

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2006-508669

(P2006-508669A)

(43) 公表日 平成18年3月16日(2006.3.16)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/06 (2006.01)	C 1 2 Q 1/06 Z N A	4 B O 2 4
C 1 2 Q 1/10 (2006.01)	C 1 2 Q 1/10	4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/14 (2006.01)	C 1 2 Q 1/14	
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	
審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 32 頁)		

(21) 出願番号	特願2004-557967 (P2004-557967)	(71) 出願人	591003013
(86) (22) 出願日	平成15年12月2日 (2003. 12. 2)		エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
(85) 翻訳文提出日	平成17年7月19日 (2005. 7. 19)		F. HOFFMANN-LA ROCH
(86) 国際出願番号	PCT/EP2003/013545		E AKTIENGESELLSCHAFT
(87) 国際公開番号	W02004/053148		T
(87) 国際公開日	平成16年6月24日 (2004. 6. 24)		スイス・シーエイチー4070バーゼル・
(31) 優先権主張番号	02027272.0		グレンツアーヘルストラツセ124
(32) 優先日	平成14年12月6日 (2002. 12. 6)	(71) 出願人	505209599
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		インノゲネティクス エヌ. ブイ.
			ベルギー国 ヘント ビー-9052 ボ
			ックス 4, インダストリーパーク ズウ
			ィナーデ 7
		(74) 代理人	100095832
			弁理士 細田 芳徳
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 ブドウ球菌属、腸球菌属、および連鎖球菌属から選択される病原性グラム陽性細菌の検出のための方法

(57) 【要約】

本発明は、以下の工程を含む、グラム陽性病原性細菌の同定のための方法に関する： (a) 病原性グラム陽性細菌の第1の予め決定されたサブグループから予め選択された核酸配列の領域を増幅することができる少なくとも第1のセットの増幅プライマーを用いる増幅工程、 (ab) 病原性グラム陽性細菌の第1の予め決定されたサブグループから予め選択された核酸配列の領域を特異的に検出することができる少なくとも第1のハイブリダイゼーション試薬を用いる検出工程。上記検出工程は、 (aba) ハイブリダイゼーションが予め選択された温度で生じるかどうかをモニターする工程であって、ハイブリダイゼーションの発生が試料中に存在する少なくとも病原性生物の属についての指標である工程、および (abb) ハイブリダイゼーションの温度依存性をモニターする工程であって、上記温度依存性が少なくとも上記病原性グラム陽性細菌の種についての指標である工程を含む。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

臨床試料中のグラム陽性病原性生物または病原性グラム陽性細菌の予め決定された群のメンバーである生物の部分集合の同定方法であって、

a) 少なくとも部分的に精製された核酸を含む臨床検体を単離する工程、

b) b a) グラム陽性病原性生物が属する病原性グラム陽性細菌の予め決定されたサブグループから予め選択された核酸配列領域を増幅することができる少なくとも 1 セットの増幅プライマーを使用する増幅工程、

b b) 前記の病原性グラム陽性細菌の予め決定されたサブグループから、前記の予め選択された核酸配列領域を検出することができる少なくとも 1 つのハイブリダイゼーション試薬を使用する検出工程であって、ここで前記検出工程 b b) は 10

b b a) 予め選択された温度でハイブリダイゼーションをモニタリングする工程であって、前記ハイブリダイゼーションが、前記サブグループに含まれる少なくとも 1 種が試料中に存在することの指標である工程、および

b b b) ハイブリダイゼーションの温度依存性をモニタリングする工程であって、前記温度依存性は少なくとも前記病原性グラム陽性細菌または前記生物の部分集合の種の存在の指標である工程

を含む、少なくとも 1 回の増幅および検出工程に前記臨床検体を供する工程、

c) b b) におけるモニタリング工程の結果に基づいて、前記生物または前記生物の部分集合を同定する工程 20

を含む、方法。

【請求項 2】

前記サブグループが属である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

ハイブリダイゼーション試薬が標的核酸配列領域における隣接配列に相補的な 2 つのプロープを含み、1 つは FRET ドナーにより標識されており、他方は FRET アクセプターにより標識されている、請求項 1 および 2 いずれか記載の方法。

【請求項 4】

前記病原性グラム陽性細菌の予め決定された群が種を含む、請求項 1 ～ 3 いずれか記載の方法。 30

【請求項 5】

予め決定されたサブグループが、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*)、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)、エンテロコッカス・ファエシウム (*Enterococcus faecium*) およびエンテロコッカス・ファエカリス (*Enterococcus faecalis*) の種を含む、請求項 1 ～ 4 いずれか記載の方法。

【請求項 6】

予め選択された核酸配列領域が、rRNA スペーサー領域の少なくとも 20 ヌクレオチドを含む、請求項 1 ～ 5 いずれか記載の方法。

【請求項 7】

前記増幅および検出が均質に行われる、請求項 1 ～ 6 いずれか記載の方法。 40

【請求項 8】

前記種がブドウ球菌 (*Staphylococcus*) 属、腸球菌 (*Enterococcus*) 属ならびに連鎖球菌 (*Streptococcus*) 属から選択される、請求項 1 ～ 7 いずれか記載の方法。

【請求項 9】

前記種がブドウ球菌属の 1 つから選択される、請求項 1 ～ 7 いずれか記載の方法。

【請求項 10】

腸球菌、ブドウ球菌および連鎖球菌それぞれの 16S-23S rRNA スペーサー領域から少なくとも 20 ヌクレオチドの配列を増幅することが可能なプライマーのセットを含む、腸球菌属、ブドウ球菌属および連鎖球菌属から選択されるグラム陽性病原性細菌の同定のためのキット。 50

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、病原性微生物の検出の技術分野に関する。より具体的には、本発明は、病原性グラム陽性細菌からの特異的な核酸配列の増幅および検出による、臨床材料中の病原性グラム陽性細菌によって引き起こされる感染の検出の分野に関する。

【0002】

背景技術

病原性細菌による感染は、特に、敗血症を引き起こすものとなると、主に病院の集中治療室（ICU）で起こり、深刻である。患者が感染している細菌はほとんどの場合において不明であり、症状からは決定することができない。各々の細菌に、特異的な抗生物質の投与を用いた異なった治療が必要である。現在、日常的に行われる診断において、病原性細菌、特に、グラム陽性細菌が存在する場合には、血液または他の体液の試料を培養に供し、もし存在するなら、細菌を増殖する方法を使用して検出されている。この培養物は、約3日の間、細菌の増殖に好ましい条件で維持される。この間に、細菌の数、したがってそれらの核酸が増大する。その後、培養培地が溶解に供される。溶解混合物は、ハイブリダイゼーション反応のための試料として使用される。病原性細菌による試料の何らかの感染についての明確な結果に達するまでには、この方法全体に少なくともおよそ4日を要する。病原性細菌による感染は、感染者にとっては非常に深刻な問題である。感染の第1日目 10
のうちに、治療、好ましくは、特定の感染細菌に作用する適切な抗生物質の投与による治療が開始されなければならない。そうでなければ、感染者は感染によりあまりに大きな影響を受けすぎて、感染についての明確な結果に達する前に死亡してしまう場合がある。一 20
方で、全ての可能性のある細菌の増殖を妨げるための数種の抗生物質の同時の投与は、患者が衰弱してしまわないように避けなければならない。したがって、該方法は、日常的に行われるICUでの診断として満足できるものではない。

【0003】

特異的なハイブリダイゼーションプローブを用いる核酸に基づくハイブリダイゼーションによる、病原性細菌または病原性真菌のような病原性生物の同定は、当該分野においてすでに長い間知られている。たとえば、欧州特許第0131052号には、特定の種または特定の群の生物のリボソームリボ核酸（rRNA）配列が培養培地から直接検出される方法および 30
プローブが開示されている。リボソームの標的配列の検出は、これらの配列が生体内で増幅され、これによりそれぞれのアッセイで高い感度を得られるという事実から、特に有用である。

【0004】

病原性生物の核酸配列に基づく検出の改良は、PCR技術の有効性により獲得された。カンジダ属およびアスペルギルス属のような病原性真菌の検出については、たとえば、国際公開番号W097/07238に、全ての型の真菌のリボソーム18S rDNA配列を増幅するための一般的なプライマーを使用し、その後、真菌種特異的プローブとハイブリダイズさせる方法が開示されている。

【0005】

リボソームの遺伝子配列の分析のための代替的方法として、16S rRNA遺伝子と23S rRNA遺伝子との間に存在しているITS-1領域のような、非コード配列だが転写されるリボソームスペーサーDNA配列が、いくつかの病原性生物の検出および同定に使用されている（たとえば、欧州特許第0452596号を参照）。 40

【0006】

別の状況では、グラム陽性細菌およびグラム陰性細菌が、対立遺伝子特異的増幅手法（Klauseggerら、Journal of Clinical Microbiology 33 (1990) 464-466）と類似する標的依存性増幅によって識別されている。これらの16S rDNA配列に基づけば、Klauseggerらによって調べられた種は、全ての調べられたグラム陰性細菌が特定のヌクレオチド位置にG残基を含むのに対して、全ての調べられたグラム陽性細菌は上記のヌクレオチド位置に必 50

ずC残基を含むという点で、16S rRNA遺伝子のある所定の位置で異なる。したがって、識別用の相補的な3'末端C残基または相補的なG残基のいずれかを有する適切なプライマーをそれぞれ使用することにより、グラム陽性配列またはグラム陰性配列のいずれかの起源のDNAの増幅が生じる。

【0007】

動的リアルタイムPCRの有効性がさらに進歩した。この種のアッセイでは、PCR産物の形成がPCRの各サイクルにおいてモニタリングされる。増幅は通常、増幅反応の間に蛍光シグナルをモニタリングするための別の検出手段を有するサーモサイクラーで測定される。典型的な例は、Roche Diagnostics LightCycler（登録商標）（カタログ番号20110468）である。LightCycler（登録商標）ならびに現在市販されている他のリアルタイムPCR装置では、増幅産物は、標的核酸に結合した場合に蛍光シグナルを放射するだけの蛍光標識ハイブリダイゼーションプローブによって検出されるか、または特定の場合においては、二本鎖DNAに結合する蛍光色素によっても検出される。定義されたシグナル閾値は分析される全ての反応について決定され、この閾値に達するために必要なサイクル数（Cp）が、標的核酸について、ならびに標準またはハウスキーピング遺伝子のような対照核酸についても決定される。標的分子の絶対的または相対的なコピー数は、標的核酸および参照核酸について得られたCp値に基づいて決定することができる（Roche Diagnostics LightCycler（登録商標）操作マニュアル（カタログ番号20110468））。 10

【0008】

増幅されたDNAの検出のためには種々の形式がある： 20

【0009】

a) DNA結合色素形式

二本鎖の増幅産物の量は、通常、分析される試料中にもともと存在している核酸の量より多いので、適切な波長で励起させると、二本鎖DNAに結合している場合にのみ増強された蛍光を示す、二本鎖DNAに特異的な色素を使用することができる。かかる方法は、欧州特許第0512334号に記載されている。好ましくは、PCR反応の効率には影響を与えない、たとえば、SYBR（登録商標）Green Iのような色素だけが使用される。

【0010】

当該分野で知られている他の全ての形式には、標的核酸に結合した場合に蛍光を放射するだけの、蛍光標識ハイブリダイゼーションプローブの適切な設計が必要である。 30

【0011】

b) TaqMan（登録商標）プローブ

一本鎖のハイブリダイゼーションプローブは2つの成分で標識される。第1の成分、いわゆる蛍光剤が適切な波長の光で励起させられると、吸収されたエネルギーが、蛍光共鳴エネルギー転移の原理にしたがって第2の成分、いわゆる消光剤に転移させられる。PCR反応のアニーリング工程の間に、ハイブリダイゼーションプローブは標的DNAに結合し、ポリメラーゼ、たとえば、Taqポリメラーゼの5'-3'-エキソヌクレアーゼ活性によって、伸張期の間に分解される。結果として、励起させられた蛍光成分と消光剤は互いに空間的に離れ、これにより第1の成分の蛍光放射を測定することができる（欧州特許第0543942号および米国特許第5,210,015号）。 40

【0012】

c) 分子ビーコン

これらのハイブリダイゼーションプローブもまた、第1の成分と消光剤とで標識される。好ましくは、標識は、少なくとも部分的に自己相補的であるプローブの異なる末端に配置される。プローブの二次構造の結果として、両方の成分は溶液中で空間的に接近している。標的核酸へのハイブリダイゼーションの後、両方の成分は互いに離れ、その結果、適切な波長の光で励起させた後、第1の成分の蛍光放射測定できる（米国特許第5,118,801号）。 50

【0013】

d) FRETハイブリダイゼーションプローブ

蛍光共鳴エネルギー転移 (FRET) ハイブリダイゼーションプローブ試験形式は、全ての種の相同ハイブリダイゼーションアッセイに特に有用である (Matthews, J.A. および Kricka, L.J., Anal Biochem 169 (1988) 1-25)。これは、同時に使用され、(増幅された) 標的核酸の同じ鎖の隣接する部位に相補的である2つの一本鎖ハイブリダイゼーションプローブによって特徴付けられる。両方のプローブが別々の蛍光成分で標識される。適切な波長の光で励起させると、第1の成分は吸収したエネルギーを、蛍光共鳴エネルギー転移の原理にしたがって第2の成分へと転移させ、その結果、第2の成分の蛍光放射が、両方のハイブリダイゼーションプローブが検出される標的分子の隣接している位置に結合している場合にのみ測定され得る。

【0014】

標的配列にアニーリングすると、ハイブリダイゼーションプローブは、頭と尾を突き合わせた状態で互いに極めて接近して存在しなければならない。通常、第1のプローブの標識された3'末端と、標識された5'末端または第2のプローブとの間のギャップは可能な限り小さい、すなわち、1~5塩基である。これにより、FRETドナー化合物とFRETアクセプター化合物とが非常に接近することができ、典型的には10~100オングストロームである。詳細は周知であり、たとえば、欧州特許第0070687号に開示されている。

【0015】

FRETアクセプター成分の蛍光の増大をモニタリングする代わりに、ハイブリダイゼーション事象の定量的測定として、FRETドナー成分の蛍光の減少をモニタリングすることもまた可能である。

【0016】

具体的には、増幅された標的DNAを検出するために、FRETハイブリダイゼーションプローブ形式をリアルタイムPCRにおいて使用することができる。当該分野で公知であるリアルタイムPCRの全ての検出形式の中でも、FRETハイブリダイゼーションプローブ形式は高感度であり、正確であり、確実であることが証明されている (国際公開番号W097/46707; 同W097/46712; 同W097/46714)。なお、適切なFRETハイブリダイゼーションプローブ配列の設計は、検出される標的核酸配列の特別な性質によって制限される場合もある。

【0017】

2つのFRETハイブリダイゼーションプローブを使用する代わりに、蛍光標識プライマーを使用すること、および1種類だけの標識オリゴヌクレオチドプローブを使用することも可能である (Bernard, P.S.ら、Anal. Biochem. 255 (1998) 101-7)。これに関しては、プライマーをFRETドナー化合物またはFRETアクセプター化合物で標識するかどうかを、適宜選択することができる。

【0018】

FRETハイブリダイゼーションプローブ (FRET-HybprobeまたはFRETプローブとも呼ばれる) もまた、融解曲線分析に使用することができる (国際公開番号W097/46707; 同W097/46712; 同W097/46714)。かかるアッセイでは、標的核酸が、最初に適切な増幅プライマーを用いた通常のPCR反応で増幅される。ハイブリダイゼーションプローブは増幅反応の間にすでに存在していてもよく、またはその後に加えられてもよい。PCR反応の完了後、試料の温度が構成的に上昇させられる。ハイブリダイゼーションプローブが標的DNAに結合している限りは、蛍光が検出される。融解温度では、ハイブリダイゼーションプローブがそれらの標的から遊離し、蛍光シグナルがバックグラウンドのレベルにまで直ちに下がる。この低下を、適切な蛍光対温度-時間プロットでモニタリングし、その結果、一次導関数のネガティブを計算することができる。次いで、得られたかかる関数の最大に対応する温度値が、FRETハイブリダイゼーションプローブの上記の対についての決定された融解温度として採用される。

【0019】

標的核酸内での点突然変異または多形は、標的核酸とFRETプローブとの間で100%未満の相補性を生じ、これにより融解温度の低下が生じる。これにより、その後に、プールの異なるメンバーを、融解曲線分析を行うことにより識別することが適切ではあるが、FRET

10

20

30

40

50

-Hybprobeハイブリダイゼーションにより配列バリエーションのプールの一般的な検出が可能である。FRETハイブリダイゼーションプローブの代わりに、分子ビーコンが融解曲線分析に使用される場合もある。

【0020】

リアルタイムPCRおよび相同リアルタイムPCR融解曲線分析の有効性については、特定の型の種または株の識別が、SybrGreen（登録商標）Iのような二本鎖DNA結合色素、あるいは、異なるが類似している標的配列にハイブリダイズする特別に設計されたハイブリダイゼーションプローブのいずれかを使用することで可能になった。

【0021】

第1の場合では、生じた二本鎖PCR産物の融解温度を決定しなければならない。さらに、この方法は適用が限られている。なぜなら、重要ではない配列のバリエーションによって微妙な融解温度の差が生じるだけなので、差を効率よくモニタリングすることができないからである。成功例が、Wooら、Journal of Microbiology 35 (1999) 23-30によって開示されており、彼らは、種々のレプトスピラ種のDNAを起源とする非特異的増幅産物からLeptospira biflexa株を識別するために、Leptospira biflexaの16S rDNA配列の増幅、その後SybrGreen（登録商標）IをDNA結合色素として使用して融解曲線分析を行った。

【0022】

あるいは、ハイブリダイゼーションプローブを、プローブ／標的核酸のハイブリッドの融解温度が決定されるような方法で使用することもできる。たとえば、Espyら、Journal of Clinical Microbiology 33 (2000) 795-799は、単純ヘルペスの配列を増幅し、その後FRETハイブリダイゼーションプローブを使用して分析して、HSV I遺伝子型とHSV II遺伝子型とを区別することによる、単純ヘルペス感染の診断を開示している。

【0023】

さらに、国際公開番号W001/48237は、種々の病原性の種を検出するために増幅と温度依存性ハイブリダイゼーションとの関連を一般的に示唆している。しかし、国際公開番号W001/48237は、病原性生物の排他的な検出が可能であり、いかなる非病原性生物も検出しない方法または条件については何ら教示してはいない。

【0024】

さらに、特定の細菌種の生体外での増幅、その後の上記細菌の検出を含む現在使用されている方法は、至急診断することが必要とされる場合、たとえば、ICUでは有用ではない。なぜなら、各々の細菌について増幅反応と検出反応とを行わなければならないからである。これには、多量の試料体積、たとえば、血液をそれぞれの患者から採取することが必要である。ICUでは、重症の感染患者から多量の試料を得ることはできない。

【0025】

したがって、目的の該当する病原性生物を検出するために特に適用できる方法を提供することが、当該分野で必要とされている。具体的には、全ての該当する病原性グラム陽性細菌を検出することができるが、同時に類似している非病原性のグラム陽性細菌は検出しない方法が当該分野で必要とされている。特に、どの病原性の属および／または種が試料中に存在するのかを決定することが必要とされている。

【0026】

発明の簡潔な説明

上記で開示された課題は、本出願に開示され、請求される方法および化合物によって解決される。

【0027】

したがって、本発明は：

- a) 少なくとも部分的に精製された核酸を含む臨床材料を単離する工程、
- b) 上記臨床材料を、以下の工程を含む少なくとも1回の増幅および検出に供する工程：
 - ba) グラム陽性病原性生物が属する病原性グラム陽性細菌の予め決定されたサブグループから予め選択された核酸配列の領域を増幅することができる少なくとも1セットの増幅プライマーを使用する増幅工程、

bb) 上記の病原性グラム陽性細菌の予め決定されたサブグループから上記の予め選択された核酸配列の領域を検出することができる少なくとも1つのハイブリダイゼーション試薬を使用する検出工程であって、

bba) 予め選択された温度でハイブリダイゼーションをモニタリングする工程であって、上記ハイブリダイゼーションが、上記サブグループに含まれる少なくとも1種が試料中に存在することの指標である工程、および

bbb) ハイブリダイゼーションの温度依存性をモニタリングする工程であって、上記温度依存性が、上記病原性グラム陽性細菌または上記の生物のサブセットの少なくとも数種が存在することの指標である工程

を含む工程、

c) bb) のモニタリング工程の結果に基づいて上記生物または上記の生物のサブセットを同定する工程

を含む、臨床試料中のグラム陽性病原性生物または予め決定された群の病原性グラム陽性細菌のメンバーである生物のサブセットの同定のための方法に関する。

【0028】

本発明はまた、上記に開示された方法を行うために適切な組成物に関する。

【0029】

さらに、本発明は、上記に開示された方法を行うために適切なキットに関する。

【0030】

発明の詳細な説明

本発明は、グラム陽性細菌の病原性感染の診断に特に適切な方法および化合物を提供する。これに関して、患者がグラム陽性細菌による感染を有していると疑われる場合には、本発明は、上記病原性グラム陽性生物の種を決定するための手段を提供する。さらに、本発明による新規の方法は、特に、LightCycler（登録商標）システムのようなリアルタイムPCR技術と組み合わせられた場合に、敗血症を引き起こす感染性因子の迅速な診断を可能にする。このような迅速な診断は多くの臨床環境において極めて重要である。

【0031】

したがって、本発明は、一般に、臨床試料中のグラム陽性病原性生物または病原性グラム陽性細菌の予め決定された群のメンバーである生物の部分集合の同定方法であって：

a) 少なくとも部分的に精製された核酸を含む臨床材料を単離する工程、

b) ba) グラム陽性病原性生物が属する病原性グラム陽性細菌の予め決定されたサブグループから予め選択された核酸配列の領域を増幅することができる少なくとも1セットの増幅プライマーを使用する増幅工程、

bb) 上記の病原性グラム陽性細菌の予め決定されたサブグループから上記の予め選択された核酸配列の領域を検出することができる少なくとも1つのハイブリダイゼーション試薬を使用する検出工程であって、上記検出工程bb) は、

bba) 予め選択された温度でハイブリダイゼーションをモニタリングする工程であって、上記ハイブリダイゼーションが、上記サブグループに含まれる少なくとも1種が試料中に存在することの指標である工程、および

bbb) ハイブリダイゼーションの温度依存性をモニタリングする工程であって、上記温度依存性が、少なくとも上記病原性グラム陽性細菌または上記の生物の部分集合の種の存在の指標である工程、

を含む少なくとも1回の増幅および検出工程に上記臨床試料を供する工程

c) bb) のモニタリング工程の結果に基づいて上記生物または生物の部分集合を同定する工程

を含む方法に関する。

【0032】

本発明の文脈において、上記で使用された特定の用語は以下のように定義される。

【0033】

用語「病原性グラム陽性生物の同定」は、病原性グラム陽性細菌の予め決定された群ま

10

20

30

40

50

たはサブグループに含まれる種の中の特定の種または株または分離株が試料中に存在するかどうかを決定するための方法を記載するために使用される。同定による産出物または同定の結果は、種または株または分離株の名称である。これにより、続いて、選択的な抗生物質での治療の適切な選択が可能になる。

【0034】

用語「病原性グラム陽性細菌の予め決定された群」は、特定の作業のための目的である病原性グラム陽性細菌から構成される病原性グラム陽性細菌の予め決定された群を記載するために使用される。好ましくは、グラム陽性細菌の予め決定された群は、所定の臨床環境下において臨床的に関連している全ての病原性グラム陽性細菌の群であり得、増幅されるそれぞれのゲノム配列は当該分野で実質的に公知である。

10

【0035】

たとえば、そのような予め決定された群には、2種類以上の属の臨床的に関連しているメンバーが含まれる場合がある。あるいは、特定の属の全ての既知の臨床的に関連しているメンバーが、このような予め決定された群を構成する場合もある。あるいは、特定の種の全ての既知の臨床的に関連しているメンバーまたは株または分離株が、このような予め決定された群を構成する場合もある。予め決定された群にはまた、他の属または種に由来する株と混合された、異なる属の分類学上複数のサブグループが含まれる場合もある。

【0036】

用語「特異的」は、対象が特定の、および定義された結果についてのみに関する、対象の特徴（たとえば、方法、工程、または試薬において）を記載するために使用される。たとえば、特定の種の検出のための方法が、他の種ではなくこの種だけが検出される場合に特異的であるとみなされる。標的とのプローブの特異的なハイブリダイゼーションは、プローブと標的との間でのみ生じ、他の核酸との間では生じないハイブリダイゼーションである。

20

【0037】

本文脈においては、本発明の方法全体が、生物の同定に関して実質的に特異的であることが好ましい。予め決定された群またはサブグループのメンバーではない生物は同定されないことが好ましい。なぜなら、試薬を用いて行われる工程は、その群には属さない生物を検出しないように調整されるからである。このことは、方法中の一つ一つの工程が特異的であることを必ずしも意味するものではないが、そうであることもありえる。たとえば、増幅プライマーが同定される生物に特異的ではないように選択される（そのようなプライマーを同定されない生物の核酸を増幅するために使用することができる）場合には、工程ba)は特異的ではない。その結果、方法全体の特異性は、特異的である検出工程、たとえば、工程bbb)の1つ以上の部分を選択することによって達成することができる。例として、本発明には、工程bba)では予め決定された群のメンバーの核酸との、さらには試料中または／および工程ba)で増幅された非標的核酸とのハイブリダイゼーション試薬のハイブリダイゼーションにより陽性のシグナルが生じるが、工程bbb)において温度依存性をモニターすることによって、非標的核酸の実体とは無関係に、予め決定された群のメンバーの種の実態のみが証明される実施形態が含まれる。

30

【0038】

当該分野で公知の方法と比較した主な利点としては、第1に、本発明により、細菌属または種の病原性のメンバーの選択的な同定が可能になり、一方、上記属または上記種の他の既知の非病原性のメンバーは同定されない。

40

【0039】

本文脈においては、分析される臨床材料が新規のわずかに異なる標的配列を有している新規のこれまでには知られていない株を含む場合には、本発明の新規の方法により、擬陽性または擬陰性のいずれかの結果を時おり生じることに注意することが重要である。未知の非病原性生物が増幅され、検出される場合には、工程bba)の結果が擬陽性になる。さらにこの場合には、擬陽性の結果は請求される方法の工程bbb)で、すなわち、ハイブリダイゼーションの温度依存性をモニターする間に検出され得る。この場合、既知の病原性

50

生物の温度依存性と工程bbb)の温度依存性との比較は、生物が予め決定された群の種には属さないこと、すなわち、工程c)の結果が陰性であることを示す。未知の病原性生物が増幅も検出もされない場合は、結果は擬陰性である。さらに、これまでに本発明者らによって行われた臨床分離株についての全ての研究によれば、これらの場合は非常に稀であり、加えて、当該分野で公知の任意の他の類似の方法によって回避することもできない。

【0040】

用語「グラム陽性細菌の予め決定されたサブグループ」は、病原性細菌の予め決定された群の一部または全体を記載するために使用される。好ましくは、予め決定されたサブグループは、全ての病原性グラム陽性細菌のごく小さい部分であり、さらに好ましくは、主に病院において発生する細菌である。群およびサブグループのメンバーは1つの属から選択することができるが、異なる属から選択することもできる。予め決定された群が全ての病原性および臨床的に関連している属のメンバーによって示される場合は、それぞれのサブグループには特定の種の全てのそれぞれの病原性メンバーが含まれる場合がある。同様に、上記の予め決定された群が特定の種の全ての臨床的に関連しているメンバーから構成される場合には、サブグループが特異的な株の全てのメンバーから構成される場合もある。1つの非常に好ましいサブグループは、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*)、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)、エンテロコッカス・ファエシウム (*Enterococcus faecium*)、エンテロコッカス・ファエカリス (*Enterococcus faecalis*)、表皮ブドウ球菌 (*Staphylococcus epidermidis*)、および表皮ブドウ球菌 (*Staphylococcus haemolyticus*)の種および株から構成される (I群と呼ぶ)。別の好ましいサブグループは、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*)と全てのコアグラウゼ陰性ブドウ球菌から構成される。別の好ましいサブグループは、エンテロコッカス・ファエシウム (*Enterococcus faecium*)、とエンテロコッカスファエカリス (*Enterococcus faecalis*)から構成される。

10

20

【0041】

用語「増幅および検出反応」は、核酸配列のプールから1種以上の標的配列を増幅するための1以上の「増幅工程」と、増幅産物の実体を明らかにするための1以上の「検出工程」とを含む、任意の種類のインビトロでの方法を意味するものとする。

【0042】

用語「増幅工程」は、DNAを含む試料からの核酸の増幅反応のための正方向プライマーと逆方向プライマーとを使用して、標的配列 (もし臨床材料中に存在する場合には)を増幅する1の反応または一連の反応を意味するものとする。上記増幅工程の特異性は、選択された群に依存し、そして使用するプライマーの特異性によって支配される。好ましくは、増幅は、熱安定性DNAポリメラーゼを使用するポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)によって得られる。1つの実施形態では、増幅は通常、細菌について特異的である；すなわち、ウイルスは実質的な量には増幅されない。

30

【0043】

好ましくは、増幅工程は、サブグループのメンバーについて特異的である。好ましい実施形態では、増幅は、同定される種が属している属に特異的である。

【0044】

用語「検出工程」は、標的核酸に対するハイブリダイゼーション試薬のハイブリダイゼーションの温度依存性をモニターすることを含む、適切なハイブリダイゼーション試薬とのハイブリダイゼーションによって増幅産物が検出されることを意味するものとする。増幅および検出は、必ずしも別々である必要はなく、連続して行われる必要もなく、同時に行うことが可能である。

40

【0045】

用語「予め選択された核酸配列の領域」は、増幅され、検出されることが意図される全ての生物のDNA中に存在する明確な標的核酸の領域を意味するものとする。実施形態によっては、種々の生物の配列の間にいくつかの配列のバリエーションが存在する場合がある。言い換えると、増幅されるものは、常に、それぞれの生物の同じ遺伝子または同じ相同

50

配列である。このような領域の一例は、16S/23S rDNAスペーサー領域、すなわち、16S rRNAと23S rRNAをコードする配列の間の領域、またはそれらの一部である。さらに好ましくは、予め選択された核酸配列の領域には、増幅される生物の16S/23Sスペーサー領域に由来する少なくとも20、なおさらに好ましくは40を超える連続する核酸塩基の部分が含まれる。この領域には、進化の過程で保存されてきた、さらには超可変の配列が含まれる。これにより、属および種特異的プライマーおよびプローブの両方を自由に設計することができる。この領域は、核酸上のプライマー結合部位によって定義される領域に含まれる。

【0046】

用語「病原性」は、ヒトが細菌に感染した場合に、細菌がヒトの健康状態に影響を与え得ることを意味している。本発明の趣旨は、敗血症を引き起こす細菌の同定に関係している。この場合においては、予め決定された群である。 10

【0047】

用語「増幅プライマーのセット」は、当然、少なくとも2つの（伸張可能な）オリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド誘導体、すなわち、標的核酸の第一鎖に結合する少なくとも1つの（正方向）プライマーと、増幅される標的配列の反対方向の鎖に結合する少なくとも1つの第2（逆方向）プライマーを意味するものとする。さらに、プライマーの位置は、それぞれのプライマーの温度依存性の伸張により、もう一方のプライマーがハイブリダイズできるプライマー結合部位を含む伸張産物を生じるように設計される。

【0048】

ほとんどの場合は、1つの正方向プライマーと1つの逆方向プライマーから構成される2つの増幅プライマーの対を使用することで十分である。しかし、時として、同定される種々の病原性グラム陽性細菌の種々の配列のプライマー結合部位の配列中にいくつかの小さな配列の変異が存在する場合もある。したがって、1つの正方向プライマーと1つの逆方向プライマーを使用するだけでは全てのメンバーの配列を増幅することができない場合がある。そのような場合には、増幅プライマーのセットは、1つ、2つ、もしくはそれ以上の正方向プライマー、および／または1、2、もしくはそれ以上の逆方向プライマーから構成される場合がある。これらのプライマーは類似しており、相同配列に結合するが、1つ、2つ、3つ、またはいくつかの1ヌクレオチド、2ヌクレオチド、または3ヌクレオチドの置換、欠失、または付加によって互いに異なる。 20

【0049】

さらに、種々の予め選択された核酸配列の領域を増幅することができる2つ、3つ、または複数のセットの増幅プライマーが使用される場合もまた、本発明の範囲内である。この場合には、上記の種々の予め選択された核酸配列は、配列に関して必ずしも互いに関係している必要はない。さらに、種々の予め選択された核酸配列の領域が少なくとも部分的にまたはほとんど完全に重複している場合もまた、本発明の範囲内である。 30

【0050】

一般的には、増幅プライマーの設計は、増幅される病原性細菌の予め選択された標的核酸配列の領域に関して入手することができる配列情報、ならびに、増幅されてはならないグラム陽性細菌およびグラム陰性細菌の相同配列に関して入手することができる配列情報に基づいて行うことができる。より正確には、増幅プライマーのセット（単数または複数）は、病原性グラム陽性細菌の選択された予め決定された群の全ての標的核酸配列に関する相補性が最大となり、一方、全ての他の選択されていないグラム陽性細菌およびグラム陰性細菌、すなわち、予め決定された群には属さないかまたは病原性ではない細菌、ならびに真菌の核酸配列に関する配列相補性が最小となるように選択される。 40

【0051】

用語「ハイブリダイゼーション試薬」は、予め選択された核酸配列の領域内での工程bb)の増幅の産物、すなわち、アンプリコン（単数または複数）の少なくとも一つの鎖にハイブリダイズできる試薬を記載するために使用される。この試薬には、1つ以上のプローブが含まれ、これは、一本鎖であるか、またはハイブリダイゼーションの前に一本鎖にされることが好ましい。好ましくは、この試薬は、通常、二本鎖の増幅された標的核酸の一 50

つの鎖にハイブリダイズできる1つまたは2つの核酸を含む、一本鎖の核酸ハイブリダイゼーションプローブシステムである。検出形式の型によっては、ハイブリダイゼーション試薬が検出可能な部分で適切に標識されている場合がほとんどの場合において有利であり、その結果、上記標識の検出により、アンプリコン／ハイブリダイゼーション試薬のハイブリッドを検出することができる。

【0052】

好ましい実施形態では、ハイブリダイゼーション試薬は、ハイブリダイゼーションが市販されているリアルタイムPCR装置で検出できるように、蛍光部分で標識される。このために有用な試薬は、増幅されたDNAの検出のための種々の形式を記載している上記の文献において開示されている。

10

【0053】

ハイブリダイゼーション試薬は、簡単な場合には、オリゴヌクレオチドプローブでもよい。たとえば、分子ビーコン形式（米国特許第5,118,801号）を用いてもよい。あるいは、適切な一本鎖標識オリゴヌクレオチドを使用することも可能である（国際公開番号W002/14555）これらの参考文献は、試薬および検出プロセスに関するそれらの内容を組み入れるために引用される。

【0054】

さらに好ましくは、ハイブリダイゼーション試薬は、上記に開示されているような（国際公開番号W097/46707；同W097/46712；同W097/46714）FRET-Hybprobe検出形式に従ってそれらが互いに作用することができるように適切に標識された、2つの隣接してハイブリダイズするオリゴヌクレオチドから構成される。

20

【0055】

さらに、本文脈においては、用語「FRET対」は、FRETプロセスを作成するようにともに作用する蛍光標識の対として定義される。すなわち、これはFRETドナー部分とFRETアクセプター部分から構成される。

【0056】

増幅プライマーのセットの設計と同様に、ハイブリダイゼーション試薬または複数のハイブリダイゼーション試薬の設計もまた、増幅され検出される予め選択された標的核酸配列に関して入手することができる全ての配列情報、ならびに、検出されるべきでない病原性グラム陽性細菌の相同配列に関して入手することができる全ての配列情報に基づいて行うことができる。より正確には、ハイブリダイゼーション試薬（単数または複数）の配列は、病原性グラム陽性細菌の選択された予め決定された群の全ての標的核酸配列に関する配列相補性が最大となり、一方、全ての他の選択されていないグラム陽性細菌またはグラム陰性細菌の全ての相同核酸配列に関する配列相補性が最小となるように選択される。

30

【0057】

さらに、ハイブリダイゼーション試薬の設計には、ハイブリダイゼーションの温度依存性をモニターすることに基づいていくつかの標的配列のバリエーションを識別することが可能であることを考慮する必要がある。本発明には、種々の病原性グラム陽性細菌を起源とする種々の標的配列変異体に対するハイブリダイゼーション試薬のハイブリダイゼーションのための種々の融解温度が必要である。したがって、本発明のハイブリダイゼーション試薬の配列は、種々のハイブリダイゼーション試薬／標的配列のハイブリッドの計算された融解温度（当該分野で公知の方法によって計算される）が、互いに少なくとも2℃、好ましくは4℃、最も好ましくは少なくとも6℃異なるように設計される。

40

【0058】

まとめると、本発明は、特定の予め決定された群に属している特定のサブグループの属の全ての病原性のメンバーを検出することを特徴とする、サブグループ、好ましくは、属特異的ハイブリダイゼーション試薬の設計の可能性を提供する。あるいは、特定の予め決定された群に属している特定の種の全ての病原性株の検出が可能である、種または株特異的ハイブリダイゼーション試薬を設計することができる。

【0059】

50

用語「ハイブリダイゼーションの温度依存性をモニターすること」は、当然、ハイブリッドの解離とともに変化し、ハイブリッドの解離に依存する反応混合物の性質が、意図されるアッセイの正確性のために必要とされる一定の期間または間隔でモニターされることを意味するものとする。通常、標識プローブを使用するハイブリダイゼーションアッセイと組み合わせて、この性質は、プローブ上の標識によって影響をうけるシグナルであり、アンプリコン／標的に対するプローブのハイブリダイゼーションの際に変化する。

【0060】

本文脈においては、ハイブリッドの融解温度 (T_m) は、ハイブリダイゼーション対温度シグナルのプロットの一次導関数が最大に達する温度として定義される。 T_m は、鎖の相補性によって変化するハイブリッドの性質である。

10

【0061】

本発明では、プローブ（単数または複数）のアニーリング温度は、好ましくは、使用されるプライマーの融解温度よりも低い。

【0062】

性質の変化は、特に、それぞれのハイブリッドの融解温度で、またはその周辺で生じる。融解温度は、特定のハイブリダイゼーション試薬と、試薬が結合するそれぞれの標的上の対応する領域によって決定される。具体的には、本発明の方法においては、プローブが標的核酸／アンプリコンとともに形成されたハイブリダイゼーション複合体から解離する融解温度が決定される。この文脈では、融解温度 (T_m) が実際の標的核酸配列自体とは無関係にいくつかの要因、たとえば、塩濃度、プローブの長さおよびGC含量によって変化することに注意することが重要である。なおさらに、融解温度は不適合の数、すなわち、プローブと標的配列との間の相補性の程度に強く依存する。結果として、種々の融解温度が、異なる種の異なる株、または異なる属の異なる種において見られる標的配列について得られる。結果として、適切なプローブの設計を用いることにより、1つの型のハイブリダイゼーション試薬（たとえば、1つのプローブ）を、ハイブリダイゼーションの温度依存性をモニターすることにより、予め選択された生物の群の全てのメンバーの検出、および上記メンバーの識別の両方に使用することができる。この場合、第1のグラム陽性病原性生物（たとえば、エンテロコッカス・ファエシウム (*Enterococcus faecium*)）の標的領域の配列に対して相補性を有するが、第2のグラム陽性病原性細菌（たとえば、エンテロコッカス・ファエカリス (*Enterococcus faecalis*)）の標的領域の配列とはわずかに異なる（たとえば1または2ヌクレオチド配列で）プローブが使用される。

20

30

【0063】

用語「上記サブグループに含まれる少なくとも1種についての指標である」または「上記属に含まれる少なくとも1種についての指標である」は、ハイブリダイゼーションシグナルが工程bba) で生じた場合に、上記サブグループまたは上記の特定の属の病原性生物が、それぞれ、患者から回収された試料中に存在する可能性があることを工程c) において結論付けることができることを意味するものとする。増幅プライマーのセット（単数または複数）の設計（たとえば、配列）によって、さらには、ハイブリダイゼーション試薬（単数または複数）の設計によっては、異なるハイブリダイゼーション試薬のシグナルから得られるハイブリダイゼーションシグナルが、さらに、検出される病原性生物の種についての指標である場合もある。好ましくは、工程bba) によって決定されるハイブリダイゼーションシグナルは、予め決定された群のメンバーの1つの存在についての疑いのない指標であるが、どのメンバーが存在するかを知ることを、必ずしも直接可能にするものではない。

40

【0064】

用語「少なくとも複数の種についての指標である」は、工程bbb) でモニターされたハイブリダイゼーションの温度依存性のモニタリングの結果に基づいて、どの病原性の種が臨床試料中に存在するかを、工程c) において疑いなく結論付けることができることを意味するものとする。増幅プライマーのセット（単数または複数）の設計およびハイブリダイゼーション試薬（単数または複数）の設計に応じて、ハイブリダイゼーションの温度依

50

存性をモニターすることによって得られたデータが、それぞれの病原性生物の種、またさらには特定の株の実体についての指標となる。試料が標的配列と類似しているかまたはそれと同一である非標的配列を含み得る場合であっても、これらは増幅されない。なぜなら、これらのプライマーは非標的領域を増幅するには適切ではないからである。

【0065】

用語「生物のサブセット」は、病原性グラム陽性細菌の予め決定された群および予め決定されたサブグループの全てのメンバーである種の、予め決定されたコレクションを記載するために使用される。たいていは、これらの生物は1つの属に属している。このような群の一例は、コアグラゼ陰性ブドウ球菌 (CoNS) の群であり、これには、表皮ブドウ球菌 (*Staphylococcus epidermidis*) および表皮ブドウ球菌 (*Staphylococcus haemolyticus*)、またはピリダンス型連鎖球菌 (*Streptococcus viridans*) の群 (これには、緑色連鎖球菌 (*Streptococcus mitis*)、ミュータンス菌 (*Streptococcus mutans*)、およびルーメン常在乳酸菌 (*Streptococcus bovis*) が含まれる) が含まれる。サブセットには好ましくは、10未満、より好ましくは7未満の種が含まれる。上記サブセット中に存在する生物の存在を同定する場合においては、本発明の方法は、上記サブセットのどの種が臨床試料中に含まれているかという結果を必ずしも提供するものではない。

【0066】

まとめると、本発明は、プライマー対の1つまたはいくつかの適切なセットを使用する最初の増幅工程において、目的の全ての病原性グラム陽性細菌の配列が増幅され、続いて、適切なハイブリダイゼーション試薬によって検出される、グラム陽性病原性細菌の同定のための方法が提供される。適切なプライマーおよびプローブの設計のおかげで、非病原性のグラム陽性細菌または他の微生物の配列は増幅されないか、または検出されないか、または増幅されるが検出されないかのいずれかである。異なるハイブリダイゼーション試薬を用いたハイブリダイゼーションが生じる場合には、これは、少なくともグラム陽性感染性病原菌のサブグループまたは属についての指標となる。

【0067】

続いて、温度依存性の蛍光のモニターが、たとえば、試料の温度を連続的に上昇させ、標的核酸とハイブリダイゼーション試薬との間で融解が生じる温度を決定する形式で行われる。その結果、モニターされた融解温度は、少なくとも複数の種についての指標となるか、またさらには、もとの試料中に存在しているそれぞれの病原体の亜種または株についての指標となる。

【0068】

通常、新規の方法は、患者がグラム陽性病原性細菌による感染に罹患していることが予め示されているが、その病原菌の正確な実体がまだわかっていない状況に特に適用することができる、有用である。

【0069】

請求される方法の種々の工程の定義とは無関係に、工程a)、b)、およびc)は好ましくは、順に連続して行われ、第1の工程が工程a)であり、第2の工程が工程b)であり、第3の工程が工程c)である。さらなる工程を、これらの工程の前、それらの間、および後に行うこともできる。

【0070】

本発明の方法の出発材料は、グラム陽性細菌を含むと疑われる臨床試料である。このような臨床試料の例は、全血、血清、および脳脊髄液である。出発材料はヒトに起源することが好ましい。

【0071】

工程a)は常に最初に行われ、当該分野で公知の方法にしたがって行うことができる。本明細書では、「臨床材料」は、好ましくは、核酸を含有している臨床試料に由来する試料、好ましくは、流体と理解され、これは同定が行われる生物の核酸を含んでいる。

【0072】

感染の検出のために十分な感度を得るためには、本発明の方法には、もともとの試料か

10

20

30

40

50

ら核酸を少なくとも部分的に精製することが必要である。単離される核酸はRNAまたはDNAまたはそれらの混合物のいずれかであり得る。本発明の最も好ましい実施形態は病原性生物の最終的な同定に細菌DNAを使用するので、臨床材料がRNAを含むことは必要ではない。したがって、臨床試料からRNAを部分的に、またはさらに完全に単離する必要はない。陽性対照を用いてシグナルを入手することが必要である場合には、臨床試料からのDNAの単離で十分であり完璧であるはずである。

【0073】

具体的には、核酸は、もともとの試料中に存在しているタンパク質、糖、および塩とは分離される。当該分野で公知の任意の精製方法を、本発明の状況において使用することができる。好ましくは、臨床試料の他の成分からの分析される全DNAの本質的に完全な精製を生じる方法が適用される。少なくとも、精製は、さらに実質的に希釈することなく、試料のアリコート中の核酸配列をPCRのような生体外での増幅においてうまく増幅することができる程度にまで行われるべきである。精製においては、ポリメラーゼを実質的に阻害するあらゆる化合物が核酸から除去される。特に有用な核酸の単離方法は、国際公開番号W096/41811に開示されている。

10

【0074】

工程a)の結果物は、通常は、もともとの臨床試料に由来する核酸と、さらに、緩衝液のような単離工程の間に添加されたさらなる試薬を含む流体である。工程b)では、臨床試料またはその一部が1回以上の増幅反応に供される。増幅および検出反応には、1回以上の工程が含まれ得る。増幅反応および検出反応のいずれもが当該分野で公知である。増幅は、生体外での方法、好ましくはPCR（欧州特許第0201184号）を使用して行われる。以下ではPCRについて言及するが、他の生体外での方法もまた適切であることが理解される。増幅反応の結果は、一方のプライマーの5'末端位置から他方のプライマーの5'末端位置にまで達する配列を大部分が有している、多量の上記プライマーの伸張産物の生産である。生産されたこれらの核酸は、通常「アンプリコン」と呼ばれる。

20

【0075】

臨床材料中に存在している可能性がある阻害性の残留成分による擬陰性の結果を回避するため、および定量の目的のためには、内部対照の鋳型を加えれば特に効果的であることが証明されている。通常は、上記の対照鋳型は、検出される標的核酸配列の増幅に使用される増幅プライマーの少なくとも1つのセットに相補的なプライマー結合部位を有している既知の配列を含む。結果として、上記増幅プライマーのセットは対照鋳型の上記の選択された配列の増幅をプライミングすることができる。特に定量についての内部標準の使用の詳細は、欧州特許第0497784号に開示されている。

30

【0076】

本発明の方法が、10から100 μ lの間の容量の臨床材料のアリコートを使用して行われる場合が効果的であると証明されている。したがって、本発明の方法は、全血または血清のような臨床試料がごく少量しか入手できない場合にも、十分な感度をもって行うことができる。

【0077】

なお、最後に、本発明の方法または当該分野で公知の任意の他の方法の結果は、臨床材料中に存在するヒトのゲノムDNAの高いバックグラウンドによって影響を受ける場合がある。この場合は、国際公開番号W001/94634に記載されている予備増幅工程を行うことができる。この工程は、ヒト以外のDNA配列が選択的に増幅されることを特徴とする。

40

【0078】

工程b)については、異成分を含まない(heterogenous)実施形態または異成分を含む(homogenous)実施形態のいずれの可能性も存在する。異成分を含まない実施形態では、工程ba)に必要な試薬が最初に添加され、増幅工程ba)が最初に行われる。続いて、必要に応じて別の検出試薬が補充されて、工程bb)が行われる。

【0079】

異成分を含まない実施形態よりもさらに好ましい異成分を含む実施形態では、増幅工程

50

と検出工程の両方の試薬が、増幅工程ba)の開始前に試料に添加される。場合によっては、工程ba)と工程bba)が同時に行われる、すなわち、ハイブリダイゼーションのモニターが増幅の間に、PCRの場合には、数回の温度循環の間、または数回の熱サイクルのそれぞれを行った後、または数回の熱サイクルの後に一度、行われる場合もある。この場合、好ましくは、上記の工程bba)の予め選択される温度は、通常はPCRの温度循環プロトコールのアニーリング温度と同じであるか、またはこれに非常に近い。アニーリング温度は、ハイブリダイゼーション試薬（たとえば、プローブ）がその標的（すなわち、増幅される核酸、または／および以前の伸張反応において形成されたアンプリコン）にハイブリダイズする温度である。ハイブリダイゼーションの十分な特異性を得るために（すなわち、標的の配列を優先して検出するために）、アニーリング温度は、プローブが標的核酸（単数または複数）に優先的にアニーリング／ハイブリダイズするが、同定されない生物の核酸にはしないように選択される。核酸に対するプローブのハイブリダイゼーションの選択性に影響を与えるための手段は広く知られている（長さ、GC含量、および相補性の程度）。 10

【0080】

本発明によれば、増幅工程ba)と検出工程bb)は、1つ以上のハイブリダイゼーション試薬が増幅工程の間に反応混合物中にすでに存在していることを特徴とする、異成分を含むアッセイ形式で続けて行われることが好ましい。言い換えると、増幅工程ba)と検出工程bb)は、同じ反応容器内で行われ、そしてこれらの工程の間にさらなる試薬は添加されない。

【0081】

なお、別法として、少なくともいくつかの場合には、増幅工程ba)の後に、反応混合物が少なくとも2つ、3つ、4つ、またはいくつかの小さなアリコートに分けられる場合が、有効である場合もある。その後、工程bb)が、少なくとも同じ数の異なるハイブリダイゼーション試薬を用いて、それぞれが異なる反応容器内で行われる。 20

【0082】

工程bba)は、ハイブリダイズしたハイブリダイゼーション試薬のシグナルが測定され、特に、LightCyclerについての種々の方法について上記に概説したように、従来の相同核酸ハイブリダイゼーションとして行われる工程である。

【0083】

工程bba)とbbb)は、最初にハイブリダイゼーション事象自体が予め選択された第1の温度でモニターされる様式で、一緒に行われることが好ましい。その後、温度は、少なくともハイブリダイゼーション試薬を含むハイブリッドが解離する温度にまで連続的に上昇させられる。言い換えれば、ハイブリッドについての融解曲線分析が行われる。 30

【0084】

さらに正確には、増幅反応後、PCR産物（ハイブリダイゼーション試薬の存在下で）が第1の温度、たとえば、90～100℃で変性させられ、その後、第2の温度にまで冷却される。上記第2の温度は、PCRプロトコールのアニーリング温度と類似しているかまたはそれと同じである。その後、温度は0.01～10℃/sの間、好ましくは、0.1～2℃/s、最も好ましくは、0.5～1℃/sの速度で上昇させられる。

【0085】

モニター工程bbb)は、好ましくは、温度依存性によって検出することができるレベルにまで、存在する任意の標的配列を増幅させるために十分な回数のCpが行われた後に、行われる。これは、通常は、プローブのハイブリダイゼーションを通じて検出することができる核酸の量と一致している、すなわち、測定された工程bba)において明らかな陽性のシグナルが存在すると直ちに、工程bbb)を行うことができる。Cpは好ましくは、20から40の間である。 40

【0086】

ハイブリダイゼーションが増幅反応の間にモニターされる（「リアルタイム」とも呼ばれる）場合は、予め選択された温度ではハイブリダイゼーションシグナルを見ることができない限りにおいて、融解曲線分析を行うことは省略することができる場合がある。 50

【0087】

工程c)には、工程bb)の間に得られる結果を解釈することが含まれる。これは、得られた結果の解釈によって手作業で行われ得る。好ましくは、結果は、グラム陽性細菌が試料中に存在するかどうか、およびどのグラム陽性細菌が試料中に存在するか、したがって、どのグラム陽性細菌が感染の原因であり得るかを明確に指し示す出力をするコンピュータプログラムを使用して分析される。

【0088】

解釈は、工程bba)および工程bbb)で得られたシグナルと、陽性対照による既知の値との相関関係に基づく。陽性対照の使用もまた、先行技術から一般的に知られている。陽性対照は、試料中に、または人工的に調製された対照試料中に存在することがわかっている核酸である。たとえば、予め選択された温度でのプローブのハイブリダイゼーションの特異性を使用して、工程ba)でプライマーによって増幅することができ、上記のグラム陽性病原性生物のサブグループに属するいずれかの核酸が試料中に存在するかどうかを決定することができる。陽性シグナル（陰性対照を上回る）は、たとえ上記種の実体を上記工程bba)から決定されなくても、上記のサブグループに属する種が存在していることの指標である（工程bba)）。

10

【0089】

ハイブリダイゼーションの温度依存性は、試料中に存在する種の同定のために使用される。この工程により、その一般的な存在が工程bba)によって決定される上記生物が、上記サブグループのどの種に属するかが決定される。たとえば、その融解温度は、特定の種の核酸の指標である。したがって、実際の試料中に予め決定された種が存在することを、標的のハイブリダイゼーション試薬とのハイブリッドの融解温度に達した際のシグナルの変化の出現によって確認することができる。

20

【0090】

第1の特異的な実施形態では、病原性グラム陽性細菌の予め決定された群には、以下の種および株の2つ以上が含まれる。

【0091】

黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*)、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)、化膿連鎖球菌 (*Streptococcus pyogenes*)、乳腺炎菌 (*Streptococcus agalactiae*)、ビリダンス型連鎖球菌 (*Streptococcus viridans*) 群（緑色連鎖球菌 (*S. mitis*)、ミュータンス菌 (*S. mutans*)、およびルーメン常在乳酸菌 (*S. bovis*) が含まれる）、エンテロコッカス・ファエシウム (*Enterococcus faecium*)、エンテロコッカス・ファエカリス (*Enterococcus faecalis*)、表皮ブドウ球菌 (*Staphylococcus epidermidis*)、および表皮ブドウ球菌 (*Staphylococcus haemolyticus*) (I群と呼ぶ)。

30

【0092】

該方法によって他の全ての病原性生物および非病原性生物が実質的に検出されないのが好ましく、以下の種および生物は検出されないのが好ましい。

【0093】

大腸菌 (*Escherichia coli*)、肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、クレブシエラ・オキトカ (*Klebsiella oxytoca*)、霊菌 (*Serratia marcescens*)、エンテロバクター・クロアカ (*Enterobacter cloacae*)、エンテロバクター・アエロゲネス (*Enterobacter aerogenes*)、プロテウス・ミラビリス (*Proteus mirabilis*)、プロテウス・ブルガリス (*Proteus vulgaris*)、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、アシネトバクター・バウマニ (*Acinetobacter baumannii*)、ステノトロフォモナス・マルトフィリア (*Stenotrophomonas maltophilia*)、カンジダ・アルビカンス (*Candida albicans*)、カンジダ・トロピカリ (*Candida tropicalis*)、カンジダ・パラプシローシス (*Candida parapsilosis*)、カンジダ・クルセイ (*Candida krusei*)、カンジダ・グラブラータ (*Candida glabrata*)、アスペルギルス・フミガーツス (*Aspergillus fumigatus*) (II群と呼ぶ)。

40

【0094】

このような方法により、I群の全ての種からなる生物の群が検出されるが、II群に属し

50

ているいずれの生物も検出されないことが最も好ましい。

【0095】

第2の特異的な実施形態では、病原性グラム陽性細菌の予め決定された群には、エンテロコッカス・ファエシウム (*Enterococcus faecium*)、およびエンテロコッカス・ファエカリス (*Enterococcus faecalis*) の複数の種および株が含まれるが、II群のいずれの生物も検出されない。

【0096】

第3の特異的な実施形態では、病原性グラム陽性細菌の予め決定された群には、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*)、表皮ブドウ球菌 (*Staphylococcus haemolyticus*)、および表皮ブドウ球菌 (*Staphylococcus epidermidis*) の複数の種および株が含まれるが、II群のいずれの生物も検出されない。同定される生物は、黄色ブドウ球菌 (*S.aureus*) (1種) およびCoNS (種間に差のないサブセット) である。 10

【0097】

この領域には、進化の過程で保存されてきた配列、さらには超可変配列が含まれ、これにより、属および種特異的プライマーおよびプローブの両方の柔軟な設計が可能である。

【0098】

したがって、本発明はまた、配列番号1および2 (腸球菌 (*Enterococcus*))、ならびに配列番号7および8 (ブドウ球菌 (*Staphylococcus*)) に記載されている少なくとも1セットの増幅プライマーが使用される、上記に開示された病原性グラム陽性細菌の検出のための方法に関する。 20

【0099】

さらに、本発明は、本発明において開示される方法に従ってITS-1配列を増幅および検出することにより病原性グラム陽性細菌を同定するために使用することができる化合物およびキットを提供する。

【0100】

1つの局面では、本発明は、上記で定義したような、少なくとも1セットの増幅プライマー、好ましくは、配列番号1および2 (腸球菌 (*Enterococcus*))、または配列番号7および8 (ブドウ球菌 (*Staphylococcus*)) に記載されている配列を有している増幅プライマーのセットを含む組成物を提供する。

【0101】

第2の局面では、本発明は、少なくとも2対のFRETハイブリダイゼーションプローブをさらに含む組成物を提供する。上記の2対は、以下のFRET対の群から選択される：

配列番号3および4

配列番号5および6

配列番号9および10。

【0102】

上記に開示された成分に加えて、本発明の組成物には、以下のリストから選択される他の1つまたは数種の化合物および試薬を、それぞれ別々に、または組み合わせて含めてもよい：

ーポリメラーゼ連鎖反応に適用することができる緩衝液

ーデオキシヌクレオシド三リン酸

ー鋳型依存性DNAポリメラーゼ (好ましくは、熱安定性)。

【0103】

加えてさらに、このような組成物にはさらに、少なくとも部分的に精製された核酸が含まれてもよい。これは、たとえば、臨床材料を起源とするもので、本発明の方法のいずれかに供される。

【0104】

1つの局面では、本発明は、配列番号1および2 (腸球菌 (*Enterococcus*))、または配列番号7および8 (ブドウ球菌 (*Staphylococcus*)) に記載されているオリゴヌクレオチド配列を有している、少なくとも1セットの増幅プライマーを含むキットを提供する。 30

10

20

30

40

50

【0105】

第2の局面では、本発明は、少なくとも2つのFRETハイブリダイゼーションプローブを含むキットを提供する。上記ハイブリダイゼーションプローブは、腸球菌属（Enterococcus）、ブドウ球菌属（Staphylococcus）、および連鎖球菌属（Streptococcus）のいずれかの病原性生物の16S/23S rRNAスペーサー領域の少なくとも20ヌクレオチドを増幅することにより作成されるアンプリコンにハイブリダイズすることができる。

【0106】

上記に開示された成分に加えて、本発明のキットには、以下のリストから選択される1つまたは数種の他の化合物および試薬を含めてもよい：

ーポリメラーゼ連鎖反応に適用することができる緩衝液

ーデオキシヌクレオシド三リン酸

ー鋳型依存性DNAポリメラーゼ（好ましくは、熱安定性）。

【0107】

上記に開示した成分のそれぞれは、1つの保存容器内で保存することができる。さらに、同じ容器内で保存するために成分を任意で組み合わせることもまた可能である。

【0108】

さらに、このようなキットには、請求される方法によって得られたデータの定性的または定量的分析のためにコンピュータプログラムを媒介するコンパクトディスクのような、ソフトウェアツールも含まれてもよい。

【0109】

既知のアッセイによっては1つの特定の種または株についての情報しか提供できない（試料中の特定の生物の存在の検出のための従来の方法）が、本発明の試薬は、2つ以上の種の潜在的な同定に適切であり、そのために使用され、同時にそれらのいずれかが存在しているかどうか（どの生物であるかにはかわりなく）を示す点で、従来技術の細菌アッセイとは異なる。

【0110】

参考文献一覧

EP 0 131 052

EP 0 452 596

WO 97/46707

WO 97/46712

WO 97/46714

EP 0 512 334

EP 0 543 942

US 5,210,015

EP 0 070 687

EP 0 201 184

EP 0 497 784

WO 01/94634

WO 97/07238

WO 01/48237

WO 02/14555

US 5,118,801

Klauegger ら, Journal of Clinical Microbiology 33 (1990) 464-466

Woo ら, Journal of Microbiology 35 (1999) 23-30

Espy ら, Journal of Clinical Microbiology 33 (2000) 795-799

Matthews, J.AおよびKricka, L.J., Anal Biochem 169 (1988) 1-25

Bernard, P.S.ら, Anal Biochem 255 (1998) 101-7

【実施例】

【0111】

本発明の理解を助けるために、以下の例、参考文献、配列表および図面が提供され、その真の範囲は添付された特許請求の範囲に示される。本発明の趣旨から逸脱すること無しに、示される手順において修正がなされ得ることが理解される。

【0112】

全般：

本明細書中に示される全てのオリゴヌクレオチドは化学合成によって調製した。標識を攻撃するための試薬は、Roche Diagnostics GmbH (LightCycler Red 640 NHS Ester カタログ番号2015161; LightCycler Red 705 Phosphoramidite カタログ番号2157594; LightCycler Fluorescein (以下「F」と省略) CPG カタログ番号3113906) から購入することができる。それらの試薬の使用はBiochemica No.1 (2001), p.8-13に記載される。 10

【0113】

全ての試薬は、検出対象の生物による汚染についてチェックされる必要がある。それらの生物およびそれらを起源とする核酸を含まない試薬のみが最適な感受性を導くことができる。

【0114】

実施例 1

腸球菌 (Enterococcus)

【0115】

A. 材料

プライマー

配列番号 1 : 5'-tac ttt gtt cag ttt tga gag gt-3' フォワードプライマー

配列番号 2 : 5'-gca att gaa ctt att aaa aaa ctc-3' リバースプライマー

【0116】

プローブ

配列番号 3 : LCR640-5' acc gag aac acc gcg ttg aat-3' アンカープローブ

配列番号 4 : 5'-ctg gat att gaa gta aaa aga atc aaa ac-3'-F センサープローブ

配列番号 5 : 5'-gat att tga agt aaa tgt aag taa t-3'-F センサープローブ (標的用およびIC用)

配列番号 6 : LCR705-5'-cca gca gaa tgc caa cca cc-3' アンカー (IC用)

【0117】

陽性対照 (PC)

pEfis_wt1 E.faecalis 16S/23S-rRNA-スぺーサー領域を含むpT3T7BMに基づくプラスミド

pEfum_wt2 E.faecium 16S/23S-rRNA-スぺーサー領域を含むpT3T7BMに基づくプラスミド

【0118】

内部対照 (IC)

pEntero_IC2 pEfis_wt1に基づくプラスミド、しかし配列番号：3 相補配列が配列番号：6 の相補配列で置換されている。

【0119】

ハードウェア／ソフトウェア

ソフトウェア バージョン3.5を有するLightCyclerTM 1.2 (20 µl キピラリー) (Roche Diagnostics GmbH, Germany)

【0120】

試薬

1 FastStartポリメラーゼ

2 以下を含む、FastStartマスターミックス：

MgCl₂ 3.5 mM

プライマー 0.5 µM

センサープローブ 0.2 µM

アンカープローブ 0.3 μ M

センサープローブ (IC) 0.2 μ M

3 PCR-グレードH₂O (より早い増幅の交差汚染核酸およびアンプリコンを含まないように精製される)

【0121】

FastStartポリメラーゼおよびFastStart Masterは、一般的に、LightCycler-FastStart-DNA Master Hybridization Probes Kit (Roche Diagnostics GmbH カタログ番号2239272)で推奨されているように使用される。

【0122】

試料

10

試料は下記いずれかである。

- a. プライマーおよびプローブ用の適切な結合配列を含むプラスミドDNA、または
- b. 細菌DNAの調製物 (例えば、細菌培地由来)

【0123】

試料 (特に臨床試料) を試料調製に供し、試料の他の成分から核酸を放出し精製した。これはMagNAPureTM LCおよびMagNA Pure LC DNA 単離キットIII (細菌、真菌) (Roche Diagnostics GmbH, Germany, カタログ番号3 264 785) を使用して行われた。試料調製により、溶出バッファー中に核酸を含む検体が生じた。

【0124】

試料調製手順またはLightCyclerアッセイ実行のためのインープロセス (in-process) コントロールを目的とするかどうか依存して、各キャピラリーにおいてICを試料調製内に処理する (例えば、MagNA Pureにより) か、または完全なマスターミックスに添加する (以下参照)。IC由来のシグナルは、LightCycler装置のチャンネルF3において検出される。

20

【0125】

B. 方法

まず、ホールローターの32キャピラリーのためのFastStartマスターミックスの全ての成分を共に混合した。

次いで、15 μ lのマスターミックスの一部を各キャピラリーにピペットで移した。ICをPCRのコントロールとして使用する場合は、ICをマスターミックスに添加した。あるいは、ICをMagNA Pure LC溶解/結合バッファーに加え、検体と共に処理した。

30

配列番号3および4または配列番号5および3の配列特異性をそれぞれ有する2つのプラスミドの組み合わせを含む5 μ lの陽性対照溶液を、マスターミックスを含むかかる第一のキャピラリーに添加した。

第2のキャピラリーに、試料または陽性対照の代わりに、5 μ lの水の形態で「陰性対照」を添加した。「陰性対照はまた、インープロセスコントロール用のICも含む。

ポジティブおよび陰性対照がキャップされた後に、試料 (各5 μ lの量) を他のキャピラリーに添加した。

残りのキャピラリーをキャップした後、LightCycler-run を以下のプロフィールを使用して実行した：

40

【0126】

	サイクル	時間 (秒)	温度 (°C)	スロープ (°C)
変性	1	600	95°C	20
増幅	45	10	95	20
		15	50	20
		10	72	20
溶解曲線	1	60	95	20
		60	40	20
		0	80	0.1
冷却	1	30	40	20

10

【0127】

C. 結果

上記のように、LightCyclerで分析を実行した。E.faeciumおよびE.faecalis試料はそれぞれ54.5°Cおよび58.5°CでチャンネルF2において定量曲線および溶解ピークを示した。他のほとんどの腸球菌 (Enterococci) 種は検出されなかった。数種の珍しい種 (例えばE.durans, E.hirae, E.mundtii) はより低い温度 (<46°C) で溶解ピークを得た。そのため、検出対象の種 (E.faeciumおよびE.faecalis) は互いに区別することができ、試料中に存在する全ての他の腸球菌 (Enterococcus) 種を異なる溶解温度によって決定することができる。我々は、PCRあたり少なくとも10~20ゲノム等価のより低い検出限界を見出した。

20

PC (pEfis_wt1およびpEfum_wt2の混合物) はE.faeciumおよびE.faecalis特異的ピークの組み合わせから生じる定量曲線および二重ピークを示した。

ICは特異的な試料が存在しない場合の検出を可能にした。これは、E.faecalisまたはE.faeciumテンプレートDNAの過剰では検出できない。

30

【0128】

実施例 2

ブドウ球菌 (Staphylococcus)

【0129】

A. 材料

プライマー

配列番号7: 5'-tgt aca ttg aaa act aga taa gta ag-3' フォワードプライマー

配列番号8: 5'-acg cgt tat taa tct tgt gag t-3' リバースプライマー

【0130】

プローブ

配列番号9: LCR640-5-gct tga att cat aag aaa taa tc-3' アンカープローブ

配列番号10: 5'-ccg agt gaa taa aga gtt tta aa-3'-F センサープローブ (標的およびIC用)

40

配列番号6: LCR705-5'-cca gca gaa tgc caa cca cc-3' アンカー (IC)

【0131】

陽性対照 (PC)

PStaph_wt S.aureus 16S/23S-rRNA-スパーサー領域を含むpT3T7BMに基づくプラスミド

【0132】

内部対照 (IC)

PStaph_IC PStaph_wtに基づくプラスミド、しかし配列番号9の相補配列が配列番号6の

50

相補配列で置換されている。

【0133】

ハードウェア／ソフトウェア

ソフトウェア バージョン3.5 (Roche Diagnostics GmbH, Germany) を有するLightCyclerTM 1.2 (20 µlキャピラリー)

【0134】

試薬

1 FastStartポリメラーゼ

2 以下を含む、FastStartマスターミックス：

MgCl₂ 3.5 mM

プライマー 0.4 µM

プローブ 0.2 µM

センサープローブ (IC) 0.1 µM

3 PCR-グレードH₂O (より早い増幅の交差汚染核酸およびアンプリコンを含まないように精製される)

【0135】

FastStartポリメラーゼおよびFastStart Masterは、一般的に、LightCycler-FastStart-DNA Master Hybridization Probes Kit (Roche Diagnostics GmbH カタログ番号：2239272)で推奨されているように使用される。

【0136】

試料

試料は下記のいずれかである。

a. プライマーおよびプローブ用の適切な結合配列を含むプラスミドDNA

または

b. 細菌DNAの調製物 (例えば、細菌培地由来)

【0137】

試料 (特に臨床試料) を試料調製に供し、試料の他の成分から核酸を放出し精製した。これはMagNAPureTM LCおよびMagNA Pure LC DNA 単離キットIII (細菌、真菌) (Roche Diagnostics GmbH, Germany, カタログ番号3 264 785) を使用して行われた。試料調製物が、溶出バッファー中に核酸を含む検体中に生じた。

【0138】

試料調製手順またはLightCyclerアッセイ実行のためのインープロセスコントロールを目的とするかどうかに依存して、各キャピラリーにおいてICを試料調製内に処理する (例えば、MagNA Pureにより) か、または完全なマスターミックスに添加する (以下参照)。IC由来のシグナルは、LightCycler装置のチャンネルF3において検出される。

【0139】

B. 方法

まず、ホールローターの32キャピラリーのためのFastStartマスターミックスの全ての成分を共に混合した。

次いで、15 µlのマスターミックスの一部を各キャピラリーにピペットで移した。ICをPCRのコントロールとして使用する場合は、ICをマスターミックスに添加した。あるいは、ICをMagNA Pure溶解／結合バッファーに加え、検体と共に処理した。

配列番号9および10の配列特異性をそれぞれ有するプラスミドを含む5 µlの陽性対照溶液を、マスターミックスを含むかかる第一のキャピラリーに添加した。

第2のキャピラリーに、試料または陽性対照の代わりに5 µlの水の形態で「陰性対照」を添加した。「陰性対照はまた、インープロセスコントロール用のICも含んだ。

ポジティブおよび陰性対照がキャップされた後に、試料 (各5 µlの量) を他のキャピラリーに添加した。

残りのキャピラリーをキャップした後、LightCycler-run を以下のプロファイルを使用して実行した：

10

20

30

40

50

【0140】

	サイクル	時間 (秒)	温度 (°C)	スロープ (°C)
変性	1	600	95°C	20
増幅	45	10	95	20
		15	50	20
		10	72	20
溶解曲線	1	60	95	20
		60	40	20
		0	80	0.1
冷却	1	30	40	20

10

【0141】

C. 結果

上記のように、LightCyclerで分析を実行した。S.aureusおよびコアグラエーネガティブブドウ球菌 (Staphylococci) (CoNSと呼ばれる) 試料は定量曲線を示した。溶解ピークをそれぞれ約55°C (S.aureus) および48-48°C (CoNS) で、チャンネルF2において観察した。我々は、PCRあたり少なくとも10~20ゲノム等価のより低い検出限界を見出した。

20

PCはS.aureus定量に似た定量曲線および溶解ピークを示した。

ICは特異的な試料が存在しない場合の検出を可能にした。これは、ブドウ球菌 (Staphylococcus) テンプレートDNAの過剰では検出できない。

【配列表】

30

SEQUENCE LISTING

5 <110> Roche Diagnostics GmbH
<110> F. Hoffmann-La Roche AG
<110> Innogenetics N.V.

10 <120> Method for the detection of pathogenic Gram positive Bacteria

15 <130> 21518 EP

20 <160> 11

<170> PatentIn version 3.1

25 <210> 1

<211> 23

30 <212> DNA

<213> Enterococcus

35 <400> 1
tactttgttc agttttgaga ggt
23

40 <210> 2

<211> 24

45 <212> DNA

<213> Enterococcus

50 <400> 2

10

20

30

gcaattgaac ttattaaaaa actc
24

5 <210> 3
<211> 21
<212> DNA
10 <213> Enterococcus

15 <400> 3
accgagaaca ccgcgttgaa t
21

20 <210> 4
<211> 29
<212> DNA
25 <213> Enterococcus

30 <400> 4
ctggatattg aagtaaaaag aatcaaaac
29

35 <210> 5
<211> 25
<212> DNA
40 <213> Control

45 <400> 5
gatatttgaa gtaaatgtaa gtaat
25

50 <210> 6

10
20
30

<211> 20

<212> DNA

5 <213> Control

<400> 6

10 ccagcagaat gcccaaccacc
20

<210> 7

15 <211> 26

<212> DNA

20 <213> Staphylococcus

<400> 7

25 tgtacattga aaactagata agtaag
26

<210> 8

30 <211> 22

<212> DNA

35 <213> Staphylococcus

<400> 8

40 acgcggttatt aatcttgtga gt
22

<210> 9

45 <211> 23

<212> DNA

50 <213> Staphylococcus

10

20

30

30

b b) 前記の病原性グラム陽性細菌の予め決定されたサブグループから、前記の予め

選択された核酸配列領域を検出することができる少なくとも1つのハイブリダイゼーション試薬を使用する検出工程であって、ここで前記検出工程 b b) は

b b a) 予め選択された温度でハイブリダイゼーションをモニタリングする工程であって、前記ハイブリダイゼーションが、前記サブグループに含まれる少なくとも1種が試料中に存在することの指標である工程、および

b b b) ハイブリダイゼーションの温度依存性をモニタリングする工程であって、前記温度依存性は少なくとも前記病原性グラム陽性細菌または前記生物の部分集合の種の存在の指標である工程

を含む、少なくとも1回の増幅および検出工程に前記臨床検体を供する工程、

c) b b) におけるモニタリング工程の結果に基づいて、前記生物または前記生物の部分集合を同定する工程

を含む、方法。

【請求項2】

前記サブグループが属である、請求項1記載の方法。

【請求項3】

予め選択された核酸配列領域が、rRNAスペーサー領域の少なくとも20ヌクレオチドを含む、請求項1 または2 記載の方法。

【請求項4】

前記増幅および検出が、増幅用および検出用の両方の試薬の存在下で (homogeneously) 行われる、請求項1～3 いずれか記載の方法。

【請求項5】

腸球菌、ブドウ球菌および連鎖球菌それぞれの16S-23S rRNAスペーサー領域から少なくとも20ヌクレオチドの配列を増幅することが可能なプライマーのセットを含む、腸球菌属、ブドウ球菌属および連鎖球菌属から選択されるグラム陽性病原性細菌の同定のためのキット。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 03/13545
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12Q1/14 G01N33/58 G01N33/542 C12Q1/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12Q G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) BIOSIS, EMBASE, EPO-Internal, PAJ, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EDWARDS K J ET AL: "Rapid and accurate identification of coagulase-negative staphylococci by real-time PCR." JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, vol. 39, no. 9, September 2001 (2001-09), pages 3047-3051, XP002242459 ISSN: 0095-1137	1-10
Y	abstract; figure 1; table 1	3,6
X	WO 01/48237 A (HOEFT ANDREAS ;STUEBER FRANK (DE)) 5 July 2001 (2001-07-05) cited in the application page 3, last paragraph -page 4, paragraph 2; claims; examples page 4, last paragraph -page 5, paragraph 1	1-10
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *G* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 4 May 2004		Date of mailing of the international search report 13/05/2004
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Vadot-Van Geldre, E

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 03/13545

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CONNOLLY GEOFFREY R ET AL: "Development of fluorescent adjacent hybridization probes and their application in real-time PCR for the simultaneous detection and identification of Fervidobacterium and Caloramator." INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY, vol. 52, no. 5, September 2002 (2002-09), pages 1837-1843, XP008017744 ISSN: 1466-5026	1-10
Y	abstract	3
X	SLOAN L M ET AL: "Evaluation of a combined LightCycler assay for the detection of vanA, vanB, and vanB-2/3 genes in enterococci." ABSTRACTS OF THE GENERAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY FOR, vol. 102, 2002, page 143 XP008017759 102nd General Meeting of the American Society for Microbiology; Salt Lake City, UT, USA; May 19-23, 2002, http://www.asmtusa.org/mtgsrvc/generalmeeting.htm 2002 ISSN: 1060-2011	1-10
Y	abstract	3
X	NIEMEYER D M ET AL: "REAL-TIME PCR DETERMINES STAPHYLOCOCCAL METHICILLIN RESISTANCE" PROGRAM AND ABSTRACTS OF THE INTERSCIENCE CONFERENCE ON ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, XX, XX, vol. 39, 1999, page 208 XP001016143	1-10
Y	abstract	3
X	US 5 849 488 A (ALATOSSAVA JOUKO TAPANI ET AL) 15 December 1998 (1998-12-15)	10
Y	claims; examples 2,3	6
Y	EP 1 207 210 A (HOFFMANN LA ROCHE ; ROCHE DIAGNOSTICS GMBH (DE)) 22 May 2002 (2002-05-22) claims	3
X	EP 1 088 899 A (INNOGENETICS NV) 4 April 2001 (2001-04-04)	10
A	paragraphs '0005!', '0105!', '0230!'; claims; example 9	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 03/13545

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0148237	A	05-07-2001	DE 10027113 A1	27-09-2001
			AU 3360101 A	09-07-2001
			WO 0148237 A2	05-07-2001
			DE 10084146 D2	16-01-2003
			EP 1266028 A2	18-12-2002
US 5849488	A	15-12-1998	AU 716675 B2	02-03-2000
			AU 1881997 A	16-09-1997
			EP 1012328 A2	28-06-2000
			WO 9732038 A2	04-09-1997
			NZ 332047 A	29-07-1999
EP 1207210	A	22-05-2002	EP 1207210 A1	22-05-2002
			JP 2002191384 A	09-07-2002
			US 6664064 B1	16-12-2003
EP 1088899	A	04-04-2001	EP 0769068 A1	23-04-1997
			EP 1088899 A2	04-04-2001
			EP 1091004 A2	11-04-2001
			EP 1098006 A1	09-05-2001
			EP 1098007 A1	09-05-2001
			AU 2924695 A	19-01-1996
			AU 3503599 A	02-09-1999
			BR 9508101 A	30-12-1997
			CA 2193101 A1	04-01-1996
			CZ 9603819 A3	15-04-1998
			WO 9600298 A1	04-01-1996
			JP 10501976 T	24-02-1998
			RU 2154106 C2	10-08-2000
			US 6312903 B1	06-11-2001
			US 6025132 A	15-02-2000
			US 2003215802 A1	20-11-2003

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 ハーベルハウゼン, ゲルト

ドイツ連邦共和国 ペンツベルク 8 2 3 7 7 カペレンウィーゼ 3 5

(72)発明者 エムリッヒ, トーマス

ドイツ連邦共和国 イッフェルドルフ 8 2 3 9 3 ヴァルトシュトラッセ 2 1

(72)発明者 ロッサウ, ルディ

ベルギー国 エーケレン ビー—2 1 8 0 ウィルゲーエーベストラート 4 5

(72)発明者 ジャネス, ゲールト

ベルギー国 ルーフエン ビー—3 0 1 0 イー. バンホーレンベケラーン 2 3 / 1

(72)発明者 デ ボス, ダニエル

ベルギー国 シェルベル ビー—9 2 6 0 デンダーモンドセステーションヴェーグ 4 5 エイ

Fターム(参考) 4B024 AA11 CA04 CA05 CA06 CA09 CA11 EA04 GA19 HA08 HA09

HA12 HA14

4B063 QA01 QA18 QQ03 QQ06 QQ42 QQ54 QR08 QR32 QR35 QR42

QR55 QR62 QR75 QS25 QS34 QX02