的條件下接觸；及

使該等經固定抗體與該含有該等經標記抗體之樣品在可有效引起該等經標記抗體、該一或多種分析物及該等經固定抗體之間結合的條件下接觸。

25. 如請求項20至24中任一項之方法，其中該等抗體為單株抗體、多株抗體或其組合。

26. 如請求項25之方法，其中該等抗體係選自由MAb-76、MAb-107、親和力純化之RxC1f40、親和力純化之

GxC1f40、MAb 12-9、其片段及其組合組成之群。

27. 如請求項20至26中任一項之方法，其中該等經固定抗體係與固體支撐物質結合。
28. 如請求項27之方法，其中該固體支撐物質包含一個微孔盤之表面。
29. 如請求項28之方法，其中該微孔盤之一孔具有抗體混合物固定於其中。
30. 如請求項29之方法，其中該抗體混合物包含兩種單株抗體。
31. 如請求項29之方法，其中該抗體混合物包含多株抗體及單株抗體。
32. 如請求項26至31中任一項之方法，其中該等經固定抗體包含MAb12-9及MAb-76。
33. 如請求項26至31中任一項之方法，其中該等經標記抗體包含抗體MAb-107及親和力純化之RxC1f40。
34. 如請求項20至33中任一項之方法，其中該等經標記抗體包含一個直接酶標記。
35. 如請求項20至33中任一項之方法，其中該等經標記抗體包含經由一個聚氧化乙烯連接子連接之生物素。
36. 如請求項20至33及35之方法，其中若該等經標記抗體包含一個間接標記，則該方法進一步包括在使該一或多種捕捉之分析物(若存在)與該等經標記抗體接觸之前、期間或之後使該等經標記抗體與一種酶結合物反應。
37. 如請求項20至36中任一項之方法，其中分析該特定細菌

之存在或不存在包含用比色法分析。

38. 如請求項37之方法，其中該比色分析包含使用一種產色(chromogenic)酶受質。

39. 如請求項38之方法，其中該產色酶受質包含對-硝基苯基磷酸鹽。

40. 如請求項20至39中任一項之方法，其中該特定細菌包含革蘭氏陽性細菌。

41. 如請求項40之方法，其中該特定細菌包含金黃色葡萄球菌。

42. 如請求項20至41中任一項之方法，其中該樣品包含溶胞細胞。

43. 如請求項42之方法，其中該樣品係經溶葡萄球菌素處理以形成該等溶胞細胞。

44. 如請求項20至43中任一項之方法，其中分析該特定細菌之存在或不存在包含定量存在之分析物之總量。

45. 如請求項20至41中任一項之方法，其中該樣品包含完整細胞。

46. 如請求項20至45中任一項之方法，其中該樣品為鼻樣品。

47. 一種分析細菌樣品之方法，該方法包含：

提供一種懷疑包括特定細菌之特徵之一或多種分析物的樣品；

提供兩種或多種對於該特定細菌之特徵之兩種或多種不同分析物具有抗原特異性的粒子-抗體結合物；

提供一種包含一個聲-機械感應器之系統，該感應器包含一個偵測表面包含兩種或多種對於該特定細菌之特徵之兩種或多種不同分析物具有抗原特異性的經固定抗體；

提供該樣品、該聲-機械感應器之該偵測表面上之該等經固定抗體及該等粒子-抗體結合物之間接觸以使該一或多種分析物結合於該等粒子-抗體結合物與該等經固定抗體之間；

其中對於存在之每一分析物，該等經固定抗體及該等粒子-抗體結合物包含兩種或多種抗原結合對；及

分析該特定細菌之存在或不存在。

48. 如請求項47之方法，其中提供該樣品、該聲-機械感應器之該偵測表面上之該等經固定抗體及該等粒子-抗體結合物之間接觸包含：

使該樣品與該等粒子-抗體結合物在可有效引起該特定細菌之特徵之一或多種分析物(若該樣品中存在)與該等粒子-抗體結合物之間相互作用的條件下接觸；及

使該聲-機械感應器之該偵測表面與該含有該等粒子-抗體結合物之樣品在可有效引起該等粒子-抗體結合物、該一或多種分析物及該等經固定抗體之間結合的條件下接觸。

49. 如請求項47之方法，其中提供該樣品、該聲-機械感應器之該偵測表面上之該等經固定抗體及該等粒子-抗體結合物之間接觸包含：

使該樣品與該等經固定抗體在可有效捕捉特定細菌之特徵之一或多種分析物(若該樣品中存在)的條件下接觸，以形成一或多種捕捉之分析物；及

使該一或多種捕捉之分析物(若存在)與該等粒子-抗體結合物在可有效引起該一或多種捕捉之分析物與該等粒子-抗體結合物之間結合的條件下接觸。

50. 如請求項49之方法，其中使該樣品與該等經固定抗體接觸包含提供該樣品與各經固定抗體之間的同時接觸。

51. 如請求項49或50之方法，其中使該一或多種捕捉之分析物(若存在)與該等粒子-抗體結合物接觸包含提供該等捕捉之分析物與各粒子-抗體結合物之間的同時接觸。

52. 如請求項47之方法，其中該等粒子-抗體結合物之該等粒子包含磁性粒子。

53. 如請求項52之方法，其中各粒子具有至少兩種結合不同分析物之抗體安置於其上。

54. 如請求項52或53之方法，其中該方法進一步包含：

提供一種能夠提供一個磁場最接近該偵測表面之磁場產生器，該磁場可將該具有該等連接磁性粒子之靶分析物吸引至該感應器之該偵測表面；

將該具有該等連接磁性粒子之靶生物學分析物選擇性附著於該偵測表面；

使該磁場產生器無能力(disabling)以大體上減小最接近該偵測表面之該磁場；及

操作該聲-機械感應器以偵測該等附著之靶生物學分析

物，同時將該偵測表面浸沒於液體中。

55. 如請求項54之方法，其中使該磁場產生器無能力包含將該磁場產生器移開一個足以大體上減小最接近該偵測表面之該磁場之距離。
56. 如請求項47至55中任一項之方法，其中該聲-機械感應器包含一個表面聲波感應器。
57. 如請求項56之方法，其中該表面聲波感應器包含一個剪力水平表面聲波感應器。
58. 如請求項57之方法，其中該表面聲波感應器包含一個拉夫(Love)型剪力水平表面聲波感應器。
59. 如請求項47至58中任一項之方法，其中該等抗體係選自由MAb-76、MAb-1047、親和力純化之RxC1f40、親和力純化之GxC1f40、MAb 12-9、其片段及其組合組成之群。
60. 如請求項47至59中任一項之方法，其中該特定細菌包含革蘭氏陽性細菌。
61. 如請求項60之方法，其中該特定細菌包含金黃色葡萄球菌。
62. 如請求項47至61中任一項之方法，其中該樣品包含溶胞細胞。
63. 如請求項62之方法，其中該樣品係經溶葡萄球菌素處理以形成該等溶胞細胞。
64. 如請求項47至63中任一項之方法，其中分析該特定細菌之存在或不存在包含定量存在之分析物之總量。

65. 如請求項47至64中任一項之方法，其中該樣品為鼻樣品。

66. 一種分析物結合物質，其包含：

一種固體支撐物質；

安置於該固體支撐物上之抗體MAb-76、MAb-107、親和力純化之RxC1f40、親和力純化之GxC1f40、MAb 12-9、其片段或其組合；及

視情況一種可偵測標記物(marker)。

67. 如請求項66之分析物結合物質，其中該固體支撐物質包含微粒物質。

68. 如請求項66之分析物結合物質，其中該微粒物質之各粒子具有至少兩種結合不同分析物之抗體安置於其上。

69. 如請求項66之分析物結合物質，其中該固體支撐物質包含一個微孔盤之表面。

70. 如請求項69之分析物結合物質，其中該微孔盤之一孔具有抗體混合物固定於其中。

71. 如請求項70之分析物結合物質，其中微孔盤具有至少兩種與不同分析物結合之抗體安置於其上。

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：(無)

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)