

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5203387号  
(P5203387)

(45) 発行日 平成25年6月5日 (2013.6.5)

(24) 登録日 平成25年2月22日 (2013.2.22)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

C 1 2 Q 1/68 Z N A A

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 A

請求項の数 15 (全 46 頁)

(21) 出願番号 特願2009-543399 (P2009-543399)  
 (86) (22) 出願日 平成19年12月28日 (2007.12.28)  
 (65) 公表番号 特表2010-514429 (P2010-514429A)  
 (43) 公表日 平成22年5月6日 (2010.5.6)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2007/011458  
 (87) 国際公開番号 W02008/080620  
 (87) 国際公開日 平成20年7月10日 (2008.7.10)  
 審査請求日 平成22年10月6日 (2010.10.6)  
 (31) 優先権主張番号 60/882,799  
 (32) 優先日 平成18年12月29日 (2006.12.29)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 07008206.0  
 (32) 優先日 平成19年4月23日 (2007.4.23)  
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 501083115  
 メイヨ・ファウンデーション・フォー・メ  
 ディカル・エデュケーション・アンド・リ  
 サーチ  
 アメリカ合衆国、ミネソタ州 55905  
 、ロチェスター、ファースト・ストリート  
 ・サウスウエスト 200  
 (73) 特許権者 591003013  
 エフ・ホフマン・ラ ロシュ アーゲー  
 F. HOFFMANN-LA ROCH  
 E AKTIENGESELLSCHAFT  
 スイス・シーエイチ・4070バーゼル・  
 グレンツアーヘルストラツセ 124

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 メチシリン耐性黄色ブドウ球菌の検出方法ならびにその検出用プライマー、プローブおよびキット

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

試料中のメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) の存在または非存在を検出する方法であって、

(a) 試料と一組のMRSAプライマーとを接触させてMRSAが試料中に存在する場合に増幅産物を生成することを含む増幅ステップを行なう工程、

(b) 工程(a)の増幅産物と一対のMRSAプローブとを接触させることを含むハイブリダイズステップを行なう工程、該一対のMRSAプローブの第一MRSAプローブがドナー蛍光部分で標識され、該一対のMRSAプローブの第二MRSAプローブが対応するアクセプター蛍光部分で標識される；および

(c) 第一MRSAプローブのドナー蛍光部分と第二MRSAプローブのアクセプター蛍光部分との間で蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) の存在または非存在を検出する工程、FRETの存在が試料中のMRSAの存在を示し、FRETの非存在が試料中のMRSAの非存在を示す

を含み、

MRSAのブドウ球菌染色体カセット (SCCmec) タイプI~Vのそれぞれを検出することができ

、一組のプライマーが、

(i) MRSAタイプRE2に特異的なプライマー、即ち、核酸配列5'-TGA AAT GAA AGA CTG CGG A G-3' (MRSAダイレクトRE2 fwd; 配列番号:92) からなるプライマー；

および

(ii)MRSAタイプRE3に特異的なプライマー、即ち、核酸配列5'-CCA CAT CTC ATT AAA TTT TTA AAT TAT ACA C-3'(MRSAダイレクトRE3 fwd; 配列番号:93)からなるプライマー;  
および

(iii)MRSAタイプRE7に特異的なプライマー、即ち、核酸配列5'-CAA TCC TTT TTA TAT TTA AAA TAT ATT ATA CAC-3'(MRSAダイレクトRE7 fwd; 配列番号:94)からなるプライマーを含む、方法。

【請求項2】

一組のプライマーが、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)およびメチシリン感受性黄色ブドウ球菌(MSSA)に特異的なさらなるプライマーをさらに含む、請求項1記載の方法。

【請求項3】

さらなるプライマーが、核酸配列5'-CAA GGA AAG ATG CTA TCT TCC G-3'(MRSAダイレクトrev; 配列番号:95)からなる、請求項2記載の方法。

【請求項4】

- 一組のプライマーが最大4個または5個のプライマーからなる、および/または  
- 一組のプライマーが、MRSAダイレクトRE2 fwd、MRSAダイレクトRE3 fwdおよびMRSAダイレクトRE7 fwdならびにリバースプライマーを含むまたはこれらからなる、請求項1～3いずれかに記載の方法。

【請求項5】

リバースプライマーが、MRSAダイレクトrevである、請求項1～4いずれかに記載の方法。

【請求項6】

一対のプロープの少なくとも1つのプロープが、蛍光部分ならびに  
- 5'-AAG TCG CTT TGC CCT TGG G-3'(MRSAダイレクトFluos標識なし; 配列番号:96)、および  
- 5'-CAT GCG TTG GTT CGA TTC TTG-3'(MRSAダイレクトRed 610標識なし; 配列番号:97)からなる群より選択される核酸配列からなる、請求項1～5いずれかに記載の方法。

【請求項7】

第一標識を含む第一プロープが5'-AAG TCG CTT TGC CCT TGG G-3'-フルオレセイン(MRSAダイレクトFluos)であり、第二標識を含む第二プロープがLC-Red 610-5'-CAT GCG TTG GTT CGA TTC TTG-3'(MRSAダイレクトRed 610)である、請求項1～6いずれかに記載の方法。

【請求項8】

- 一対のMRSAプロープのメンバーが、5ヌクレオチド以下、4ヌクレオチド以下または3ヌクレオチド以下の範囲で増幅産物にハイブリダイズする; および/または

- (a) ドナー蛍光部分がフルオレセインである; および/または  
(b) アクセプター蛍光部分がLC-Red 610、LC-Red 640、LC-Red 670、LC-Red 705、Cy5、およびCy5.5からなる群より選択される、

請求項1～7いずれかに記載の方法。

【請求項9】

試料中のメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)の存在または非存在を検出する方法であって、

(a)試料と一組のMRSAプライマーとを接触させてMRSAが試料中に存在する場合に増幅産物を生成することを含む増幅ステップを行なう工程、

(b)工程(a)の増幅産物とMRSAプロープとを接触させることを含むハイブリダイズステップを行なう工程、MRSAプロープがドナー蛍光部分および対応するアクセプター蛍光部分で標識される; ならびに

(c)MRSAプロープのドナー蛍光部分とアクセプター蛍光部分との間で蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)の存在または非存在を検出する工程、FRETの存在または非存在が試料中のMRSAの存在または非存在を示す

を含み、MRSAのブドウ球菌染色体カセット(SCCmec)タイプI～Vのそれぞれを検出でき、該

10

20

30

40

50

一組のプライマーが請求項 1 ~ 6 いずれかに記載される通りである、方法。

【請求項 1 0】

- a) プローブが、2つの蛍光部分を含むまたはこれらからなる、
- b) プローブが、2つの蛍光部分を含むまたはこれらからなる、

ドナー蛍光部分がフルオレセインである； および / またはアクセプター蛍光部分がLC-Red 610、LC-Red 640、LC-Red 670、LC-Red 705、Cy5、 およびCy5.5からなる群より選択される；

c) 増幅ステップで5' 3'エキソヌクレアーゼ活性を有するポリメラーゼ酵素が使用される；

d) ドナー蛍光部分およびアクセプター蛍光部分がプローブ上で互いに5ヌクレオチド以下の範囲に存在する；

e) プローブが二次構造形成を可能にする核酸配列を含み、該二次構造形成によってドナー蛍光部分とアクセプター蛍光部分との間で空間近接がもたらされる； および / または

f) アクセプター蛍光部分がクエンチャーである、

請求項 9 記載の方法。

【請求項 1 1】

a) 検出工程がドナー蛍光部分によって吸収される波長で試料を励起することならびにアクセプター蛍光部分によって放出される波長を視覚化および / または測定することを含む；

b) 検出がFRETの量を計ることを含む；

c) 55サイクル、45サイクルまたは35サイクル内でのFRETの存在が試料中のMRSAの存在を示す；

d) 検出工程が増幅およびハイブリダイゼーションの各ステップの後および / またはリアルタイムで行なわれる；

e) (1つまたは複数の) プローブの1つまたは両方と増幅ステップの増幅産物との間の融解温度を決定する工程をさらに含み、該融解温度によってMRSAの存在または非存在が確認される；

f) 夾雑核酸の増幅を妨げる工程をさらに含む；

g) ウラシルの存在下で増幅ステップを行なうことにより夾雑核酸の増幅を妨げる工程、および第一増幅ステップの前に試料をウラシルDNAグリコシラーゼで処理する工程をさらに含む；

h) 対照試料で行なわれる；

i) 試料が生物試料である； および / または

j) 試料が、感染傷のスワブ、皮膚のスワブ、鼻のスワブ、咽喉のスワブ、鼠蹊部のスワブ、腋窩のスワブ、侵襲性デバイス部位からのスワブ、感染の可能性のある部位からのスワブ、体液、血液試料、尿試料および会陰のスワブからなる群より選択される、

請求項 1 ~ 1 0 いずれかに記載の方法。

【請求項 1 2】

請求項 1 ~ 5 いずれかに記載の一組のプライマーを含む組成物。

【請求項 1 3】

請求項 6 ~ 8 いずれか一項に記載のプローブおよび / または一对のプローブをさらに含む、請求項 1 2 記載の組成物。

【請求項 1 4】

(a) 請求項 1 ~ 5 いずれかに記載の一組のプライマー；

(b) 請求項 6 もしくは 8 記載の一对のプローブまたは請求項 1 0 記載のプローブ；ならびに

(c) ドナー蛍光部分および (1つまたは複数の) プローブを標識する対応する蛍光部分を含むキットであって、MRSAのブドウ球菌染色体カセット(SCCmec)タイプI~Vのそれぞれを検出することができる、キット。

【請求項 1 5】

a) 請求項 1 ~ 11 いずれかに記載の方法を行なうのに適切である；

b) 試料中のMRSAの存在または非存在を検出する一組のMRSAプライマーおよび対のMRSAプローブを使用するための説明書を有するパッケージラベルまたはパッケージ挿入物をさらに含む；および/または

c) ウラシル-DNA-グリコシラーゼおよび/またはDNAポリメラーゼおよび/または適切なバッファをさらに含む、

請求項 14 記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、試料中のメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)の存在または非存在を検出する方法であって、増幅工程、ハイブリダイズ工程および検出工程を行なうことを含む方法に関する。さらに、本発明は、MRSA検出用プライマー、プローブおよびキットに関する。

【背景技術】

【0002】

黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*(*S. aureus*; SA))は細菌であり、天然で存在する場所は鼠蹊、肛門もしくは鼻などの粘液質または湿った/塩気のある皮膚領域である。また、黄色ブドウ球菌は外傷にも存在する。全てを考慮すると、黄色ブドウ球菌が顕著な環境は鼻である。しかし、黄色ブドウ球菌は、軽症の皮膚感染(例えば、にきび、おでき、およびセリュライト)ならびに膿瘍から、肺炎、髄膜炎、心内膜炎、毒性ショック症候群(TSS)、敗血症および多臓器機能不全症候群(MODS)のような重篤な疾患までの範囲の病気を引き起こす。毎年、米国の病院で約500,000人の患者がブドウ球菌感染にかかる。

【0003】

今日、黄色ブドウ球菌は、一般的に使用される多くの抗生物質に対して耐性になっている。英国では、黄色ブドウ球菌の単離物すべてのうち2%だけがペニシリンに対して感受性があり、世界の他国でも同様な状況である。 -ラクタマーゼ耐性ペニシリン(メチシリン、オキサシリン、クロキサシリンおよびフルクロキサシリン)が、ペニシリン耐性黄色ブドウ球菌を処置するために開発され、第一線の治療薬として今でも使用されている。メチシリンは、昔に使用された種類の第一抗生物質であった(メチシリンは1959年に紹介された)が、わずか2年後に、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)の最初の症例が英国で報告された。また、MRSAはオキサシリン耐性黄色ブドウ球菌(ORSA)および多剤耐性黄色ブドウ球菌としても知られ得るが、メチシリンに耐性でない菌株の黄色ブドウ球菌はときどき、明白な区別がされる必要がある場合にメチシリン感受性黄色ブドウ球菌(MSSA)と呼ばれる。

【0004】

その阻止にも関わらず、1990年代までMRSAは一般的に病院環境にもほとんど見られなかったが、MRSAの流行が病院で劇的に増加し、現在では蔓延している。さらに、米国では、健常な集団の中でも、ロッカールームおよびジムでの皮膚接触を介したMRSAの集落形成および感染の大発生の報告が増加している。また、MRSAは、小児科で問題になっている(Johnson AP et al., 2005, J Antimicrob Chemother 56 (3): 455-62)。2005年始め現在で、英国でのMRSAに起因する死者数は、様々な情報源によって推定され、1年あたり3000人の範囲にある(Johnson, 上掲)。

【0005】

耐性のために治療がわずかな抗生物質だけに制限されるため、MRSAによって引き起こされる感染は、高い致死率およびより重篤な症状を示す。MRSAの第一線治療薬は、現在グリコペプチド抗生物質(バンコマイシンおよびテイコブラニン)である。しかし、これらの抗生物質に関して、主に静脈投与(経口調製物が利用可能でない)の必要性、毒性および定期的な血液試験による薬物レベルのモニターの必要性を中心とした多くの問題がある。また、グリコペプチド抗生物質は感染組織にとっても十分に浸透しないという問題がある(これは脳および髄膜の感染ならびに心内膜炎での特有の問題である)。しかし、グリコペプチ

10

20

30

40

50

ドは、結果が優れていないのでメチシリン感受性黄色ブドウ球菌を処置するために使用される必要はない。以上により、MRSAに感染した患者はSAに感染しただけの患者よりも病院に長く滞在する。

【 0 0 0 6 】

さらに、認識されないMRSAの集落形成によって、MRSA集落形成しない患者の微生物叢がMRSAと置き換えられてある患者から他の患者へのMRSAの分布がもたらされ得る。集落形成は、例えば以前の抗生物質治療、多くの病的状態および糖尿病ならびに病院での以前の滞在などの特定のリスク要因によって容易になる。

【 0 0 0 7 】

このことから、MRSAの診断および/または検出のための安全で信頼できるツールを有することが非常に重要であることが導かれる。

10

【 0 0 0 8 】

現在、ほとんどの皮膚感染の診断は症状のパターンおよび身体検査所見によって行われるが、感染がブドウ球菌細菌のいずれかのタイプまたは例えばグループAベータ-血液溶解性連鎖球菌(化膿性連鎖球菌(*Streptococcus pyogenes*))のような別の細菌によって引き起こされるかどうかを知ることは通常可能ではない。明確な診断を行なうためおよびMRSAが感染を引き起こす細菌であることを確認するために、培養が行われ得る。

【 0 0 0 9 】

しかし、従来の培養を使用したMRSAの診断には、16~72時間を要し、治療の遅延を引き起こし、患者の結果を有意に損ない、大発生および病院コストの増大を促進し得る。

20

【 0 0 1 0 】

コアグララーゼタイプ、エンテロトキシン(SE)タイプなどの表現型分析、毒性ショック症候群トキシン-1の生成およびインビトロでの抗生物質感受性が、MRSA菌株タイピングで慣例的に使用されている。

【 0 0 1 1 】

また、MRSA菌株の遺伝子型分析が確立されており、表現型分析よりも詳細な分類を提供する。特に、MRSAの全ゲノムDNAの制限断片を用いたパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)が、優れた特徴付けの方法である。

【 0 0 1 2 】

あるいは、多座配列タイピング(MLST)が、7個のハウスキーピング遺伝子の内部断片の配列を用いることによって細菌の単離物を特徴付けするために使用され得る。MLSTは、黄色ブドウ球菌のために開発され、かつ有効とされ(Enrightら 2002, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 99: 7687-7692)、別の国で発見された関連菌株が容易に同定されることを可能にする識別方法を提供する。

30

【 0 0 1 3 】

試験キット(例えば、IDI-MRSAアッセイ、Becton Dickinson, USA)は、MRSAを検出するために開発され、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)による鼻集落形成の直接検出のためのインビトロ診断試験であり、健康管理環境でのMRSA感染の防止および制御に役立つ。

【 0 0 1 4 】

しかし、このキットは、キットの有用性を制限する一連の不利を有する。第一に、キットはMRSAのブドウ球菌染色体カセット(SCC)タイプVを検出せず、SCCタイプVは以前に同定されたタイプであり、特にアジアおよびオーストラリアに存在するために重要である。第二に、実用性が多数のプロープに制限される。第三に、試料の調製は、かなり複雑または困難である。第四に、対照に使用される概念は当該技術分野の水準ではない。さらに、阻害率がかなり高く、最終的に、使用される多数のプライマーおよびプロープが必要とされ、エラーしがちな診断ツールをもたらす。また、FRETプロープアッセイによって使用され得る融解曲線分析は、増幅曲線と比較して出力シグナル内での高い特異性を可能にする。

40

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 1 5 】

50

従って、本発明の1つの目的は、MRSAを検出する代替方法、好ましくは上記の不利を回避する代替方法を提供することであった。

【課題を解決するための手段】

【0016】

本発明の目的は、試料中のメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)の存在または非存在を検出する方法であって、

(a)試料と一組のMRSAプライマーとを接触させてMRSAが試料中に存在する場合に増幅産物を生成することを含む増幅段階を行なう工程、

(b)工程(a)の増幅産物と一組のMRSAプローブとを接触させることを含むハイブリダイズ段階を行なう工程であって、一組のMRSAプローブの第一MRSAプローブがドナー蛍光部分で標識され、一組のMRSAプローブの第二MRSAプローブが対応するアクセプター蛍光部分で標識される工程；および

(c)第一MRSAプローブのドナー蛍光部分と第二MRSAプローブのアクセプター蛍光部分との間で蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)の存在または非存在を検出する工程であって、FRETの存在が試料中のMRSAの存在を示し、FRETの非存在が試料中のMRSAの非存在を示す工程を含み、MRSAのブドウ球菌染色体カセット(SCCmec)タイプI~Vのそれぞれを検出することができる、

方法を提供することによって解決された。

【発明の効果】

【0017】

該方法は、試料中のMRSAの迅速でかつ信頼できる検出のために使用され得る。特に、該方法は、試料中のMRSAを検出するためまたは患者などの個体のMRSA感染を診断するために使用され得る。

【0018】

従って、MRSAの迅速な検出によって、例えば早期の治療によってMRSAに罹患する患者の状態を改善し、例えば病院においてMRSA集落形成または感染した患者のための障壁予防策の迅速でかつ徹底した利用によってMRSAの大発生を防止し、従って健康管理コストを減らす。また、本発明の好ましい態様において、制限された数のプライマー、例えば3個または4個が、現在公知のSCCmecタイプの全ての各部、即ちタイプI、II、III、IVおよびVを検出するために使用され得、MRSAの検出のための非常に信頼できるツールを提供する。

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】図1は、MRSAのアンプリコン配列、特に、RE2、RE3およびRE7(各々、最初のorfX(CC)を含む)ならびにorfXを示す。

【図2】図2は、93個の異なるMRSA菌株由来のRE2アライメントの配列を示す。変異の数および変異の種類を含む点変異を示す。SCCmec タイプIに存在する102bp複製物が、\_\_\_\_\_によって同定される。SCCmecからSA部分への移行配列がCCによって同定される。

【図3】図3は、RE2検出の増幅曲線(図3A)および融解曲線(図3B)を示す。解析実験において、5対数ステップのダイナミックレンジおよび10ゲノムコピーの範囲の感度により、診断的使用の要件を満たすことが示された。この実験は、アッセイの機能性を証明する。

【図4】図4は、RE3検出の増幅曲線(図4A)および融解曲線(図4B)を示す。解析実験において、5対数ステップのダイナミックレンジおよび10ゲノムコピーの範囲の感度により、診断的使用の要件を満たすことが示された。この実験は、アッセイの機能性を証明する。

【図5】図5は、RE7検出の増幅曲線(図5A)および融解曲線(図5B)を示す。解析実験において、5対数ステップのダイナミックレンジおよび10ゲノムコピーの範囲の感度により、診断的使用の要件を満たすことが示された。この実験は、アッセイの機能性を証明する。

【発明を実施するための形態】

【0020】

先に詳述したように、本発明の方法は、公知のブドウ球菌染色体カセット(SCCmec)タイプ全て、即ち、タイプI、II、III、IVおよびVのMRSA検出に適切である。このことは、例

10

20

30

40

50

えばMRSAに感染した患者のために適切な治療を選ぶために特に重要である。

#### 【 0 0 2 1 】

メチシリン耐性遺伝子(mecA)．MecAは改変されたメチシリン耐性ペニシリン結合タンパク質(PBP2aまたはPBP2')、 $\beta$ -ラクタム環( $\beta$ -ラクタム抗生物質、例えばペニシリン、セファロsporinおよびカルバペネムの主要活性部位)に対する親和性が低下したペニシリン結合タンパク質をコードする(Guignard Bら, 2005, Curr Opin Pharmacol 5 (5): 479-89)が、これは感受性のある菌株に存在せず、離れた関連種から獲得されたと考えられる。MecAは、移動性遺伝子エレメント、MRSA菌株のブドウ球菌染色体カセットmec(SCCmec)で運ばれ、サイズおよび遺伝子組成で異なる5つのエレメント形態が記載されている。SCCエレメントは、感受性黄色ブドウ球菌でも生じるが、mecA遺伝子を有さず、または非機能性mecA遺伝子を有する。かかる菌株は、同じ右末端接合部(right extremity junction)を有するために、偽陽性結果の主な原因である。

10

#### 【 0 0 2 2 】

しかし、鼻被検物からのmecA遺伝子および黄色ブドウ球菌特異的遺伝子の検出によるMRSAの検出は、非耐性SAとメチシリン耐性コアグラーゼ陰性ブドウ球菌(MRCoNS)の両方の量が変化するために、低い陽性予測値(PPV)をもたらす。これらの組み合わせは、両方の標的が存在するために、MRSAと区別することができない。MRSAの流行に依存して、この状況は30%までの偽陽性結果をもたらす。良好なPPVのために、選択された標的はMRSAに特有であることが必要である。現在公知である唯一の標的は、ブドウ球菌染色体カセット(SCCmec)であり、mecA遺伝子を有する遺伝子エレメントのためのトランスポゾン統合部位を増幅する。

20

#### 【 0 0 2 3 】

(機能性mecA遺伝子を含む)MRSAのSCCエレメントであるSCCmecは、3'部分の、mecA遺伝子を含む黄色ブドウ球菌のオープンリーディングフレームX(orfX)に統合された16kb~67kb長のトランスポゾンである。MecAは、メチシリンおよびその誘導体ならびに他の抗生物質に対して耐性を付与するPBP2aをコードする。OrfXは、黄色ブドウ球菌の定義された機能を持たず、SAに特有である。SCCmecの統合によって、MRSAに特有な特性が生じる。

#### 【 0 0 2 4 】

SCCmecエレメントは、2つの不可欠な成分ccr遺伝子複合体(ccr)およびmec遺伝子複合体(mec)を有する。ccr遺伝子複合体は、ccr遺伝子および周辺のオープンリーディングフレーム(ORF)から構成され、mec遺伝子複合体は、mecA遺伝子、調節遺伝子、およびmecAの上流または下流の挿入配列から構成される。いくつかのmecおよびccrアロタイプが、SCCmecエレメントの中で見つかり、以下の分類がもたらされた(Itoら, 2004, Antimicrob Agents Chemother. 48: 2637-2651):

30

- ・ タイプI SCCmec, クラスB mec およびタイプ1 ccrを含む;
- ・ タイプII SCCmec, クラスA mecおよびタイプ2 ccrを含む;
- ・ タイプIII SCCmec, クラスA mecおよびタイプ3 ccrを含む;
- ・ タイプIV SCCmec, クラスB mecおよびタイプ2 ccrを含む; ならびに
- ・ タイプV SCCmec, クラスC2 mecおよびタイプ5 ccrを含む。

#### 【 0 0 2 5 】

40

しかし、MRSAの分類およびSCCmecタイプI~Vへの特定が、表現型アプローチである。あるいは、MRSAの異なる遺伝子型を用いたアプローチが使用され得る。遺伝子型に基づいたMRSA検出および分類の1つの標的は、SCCmecの右末端接合部(RE)であり得る。従って、このMRSAタイピング関連の代替方法は、RE(SCCmecの右末端)タイピングと呼ばれる。このタイピング法は、3つのタイプのSCCmecの間で、統合部位に隣接するSCCmec DNAの右末端での多形を利用する。配列番号:78~85の核酸配列に基づいて、MRSAが以下の通りに分類され得る:

#### 【 0 0 2 6 】

RE2 タイプ A (GenBank gi|73537130|gb|DQ106887.1|; 配列番号 : 78)

TTTGCTTCACTATAAGTATTCAGTATAAAGAATATTTTCGCTATTATTTACTTGAAATGAAA  
GACTGCGGAGGCTAACTATGTCAAAAATCATGAACCTCATTACTTATGATAAGCTTCTTAA  
AAACATAACAGCAATTCACATAAACCTCATATGTTCTGATACATTCAAATCCCTTTATGA  
AGCGGCTGAAAAAACCGCATCATTTGATATGCTTCTTAAAAACATAACAGCAATTCACATA  
AACCTCATATGTTCTGATACATTCAAATCCCTTTATGAAGCGGCTGAAAAAACCGCATCA  
TTTATGATATGCTTCTCCACGCATAATCTTAAATGCTCTATACACTTGCTCAATTAACACA  
ACCCGCATCATTGATGTGGGAATGTCATTTTGTGGAATGATAGTGCCTAGTTACTGCGTT  
GTAAGACGTCCTTGTGTCAGGCCGTTTGATCCGCCAATGACGAATACAAAGTCGCTTTGCC  
TTGGGTCATGCGTTGGTTCAATTCTTGGGCCAATCCTTCGGAAGATAGCATCTTTCCTTGT  
ATTTCTAATGTAATGACTGTGGATTGTGGTTTAAATTTGGCTAGTATTCGTTGGCCTTCTT  
TTTCTTTTACTTGCTCAATTTCTTTGTCTGCTCA

10

【 0 0 2 7 】

RE2\_タイプ\_B (GenBank gi|73537130|gb|DQ106887.1|; 配列番号 : 79)

TTTGCTTCACTATAAGTATTCAGTATAAAGAATATTTTCGCTATTATTTACTTGAAATGAAA  
GACTGCGGAGGCTAACTATGTCAAAAATCATGAACCTCATTACTTATGATAAGCTTCTTAA  
AAACATAACAGCAATTCACATAAACCTCATATGTTCTGATACATTCAAATCCCTTTATGA  
AGCGGCTGAAAAAACCGCATCATTATGATATGCTTCTCCACGCATAATCTTAAATGCTCT  
ATACACTTGCTCAATTAACACAACCCGCATCATTGATGTGGGAATGTCATTTTGTGGAAT  
GATAGTGCCTAGTTACTGCGTTGTAAGACGTCCTTGTGTCAGGCCGTTTGATCCGCCAATGA  
CGAATACAAAGTCGCTTTGCCCTTGGGTCATGCGTTGGTTCAATTCTTGGGCCAATCCTTC  
GGAAGATAGCATCTTTCCTTGTATTCTAATGTAATGACTGTGGATTGTGGTTTAAATTTTG  
GCTAGTATTCGTTGGCCTTCTTTTT

20

【 0 0 2 8 】

RE2\_タイプ\_C (GenBank gi|57284222|gb|CP000046.1|; 配列番号 : 80)

TTTGCTTCACTATAAGTATTCAGTATAAAGAATATTTTCGCTATTATTTACTTGAAATGAAA  
GACTGCGGAGGCTAACTATGTCAAAAATCATGAACCTCATTACTTATGATAAGCTTCTCCA  
CGCATAATCTTAAATGCTCTATACACTTGCTCAATTAACACAACCCGCATCATTGATGTG  
GGAATGTCATTTTGTGGAATGATAGTGCCTAGTTACTGCGTTGTAAGACGTCCTTGTGCAG  
GCCGTTTGATCCGCCAATGACGAATACAAAGTCGCTTTGCCCTTGGGTCATGCGTTGGTTC  
AATTCTTGGGCCAATCCTTCGGAAGATAGCATCTTTCCTTGTATTCTAATGTAATGACTG  
TGGATTGTGGTTTAAATTTGGCTAGTATTCGTTGGCCTTCTTTTT

30

【 0 0 2 9 】

RE3 (GenBank gi|23451317|gb|AF422696.1|; 配列番号 : 81)

CATTCTTTCTTGATTCCATTAGTTTAAATTTAAAATTTNTCATACAATTTCTTAATTTAAT  
TGTAAGTTCCATAATCAATATAATTTGTACAGTTATTATATATTCTAGATCATCAATAGTTG  
AAAAATGGTTTATTAAACACTCTATAAACATCGTATGATATTGCAAGGTATAATCCAATAT  
TTCATATATGTAATTCCTCCACATCTCATTAAATTTTAAATTATACACAACCTAATTTTT  
AGTTTTATTTATGATACGCTTCTCCACGCATAATCTTAAATGCTCTGTACACTTGTTCAAT  
TAACACAACCCGCATCATTGATGTGGGAATGTCATTTTGTGGAATGATAGTGCCTAGTTA  
CTGCGTTGTAAGACGTCCTTGTGTCAGGCCGTTTGATCCGCCAATGACGAATACAAAGTCGC  
TTTGCCCTTGGGTCATGCGTTGGTTCAATTCTTGGGCCAATCCTTCGGAAGATAGCATCTT  
TCCTTGATTTCTAATGTAATGACTGTTGATTGTGGTTTGAATTTGGCTAGTATTCGTTGG  
CCTTCTTTTCTTTTACTTGCTCAATTTGCTTTGTCTGCTCATATT

40

【 0 0 3 0 】



RE4 (GenBank AY267374\_ ; 配列番号 : 82)

TCCATCTCTACTTTATTGTTTCTTCAAATATTATCTCGTAATTTACCTTGTTCATTAAAC  
AAAAAACTGGATAAAAAACCGCATCATTTGTGGTACGCTTCTCCACGCATAATCTTAAATG  
CTCTGTACACTTGTTCATTAACACAACCCGCATCATTTGATGTGGGAATGTCATTTTGCT  
GAATGATAGTGCCTAGTTACTGCGTTGTAAGACGTCCTTGTGCAGGCCGTTTGATCCGCCA  
ATGACGAATACAAAGTCGCTTTGCCCTTGGGTGTCGCTTGGTTCAATTCTTGGGCCAATC  
CTTCGGAAGATAGCATCTTTCCTTGTATTTCTAATGTAATGACTGTTGATTGTGGTTTGAT  
TTTGGCTAGTATTCGTTGGCCT

【 0 0 3 1 】

10

RE5 (GenBank AY267381; 配列番号 : 83)

AGATGCCTATAAACTAACAAATTACAAATTATTATTTGTGTTTACATTATAATATATCAA  
CTAGAATTAATTTCTTAATAAAAAAGTAATCATTAAATTTAATAAACTCTGCTTTATATTAT  
AAAATTACGGCTGAATAACCGCATCATTTATGATATGCTTCTCCTCGCATAATCTTAAAT  
GCTCTATACACTTGTTCATTAACACAACCCGCATCATTTGATGTGGGAATGTCATTTTGC  
TGAATGATAGTGCCTAGTTACTGCGTTGTAAGACGTCCTTGTGCAGGCCGTTTGATCCGCC  
AATAACGAATACAAAGTCGCTTTGCCCTTGGGTGTCGCTTGGTTCAATTCTTGGGCCAAT  
CCTTCGGAAGATAGCATCTTTCCTTGTATTTCTAATGTAATGACTGTGGATTGTGGTTTGA  
TTTTGGCTAGTATTCGTTGGCCTTCTTTTCTTTTACTTGCTCGATTTCTTT

【 0 0 3 2 】

20

RE6 (GenBank AY267375; 配列番号 : 84)

AAAAAGAAGTCGATTTACACACCATGTATTAAATAATGGAAATTCCTAATCTTTACTTGTA  
CCTAAATTATCAAACCTTAATATTCATTTTATTCTTCAAAGATTTGAGCTAATTTAATAA  
TTTTCTCATATTTTATGTTTTATTGTGGTACGCTTCTCCTCGCATAATCTTAAATGCTC  
TATACACTTGTTCATTAACACAACCCGCATCATTTGATGTGGGAATGTCATTTTGCTGAA  
TGATAGTGCCTAGTTACTGCGTTGTAAGACGTCCTTGTGCAGGCCGTTTGATCCGCCAATA  
ACGAATACAAAGTCGCTTTGCCCTTGGGTGTCGCTTGGTTCAATTCTTGGGCCAATCCTT  
CGGAAGATAGCATCTTTCCTTGTATTTCTAATGTAATGACTGTGGATTGTGGTTTGATTTT  
GGCTAGTATTCGTTGGCCTTCTTTTCTTTTACTTGCTCGATTTCTTT

【 0 0 3 3 】

RE7 (GenBank gi|49257031|dbj|AB121219.1|, 配列番号 : 85)

30

CAAAAAATATATTTACTTTAGTCAAATCATCTTCACTAGTGTAATTATCGAATGATTATA  
ACTAACATTTTCTAATTTATTTAACATAAAATCAATCCTTTTTATATTTAAATATATTAT  
ACACAATCCGTTTTTTAGTTTTATTTATGATACGCCTCTCCACGCATAATCTTAAATGCTC  
TATACACTTGTTCATTAACACAACCCGCATCATTTGATGTGGGAATGTCATTTTGCTAAA  
TGATAGTGCATAGTTACTGCGTTGTAAGACGTCCTTGTGCAGGCCGTTTGATCCGCCAATG  
ACGAATACAAAGTCGCTTTGCCCTTGGGTGTCGCTTGGTTCAATTCTTGGGCCAATCCTT  
CGGAAGATAGCATCTTTCCTTGTATTTCTAATGTAATGACTGTGGATTGTGGTTTGATTTT  
GGCTAGTATTCGTTGGCCTTCTTTTCTTTTACTTGCTCAATTTCTTTGT

【 0 0 3 4 】

先に詳述したように、REタイプは、SCCmecトランスポゾンの右末端接合部の配列変化を説明するものである。RE2は、全てのREタイプ(SCCmecタイプI、II、III(の一部)および一部のIVを表す)のうちの大部分を構成する。RE3およびRE7は、SCCmecタイプIIIおよびVならびにSCCmecタイプVのそれぞれを表す。

40

【 0 0 3 5 】

従って、本発明の好ましい一態様において、特定の一組のプライマーが、全てのSCCmecタイプの検出を提供するために使用される。一組のプライマーが、

(i)MRSAタイプRE2に特異的なプライマー、

特に、

・ 5' - GCA ATT CAC ATA AAC CTC ATA TGT TC -3' (AR mec1 フォワード; 配列番号:1)

、

・ 5' - ACC TCA TAT GTT CTG ATA CAT TCA -3' (AR mec2 フォワード; 配列番号:2)、

・ 5' - GCA ATT CAC ATA AAC CTC ATA T -3' (AR mec3 フォワード; 配列番号:3)、

50

- ・ 5' - CAT AAC AGC AAT TCA CAT AAA CCT C -3' (AR mec4 フォワード; 配列番号:4)
- 、
- ・ 5' - TAA CAG CAA TTC ACA TAA ACC T -3' (AR mec5 フォワード; 配列番号:5)、
- ・ 5' - CGC TAT TAT TTA CTT GAA ATG AAA GAC -3' (AR mec6 フォワード; 配列番号:6)
- 、
- ・ 5' - CTT GAA ATG AAA GAC TGC GGA -3' (AR mec7 フォワード; 配列番号:7)、
- ・ 5' - TTG CTT CAC TAT AAG TAT TCA GTA TAA AGA -3' (AR mec 8 フォワード; 配列番号:8)、
- ・ 5' - ATT TAC TTG AAA TGA AAG ACT GCG -3' (AR mec9 フォワード; 配列番号:9)、
- ・ 5' - AAA GAA TAT TTC GCT ATT ATT TAC TTG AA -3' (AR mec 10 フォワード; 配列番号:10)、
- ・ 5' - TCA GTA TAA AGA ATA TTT CGC TAT TAT TT -3' (AR mec 11 フォワード; 配列番号:11)、
- ・ 5' - TGA AAT GAA AGA CTG CGG AG -3' (AR mec12 フォワード; 配列番号:12)、
- ・ 5' - AAC CTC ATA TGT TCT GAT ACA TTC AAA -3' (JU1 フォワード; 配列番号:13)、
- ・ 5' - TAT GTC AAA AAT CAT GAA CCT CAT TAC T -3' (JU2 フォワード; 配列番号:14)、
- ・ 5' - CAT AAC AGC AAT TCA CAT AAA CCT C -3' (JU3 フォワード; 配列番号:15)、
- ・ 5' - GAC TGC GGA GGC TAA CT -3' (JU4 フォワード; 配列番号:16)、
- ・ 5' - ATC CCT TTA TGA AGC GGC -3' (JU5 フォワード; 配列番号:17)、および
- ・ 5' - TGA AAT GAA AGA CTG CGG AG -3' (MRSAダイレクトRE2 フォワード; 配列番号: 20 92)

からなる群より選択される核酸配列を含むまたは該核酸配列からなるプライマー、  
特にAR mec 11 フォワードまたはAR mec 12 フォワードまたはMRSAダイレクトRE2 フォワード、

特にMRSAダイレクトRE2 フォワード;

および/または

(ii)MRSAタイプRE3に特異的なプライマー、

特に、

- ・ 5' - GCA AGG TAT AAT CCA ATA TTT CAT ATA TGT -3' (AR mecA 3/1; 配列番号:18)
- 、
- ・ 5' - AGT TCC ATA ATC AAT ATA ATT TGT ACA GT -3' (AR mecA 3/2; 配列番号:19)、
- ・ 5' - ACA TCG TAT GAT ATT GCA AGG TA -3' (AR mecA3/3; 配列番号:20)、
- ・ 5' - CTT TCA TTC TTT CTT GAT TCC ATT AG -3' (AR mecA3/4; 配列番号:21)、
- ・ 5' - CAC TCT ATA AAC ATC GTA TGA TAT TGC -3' (AR mecA3/5; 配列番号:22)、
- ・ 5' - TTC TTA ATT TAA TTG TAG TTC CAT AAT CAA -3' (AR mecA 3/6; 配列番号:23)
- 、
- ・ 5' - AAT TAT ACA CAA CCT AAT TTT TAG TTT TAT -3' (AR mecA 3/7; 配列番号:24)、
- ・ 5' - AAT TTT TAG TTT TAT TTA TGA TAC GCT TC -3' (AR mecA 3/8; 配列番号:25)、
- ・ 5' - ACA CAA CCT AAT TTT TAG TTT TAT TTA TGA -3' (AR mecA 3/9; 配列番号:26)
- 、
- ・ 5' - TTT ATT AAA CAC TCT ATA AAC ATC GTA TGA -3' (AR mecA 3/10; 配列番号:27)、
- ・ 5' - CCA CAT CTC ATT AAA TTT TTA AAT TAT ACA C -3' (AR mecA3/13配列番号:28)
- 、および
- ・ 5' - CCA CAT CTC ATT AAA TTT TTA AAT TAT ACA C -3' (MRSAダイレクトRE3 フォワード; 配列番号:93)

からなる群より選択される核酸配列を含むまたは該核酸配列からなるプライマー、

特にAR mecA 3/8またはAR mecA 3/1またはMRSAダイレクトRE3 フォワード、

特にMRSAダイレクトRE3 フォワード;

および/または

(iii)MRSAタイプRE7に特異的なプライマー、

10

20

30

40

50

特に、

- ・ 5' - ATA TTA TAC ACA ATC CGT TTT TTA GTT TTA -3' (AR mec 5/1, 配列番号:29)、
- ・ 5' - ACA CAA TCC GTT TTT TAG TTT TAT TTA TG -3' (AR mec 5/2, 配列番号:30)、
- ・ 5' - TTC TAA TTT ATT TAA CAT AAA ATC AAT CCT -3' (AR mec5/3, 配列番号:31)、
- ・ 5' - CAA TCC TTT TTA TAT TTA AAA TAT ATT ATA CAC -3' (AR mec 5/16 配列番号:32)

2)、および

- ・ 5' - CAA TCC TTT TTA TAT TTA AAA TAT ATT ATA CAC -3' (MRSAダイレクトRE7 フォワード; 配列番号:94)

からなる群より選択される核酸配列を含むまたは該核酸配列からなるプライマー、

特にAR mec 5/2またはAR mec 5/16またはMRSAダイレクトRE7 フォワード、

特にMRSAダイレクトRE7 フォワード

を含み得る。

#### 【0036】

用語「プライマー」は、本明細書で当業者に公知のように使用され、鋳型依存性DNAポリメラーゼによってDNA合成を「プライムする」ことができる「オリゴマー化合物」から主に「オリゴヌクレオチド」だけでなく「修飾オリゴヌクレオチド」のことをいい、即ち、例えばオリゴヌクレオチドの3'末端は遊離3'-OH基を提供して、そこにさらなる「ヌクレオチド」が3' 5'ホスホジエステル結合を確立する鋳型依存性DNAポリメラーゼによって結合され得、そこでデオキシヌクレオシド三リン酸が使用され、ピロリン酸が放出される。従って、意図される機能を除いて、本発明による「プライマー」、「オリゴヌクレオチド」または「プローブ」の間で基本的な違いはない。

#### 【0037】

本発明のさらにより好ましい態様において、一組のプライマーが、MRSAタイプRE2に特異的なプライマー、MRSAタイプRE3に特異的なプライマーおよびMRSAタイプRE7に特異的なプライマーを含むまたは該プライマーからなり、特にMRSAタイプRE2用プライマー、MRSAタイプRE3用プライマーおよびMRSAタイプRE7用プライマーが、配列番号:1~17および92、配列番号:18~28および93ならびに配列番号:29~32および94それぞれの配列から選択される核酸配列を含むまたは該核酸配列からなり、特にMRSAタイプRE2用プライマー、MRSAタイプRE3用プライマーおよびMRSAタイプRE7用プライマーが、配列番号:11、配列番号:25および配列番号:30それぞれの核酸配列を含むまたは該核酸配列からなり、あるいは好ましくは特にMRSAタイプRE2用プライマー、MRSAタイプRE3用プライマーおよびMRSAタイプRE7用プライマーが、配列番号:12、配列番号:28および配列番号:32それぞれの核酸配列を含むまたは該核酸配列からなり、より好ましくはMRSAタイプRE2用プライマー、MRSAタイプRE3用プライマーおよびMRSAタイプRE7用プライマーが、配列番号:92、配列番号:93および配列番号:94それぞれの核酸配列を含むまたは該核酸配列からなる。

#### 【0038】

本発明の別の好ましい態様において、一組のプライマーが、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)およびメチシリン感受性黄色ブドウ球菌(MSSA)に特異的なさらなるプライマー(MRSA/MSSA用プライマー)をさらに含む。かかるプライマーの例は、

- ・ 5' - AGG AAA GAT GCT ATC TTC CGA -3' (AR mec 1 リバース, 配列番号:33)、
- ・ 5' - GAA AGA TGC TAT CTT CCG AAG -3' (AR mec 2 リバース, 配列番号:34)、
- ・ 5' - GAT GCT ATC TTC CGA AGG -3' (AR mec 3 リバース, 配列番号:35)、
- ・ 5' - GTC ATT ACA TTA GAA ATA CAA GGA AAG AT -3' (AR mec 4 リバース, 配列番号:36)、
- ・ 5' - GCC AAC GAA TAC TAG CC -3' (AR mec 5 リバース, 配列番号:37)、
- ・ 5' - ACG AAT ACT AGC CAA AAT TAA ACC -3' (AR mec6-2 リバース, 配列番号:38)、
- ・ 5' - CAC AAT CCA CAG TCA TTA CAT TAG A -3' (AR mec7 リバース, 配列番号:39)、
- ・ 5' - CAA GGA AAG ATG CTA TCT TCC G -3' (JU1 リバース, 配列番号:40)、
- ・ 5' - AGT CAT TAC ATT AGA AAT ACA AGG AAA GA -3' (JU2 リバース, 配列番号:41)、
- ・ 5' - AGGAAAGATGCTATCTTCCGA -3' (JU3 リバース, 配列番号:42)、

- ・ 5' - AGG AAA GAT GCT ATC TTC CGA -3' (JU4 リバース, 配列番号:43)、
  - ・ 5' - ACA ATC CAC AGT CAT TAC ATT AGA A -3' (JU5 リバース, 配列番号:44)、および
  - ・ 5' - CAA GGA AAG ATG CTA TCT TCC G -3' (MRSAダイレクトリバース; 配列番号:95)
- からなる群より選択される核酸配列を含むまたは該核酸配列からなるプライマーの群より選択され、

特にAR mec 6-2 リバースまたはJU1 リバースまたはMRSAダイレクトリバース、  
特にMRSAダイレクトリバースである。

#### 【 0 0 3 9 】

先に詳述されるように、本発明の目的は、MRSAの検出のための非常に信頼できるツールを提供することである。本発明の方法の失敗のしやすさを減らすために、方法に使用されるプライマー数が制限され得る。従って、本発明のさらに好ましい態様において、一組のプライマーが最大5個、好ましくは最大3個または4個のプライマーからなる。かかる組の例は、

- ・ MRSAタイプRE2に特異的なプライマー、MRSAタイプRE3に特異的なプライマー、およびMRSAタイプRE7に特異的なプライマー、特にここで1個、2個または3個のプライマーが配列番号:1~32および92~94の核酸から選択される、

- ・ MRSAタイプRE2に特異的なプライマー、MRSAタイプRE3に特異的なプライマー、MRSAタイプRE7に特異的なプライマー、ならびにMRSAおよびMSSAに特異的なプライマー(MRSA/MSSA用プライマー)、特にここで1個、2個、3個または4個のプライマーが配列番号:1~44および92~95の核酸から選択される、

- ・ AR mec 11 フォワード、AR mecA 3/8およびAR mec 5/2ならびに任意にリバースプライマー、

- ・ AR mec 12 フォワード、AR mecA 3/13およびAR mec 5/16ならびに任意にリバースプライマー、

- ・ AR mec 11 フォワード、AR mecA 3/8、AR mec 5/2およびAR mec 6-2 リバース、

- ・ AR mec 12 フォワード、AR mecA 3/13、AR mec 5/16およびJU1 リバース、

- ・ MRSAダイレクトRE2 フォワード、MRSAダイレクトRE3 フォワードおよびMRSAダイレクトRE7 フォワードならびに任意にリバースプライマー、あるいは

- ・ MRSAダイレクトRE2 フォワード、MRSAダイレクトRE3 フォワード、MRSAダイレクトRE7 フォワードおよびMRSAダイレクトリバース

である。

#### 【 0 0 4 0 】

本発明の別の態様において、RE2用、RE3用、RE7用および/またはMRSA/MSSA用プライマーは、配列番号:1~44または92~95のプライマーのいずれかの機能活性バリエーションを含むまたは該バリエーションからなり、任意に先に詳述した特定のプライマーの好ましい組み合わせのいずれかを含む。

#### 【 0 0 4 1 】

配列番号:1~44または92~95のプライマーのいずれかの機能活性バリエーションは、本発明の方法においてプライマーを使用することによって同定され得る。配列番号:1~44または92~95のいずれかのプライマーの機能活性バリエーションは、配列番号:1~44または92~95のそれぞれの配列と比べて、本発明の方法またはキットにおいて同等または高い特異性および感度を提供するプライマーに関する。

#### 【 0 0 4 2 】

所定のクラスに関して二値分類試験における用語「特異性」は、試験が当該クラスに属さない事例を正しく分類する確率である。つまり、特異性は、集団における全ての陰性事例のうちの真陰性の割合である。特異性は、試験のパラメーターである。本例において、MRSAの検出についてMRSAが存在するかどうかを決定するために、MRSAの存在に対する特異性は、MRSAが存在しない場合に試験が陰性である確率である。

#### 【 0 0 4 3 】

10

20

30

40

$$\text{特異性} = \frac{\text{真陰性の数}}{\text{真陰性の数} + \text{偽陽性の数}}$$

## 【 0 0 4 4 】

従って、100%の特異性は、試験が全てのMRSA陽性試料をMRSA陽性として認識することを意味する。

## 【 0 0 4 5 】

本発明の状況において同様な特異性は、プライマー(バリエーションおよび変異なしのそれぞれのプライマー)が本発明の方法、好ましくは実施例3に記載される方法で試験される場合、それぞれのプライマーのものよりも最大10%、好ましくは最大5%、より好ましくは最大4%、3%、2%または1%小さい特異性に関する。

10

## 【 0 0 4 6 】

所定のクラスに関して二値分類試験における用語「感度」は、試験が当該クラスに属する事例を正しく分類する確率である。つまり、感度は集団における全ての陽性事例のうちの真陽性の割合である。感度は、試験のパラメータである。本例において、MRSAの検出についてMRSAが存在するかどうかを決定するために、MRSAの存在に対する感度は、MRSAが存在する場合に試験が陽性である確率である。

## 【 0 0 4 7 】

20

$$\text{感度} = \frac{\text{真陽性の数}}{\text{真陽性の数} + \text{偽陰性の数}}$$

## 【 0 0 4 8 】

100%の感度は、試験がこのように全ての病気の人々を認識することを意味する。常に、陽性な全ての試験事例を分類することによって100%感度を達成する自明な試験を構築することができる。

## 【 0 0 4 9 】

本発明の状況において同様な感度は、プライマー(バリエーションおよび変異なしのそれぞれのプライマー)が、本発明の方法、好ましくは実施例3に記載される方法で試験される場合、それぞれのプライマーのものよりも最大10%、好ましくは最大5%、より好ましくは最大4%、3%、2%または1%小さい感度に関する。

30

## 【 0 0 5 0 】

好ましい態様において、プライマーが、配列番号:1~44または92~95のプライマーのいずれかの機能活性バリエーションを含むまたは該バリエーションからなり、

(a) 機能活性バリエーションが、配列番号:1~44または92~95のプライマーの機能活性部分であり、該部分が、配列番号:1~44または92~95の配列のいずれかの少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%、最も好ましくは少なくとも95%を含む;

(b) 機能活性バリエーションが、配列番号:1~44または92~95の配列のいずれかと少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%、最も好ましくは少なくとも95%の配列同一性を有する機能活性バリエーションである;

40

(c) 機能活性バリエーションが、配列番号:1~44または92~95のプロープであり、少なくとも1つの化学修飾核酸を含む; および / または

(d) 機能活性バリエーションが、配列番号:1~44または92~95の配列のいずれかあるいは(a)、(b)および / または(c)の機能活性バリエーションに相補的な機能活性バリエーションである。

## 【 0 0 5 1 】

プライマーの一部は、(5'末端および / または3'末端での)ヌクレオチドの末端欠失によって得られ得る。配列同一性が配列アライメントによって決定され得る。比較のための配列のアライメントの方法は当該技術分野で周知である。様々なプログラムおよびアラ

50

イメントアルゴリズムが、例えばSmithおよびWaterman, Adv. Appl. Math. 2: 482, 1981 またはPearsonおよびLipman, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85: 2444-2448, 1988に記載されている。

【0052】

NCBIベーシック局所アライメント検索ツール(BLAST)(Altschulら, J. Mol. Biol. 215: 403-410, 1990)がいくつかの供給元、例えばNational Center for Biotechnology Information(NCBI, Bethesda, MD)から利用可能であり、インターネット上で、配列分析プログラムblastp、blastn、blastx、tblastnおよびtblastxと共に使用する。配列番号:1~44または92~95の配列のいずれかのプライマーのバリエーションは、典型的にNCBI Blast 2.xを用いて特徴付けされる。

10

【0053】

バリエーションは、例えば1つ以上のヌクレオチド付加、欠失または置換によって、特に配列番号:1~44または92~95のそれぞれの配列の5'末端および/または3'末端での1つ以上のヌクレオチド付加、欠失または置換によって配列番号:1~44または92~95の配列から変換し得る。

【0054】

先に詳述したように、プライマー(および/またはプローブ)が化学修飾され得、即ち、プライマーおよび/またはプローブは修飾ヌクレオチドまたは非ヌクレオチド化合物を含む。その上、プローブ(またはプライマー)は修飾オリゴヌクレオチドである。「修飾ヌクレオチド」(または「ヌクレオチドアナログ」)は、いくつかの修飾によって天然「ヌクレオチド」と異なるが、それでも塩基、ペントフラノシル糖、リン酸部分、塩基同等物、ペントフラノシル糖同等物およびリン酸同等物部分またはそれらの組み合わせからなる。例えば、「標識」は、「ヌクレオチド」の塩基部分に結合され得、それによって「修飾ヌクレオチド」が得られる。「ヌクレオチド」の天然塩基はまた、例えば7-デアザプリンによって置換され得、それによって「修飾ヌクレオチド」が同様に得られる。用語「修飾ヌクレオチド」または「ヌクレオチドアナログ」は、本願で相互交換可能に使用される。「修飾ヌクレオチド」(または「ヌクレオチドアナログ」)は、「修飾ヌクレオチド」(または「ヌクレオチドアナログ」)について先に概説した様式でいくつかの修飾によって天然ヌクレオチドと異なっている。

20

【0055】

「修飾オリゴヌクレオチド」(または「オリゴヌクレオチドアナログ」)は、「オリゴマー化合物」の別の特定サブグループに属し、「単量体単位」として1つ以上の「ヌクレオチド」、1つ以上の「非ヌクレオチド化合物」または「修飾ヌクレオチド」を有する。従って、用語「修飾オリゴヌクレオチド」(または「オリゴヌクレオチドアナログ」)とは、「オリゴヌクレオチド」と実質的に同様な様式で機能する構造のことをいい、本願を通じて相互交換可能に使用される。合成の観点から、「修飾オリゴヌクレオチド」(または「オリゴヌクレオチドアナログ」)は、例えばリン酸骨格、リボース単位またはヌクレオチド塩基の適切な修飾による「オリゴヌクレオチド」の化学修飾によって作製され得る(UhlmannおよびPeyman, Chemical Reviews 90 (1990) 543; Verma S.,およびEckstein F., Annu. Rev. Biochem. 67 (1998) 99-134)。代表的な修飾としては、ホスホジエステルヌクレオチド間結合の代わりにホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、メチルホスホネート、ホスホトリエステルまたはホスホルアミデートヌクレオチド間結合;天然プリンおよびピリミジン塩基の代わりにデアザまたはアザプリンおよびピリミジン、5位または6位で置換基を有するピリミジン塩基; 2位、6位もしくは8位または7-デアザプリンとして7位に改変置換基を有するプリン塩基;例えば2位に置換基を有する糖;または炭素環式もしくは非環式糖アナログが挙げられる。本発明の精神と一致した他の修飾が当業者に公知である。かかる「修飾オリゴヌクレオチド」(または「オリゴヌクレオチドアナログ」)は、天然「オリゴヌクレオチド」(または天然物に沿った合成「オリゴヌクレオチド」)と構造的に異なっても機能的に相互交換可能であるものとして最も記載されている。より詳細には、例示的修飾がVerma S.,およびEckstein F., Annu. Rev. Biochem. 67 (1998) 99-134ま

30

40

50

たはWO 02/12263に開示されている。また、ヌクレオシド単位がヌクレオシド間リン酸または糖リン酸結合を置換する基を介して結合される修飾が作製され得る。かかる結合としては、Verma S., およびEckstein F., Annu. Rev. Biochem. 67 (1998) 99-134に開示されるものが挙げられる。リン酸結合以外がヌクレオシド単位と結合するように利用される場合、かかる構造は、「オリゴヌクレオシド」としても記載されている。

#### 【0056】

しかし、MRSAをコードする核酸分子、例えばRE2、RE3またはRE7の一部の代替部分をコードする核酸を増幅する代替プライマーは、例えば、OLIGO(Molecular Biology Insights Inc., Cascade, CO)等のコンピュタープログラムを用いて設計され得る。増幅プライマーとして使用されるオリゴヌクレオチドを設計する場合の重要な特徴としては、限定されないが、(例えば、電気泳動による)検出を容易にする適切なサイズの増幅産物、一組のプライマーの各部のための同じ融解温度、および各プライマーの長さ(即ち、プライマーは、配列特異性でアニーリングし、合成を開始するほど十分に長い、忠実度がオリゴヌクレオチド合成中に減少するほど長くはない必要がある)が挙げられる。典型的に、オリゴヌクレオチドプライマーは、8~50ヌクレオチド長(例えば8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、または50ヌクレオチド長)である。

#### 【0057】

MRSAの様々なサブタイプのSCCmecの配列が一般に利用可能であり、例えばNCBI(National Center for Biotechnology Information)のヌクレオチドデータベースにある(例えば、タイプIブドウ球菌カセット染色体mecについてAB033763: 菌株NCTC10442; タイプIIブドウ球菌カセット染色体mecについてD86934: 菌株N315; AB047089, タイプIIIブドウ球菌カセット染色体mecの右末端および隣接する染色体領域: 菌株85/3907; タイプIV.1(IVa)ブドウ球菌カセット染色体mecについてAB063172: 菌株CA05(JCSC1968); またはAB121219タイプVブドウ球菌カセット染色体mec: 菌株JCSC3624(WIS)を参照)。

#### 【0058】

「RE2に特異的なプライマー」または「RE3に特異的なプライマー」または「RE7に特異的なプライマー」は、本明細書で使用される場合、RE2またはRE3またはRE7のそれぞれをコードする核酸配列にアニーリングし、適切な条件下で合成を開始するオリゴヌクレオチドプライマーのことをいう。

#### 【0059】

一組のプライマーの他に、本発明の方法は、MRSAの存在または非存在を検出するために一組のプロープを使用する。用語「プロープ」とは、合成または生物学的に製造された核酸(DNAまたはRNA)のことをいい、設計または選択によって、定義された所定のストリンジェンシー下で「標的核酸」、本例でMRSA(標的)核酸に特異的に(即ち、優先的に)ハイブリダイズすることができる特定のヌクレオチド配列を含むものである。「プロープ」は、標的核酸を検出することを意味する「検出プロープ」として同定され得る。

#### 【0060】

本発明の好ましい態様において、一組のプロープの少なくとも1つのプロープが、蛍光部分ならびに

- ・ 5'- AAG TCG CTT TGC CTT TGG GTC A -3' (AR mecFluo 1 標識なし; 配列番号:45)、
- ・ 5'- TAC AAA GTC GCT TTG CCT TTG GGT CA -3' (AR mecFluo 2 標識なし; 配列番号:46)、
- ・ 5'- GGC CGT TTG ATC CGC CAA T -3' (AR mecFluo 3 標識なし; 配列番号:47)、
- ・ 5'- AAG TCG CTT TGC CCT TGG GTA -3' (AR mecFluo 4 標識なし; 配列番号:48)、
- ・ 5'- AAG TCG CTT TGC CCT TGG GT -3' (AR mecFluo 4-2 標識なし; 配列番号:49)、
- ・ 5'- AAG TCG CTT TGC CCT TGG GTC A -3' (AR mecFluo 4-3 標識なし; 配列番号:50)、
- ・ 5'- AAG TCG CTT TGC CCT TGG G -3' (AR mecFluo 4-GV 標識なし; 配列番号:51)、
- ・ 5'-CAA GAA TTG AAC CAA CGC AT -3' (AR mecFluo 4k 標識なし; 配列番号:52)、

- ・ 5' - CAA TGA CGA ATA CAT AGT CGC TTT GCC CTT -3' (AR mec Fluo 5 標識なし; 配列番号:53)、
- ・ 5' - CGT TTG ATC CGC CAA TGA CGA -3' (AR mecFluo 6 標識なし; 配列番号:54)、
- ・ 5' - GCC AAT CCT TCG GAA GAT AGC A -3' (AR mecFluo 7 標識なし; 配列番号:55)
- 、
- ・ 5' - ATT AAC ACA ACC CGC ATC -3' (AR mecFluo UR 標識なし; 配列番号:56)、
- ・ 5' - GTC GCT TTG CCC TTG GGT C -3' JU1 プローブ 1 標識なし; 配列番号:57)、
- ・ 5' - TCG CTT TGC CCT TGG GTC AT -3' JU2 プローブ 1 標識なし; 配列番号:58)、
- ・ 5' - GGC CGT TTG ATC CGC CAA T -3' JU3 プローブ 1 標識なし; 配列番号:59)、
- ・ 5' - GTC CTT GTG CAG GCC GTT TGA T -3' JU4 プローブ1 標識なし; 配列番号:60)、
- ・ 5' - CTT GGG TCA TGC GTT GGT TCA ATT -3' JU5 プローブ1 標識なし; 配列番号:61)
- 、
- ・ 5' - CGA ATA CAA AGT CGC TTT GCC CTT GGG -3' (AR mec640 3 標識なし; 配列番号:62)、
- ・ 5' - ATG CGT TGG TTC AAT TCT TG -3' (AR mec640 4 標識なし; 配列番号:63)、
- ・ 5' - GCG TTG GTT CAA TTC TTG GG -3' (AR mec610 4-3 標識なし; 配列番号:64)、
- ・ 5' - ACC CAA GGG CAA AGC GAC TT -3' (AR mec640 4k 標識なし; 配列番号:65)、
- ・ 5' - GGT AAT GCG TTG GTT CAA TTC TTG -3' (AR mec640 5 標識なし; 配列番号:66)
- 、
- ・ 5' - ACA AAG TCG CTA TGC CCT TGG GTC A -3' (AR mec640 6 標識なし; 配列番号:67)、
- ・ 5' - CTT TCC TTG TAT TTC TAA TGT AAT GAC TG -3' (AR mec 640 7標識なし; 配列番号:68)、
- ・ 5' - TTG ATG TGG GAA TGT CAT TTT GCT GAA -3' (AR mec640 UR 標識なし; 配列番号:69)、
- ・ 5' - GCG TTG GTT CAA TTC TTG GGC CAA T -3' JU1 プローブ 2 標識なし; 配列番号:70)、
- ・ 5' - GTT GGT TCA ATT CTT GGG CCA ATC CTT CG -3' JU2 プローブ 2 標識なし; 配列番号:71)、
- ・ 5' - CGA ATA CAA AGT CGC TTT GCC CTT GG -3' JU3 プローブ 2 標識なし; 配列番号:72)、
- ・ 5' - GCC AAT GAC GAA TAC AAA GTC GCT TTG CC -3' JU4 プローブ2 標識なし; 配列番号:73)、
- ・ 5' - TGG GCC AAT CCT TCG GAA GAT AGC A -3' JU5 プローブ2 標識なし; 配列番号:74)、
- ・ 5' - ATG CGT TGG TTC GAT TCT TG -3' (AR mec610 4-MM2 標識なし; 配列番号:75)
- 、
- ・ 5' - CAT GCG TTG GTT CGA TTC TTG -3' (AR mec610 4-MM2-GV 標識なし; 配列番号:76)、
- ・ 5' - AAG TCG CTT TGC CCT TGG G -3' (MRSAダイレクトFluos 標識なし; 配列番号:96)、および
- ・ 5' - CAT GCG TTG GTT CGA TTC TTG -3' (MRSAダイレクトRed 610 標識なし; 配列番号:97)

からなる群より選択される核酸配列、

特にAR mec Fluo 4標識なしおよび/またはAR mec 610 4-MM2標識なし

または特にAR mec Fluo 4-GV標識なしおよび/またはAR mec 610 4-MM2-GV標識なし

または特にMRSAダイレクトFluos標識なしおよび/またはMRSAダイレクトRed 610標識なし

、

好ましくはMRSAダイレクトFluos標識なしおよび/またはMRSAダイレクトRed 610標識なし

、

10

20

30

40

50



より好ましくはMRSAダイレクトFluos標識なしおよびMRSAダイレクトRed 610標識なしを含むまたはこれらからなる。

【0061】

好ましくは、第一プローブは、蛍光部分および配列番号:48の核酸配列を含むまたはこれらからなり、第二プローブは、蛍光部分および配列番号:75の核酸配列を含むまたはこれらからなり、あるいはその逆である。好ましくは、第一プローブは、蛍光部分および配列番号:51の核酸配列を含むまたはこれらからなり、第二プローブは、蛍光部分および配列番号:76の核酸配列を含むまたはこれらからなり、あるいはその逆である。好ましくは、第一プローブは、蛍光部分および配列番号:96の核酸配列を含むまたはこれらからなり、第二プローブは、蛍光部分および配列番号:97の核酸配列を含むまたはこれらからなり、あるいはその逆である。本発明によれば、一組のMRSAプローブの第一MRSAプローブが、ドナー蛍光部分で標識され、一組のMRSAプローブの第二MRSAプローブが、対応するアクセプター蛍光部分で標識される。適切で好ましい標識の例が、以下に列挙され、各プローブはいずれかの標識で標識され得る。しかし、好ましいプローブの組は一組であり、第一標識を含む第一プローブがフルオレセイン-5' - AAG TCG CTT TGC CCT TGG GTA -3' (AR mec Fluo 4)であり、第二標識を含む第二プローブがLC-Red 610-5' - ATG CGT TGG TTC GAT TCT TG -3' (AR mec 610 4-MM2)である。代替的で好ましいプローブの組は一組であり、第一標識を含む第一プローブがフルオレセイン-5' - AAG TCG CTT TGC CCT TGG G -3' (AR mecFluo 4-GV)であり、第二標識を含む第二プローブがLC-Red 610-5' - CAT GCG TTG G TT CGA TTC TTG -3' (AR mec 610 4-MM2-GV)である。さらにより好ましいプローブの組は一組であり、第一標識を含む第一プローブが5' - AAG TCG CTT TGC CCT TGG G -3' -フルオレセイン(MRSAダイレクトFluos)であり、第二標識を含む第二プローブがLC-Red 610-5' - CAT GCG TTG GTT CGA TTC TTG -3' (MRSAダイレクトRed 610)である。

【0062】

別の好ましい態様において、プローブが、蛍光部分および配列番号:45~76、96または97のプローブのいずれかの機能活性バリエーションを含むまたはこれらからなり、特に

(a) 機能活性バリエーションが、配列番号:45~76、96または97の配列のいずれかのプローブの機能活性バリエーションであり、該部分が、配列番号:45~76、96または97の配列のいずれかの少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%、最も好ましくは少なくとも95%を含む；

(b) 機能活性バリエーションが、配列番号:45~76、96または97の配列のいずれかと少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%、最も好ましくは少なくとも95%の配列同一性を有する機能活性バリエーションである；

(c) 機能活性バリエーションが、配列番号:45~76、96または97のプローブであり、少なくとも1つの化学修飾核酸を含む；および/または

(d) 機能活性バリエーションが、配列番号:45~76、96または97の配列のいずれかあるいは(a)、(b)および/または(c)の機能活性バリエーションに相補的な機能活性バリエーションである。

【0063】

これらのプローブのいずれかの機能活性バリエーションは、本発明の方法においてバリエーションおよびそれぞれのプローブを用いることによって同定され得る。配列番号:45~76、96または97のいずれかを含むプローブの機能活性バリエーションは、配列番号:45~76、96または97のそれぞれの配列と同等またはより高い特異性および感度を有するプローブに関する。用語「特異性」および「感度」は、プライマーについて先に定義した通りであり、プライマーのバリエーションについて詳述した通りに決定され得る。

【0064】

プローブの一部分は、(5'末端および/または3'末端での)ヌクレオチドの末端欠失によって得られ得る。配列同一性は配列アライメントによって決定され得る。比較のための配列のアライメントの方法が当該技術分野で周知である。様々なプログラムおよびアライメントアルゴリズムが、例えばSmithおよびWaterman, Adv. Appl. Math. 2: 482, 1981ま

たはPearsonおよびLipman, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85: 2444-2448, 1988に記載されている。

【 0 0 6 5 】

NCBIベーシック局所アライメント検索ツール(BLAST)(Altschulら, J. Mol. Biol. 215: 403-410, 1990)は、いくつかの供給元、例えばNational Center for Biotechnology Information(NCBI, Bethesda, MD)から入手可能であり、インターネット上で配列分析プログラムblastp、blastn、blastx、tblastnおよびtblastxと共に使用される。配列番号:45~76、96または97の配列のいずれかを含むプローブのバリエーションは、典型的にNCBI Blast 2.xを用いて特徴付けされる。

【 0 0 6 6 】

バリエーションは、例えば1つ以上のヌクレオチド付加、欠失または置換によって、特に配列番号:45~76、96または97のそれぞれの配列の5'末端および/または3'末端での1つ以上のヌクレオチド付加、欠失または置換によって配列番号:45~76、96または97の配列から変化し得る。

【 0 0 6 7 】

また、これらのことは、プライマーのバリエーションに関する上記説明を参照して、プローブのバリエーションに類似して適用され得る。

【 0 0 6 8 】

本発明のさらにより好ましい態様において、一組のプライマーが、

a) AR mec 11 フォワード、AR mecA 3/8、AR mec 5/2および任意にAR mec 6-2 リバース、ここで第一プローブがフルオレセイン-5' - AAG TCG CTT TGC CCT TGG GTA -3' (AR mecFluo 4)であり、第二プローブがLC-Red 610-5' - ATG CGT TGG TTC GAT TCT TG -3' (AR mec 610 4-MM2)である、または

b) AR mec 12 フォワード、AR mecA 3/13、AR mec 5/16および任意にJU1 リバース、ここで第一プローブがフルオレセイン-5' - AAG TCG CTT TGC CCT TGG G -3' (AR mec Fluo 4-GV)であり、第二プローブがLC-Red 610-5' - CAT GCG TTG GTT CGA TTC TTG -3' (AR mec610 4-MM2-GV)である、または

c) MRSAダイレクトRE2 フォワード、MRSAダイレクトRE3 フォワード、MRSAダイレクトRE7 フォワードおよび任意にMRSAダイレクトリバース、ここで第一標識が5' - AAG TCG CTT TGC CCT TGG G -3' -フルオレセイン(MRSAダイレクトFluos)であり、第二プローブがLC-Red 610-5' - CAT GCG TTG GTT CGA TTC TTG -3' (MRSAダイレクトRed 610)であるを含むまたはこれらからなる。

【 0 0 6 9 】

(ハイブリダイゼーション)プローブとして使用されるオリゴヌクレオチドの設計は、プライマーの設計と同様な様式で行われ得るが、一組のプローブの各部は、好ましくは蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)が(例えば、互いに1ヌクレオチド、2ヌクレオチド、3ヌクレオチド、または4ヌクレオチド以下の範囲で)生じ得るように、同じ鎖上で互いに5ヌクレオチド以下の範囲で増幅産物にアニーリングする。この最小の程度の分離は典型的に、FRETが生じるようにそれぞれの蛍光部分を十分に近接させる(以下参照)。しかし、他の分離距離(例えば、6ヌクレオチド以上)は、FRETが生じ得るように蛍光部分が(例えば、リンカーアームを含む)互いに関して適切に位置することを条件として、可能であることが理解される。また、プローブは変異または多形を含む標的にハイブリダイズするように設計され得、それによって区別される特定のMRSAサブタイプそれぞれに対応する異なる組のプローブの絶対的なハイブリダイゼーションまたは例えば一組のプローブの各部とMRSAから生じた増幅産物それぞれとの間での特異な融解温度のいずれかに基づいたMRSAの特異な検出を可能にする。オリゴヌクレオチドプライマーに関して、オリゴヌクレオチドプローブは通常、同様な融解温度を有し、各プローブの長さは生じる配列特異的ハイブリダイゼーションに十分である必要があるが、忠実度が合成中に低下するほど長くないことが必要である。オリゴヌクレオチドプローブは、8~50ヌクレオチド長(例えば8、10、12、14、16、18

10

20

30

40

50

、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、または50ヌクレオチド長)である。

【0070】

本発明は、試料中のMRSAの存在または非存在を検出する方法を提供する。本発明によって提供される方法は、試料汚染、偽陰性および偽陽性の問題を回避する。該方法は、少なくとも1つの増幅工程および少なくとも1つのハイブリダイズ工程を行なうことを含む。増幅工程は、試料と適切な一組のプライマーとを接触させてMRSA核酸分子が試料中に存在する場合に増幅産物を生成することを含む。各プライマーは、増幅産物の少なくとも一部がそれぞれのMRSA核酸に対応する核酸配列を含むように、一組のプライマーがMRSAタイプI~Vの検出を可能にするように選択され、MRSA標的核酸分子内の標的にアニーリングする。ハイブリダイズ工程は、試料と一組のMRSAプローブとを接触させることを含む。一般的に、一組のMRSAプローブの各部は、互いに5ヌクレオチド以下の範囲で適切な増幅産物にハイブリダイズする。本発明によれば、一組のMRSAプローブの第一MRSAプローブがドナー蛍光部分で標識され、一組のMRSAプローブの第二MRSAプローブが対応するアクセプター蛍光部分で標識される。該方法は、第一MRSAプローブのドナー蛍光部分と第二MRSAプローブの対応するアクセプター蛍光部分との間でFRETの存在または非存在を検出する工程をさらに含む。増幅およびハイブリダイゼーションの多数の工程が、好ましくは熱サイクラーで行われ得る。

10

【0071】

本明細書で使用されるように、「増幅」とは、鋳型核酸(例えば、MRSA核酸分子)の1つまたは両方の鎖に相補的な核酸分子を合成するプロセスのことをいう。核酸分子の増幅は、典型的に、鋳型核酸を変性すること、プライマーの融解温度以下の温度でプライマーを鋳型核酸にアニーリングさせること、およびプライマーから酵素伸長して増幅産物を生成することを含む。変性、アニーリングおよび伸長段階のそれぞれが一回で行われ得る。しかし、一般的に、指数関数増幅は本発明の方法では必要とされないが、変性、アニーリングおよび伸長段階が、増幅産物の量がしばしば指数関数的に増加するように複数回行なわれる。増幅は、典型的に、デオキシリボヌクレオシド三リン酸、DNAポリメラーゼ酵素(例えば、Taqポリメラーゼ)および適切なバッファおよび/またはポリメラーゼ酵素の最適活性のための補因子(例えば、 $MgCl_2$ および/またはKCl)の存在を必要とする。

20

【0072】

MRSA核酸の増幅が生じて増幅産物が生成される場合に、ハイブリダイズ工程によって、一組のプローブの各部の間でのFRETに基づいた検出可能なシグナルがもたらされる。本明細書で使用されるように、「ハイブリダイズ」とは、増幅産物に対するプローブのアニーリングのことをいう。ハイブリダイゼーション条件には、典型的に、プローブの融解温度以下であるがプローブの非特異的ハイブリダイゼーションを回避する温度が含まれる。

30

【0073】

本発明の方法において、MRSAの存在または非存在は、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)を用いて検出される(例えば、米国特許第4,996,143号、第5,565,322号、第5,849,489号、および第6,162,603号を参照)。FRETは、2つの分子、本例で2つのプローブ間での相互作用を測定するための技術である。この技術において、2つの異なる蛍光分子(フルオロフォアまたは標識)は、MRSAの検出に適切な一組のプローブに遺伝子上で融合される。

40

【0074】

共鳴エネルギー移動は、エネルギーが1つの分子から別の分子へと直接移動する機構である。FRETの原理は、2つの標識の合わされた特徴に基づく。標識が特定の波長(吸収周波数)の光で励起される場合、異なる波長(放出周波数)でエネルギーを再放出する。FRETでは、第一標識は励起され、次に放出波長を有する光を放出する。第一標識(ドナー)の放出ピークは第二標識(アクセプター)の励起ピークと重複する場合、第一標識がエネルギーを第二標識に移し、第二標識が自己の放出周波数で光を放出するために、2つの標識の近接が測定され得る。正味の結果は、(代わりに光として放射するエネルギーのいくつかがアクセプターに移されるために)ドナーが通常放出するよりも低いエネルギーを放出し、(ド

50

ナーフルオロフォアからの外部エネルギー入力を得るために)アクセプターは励起周波数で大きな光エネルギーを放出することになる。

【0075】

FRET技術の利点は、優れた解像度を有することである。(非放射性的)ドナーとアクセプターとの間のFRETエネルギー移動の物理学特性は、効率が分子間距離の6乗に関して低下するようなものである。従って、FRETは、一般的に、2つのフルオロフォアが互いに20~100 (0.002~0.01  $\mu\text{m}$ )の範囲に存在する場合に生じ、フルオロフォアがかなり密接にならなければならないことを意味する。

【0076】

本明細書で使用されるように、それぞれが蛍光部分を含む2つのオリゴヌクレオチドプローブは、標的核酸配列、即ち、MRSA核酸に対するオリゴヌクレオチドプローブの相補性によって決定される特定の位置で増幅産物にハイブリダイズし得る。適切な位置での増幅産物に対するオリゴヌクレオチドプローブのハイブリダイゼーションの際に、FRETシグナルが生成される。好ましい態様において、一組のMRSAプローブ(検出プローブ)の各々が、5ヌクレオチド以下、4ヌクレオチド以下または3ヌクレオチド以下、特に互いに2ヌクレオチド以下、特に互いに1ヌクレオチド以下の範囲で増幅産物にハイブリダイズする。

【0077】

先に詳述したように、一組のプローブの各プローブは適切な標識/フルオロフォア/蛍光部分で標識される。「標識」とは、「レポーター基」、「フルオロフォア」または「蛍光部分」としばしば称されるが、一般的に他のものと区別できるように標的核酸を記し付けるまたは標識する基である(「標識」を結合した核酸は、標識された核酸結合化合物、標識されたプローブまたはただのプローブとも称され得る)。

【0078】

本明細書で使用されるように、「蛍光共鳴エネルギー移動関係」および同様な用語は、「ドナー蛍光標識」が「アクセプター蛍光標識」に共鳴エネルギーを移し得、「アクセプター蛍光標識」が測定可能な蛍光放出を生ずるように、「ドナー蛍光部分」で標識された「プローブ」と「アクセプター蛍光部分」で標識された別の「プローブ」の「標的核酸」に対する隣接ハイブリダイゼーションを示す。「ドナー蛍光標識」および「アクセプター蛍光標識」が非常に離れて位置する場合、「アクセプター蛍光標識」が測定可能な蛍光を放出するように、「ドナー蛍光標識」は「アクセプター蛍光標識」に共鳴エネルギーを移すことができず、従って、「ドナー蛍光標識」および「アクセプター蛍光標識」は共鳴エネルギー移動関係にない。

【0079】

適切な標識は当該技術分野で公知であり、当業者は両方のプローブのための標識の適切な組み合わせを選択することができる。ドナーおよび対応するアクセプター蛍光部分に関して本明細書で使用されるように、「対応する」とは、ドナー蛍光部分の励起スペクトルと重複する放出スペクトルを有するアクセプター蛍光部分のことをいう。しかし、両方のシグナルは互いに分離可能であるべきである。従って、アクセプター蛍光部分の放出スペクトルの最大波長は、好ましくはドナー蛍光部分の励起スペクトルの最大波長よりも少なくとも30nm、より好ましくは少なくとも50nm、例えば少なくとも80nm、少なくとも100nmまたは少なくとも140nm大きくあるべきである。従って、効率的な非放射性的エネルギー移動がそれらの間で生成され得る。

【0080】

ドナー蛍光部分および対応するアクセプター蛍光部分は、一般的に(a) 高効率フェルスターエネルギー移動; (b) 大きな最終ストークスシフト(>100 nm); (c) 可視スペクトルの赤部分(>600 nm)にできるだけ離れた放出シフト;および(d)ドナー励起波長での励起によって生じたラマンウォーター蛍光放出よりも高い波長への放出シフトについて選ばれる。例えば、レーザーライン(例えば、ヘリウム-カドミウム442 nmまたはアルゴン488 nm)に近い最大励起、高い吸光係数、高い量子率、および対応するアクセプター蛍光部分の励起スペクトルを含む蛍光放出の良好な重複を有するドナー蛍光部分が選ばれ得る。高い吸光

係数、高い量子率、ドナー蛍光部分の放出を含む励起の良好な重複、および可視スペクトルの赤部分(> 600 nm)での放出を有する対応するアクセプター蛍光部分が選ばれ得る。しかし、主な目的は互いに分離可能なシグナルを得ることである。

#### 【0081】

FRET技術における様々なアクセプター蛍光部分と共に使用され得る代表的なドナー蛍光部分としては、フルオレセイン、ルシファーイエロー、B-フィコ-エリトリン、9-アクリジンイソチオシアネート、ルシファーイエロー-VS、4-アセトアミド-4'-イソチオシアネートスチルベン-2,2'-ジスルホン酸、7-ジエチルアミノ-3-(4'-イソチオシアネートフェニル)-4-メチルクマリン、スクシンイミジル1-ピレンブチレート、および4-アセトアミド-4'-イソチオシアネートスチルベン-2,2'-ジスルホン酸誘導体が挙げられる。使用されるドナー蛍光部分に依存した、代表的なアクセプター蛍光部分としては、LC-Red 610、LC-Red 640、LC-Red 670、LC-Red 705、Cy5、Cy5.5、リサミンローダミン B スルホニルクロライド、テトラメチルローダミンイソチオシアネート、ローダミン x イソチオシアネート、エリトロシンイソチオシアネート、フルオレセイン、ジエチレントリアミンペンタアセテートまたはランタニドイオン(例えば、ユーロピウム、またはテルビウム)の他のキレートが挙げられる。ドナーおよびアクセプター蛍光部分は、例えばMolecular Probes(Junction City, OR)またはSigma Chemical Co. (St. Louis, MO)から得られ得る。

10

#### 【0082】

本発明による好ましい標識は、蛍光標識であり、例えば、フルオレセイン色素、ローダミン色素、シアニン色素、およびクマリン色素のような蛍光色素である。例えば、ドナー蛍光部分がフルオレセインであり得るおよび/またはアクセプター蛍光部分がLC-Red 610、LC-Red 640、LC-Red 670、LC-Red 705、Cy5、およびCy5.5からなる群より選択され得、好ましくはLC-Red 610またはLC-Red 640である。より好ましくは、ドナー蛍光部分はフルオレセインであり、アクセプター蛍光部分はLC-Red 640またはLC-Red 610である。

20

#### 【0083】

ドナー-アクセプターの組のフルオレセイン-ローダミンについて、470~490nmの励起フィルター、およびフルオレセインドナーからの光を回収するための500~520nmの放出フィルターを使用し得る。その上、ローダミンアクセプターからの光を回収するための600~650nmの放出フィルターを使用し得る。これらの放出フィルターは、2つの画像チャンネル間でのクロストークを回避するために、ドナーの短い波長範囲、およびアクセプターの長い放出尾部だけを回収する必要がある。つまり、ローダミンチャンネルでフルオレセイン放出を回収することを回避することが望まれ、逆も同様である。機能するFRETについて、ドナー放出およびアクセプター励起スペクトルは重複しなければならない(高い重複が良好である)が、良好な信号雑音比画像についてフィルターを介した「間違った」光子を回収することを回避しなければならないことが問題である。

30

#### 【0084】

ドナー蛍光部分およびアクセプター蛍光部分は、リンカーアームを介して適切なプローブオリゴヌクレオチドに結合され得る。各リンカーアームの長さは、リンカーアームがドナー蛍光部分とアクセプター蛍光部分との間の距離に影響を受けるので、重要であり得る。本発明の目的でリンカーアームの長さは、ヌクレオチド塩基から蛍光部分までのオンゲストロームの距離である。一般的に、リンカーアームは約10~約25である。リンカーアームはWO 84/03285に記載される種類であり得る。また、WO 84/03285は、特定のヌクレオチド塩基にリンカーアームを結合させる方法およびリンカーアームに蛍光部分を結合させる方法を開示している。

40

#### 【0085】

アクセプター蛍光部分、例えば、LC-Red 640(-NHS-エステル)、LC-Red 610(-NHS-エステル)またはLC-Red 670(-NHS-エステル)は、C6-ホスホルアミダイト(ABI (Foster City, CA)またはGlen Research(Sterling, VA)から入手可能)と結合されて、例えばLC-Red 640-ホスホルアミダイトが作製され得る。フルオレセインなどのドナー蛍光部分をオリゴヌクレオチドに結合するために頻度高く使用されるリンカーとしては、チオウレアリンカー(F

50

ITC-誘導体化、例えば、Glen ResearchまたはChemGene(Ashland, MA)製のフルオレセイン-CPG)、アミドリンカー(フルオレセイン-NHS-エステル-誘導体化、例えば、BioGenex(San Ramon, CA)製のフルオレセイン-CPG)、またはオリゴヌクレオチド合成後にフルオレセイン-NHS-エステルのカップリングに必要な3'-アミノ-CPGが挙げられる。

【0086】

本発明の一態様において、検出工程がドナー蛍光部分によって吸収される波長で試料を励起することおよび視覚化することおよび/またはアクセプター蛍光部分によって放出される波長を測定することを含む。好ましくは、検出工程がFRETの量を計ることを含む。蛍光分析は、例えば(適切な二色性鏡および特定の範囲で蛍光放出をモニタリングするためのフィルターを含む)光子計測エピ蛍光顕微鏡システム、光子計測光電子増倍管システムまたは蛍光計を用いて行うことができる。エネルギー移動を開始する励起は、アルゴンイオンレーザー、高強度水銀(Hg)アークランプ、光ファイバー光源、または所望の範囲の励起のために適切にフィルター化した他の高強度光源を用いて行われ得る。

【0087】

本発明の別の目的は、試料中のメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)の存在または非存在を検出する代替方法であって、

(a)試料と一組のMRSAプライマーとを接触させてMRSAが試料中に存在する場合に増幅産物を生成することを含む増幅段階を行なう工程、

(b)工程(a)の増幅産物とMRSAプローブとを接触させることを含むハイブリダイズ段階を行なう工程であって、MRSAプローブがドナー蛍光部分および対応するアクセプター蛍光部分で標識される工程；ならびに

(c)MRSAプローブのドナー蛍光部分とアクセプター蛍光部分との間で蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)の存在または非存在を検出する工程であって、FRETの非存在が試料中のMRSAの存在を示し、FRETの存在が試料中のMRSAの非存在を示す工程を含み、MRSAのブドウ球菌染色体カセット(SCCmec)タイプI~Vのそれぞれを検出することができる、方法に関する。

【0088】

FRET技術の一般的な形式は2つのハイブリダイゼーションプローブを利用し、各プローブは異なる蛍光部分で標識され得、一般的に標的DNA分子(例えば、増幅産物)において互いに密接に近接してハイブリダイズするように設計される(最初に記載された上記方法を参照)。しかし、代替的FRET形式は、増幅産物の存在または非存在、つまりMRSAの存在または非存在を検出する加水分解プローブ(本発明の第二方法)を利用する。この技術は、2つの蛍光部分で標識された1つの一本鎖ハイブリダイゼーションプローブを利用する。第一蛍光部分が適切な波長の光で励起される場合、吸収エネルギーがFRETの原理によって第二蛍光部分に移動する。第二蛍光部分は、一般的にクエンチャー分子である。PCR反応のアニーリング段階中に、標識された加水分解プローブは標的DNA(即ち、増幅産物)に結合し、続く伸長期に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分解される。結果として、励起された蛍光部分およびクエンチャー部分は、互いに空間的に分離される。結果として、クエンチャーの非存在下での第一蛍光部分の励起の際に、第一蛍光部分からの蛍光放出が検出され得る。実施例で、ABI PRISM(登録商標)7700 Sequence Detection System(Applied Biosystems, Foster City, CA)は、加水分解プローブ技術を使用し、MRSAを検出するための本明細書に記載の方法を行なうのに適切である。ABI PRISM(登録商標)7700 systemを用いたPCR増幅および検出についての情報は、<http://www.appliedbiosystems.com/products>に見ることができる。

【0089】

適切な加水分解プローブの例は、

TP mec 1: 5' - AAG TCG CTT TGC CCT TGG GTC AT -3' (配列番号:87)および

TP mec 2: 5' - TGC TCA ATT AAC ACA ACC CGC ATC A -3' (配列番号:88)

である。

【0090】

本発明の好ましい態様において、該方法は以下の特徴：

a) 一組のプライマーが、本発明の第一方法の状況で先に定義される通りであり、MRSAタイプRE2に特異的なプライマー、MRSAタイプRE3に特異的なプライマーおよびMRSAタイプRE7に特異的なプライマーを含むまたは該プライマーからなる

b) プローブが、好ましくは本発明の第一方法の状況で先に定義される2つの蛍光部分、および配列番号:45~76、96または97のいずれかの核酸配列あるいは本発明の第一方法の状況で定義されるその機能活性バリエーションを含むまたはこれからなる

c) 増幅段階で5' 3' エキソヌクレアーゼ活性を有するポリメラーゼ酵素が使用される

d) ドナー蛍光部分およびアクセプター蛍光部分がプローブ上で互いに5ヌクレオチド以下の範囲に存在する

e) プローブが二次構造形成を可能にする核酸配列を含み、該二次構造形成によってドナー蛍光部分とアクセプター蛍光部分との間で空間近接がもたらされる

f) アクセプター蛍光部分がクエンチャーである

の1つ以上によってさらに定義され得る。

#### 【0091】

また、FRETに関して分子ビーコンは、本発明のリアルタイムPCR法(本発明の代替第二方法)を用いて増幅産物の存在を検出するために使用され得る。分子ビーコン技術は、第一蛍光部分および第二蛍光部分で標識されたハイブリダイゼーションを使用する。第二蛍光部分は、一般的にクエンチャーであり、蛍光標識は典型的にプローブの各末端に位置する。分子ビーコン技術は、二次構造形成(例えば、ヘアピン)を可能にする配列を有するプローブオリゴヌクレオチドを使用する。プローブ内での二次構造形成の結果として、両方の蛍光部分はプローブが溶液中にある場合に空間近接している。標的核酸(即ち、増幅産物)にハイブリダイゼーションした後に、プローブの二次構造が破壊され、蛍光部分は、適切な波長の光で励起した後に第一蛍光部分の放出が検出され得るように互いに分離される。

#### 【0092】

適切な分子ビーコンの例は、

MB mec 1: 5' - GCC GCG CTG CTC AAT TAA CAC AAC CCG CGC GGC-3' (配列番号:89) および

MB mec 2: 5' - GCC GCG CAT GCG TTG GTT CAA TTC TGC GCG GC-3' (配列番号:90)

である。

#### 【0093】

本発明の第二方法においてドナー蛍光部分および対応するアクセプター蛍光部分で標識された1つのプローブだけが使用されることを除いて、本発明の第一方法についての上記説明が本発明の第二方法に類似して適用されることに注意される。

#### 【0094】

従って、本明細書で使用されるように、「蛍光共鳴エネルギー移動関係」および同様な用語は、「ドナー蛍光標識」が「アクセプター蛍光標識」に共鳴エネルギーを移し得、「アクセプター蛍光標識」が測定可能な蛍光放出を生成するような、「ドナー蛍光部分」および「アクセプター蛍光部分」で標識された「プローブ」をことをいう。「ドナー蛍光標識」および「アクセプター蛍光標識」が非常に離れて位置する場合、「アクセプター蛍光標識」が測定可能な蛍光を放出するように「ドナー蛍光標識」が「アクセプター蛍光標識」に共鳴エネルギーを移すことができず、従って、「ドナー蛍光標識」および「アクセプター蛍光標識」は共鳴エネルギー移動関係にない。好ましくは、アクセプター蛍光部分はドナー蛍光部分によって放出されるエネルギーを吸収するクエンチャーである。

#### 【0095】

本発明による第一方法((1つまたは複数の)ハイブリダイゼーションプローブを用いる)および第二方法((1つまたは複数の)加水分解プローブあるいは(1つまたは複数の)分子ビーコンを用いる)が、米国特許第6,174,670号に記載されるLightCycler(登録商標)装置で使用するための形式で行われ得る。この形式は、増幅および検出を含み、検出は、一組のプローブまたは単一プローブと標的核酸との間の結合産物を検出するために蛍光の検出を

使用する。これらの形式はFRET技術を利用する(例えば、米国特許第4,996,143号、第5,565,322号、第5,849,489号、および第6,162,603号を参照)。本明細書で使用されるように、それぞれが蛍光標識を含む2つのプローブ、または両方の蛍光標識を含む単一プローブは、標的核酸に対するプローブの相補性によって決定される特定の位置で増幅産物にハイブリダイズし得る。蛍光標識は、ドナー蛍光標識またはアクセプター蛍光標識であり得る。適切な位置での増幅産物に対する(1つまたは複数の)プローブのハイブリダイゼーションの際に、FRETシグナルが生じる。先に詳述され例示されるコンポーネントが使用され得る(例えば、検出デバイス、光源等)。

【0096】

本発明の好ましい態様において、本発明による第一方法における増幅工程a)は、試料と一組のプライマーと任意に適切なポリメラーゼとを、特にPCRによって接触させてMRSA核酸が前記試料中に存在する場合に増幅産物を生成することを含み、前記ハイブリダイズ工程b)は、前記試料と一組のプローブとを接触させることを含み、ここで前記一組のプローブの各々が互いに5ヌクレオチド以下の範囲で前記増幅産物にハイブリダイズし、前記一組のプローブの第一プローブがドナー蛍光標識で標識され、前記一組のプローブの第二プローブが対応するアクセプター蛍光標識で標識される；工程c)は前記第一プローブの前記ドナー蛍光標識と前記第二プローブの前記アクセプター蛍光標識との間でFRETの存在または非存在を検出することによってMRSA核酸と一組のプローブとの間の結合産物を検出することを含み、ここでFRETの存在が試料中の標的核酸の存在を示し、FRETの非存在が試料中の標的核酸の非存在を示す。

【0097】

本発明の代替的で好ましい態様において、本発明による第二方法における増幅工程a)は、試料と一組のプライマーと任意に適切なポリメラーゼとを、特にPCRによって接触させてMRSA核酸が前記試料中に存在する場合に増幅産物を生成することを含み、前記ハイブリダイズ工程b)は、前記試料とプローブとを接触させることを含み、ここでプローブがドナー蛍光標識および対応するアクセプター蛍光標識例えばクエンチャーで標識され、プローブが前記増幅産物にハイブリダイズする；工程c)はプローブの前記ドナー蛍光標識とアクセプター蛍光標識との間でFRETの存在または非存在を検出することによってMRSA核酸とプローブとの間の結合産物を検出することを含み、ここでFRETの存在または非存在が試料中の標的核酸の存在または非存在を示す。

【0098】

米国特許第4,683,202号、第4,683,195号、第4,800,159号、および第4,965,188号は、従来のPCR技術を開示する。典型的にPCRは、選択された核酸鋳型(例えば、DNAまたはRNA)に結合する2つのオリゴヌクレオチドプライマーを使用する。本発明に有用なプライマーは、MRSA核酸配列内で核酸合成の開始点として機能し得るオリゴヌクレオチドを含む。

【0099】

プライマーは、従来の方法によって制限消化から精製され得る、または合成的に生成され得る。プライマーは、好ましくは増幅の最大効率のために一本鎖である。プライマーは化学合成によって生成され得る。

【0100】

PCRアッセイは、核酸(DNAまたはRNA)鋳型、一般的にDNAを使用し得る。鋳型核酸は精製される必要はない；鋳型核酸は複合混合物の少ない分画であり得、例えばヒト細胞に含まれるMRSA毒素核酸である。DNA(またはRNA)は、Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications (Persing ら(編), 1993, American Society for Microbiology, Washington D.C)に記載されるものなどの慣例技術によって、体液またはスワブなどの任意の試料から抽出され得る。

【0101】

オリゴヌクレオチドプライマーは、プライマー伸長を誘導する反応条件下で他のPCR試薬と混合される。例えば、鎖伸長反応は一般的に50 mM KCl、10 mM Tris-HCl(pH 8.3)、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>、0.001%(w/v)ゼラチン、0.5~1.0 μg変性鋳型DNA、50ピコモルの各オリゴヌ



クレオチドプライマー、2.5UのTaqポリメラーゼ、および10% DMSOを含む。反応は通常、それぞれ150～320  $\mu$ MのdATP、dCTP、dTTP、dGTP、または1つ以上のそのアナログを含む。特定の状況で、300～640  $\mu$ M dUTPが反応においてdTTPの代用とされ得る。

【0102】

新しく合成された鎖は、反応の次の段階で使用され得る二本鎖分子を形成する。鎖の分離、アニーリングおよび伸長の段階が必要に応じてしばしば繰り返されて標的MRSA核酸分子に対応する所望量の増幅産物を生成し得る。反応における制限要因は、プライマーの量、熱安定性酵素、および反応に存在するヌクレオシド三リン酸である。増幅工程およびハイブリダイゼーション工程は、好ましくは少なくとも1回繰り返される。検出における使用のために、増幅工程およびハイブリダイゼーション工程の回数は、例えば、試料の性質に依存する。試料が核酸の複合混合物である場合、多くの増幅工程およびハイブリダイゼーション工程が検出に十分な標的配列を増幅するために必要とされ得る。一般的に、増幅工程およびハイブリダイゼーション工程は、少なくとも約20回繰り返されるが、40回、60回または100回も多く繰り返され得る。本発明の好ましい態様において、増幅およびハイブリダイゼーションの55サイクル、45サイクルまたは35サイクル内でのFRETの存在が試料中のMRSAの存在を示す。

10

【0103】

ポリメラーゼ連鎖反応は、熱安定性ポリメラーゼ、ヌクレオチド、および標的核酸のための、好ましくは本発明によるプライマーであるプライマーを、試料に添加する工程、少なくとも変性温度と伸長温度との間で試料を熱サイクリングする工程；ドナー蛍光標識によって吸収される波長の光で試料を励起する工程ならびに蛍光エネルギー移動ペアの片方からの蛍光放出を検出する工程を含み得る。

20

【0104】

用語「熱安定性ポリメラーゼ」とは、熱安定であるポリメラーゼ酵素のことをいい、即ち、酵素は鋳型に相補的なプライマー伸長産物の形成を触媒し、二本鎖鋳型核酸の変性に影響を及ぼすのに必要な時間で高い温度に供される場合に不可逆的に変性しない。一般的に、合成は各プライマーの3'末端で開始され、鋳型鎖に沿って5'→3'方向に進む。熱安定性ポリメラーゼは、サーマス フラバス(*Thermus flavus*)、T.ルバー(*T. ruber*)、T.サーモフィラス(*T. thermophilus*)、T.アクアティカス(*T. aquaticus*)、T.ラクテウス(*T. lacteus*)、T.ルーベンス(*T. rubens*)、バチルス ステアロサーモフィルス(*Bacillus stearothermophilus*)、およびメタノサーマス フェルビダス(*Methanothermus fervidus*)から単離されている。それにも関わらず、熱安定性でないポリメラーゼも、酵素が補充されることを条件としてPCRで使用され得る。

30

【0105】

本発明の別の好ましい態様において、MRSA核酸の検出のための方法は、核酸の隣接領域にハイブリダイズする2つの核酸プローブの存在下で、ポリメラーゼ連鎖反応によって核酸を増幅する工程、2つのプローブの標的核酸とのハイブリダイゼーションの際に、ドナー蛍光標識およびアクセプター蛍光標識が互いに25ヌクレオチド内にあるように前記プローブの1つがアクセプター蛍光標識で標識され、他のプローブが蛍光エネルギー移動ペアのドナー蛍光標識で標識される、前記ポリメラーゼ連鎖反応は、熱安定性ポリメラーゼ、ヌクレオチドおよび標的核酸のための、先に定義されるプライマーを、試料に添加する工程、少なくとも変性温度と伸長温度との間で試料を熱サイクリングする工程を含む；ドナー標識によって吸収される波長の光で試料を励起する工程ならびに蛍光エネルギー移動ペアの片方からの温度依存性蛍光をモニタリングする工程を含む。

40

【0106】

本発明の別の好ましい代替的態様において、MRSA核酸の検出のための方法は、アクセプター蛍光標識、例えばクエンチャーおよび蛍光エネルギー移動ペアのドナー蛍光標識で標識された1つの核酸プローブの存在下で、ポリメラーゼ連鎖反応によって核酸を増幅する工程、プローブを標的核酸とハイブリダイズさせる工程、前記ポリメラーゼ連鎖反応は、任意に5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を有するポリメラーゼ、ヌクレオチド、および標

50

的核酸のための、先に定義されるプライマーを、試料に添加する工程、および少なくとも変性温度と伸長温度との間で試料を熱サイクリングする工程を含む；ドナー標識によって吸収される波長の光で試料を励起する工程、ならびに標識の蛍光エネルギー移動ペアの片方からの蛍光をモニタリングする工程を含む。

#### 【0107】

上記の方法について、核酸は二本鎖形態または一本鎖形態で存在し得る。核酸鋳型が二本鎖である場合、PCRで鋳型として使用され得る前に2つの鎖を分離することが必要である。鎖の分離は、物理的、化学的または酵素手段などの任意の適切な変性法によって達成され得る。核酸鎖を分離する1つの方法は、核酸鎖が顕著に変性される(例えば、50%、60%、70%、80%、90%または95%より高く変性される)まで核酸を加熱する工程を含む。鋳型核酸を変性するのに必要な加熱条件は、例えば、バッファ塩濃度および変性される核酸の長さおよびヌクレオチド組成に依存するが、典型的に、温度および核酸長などの反応の特徴に依存する時間で約90 ~ 約105 の範囲である。変性は、典型的に約0秒~4分間行われる。

#### 【0108】

本発明の一態様において、検出工程は、増幅およびハイブリダイゼーションの各工程の後および/またはリアルタイムで行なわれる。PCRのリアルタイムおよびオンラインモニタリングの詳細な説明は、<http://lbiochem.roche.com/lightcycler>に見られ得る。以下の特許出願：WO 97/46707、WO 97/46714およびWO 97/46712には、LightCycler技術に使用されるリアルタイムPCRが記載されている。LightCycler機器は、高品質光学装置を用いる微量容積蛍光計と組み合わされた高速サーマルサイクラーである。この高速熱サイクリング技術は、反応容器として薄いガラスキューベットを使用する。反応チャンバの加熱および冷却は、加熱空気および常温空気を交互に与えることにより調節される。少量の空気およびキューベットの高い表面積対容積比率のため、LightCycler熱チャンバ内で非常に高速の温度交換速度が達成され得る。反応成分への選択した蛍光色素の添加により、リアルタイムおよびオンラインでPCRをモニターすることが可能になる。さらに、キューベットは、(ガラスファイバー光学部材と類似した)シグナル収集のための光学部材としての機能を果たし、シグナルをキューベットの先端に集中させる。その効果は、微量容積試料の効率的な照明および蛍光モニタリングである。例示的なPCRプロトコルは実施例3に記載される。

#### 【0109】

キューベットを収容するLightCycler(登録商標)カラーセルは、機器から外すことができる。したがって、試料は、(例えば、PCR Clean Room内で)機器の外側から負荷され得る。また、この特徴により、試料カラーセルを容易に清掃および滅菌することが可能である。LightCycler(登録商標)装置の一部としての蛍光計は光源を収容する。放出された光はフィルタリングされ、エピイルミネーションレンズによってキューベットの上面に収束される。試料から放出された蛍光は、次いで、同じレンズによって収束され、2色性ミラーに通され、適切にフィルタリングされ、データ収集フォトハイブリッド上に収束される。LightCycler(登録商標)機器(Roche Diagnostics GmbH、カタログ番号03531414001)に現在利用可能な光学ユニットは、6つのバンドパスフィルター(530nm、Hex励起、610nm、640nm、670nm、および705nm)を含み、4色検出およびいくつかの蛍光取得オプションを提供する。データ収集オプションは、サイクリング工程あたり1回のモニタリング、融解曲線解析用の完全に連続した1回の試料取得、連続サンプリング(該サンプリング頻度は試料数に依存性である)および/または規定の温度間隔後の全試料の段階的測定を含む。

#### 【0110】

LightCycler(登録商標)は、PCワークステーションを用いて操作され得、ウィンドウズ(登録商標)オペレーティングシステム、例えば、ウィンドウズ(登録商標)XP、ウィンドウズ(登録商標)NTまたはウィンドウズ(登録商標)2000を利用し得る。機械がキャピラリーを光学ユニット上に逐次配置するので、試料からのシグナルが得られる。ソフトウェアは、蛍光シグナルを各測定直後にリアルタイムで表示し得る。蛍光取得時間は10~100ミリ秒(msec)である。各サイクリング工程後、すべての試料について、蛍光対サイクル数の定量

的表示が連続的に更新され得る。生じたデータは、さらなる解析のために保存され得る。

【0111】

本発明のまた別の態様において、該方法は、2つのプローブの1つと工程(a)の増幅産物との間で融解温度を決定する工程をさらに含み、該融解温度によってMRSAの存在または非存在が確認される。融解曲線解析は、サイクリングプロファイルに含まれ得るさらなる工程である。融解曲線解析は、DNAが、融解温度( $T_m$ )と呼ばれ、DNA二本鎖の半数が単鎖に分離した温度として定義される特性温度で融解するという事実に基づく。DNAの融解温度は、主に、そのヌクレオチド組成および長さに依存する。したがって、GおよびCヌクレオチドを多量に含むおよび/またはヌクレオチドが長いDNA分子は、多量のAおよびTヌクレオチドを有するおよび/またはヌクレオチドが短いものよりも高い $T_m$ を有する。シグナルが失われる温度を検出することにより、プローブの融解温度が測定され得る。同様に、シグナルが生じる温度を検出することにより、プローブのアニーリング温度が測定され得る。それぞれの増幅産物からのMRSAプローブの融解温度(1つまたは複数)により、試料中のMRSAの存在が確認され得る。

【0112】

本発明のまた別の態様において、該方法は、さらに、夾雑核酸の増幅を妨げる工程、特に、ウラシルの存在下で増幅段階(a)を行なう工程、特に、第一増幅段階の前に試料をウラシルDNAグリコシラーゼで処理する工程を含む。例えば、1つのサーモサイ클ー実行から次の実行の混入を減少または排除するためにウラシル-DNAグリコシラーゼを用いる酵素的方法は、米国特許第5,035,996号、5,683,896号および5,945,313号に記載されている。また、本発明の方法を行なう場合、標準的な研究室用閉じ込め実務および手順が望ましい。閉じ込め実務および手順としては、限定されないが、方法の異なる工程のための別個の作業領域、閉じ込めフード、バリアフィルターピペット先端および専用空気移動ピペットが挙げられる。診断のための研究室での臨床試料の取扱いでは、正確さを期して、人間による一貫した閉じ込め実務および手順が望ましい。

【0113】

試料の核酸は、上記のアッセイの1つにおいて解析され得る前に異なる成分の複雑な混合物を含む(生物学的)試料から単離または精製されなければならないことがあり得る。しばしば、第1工程では、核酸の富化を可能にする処理が使用される。

【0114】

本発明の方法の好ましい態様において、試料は、粗溶解物として使用され得、これは以下のようにして調製され得る。

【0115】

試料、例えばスワブは、適当なバッファーに移され得、細菌を不活性化するために任意に処理され得る。細胞の内容物を放出させるため、細胞は、細胞壁を溶解、分解または変性させるために酵素または化学物質で処理され得る。このプロセスは、一般的に溶解または機械的溶解とよばれる。かかる溶解物質を含む得られた溶液は、溶解物とよばれる。溶解物は、例えば、溶解物をスピンし、ペレット(残骸)を廃棄することにより精製され得る。上清は、増幅反応で試料として直接使用され得る。

【0116】

特に、粗溶解物を調製するためには、S.E.T.S.キット(Roche Diagnostics Corporation、カタログ番号03753158001)が使用され得る。該方法は、以下のように例示的に記載され得る。試料、例えばスワブはハンドルで小さくし、スワブ先端を内側S.E.T.S.チューブ(例えば、底面に穴を含み、封鎖したとき外側S.E.T.S.チューブに嵌まる0.5 mlチューブ)に挿入する。シリカビーズおよび中和バッファー(NB)を含む外側S.E.T.S.チューブにチューブを配置する。NBは、スワブ用デバイス由来の輸送媒体を中和する。スワブ由来の接着性物質をスワブ先端から除去し、重力(遠心分離)によって外側S.E.T.S.チューブに移す。S.E.T.S.チューブを封鎖し、細菌の熱不活性化のために95℃に加熱する。細胞を機械力に振とうデバイス、例えば、MagNALyser(登録商標)Instrumentによって破碎する。短いスピンによってチューブの底面に破片を集め、上清を増幅反応の試料として直接使用する。該

方法は、Uhlら, 2005、J Clin Microbiol. 8:4046-51に、より詳細に記載されている。

#### 【0117】

溶解中にみられる問題は、目的の成分を分解する他の酵素、例えば、核酸を分解するデオキシリボヌクレアーゼまたはリボヌクレアーゼが、溶解中に目的の成分と接触することである。これらの分解性酵素はまた、細胞の外側に存在し得るか、または溶解前は異なる細胞区画に空間的に分離されているが、目的の成分と接触し得る。このプロセス中に放出される他の成分は、例えば、リボ多糖のファミリーに属し、細胞に毒性である内毒素であり得、ヒトまたは動物の治療に使用することが意図される産物に問題を引き起こし得る。

#### 【0118】

上記のこの問題に取り組むために種々の手段がある。核酸を遊離させることが意図される場合、例えば、グアニジニウムチオシアネートまたはアニオン性、カチオン性、両イオン性もしくは非イオン性洗浄剤などのカオトロピック剤を使用することが一般的である。また、これらの酵素または不要なタンパク質を急速に分解するプロテアーゼを使用することが有利である。しかしながら、これは、前記物質または酵素がその後の工程で試薬または成分に阻害し得るため、別の問題を生じ得る。

#### 【0119】

上記のかかる溶解または試料調製プロセスに有利に使用され得る酵素は、タンパク質基質内のアミド結合を切断し、プロテアーゼ、または(互換的に)ペプチダーゼに分類される酵素である(Walsh, 1979、Enzymatic Reaction Mechanisms. W. H. Freeman and Company、San Francisco、第3章を参照)。先行技術で使用されているプロテアーゼは、例えば、アルカリ性プロテアーゼ(WO 98/04730)または酸性プロテアーゼ(US 5,386,024)である。核酸の単離のための試料調製に先行技術で広く使用されているプロテアーゼは、中性pH付近で活性であり、当業者にサブチリシンとして知られたプロテアーゼのファミリーに属するTritirachium album由来のプロテイナーゼKである(例えば、Sambrook J. et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、New York、1989参照)。

#### 【0120】

溶解工程後の試料調製の次の工程では、目的の成分はさらに富化され得る。目的の非タンパク質性成分は、例えば、核酸である場合、これらは、通常、プローブ系アッセイにおいて使用される前に複雑な溶解混合物から抽出される。

#### 【0121】

核酸の抽出には、いくつかの方法がある。

- 配列依存性または生体特異的方法、例えば、
  - ・ 親和性クロマトグラフィー
  - ・ 固定化されたプローブへのハイブリダイゼーション
- 配列非依存性または物理化学的方法、例えば、
  - ・ 例えば、フェノール-クロロホルムでの液体-液体抽出
  - ・ 例えば、純粋エタノールでの沈殿
  - ・ 濾紙での抽出
  - ・ セチル-トリメチル-アンモニウム-ブロミドなどのミセル形成剤での抽出
  - ・ 固定化されたインターカレート色素、例えば、アクリジン誘導体への結合
  - ・ シリカゲルまたは珪藻土への吸着
  - ・ カオトロピック条件下での磁性ガラス粒子(MGP)または有機シラン粒子への吸着

#### 【0122】

抽出目的に特に興味深いのは、他の表面も可能であるがガラス表面への核酸の吸着である。ガラス表面への結合動作の使用により天然環境から核酸を単離するための多くの手順が近年、提案されている。非修飾核酸が標的である場合、とりわけ、核酸を修飾しなくてよく、天然核酸でさえ結合され得るという理由で、シリカ表面を有する物質への核酸の直接結合が好ましい。これらのプロセスは、種々の文献に詳細に記載されている。例えば、Vogelsteinら, 1979、Proc. Natl. Acad. U.S.A. 76: 615-619には、ヨウ化ナトリウムの

存在下でアガロースゲル由来の核酸を粉碎フリントガラスに結合する手順が提案されている。過塩素酸ナトリウムの存在下でガラス粉末上での細菌からのプラスミドDNAの精製が、Markoら, 1982、Anal. Biochem. 121: 382-387に記載されている。DE-A 37 34 442には、酢酸を用いてファージ粒子を沈殿させることによるガラス繊維フィルター上の単鎖M13ファージDNAの単離および過塩素酸塩でのファージ粒子の溶解が記載されている。ガラス繊維フィルターに結合された核酸は洗浄され、次いで、メタノール含有Tris/EDTAバッファで溶出される。ファージからDNAを精製するための同様の手順が、Jakobi R.ら, Anal. Biochem. 175 (1988)196-201に記載されている。該手順は、カオトロピック塩溶液中でのガラス表面への核酸の選択結合およびアガロース、タンパク質または細胞残渣などの夾雑物からの核酸の分離を伴う。夾雑物からガラス粒子を分離するため、粒子が遠心分離され得るか、または液がガラス繊維フィルターを介して抜き取られるかのいずれかであり得る。これは制限工程であるが、大量の試料を処理するために該手順を使用しなくてよくなる。塩およびエタノールの添加による沈殿後に核酸を固定化するための磁性粒子の使用が、より有利であり、例えば、Aldertonら, 1992、Anal. Biochem. 201: 166-169およびPCT GB 91/00212に記載されている。この手順では、核酸は、磁性粒子とともに凝集される。凝集塊は、磁場を適用し、洗浄工程を行なうことによって元の溶媒から分離される。1回の洗浄工程後、核酸をTrisバッファ中に溶解する。しかしながら、沈殿は核酸に選択的でないため、この手順は不都合を有する。むしろ、種々の固体および溶解物質もまた凝集される。その結果、この手順は、存在し得る特異的酵素的反応の相当量の任意のインヒビターを除去するためには使用され得ない。多孔質の特定のガラスマトリックス内に磁性粒子を含有し、ストレプトアビジンを含む層で被覆された磁性多孔質ガラスもまた市場で入手され得る。この製品は、ピオチンに共有結合するように複雑な調製工程で修飾される場合、生物学的物質、例えば、タンパク質または核酸を単離するために使用され得る。磁化可能な特定の吸着体は、自動試料調製に非常に効率的で適当であることが証明された。フェリ磁性および強磁性ならびに超常磁性顔料がこの目的に使用される。最も好ましいMGPおよび磁性ガラス粒子の使用方法は、WO 01/37291に記載されたものである。

#### 【0123】

天然環境由来の標的核酸を含む核酸の精製または単離の後に、標的核酸、MRSA特異的核酸が検出され得る。

#### 【0124】

各サーモサイクラー実施中、対照試料もサイクルされ得る。したがって、本発明のさらなる態様において、本発明の方法は、対照試料、特にMRSA核酸分子を含む対照試料を含む。対照核酸鑄型は、例えば、対照プライマーおよび対照プローブを用いて陽性対照(試薬対照)試料から増幅され得る。また、陽性対照試料は、例えば、MRSA核酸分子を含有するプラスミド構築物を増幅するために使用され得る。かかるプラスミド対照は、内部増幅され得る(例えば、各生物学的試料中)(内部対照)か、または別々の試料中で患者の試料とともに並行して増幅され得る。また、各サーモサイクラー実施には、例えばMRSA核酸を欠く陰性対照が含まれるべきである。かかる対照は、増幅、ハイブリダイゼーションおよび/またはFRET反応の成功または失敗の指標である。したがって、対照反応により、例えば、配列特異的にアニーリングし、伸長を開始するプライマーの能力ならびに配列特異的におよびFRETが生じるようにハイブリダイズするプローブの能力が容易に決定され得る。

#### 【0125】

好ましい対照の概念は、陽性対照(公知MRSA DNAの検出)、試薬対照(MRSA標的配列を含むプラスミドの検出)および内部対照(MRSA標的配列を含むプラスミドの検出、ここで、プローブ結合部位、例えば、MRSAセンサープローブに結合する部位が、MRSAセンサープローブに結合しないが内部対照センサープローブによって認識される別の配列で置換されている;あるいは、両方のプローブに対する結合部位が交換されていてもよい)を含む。内部対照は、各反応物の一部、すなわち陽性対照、試薬対照陰性対照および各試料であり得る。

#### 【0126】

内部対照(IC)のための適当なプローブの一例は、  
MRSA IC 4 : 5' -CCA GCA GAA TGC CAA CCA-3' (配列番号 : 91)、例えば、5' がLC-Red 670で標識されている、または  
MRSAダイレクトIC : 5' -CCA GCA GAA TGC CAG CCA AT-3' (配列番号 : 98)、例えば、5' がLC-Red 670で標識されている  
である。

#### 【0127】

解析される試料は任意の試料であり得る。しかしながら、試料は、一般に生物試料、好ましくはヒト被検体由来の試料である。本発明の方法の実施に使用され得る代表的な生物試料としては、感染傷のスワブ、皮膚のスワブ、鼻のスワブ、咽喉のスワブ、鼠蹊部のスワブ、腋窩のスワブ、侵襲性デバイス部位からのスワブ、可能性のある感染部位からのスワブ、血液試料、尿試料および会陰のスワブからなる群より選択される試料などのスワブまたは体液が挙げられる。生物試料の収集および保存方法は当業者に公知である。不十分な試料収集、輸送の遅延、不適切な輸送条件、またはある種の収集スワブ(例えば、アルギン酸カルシウムまたはアルミニウム軸)の使用はすべて、試験結果の成功および/または正確さに影響し得る条件である。生物試料は、MRSA核酸が放出されるように処理され得(例えば、標準的な核酸抽出方法によって、および/または市販のキットを用いて)、生物試料をPCR反応成分および適切なオリゴヌクレオチドと直接接触させる。

#### 【0128】

本発明のさらなる主題は、本発明の上記の態様のいずれかに規定のプライマー、一組のプライマー、プローブおよび/または一組のプローブに関する。

#### 【0129】

本発明のなおさらなる主題は、

(a) 本発明の上記の態様のいずれかに規定の一組のプライマー、特に、MRSAタイプRE2に特異的なプライマー、MRSAタイプRE3に特異的なプライマーおよびMRSAタイプRE7に特異的なプライマーを含むまたは該プライマーからなる一組のプライマー；

(b) 本発明の上記の態様のいずれかに規定の一組のプローブまたはプローブ；ならびに

(c) ドナー蛍光部分および対応する蛍光部分で標識される(1つまたは複数の)プローブを含み、MRSAのブドウ球菌染色体カセット(SCCmec)タイプI~Vのそれぞれを検出することができるキットに関する。

#### 【0130】

該一組のプライマー、プローブおよび/または一組のプローブは、上記の(好ましい)態様について記載されたものまたは上記の本発明の方法のいずれかに適したものであり得る。キットは、試料中の存在または非存在を検出する一組のMRSAプライマーおよび一組のMRSAプローブを使用するための説明書を有するパッケージラベルまたはパッケージ挿入物をさらに含み得る。本発明のキットのさらなる任意の成分は、少なくとも1つの適切な酵素、特にウラシル-DNA-グリコシラーゼおよび/またはDNAポリメラーゼ、および/または適切なバッファである。キットはまた、3' 5' への外ヌクレオチド鎖分解性活性を有する鋳型依存性ポリメラーゼ、好ましくはTaq Polymerase、ヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチドを含み得る。本発明の別の態様において、鋳型依存性DNAポリメラーゼ、ヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチドまたは本発明による一組のプライマーを含むキットが提供される。

#### 【0131】

当該技術分野で公知のかかるキットは、さらに、例えば、96もしくは384ウェル形式のマイクロタイタープレートまたは例えば、Eppendorf、Hamburg、Germanyによって製造された単なる通常の反応チューブなどの増幅手順中に使用され得るプラスチック容器、および本発明による方法を実施するための他のすべての試薬を含む。

#### 【0132】

本発明の別の態様において、キットは、核酸を単離するためのさらなる試薬を含む。したがって、キットは、さらに、核酸に対して親和性を有する物質を含み、好ましくは、核

酸に対して親和性を有する物質はシリカ表面を有する物質を含む。好ましくは、シリカ表面を有する物質はガラスである。最も好ましくは、核酸に対して親和性を有する物質は、WO96/41811またはWO01/37291に記載の磁性ガラス粒子を含む組成物である。キットは、さらにまたは付加的に、例えば、カオトロピック剤、洗浄剤もしくはアルコールまたはその混合物を含有する細胞の溶解を可能にする溶解バッファーを含み、別途、不要なタンパク質の消化のためのプロテアーゼ、例えば、プロテイナーゼKを含み得る。本発明によるキットのこれらの成分は、チューブまたは保存容器に別々に提供され得る。成分の性質に応じて、これらは、単一のチューブまたは保存容器に提供されることさえあり得る。キットは、さらにまたは付加的に、DNAまたはRNAが結合した場合に磁性ガラス粒子の洗浄工程に適した洗浄溶液を含み得る。この洗浄溶液は、緩衝溶液中にエタノールおよび/またはカオトロピック剤を含有し得るか、または酸性pHを有し、上記のエタノールおよび/またはカオトロピック剤を含有しない溶液であり得る。しばしば、洗浄溶液または他の溶液は、使用前に希釈しなければならないストック溶液として提供され得る。キットは、さらにまたは付加的に、磁性ガラス粒子に結合されたDNAまたはRNAを溶出するための溶離剤または溶出バッファー、すなわち、溶液もしくはバッファー(例えば、10mM Tris、1mM EDTA、pH 8.0)または純水を含み得る。さらに、核酸、すなわちDNAまたはRNAの精製プロセスに使用され得るさらなる試薬または緩衝溶液が存在し得る。

10

#### 【0133】

本発明の好ましい態様において、キットは、内側、外側S.E.T.S.チューブおよび/または試料調製試薬としての中和バッファーを含む。好ましくは、本発明の方法は、例えば、上記に詳細に記載したように粗溶解物を調製することにより、試料の精製なしで行なわれる。したがって、キットは、核酸のさらなる単離または精製手段がキットに含まれないことを除いて、この方法に適合され得る。

20

#### 【0134】

本発明の好ましい態様は、例えば、WO99/16781に記載されたものなどの自動化可能な方法で本発明の方法またはキットを使用することである。自動化可能な方法は、方法の工程が、ヒトによる外部調節または影響がほとんどまたは全くなく操作され得る装置または機械で行なうのに適当であることを意味する。自動化方法は、自動化可能な方法の工程が、ヒトによる外部調節または影響がほとんどまたは全くなく操作され得る装置または機械で行なわれることを意味する。方法の調製工程のみが、手で行なわなければならない場合があり、保存容器を補充して正しい位置に置かなければならず、試料の選択および、制御用コンピュータの操作などの当業者に知られたさらなる工程が、人間によって行わなければならない。該装置または機械により、例えば、自動的に液体を加え、試料を混合し、または特定の温度でインキュベーション工程が行なわれ得る。典型的に、かかる機械または装置は、単一の工程およびコマンドが特定されたプログラムを実行するコンピュータによって調節される自動装置である。好ましい自動化方法は、方法および使用される機械または装置が、短時間で試料のハイスループットに最適化されていることを意味するハイスループット形式で行われる方法である。本発明の別の態様において、本発明による方法またはキットは、いくつかの反応工程が人の手によって行なわれなければならない場合があることを意味する半自動化プロセスにおいて使用される。本発明の好ましい態様において、本発明によるMGPを含む懸濁液を保存容器から取り出し、部分容量をさまざまな反応容器に加える。反応容器は、プラスチック製であり、最終的には、反応を行うことができる96または384またはそれ以上のウェルを含むマイクロタイタープレート形式である反応チューブであり得る。しかし、これらの容器は、他の物質、例えばスチール製であってもよい。

30

40

#### 【0135】

本発明の好ましい態様において、本発明によるキットは、研究、生物分析、または診断に使用される。本発明による好ましい態様において、本発明によるキットまたは本発明による方法は、ハイスループット形式、すなわち非常に多数の異なる試料を非常に短い時間で解析することを可能にする自動化方法で使用される。

50

## 【 0 1 3 6 】

本発明をその詳細な説明とともに記載したが、前述の記載は、例示を意図し、添付の特許請求の範囲に規定される本発明の範囲を限定しないことを理解されたい。他の局面、利点および変形は、以下の特許請求の範囲に含まれる。さらに、本発明は、1種類以上の市販の機器の構成、特に、本明細書に記載したものに限定されないことを理解されたい。

## 【 実施例 】

## 【 0 1 3 7 】

実施例1：MRSAのインビトロ診断試験

LightCycler(登録商標)MRSAダイレクト試験は、例えば、健康管理の環境においてMRSA集落形成の予防および調節を補助するためのメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)の直接検出のための定性的インビトロ診断試験である。試験は、LightCycler(登録商標)2.0 Instrumentにおいて行なわれ、集落形成が疑われる患者由来の試料には、試料調製のためのスワブ抽出および機械的溶解が利用され、その後、MRSA DNAの増幅のためのポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、および増幅されたDNAの検出のための蛍光発生標的的特異的ハイブリダイゼーションプローブを使用した。

10

## 【 0 1 3 8 】

機器要件：このアッセイでは、LightCycler(登録商標)2.0が指定される。

## 【 0 1 3 9 】

試薬要件：アッセイは、試料調製試薬および増幅試薬からなった。試料調製は、スワブからの細菌の抽出およびその後の溶解工程によって行なった。溶解は、酵素的または機械的のいずれかによって行なわれ得る。SAでは、過去に、機械的溶解によって良好な結果が示された。また、機械的溶解は、試料中に存在する細菌または細菌の表現型とは無関係に行なわれ得る。したがって、機械的溶解が有利な方法であった。溶解物のさらなる処理には、2つのオプションが可能である。

20

## 【 0 1 4 0 】

1. 後にDNA抽出を伴う試料溶解
2. 試料溶解および粗抽出物の使用

## 【 0 1 4 1 】

結果までの時間が重要であり、単なる溶解は高速であるため、好ましくはDNA精製は行なわず、粗溶解物のみを作製し、PCRに直接使用した。

30

## 【 0 1 4 2 】

アッセイには、PCRによる増幅およびFRETプローブを用いた検出を使用した。増幅およびハイブリダイゼーションを調節するため、増幅の対照および内部対照が含まれた。検出は、増幅曲線または融解曲線解析のいずれかによって行なった。

## 【 0 1 4 3 】

ソフトウェア要件：MRSAダイレクト試験のデータ解析には、ソフトウェアSW 4.05を使用した。データ解析には、2つの可能なアルゴリズムが使用され得る。

## 【 0 1 4 4 】

増幅曲線を使用した場合、(定性的検出モジュール)データ出力は、さらなるマニュアル工程なしでLightCycler SWによって達成された。プログラミング、対照概念および結果の表示はマクロによって指示した。これを解決するために、データ出力は、SW固有のアルゴリズムに依存した。データの結果は、専門解析によって調節されなかった。

40

## 【 0 1 4 5 】

融解曲線解析は、カスタマーがマニュアル解析工程を行なうことを必要とした。利点は、良好な特異性であった。

## 【 0 1 4 6 】

ワークフローの記載：MRSAダイレクト試験のワークフローは、以下を含んだ。

1. 中和バッファー、内側および外側S.E.T.S.チューブを使用したスワブ抽出。
2. 中和バッファーによる内部対照(IC)の添加を含む細菌の溶解(熱および機械的破壊)。

50



3. 粗溶解物(試料抽出物)を反応混合物(RM)に移す。RMは、プライマーおよびプローブ、FastStart酵素(Taqポリメラーゼ)、UNG(ウラシル-N-グリコシラーゼ)ならびにバッファーからなった。

4. 特異的プライマーおよびプローブを用いた増幅および検出(PCR)。

5. 2工程でのデータ解析。第1は、それぞれの対照による実験の検証。第2は、標的試料の有無の同定。

【0147】

実施例2：プライマーおよびプローブの設計

プライマーおよびプローブを、リバースプライマーおよび一組のプローブ(検出プローブ)が黄色ブドウ球菌部分の標的領域に位置するように設計した。したがって、この要素は、すべてのREタイプで同じままであった。REタイプは、SCC mecトランスポゾンの右末端接合部の配列変異を示す。すべてのREタイプの大部分を表すRE2アンプリコンは、93の非関連試料の配列決定によって評価された(図2)。この主なREタイプ(SCCmecタイプI、II、III(一部)および一部のIVを表す)に対してプライマーおよびプローブが設計された(表1参照)。この設定は、コアアッセイを表す。SCCタイプI~Vを包含するためのさらなるプライマーを適宜添加した(表1参照)。プライマーおよびプローブ設計のため、LightCycler(登録商標)プローブ設計ソフトウェア2.0を使用した。シグナル出力を最適化するため、これらのプライマーおよびプローブのバリエーションを設計した(表1参照)。

【0148】

表 1: SCCmec RE2、RE3 および RE7 検出のためのプライマーおよびプローブ設計

プライマー/プローブ ID	標識	配列(標識なし)	(配列番号:)
RE2 の検出のためのプライマー			
AR <i>mec</i> 1 フォワード	なし	5'- GCA ATT CAC ATA AAC CTC ATA TGT TC -3'	(1)
AR <i>mec</i> 2 フォワード	なし	5'- ACC TCA TAT GTT CTG ATA CAT TCA -3'	(2)
AR <i>mec</i> 3 フォワード	なし	5'- GCA ATT CAC ATA AAC CTC ATA T -3'	(3)
AR <i>mec</i> 4 フォワード	なし	5'- CAT AAC AGC AAT TCA CAT AAA CCT C -3'	(4)
AR <i>mec</i> 5 フォワード	なし	5'- TAA CAG CAA TTC ACA TAA ACC T -3'	(5)
AR <i>mec</i> 6 フォワード	なし	5'- CGC TAT TAT TTA CTT GAA ATG AAA GAC -3'	(6)
AR <i>mec</i> 7 フォワード	なし	5'- CTT GAA ATG AAA GAC TGC GGA -3'	(7)
AR <i>mec</i> 8 フォワード	なし	5'- TTG CTT CAC TAT AAG TAT TCA GTA TAA AGA -3'	(8)
AR <i>mec</i> 9 フォワード	なし	5'- ATT TAC TTG AAA TGA AAG ACT GCG -3'	(9)
AR <i>mec</i> 10 フォワード	なし	5'- AAA GAA TAT TTC GCT ATT ATT TAC TTG AA -3'	(10)
AR <i>mec</i> 11 フォワード	なし	5'- TCA GTA TAA AGA ATA TTT CGC TAT TAT TT -3'	(11)
AR <i>mec</i> 12 フォワード	なし	5'- TGA AAT GAA AGA CTG CGG AG -3'	(12)
JU1 フォワード	なし	5'- AAC CTC ATA TGT TCT GAT ACA TTC AAA -3'	(13)
JU2 フォワード	なし	5'- TAT GTC AAA AAT CAT GAA CCT CAT TAC T -3'	(14)
JU3 フォワード	なし	5'- CAT AAC AGC AAT TCA CAT AAA CCT C -3'	(15)
JU4 フォワード	なし	5'- GAC TGC GGA GGC TAA CT -3'	(16)
JU5 フォワード	なし	5'- ATC CCT TTA TGA AGC GGC -3'	(17)
MRSA ダイレクト RE2 フォワード	なし	5'- TGA AAT GAA AGA CTG CGG AG -3'	(92)
RE3 の検出のためのプライマー			
AR <i>mecA</i> 3/1	なし	5'- GCA AGG TAT AAT CCA ATA TTT CAT ATA TGT -3'	(18)
AR <i>mecA</i> 3/2	なし	5'- AGT TCC ATA ATC AAT ATA ATT TGT ACA GT -3'	(19)
AR <i>mecA</i> 3/3	なし	5'- ACA TCG TAT GAT ATT GCA AGG TA -3'	(20)
AR <i>mecA</i> 3/4	なし	5'- CTT TCA TTC TTT CTT GAT TCC ATT AG -3'	(21)
AR <i>mecA</i> 3/5	なし	5'- CAC TCT ATA AAC ATC GTA TGA TAT TGC -3'	(22)
AR <i>mecA</i> 3/6	なし	5'- TTC TTA ATT TAA TTG TAG TTC CAT AAT CAA -3'	(23)
AR <i>mecA</i> 3/7	なし	5'- AAT TAT ACA CAA CCT AAT TTT TAG TTT TAT -3'	(24)
AR <i>mecA</i> 3/8	なし	5'- AAT TTT TAG TTT TAT TTA TGA TAC GCT TC -3'	(25)
AR <i>mecA</i> 3/9	なし	5'- ACA CAA CCT AAT TTT TAG TTT TAT TTA TGA -3'	(26)
AR <i>mecA</i> 3/10	なし	5'- TTT ATT AAA CAC TCT ATA AAC ATC GTA TGA -3'	(27)
AR <i>mecA</i> 3/13	なし	5'- CCA CAT CTC ATT AAA TTT TTA AAT TAT ACA C -3'	(28)
MRSA ダイレクト RE3 フォワード	なし	5'- CCA CAT CTC ATT AAA TTT TTA AAT TAT ACA C -3'	(93)
RE7 の検出のためのプライマー			
AR <i>mec</i> 5/1	なし	5'- ATA TTA TAC ACA ATC CGT TTT TTA GTT TTA -3'	(29)
AR <i>mec</i> 5/2	なし	5'- ACA CAA TCC GTT TTT TAG TTT TAT TTA TG -3'	(30)
AR <i>mec</i> 5/3	なし	5'- TTC TAA TTT ATT TAA CAT AAA ATC AAT CCT -3'	(31)
AR <i>mec</i> 5/16	なし	5'- CAA TCC TTT TTA TAT TTA AAA TAT ATT ATA CAC -3'	(32)
MRSA ダイレクト RE7 フォワード	なし	5'- CAA TCC TTT TTA TAT TTA AAA TAT ATT ATA CAC -3'	(94)

10

20

30

MRSA/SSRA に特異的なプライマー			
AR <i>mec</i> 1 リバース	なし	5'- AGG AAA GAT GCT ATC TTC CGA -3'	(33)
AR <i>mec</i> 2 リバース	なし	5'- GAA AGA TGC TAT CTT CCG AAG -3'	(34)
AR <i>mec</i> 3 リバース	なし	5'- GAT GCT ATC TTC CGA AGG -3'	(35)
AR <i>mec</i> 4 リバース	なし	5'- GTC ATT ACA TTA GAA ATA CAA GGA AAG AT -3'	(36)
AR <i>mec</i> 5 リバース	なし	5'- GCC AAC GAA TAC TAG CC -3'	(37)
AR <i>mec</i> 6-2 リバース	なし	5'- ACG AAT ACT AGC CAA AAT TAA ACC -3'	(38)
AR <i>mec</i> 7 リバース	なし	5'- CAC AAT CCA CAG TCA TTA CAT TAG A -3'	(39)
JU1 リバース	なし	5'- CAA GGA AAG ATG CTA TCT TCC G -3'	(40)
JU2 リバース	なし	5'- AGT CAT TAC ATT AGA AAT ACA AGG AAA GA -3'	(41)
JU3 リバース	なし	5'- AGGAAAGATGCTATCTTCCGA -3'	(42)
JU4 リバース	なし	5'- AGG AAA GAT GCT ATC TTC CGA -3'	(43)
JU5 リバース	なし	5'- ACA ATC CAC AGT CAT TAC ATT AGA A -3'	(44)
MRSA ダイレクトリバース	なし	5'- CAA GGA AAG ATG CTA TCT TCC G -3'	(95)
orfX に特異的なプローブ			
AR <i>mec</i> Fluo 1	Fluos	5'- AAG TCG CTT TGC CTT TGG GTC A -3'	(45)
AR <i>mec</i> Fluo 2	Fluos	5'- TAC AAA GTC GCT TTG CCT TTG GGT CA -3'	(46)
AR <i>mec</i> Fluo 3	Fluos	5'- GGC CGT TTG ATC CGC CAA T -3'	(47)
AR <i>mec</i> Fluo 4	Fluos	5'- AAG TCG CTT TGC CCT TGG GTA -3'	(48)
AR <i>mec</i> Fluo 4-2	Fluos	5'- AAG TCG CTT TGC CCT TGG GT -3'	(49)
AR <i>mec</i> Fluo 4-3	Fluos	5'- AAG TCG CTT TGC CCT TGG GTC A -3'	(50)
AR <i>mec</i> Fluo 4-GV	Fluos	5'- AAG TCG CTT TGC CCT TGG G -3'	(51)
AR <i>mec</i> Fluo 4k	Fluos	5'-CAA GAA TTG AAC CAA CGC AT -3'	(52)
AR <i>mec</i> Fluo 5	Fluos	5'- CAA TGA CGA ATA CAT AGT CGC TTT GCC CTT -3'	(53)
AR <i>mec</i> Fluo 6	Fluos	5'- CGT TTG ATC CGC CAA TGA CGA -3'	(54)
AR <i>mec</i> Fluo 7	Fluos	5'- GCC AAT CCT TCG GAA GAT AGC A -3'	(55)
AR <i>mec</i> Fluo UR	Fluos	5'- ATT AAC ACA ACC CGC ATC -3'	(56)
JU1 プローブ 1	Fluos	5'- GTC GCT TTG CCC TTG GGT C -3'	(57)
JU2 プローブ 1	Fluos	5'- TCG CTT TGC CCT TGG GTC AT -3'	(58)
JU3 プローブ 1	Fluos	5'- GGC CGT TTG ATC CGC CAA T -3'	(59)
JU4 プローブ 1	Fluos	5'- GTC CTT GTG CAG GCC GTT TGA T -3'	(60)
JU5 プローブ 1	Fluos	5'- CTT GGG TCA TGC GTT GGT TCA ATT -3'	(61)
MRSA ダイレクトFluos	Fluos	5'- AAG TCG CTT TGC CCT TGG G -3'	(96)
AR <i>mec</i> 640 3	LC Red 640	5'- CGA ATA CAA AGT CGC TTT GCC CTT GGG -3'	(62)
AR <i>mec</i> 640 4	LC Red 640	5'- ATG CGT TGG TTC AAT TCT TG -3'	(63)
AR <i>mec</i> 610 4-3	LC Red 610	5'- GCG TTG GTT CAA TTC TTG GG -3'	(64)
AR <i>mec</i> 640 4k	LC Red 640	5'- ACC CAA GGG CAA AGC GAC TT -3'	(65)
AR <i>mec</i> 640 5	LC Red 640	5'- GGT AAT GCG TTG GTT CAA TTC TTG -3'	(66)
AR <i>mec</i> 640 6	LC Red 640	5'- ACA AAG TCG CTA TGC CCT TGG GTC A -3'	(67)
AR <i>mec</i> 640 7	LC Red 640	5'- CTT TCC TTG TAT TTC TAA TGT AAT GAC TG -3'	(68)
AR <i>mec</i> 640 UR	LC Red 640	5'- TTG ATG TGG GAA TGT CAT TTT GCT GAA -3'	(69)
JU1 プローブ 2	LC Red 640	5'- GCG TTG GTT CAA TTC TTG GGC CAA T -3'	(70)
JU2 プローブ 2	LC Red 640	5'- GTT GGT TCA ATT CTT GGG CCA ATC CTT CG -3'	(71)
JU3 プローブ 2	LC Red 640	5'- CGA ATA CAA AGT CGC TTT GCC CTT GG -3'	(72)
JU4 プローブ 2	LC Red 640	5'- GCC AAT GAC GAA TAC AAA GTC GCT TTG CC -3'	(73)
JU5 プローブ 2	LC Red 640	5'- TGG GCC AAT CCT TCG GAA GAT AGC A -3'	(74)
AR <i>mec</i> 610 4-MM2	LC Red 610	5'- ATG CGT TGG TTC GAT TCT TG -3'	(75)
AR <i>mec</i> 610 4-MM2-GV	LC Red 610	5'- CAT GCG TTG GTT CGA TTC TTG -3'	(76)
MRSAダイレクトRed610	LC Red 610	5'- CAT GCG TTG GTT CGA TTC TTG -3'	(97)

## 【 0 1 4 9 】

実施例3：特定のプライマーおよびプローブの解析

RE2、RE3およびRE7に対して、同じプローブおよび同じリバースプライマーだが異なるフォワードプライマーを用いた単一の試験を確立した(表1参照)。これらの単一の試験を、10倍希釈物において約 $10^6$ ゲノムコピー/PCRから10コピー/PCRまでのダイナミックレンジで解析した(図3~5)。データ解析では、定性的検出モジュールおよびマニュアルTm呼出しを使用した。

## 【 0 1 5 0 】

試薬濃度：

フォワードプライマー：0.2~0.5  $\mu$ M

10

20

30

40

50

リバースプライマー：0.3～0.5 μM

プローブ：0.1～0.4 μM

MgCl<sub>2</sub>：3.0～4.5mM（最終濃度は、個々に反応混合物中に存在するMgCl<sub>2</sub>濃度に応じて適合させる必要がある）

LightCycler(登録商標)ウラシルDNAグリコシラーゼ：1単位/反応

LightCycler(登録商標)480 Probe Master 個々に

LightCycler(登録商標)FastStart DNA Master HybProbe個々に

LightCycler(登録商標)Fast Start DNA Master <sup>PLUS</sup> HybProbe

【0151】

PCR プロトコル:

	温度	保持	ランプ(ramp)速度	取得
変性(1 サイクル):	95°C	10 分	20	なし
増幅(45 サイクル):	95°C	10 秒	20	なし
	52～55°C	10 秒	20	1 回
	72°C	12～22 秒	20	なし
融解曲線(1 サイクル):	95°C	0 秒	20	なし
	54°C	20 秒	20	なし
	45°C	20 秒	0.2	なし
	80°C	0 秒	0.1	連続
冷却(1 サイクル):	40°C	30 秒	20	なし

【0152】

表 2: 図 3～5 で使用された SCGmec RE2、RE3および RE7 検出のためのプライマーおよびプローブ

名称	機能	標識	配列 (配列番号:)
AR <i>mec</i> 12 フォワード	RE2 検出		5'- TGA AAT GAA AGA CTG CGG AG -3' (12)
AR <i>mecA</i> 3/13	RE3 検出		5'- CCA CAT CTC ATT AAA TTT TTA AAT TAT ACA C -3' (28)
AR <i>mec</i> 5/16	RE7 検出		5'- CAA TCC TTT TTA TAT TTA AAA TAT ATT ATA CAC -3' (32)
JU1 リバース:	SA に特異性		5'- CAA GGA AAG ATG CTA TCT TCC G -3' (40)
AR <i>mec</i> Fluo 4-GV:	MRSA に特異性	Flous	5'- AAG TCG CTT TGC CCT TGG G - 3' (51)
AR <i>mec</i> 610 4- MM2-GV:	MRSA に特異性	LC-Red 610	5'- CAT GCG TTG GTT CGA TTC TTG -3' (76)
MRSA IC 4	内部対照	LC-Red 670	5'- CCA GCA GAA TGC CAA CCA -3' (91)

【0153】

図3～5において使用された試薬濃度:

AR *mec* 12 フォワード：0.5 μM

AR *mecA* 3/13：0.3 μM

AR *mec* 5/16：0.3 μM

JU1 リバース：0.5 μM

AR *mec* Fluo 4-GV：0.2 μM

AR mec 610 4-MM2-GV : 0.2 μM

LightCycler(登録商標)ウラシルDNAグリコシラーゼ : 1単位/反応

LightCycler(登録商標)480 Probe Master (PCR反応中の最終濃度は3.2mM MgCl<sub>2</sub>である)

【 0 1 5 4 】

図 3～5 で使用された PCR プロトコル:

	温度	保持	ランプ速度	取得
変性(1 サイクル):	95°C	10 分	20	なし
増幅(45 サイクル):	95°C	10 秒	20	なし
	52 °C	10 秒	20	1 回
	72°C	18 秒	20	なし
融解曲線(1 サイクル):	95°C	0 秒	20	なし
	54°C	20 秒	20	なし
	45°C	20 秒	0.2	なし
	80°C	0 秒	0.1	連続
冷却(1 サイクル):	40°C	30 秒	20	なし

10

【 0 1 5 5 】

20

以下のプライマーおよびプローブを使用した以外は上記のようにして、さらなる実施例を行なった。

【 0 1 5 6 】

AR mec 11 フォワード:	RE2検出用
AR mecA 3/8:	RE3検出用
AR mec 5/2:	RE7検出用
AR mec 6-2 リバース:	SAIに特異性
AR mec Fluo 4:	MRSAに特異性
AR mec 610 4-MM2:	MRSAに特異性

30

【 0 1 5 7 】

この実施例では、図3～5のものと同様の曲線が得られ、57.21、56.71 および56.89のT<sub>m</sub>値が、それぞれRE2、RE3およびRE7について計算された。

【 0 1 5 8 】

実施例4: 好ましいLC MRSAアッセイシステムの解析

鼻のスワブ試料に存在するメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)のために、増幅のためのプライマーおよび増幅された標的核酸の検出のためのFRETハイブリダイゼーションプローブを用いるPCRアッセイをLightCycler機器について開発した。該アッセイは、特に記載のない限り、上記の実施例1～3記載のようにして行なった。

40

【 0 1 5 9 】

この実施例はプライマーおよびプローブの好ましい組の性能評価を記載する(Roche LC MRSAアッセイシステム(PCR))。

【 0 1 6 0 】

オリゴ名	標識	配列(5' - 3')	配列番号:
プライマー, MRSA ダイレクトRE2フォワード	なし	TGA AAT GAA AGA CTG CGG AG	92
プライマー, MRSA ダイレクトRE3フォワード	なし	CCA CAT CTC ATT AAA TTT TTA AAT TAT ACA C	93
プライマー, MRSA ダイレクトRE7フォワード	なし	CAA TCC TTT TTA TAT TTA AAA TAT ATT ATA CAC	94
プライマー, MRSA ダイレクトリバース	なし	CAA GGA AAG ATG CTA TCT TCC G	95
プローブ, MRSA ダイレクト Fluos	3'フルオレセイン	AAG TCG CTT TGC CCT TGG G	96
プローブ, MRSA ダイレクト Red 610	5' LC Red 610, 3' Phosphat	CAT GCG TTG GTT CGA TTC TTG	97
プローブ, MRSA ダイレクト IC Red 670	5' LC Red 670, 3' Phosphat	CCA GCA GAA TGC CAG CCA AT	98

## 【 0 1 6 1 】

## ワークフロー:

研究室に送られた鼻のスワブを600  $\mu$ lの中和バッファーおよびおよそ50  $\mu$ lの0.1mmガラスビーズを含むスクリュウキャップ付き溶解チューブ中で分解する。チューブにキャップをし、95～100Cに設定された加熱ブロック内で2分間加熱し、スピード設定5000で70秒間 MagNA Lyserで処理する。チューブを20,000  $\times$  gで1分間遠心分離し、スワブ上部の液体5  $\mu$ lをMRSAのPCRに使用する。

## 【 0 1 6 2 】

## PCR:

PCRアッセイにより3つのタイプのMRSA(RE2、RE3およびRE7)が検出される。640nmシグナルの融解曲線解析を用いてMRSAを検出する。3つのタイプのMRSAはすべて同じ融解曲線融解温度をもたらす。ベースラインより上で $T_m$ が陽性対照の $\pm 2$ である融解曲線を陽性とみなす。710nmでのハイブリダイゼーションプローブ検出を使用するアッセイには、内部対照(IC)鑄型が含まれる。PCR阻害がないことを示すため、陰性試料における陽性対照の検出が必要である。

## 【 0 1 6 3 】

## ・特異性

コアグラーゼ陰性ブドウ球菌は、PCR標的部分を有し得る。これらの細菌の単離物がPCRにおいて交差反応しないことを確認するため、29のmecA-陰性および75のmecA-陽性コアグラーゼ-陰性ブドウ球菌の溶解培養物由来のDNAを試験した。コアグラーゼ-陰性ブドウ球菌はいずれも陽性結果を示さなかった。

## 【 0 1 6 4 】

メチシリンに感受性の黄色ブドウ球菌(MSSA)の100個の臨床単離物をPCRで試験し、PCRで偽陽性結果が得られるかどうかを調べた。黄色ブドウ球菌単離物はいずれも陽性PCR結果を示さなかった。

## 【 0 1 6 5 】

## ・包含

米国(207)および南アフリカ(105)のMRSA単離物の溶解集落由来のDNAをPCRによって試験した。4つのMRSA単離物(1.3%)はPCRによって検出されなかった。5つのMRSA単離物が低感度で検出された。

## 【 0 1 6 6 】

## ・外因性阻害

種々の量の全血をスワブに添加し、ワークフローに従って処理することによりPCR阻害を試験した。5または10  $\mu$ lの全血の添加による内部対照の阻害は示されなかった。20  $\mu$ lの血液を添加すると、反復試験により10%未満の阻害が示された。70  $\mu$ lの全血をスワブに

10

20

30

40

50

添加すると、ほとんどの反復試験で内部対照のPCRの阻害が生じた。

#### 【 0 1 6 7 】

##### ・ 感度

各MRSAタイプのDNAの希釈物での陽性PCR結果の数を5回反復して試験することにより、RE2、RE3およびRE7 MRSA標的のPCRの感度を評価した。

#### 【 0 1 6 8 】

DNAコピー	MRSAタイプ		
	RE2	RE3	RE7
20	5	5	5
10	5	4	5
5	3	4	3
2.5	0	1	1

10

#### 【 0 1 6 9 】

感度は、PCRで10コピーのDNAを使用した場合、3種類のMRSAタイプすべてで 90%であった。

#### 【 0 1 7 0 】

##### ・ 臨床感度および特異性

165の鼻のスワブ試料を用いて臨床試験を行なった。比較の黄金標準は、CHROMagar MRSA (BD, Becton, Dickinson and Company, NJ, USA)を用いる培養系検出方法であった。3つのスワブは、PCRに阻害性であることがわかった。残りの162のスワブについて、以下の結果が見られた。

20

#### 【 0 1 7 1 】

		CHROMagar MRSA	
		陽性	陰性
MRSA	陽性	33	10*
PCR	陰性	1	118

30

\* 10名のうち5名は、試験時に抗生物質処置を受けていた。

	全患者	抗生物質を受けていない患者 <sup>#</sup>
感度	97.1%	98.0%
特異性	92.2%	95.2%
PPV	76.7%	90.9%
NPV	99.2%	99.0%

<sup>#</sup> 抗生物質を受けなかった患者のうち、培養系CHROMagar MRSAに対して偽陰性結果を与え得る患者を除く

40

#### 【 0 1 7 2 】

##### ・ スワブの型

3つのスワブの型を、MRSA PCRでの使用について評価した。Copan liquid Stuarts、Copan Amies Gelおよび木炭スワブを有するCopan Amies Gelはすべて、感度およびPCR阻害について同等の結果をもたらすことがわかった。

#### 【 符号の説明 】

#### 【 0 1 7 3 】

( 図 1 )

—————	プライマー
.....	第1プローブ(アンカープローブ)
- - - - -	第2プローブ(センサープローブ)
	ミスマッチを示す



【 図 1 】

**RE2:**

TTTGCTTCACTATAAGTATTCAGTATAAAGAATATTTTCGCTATTATTTACTT  
 GAAATGAAAGACTGCGGAGGCTAACTATGTCAAAAATCATGAACCTCATTAC  
 TTATGATAAGCTTCTTAAAAACATAACAGCAATTCACATAAACCTCATATGT  
 TCTGATACATTCAAAATCCCTTTATGAAGCGGCTGAAAAAACCGCATCATT  
 GATATGCTTCTTAAAAACATAACAGCAATTCACATAAACCTCATATGTTCTG  
 ATACATTCAAAATCCCTTTATGAAGCGGCTGAAAAAACCGCATCATTATGA  
 TATGCTTCT<sup>orfx</sup> orfx →

**RE3:**

CATTCTTTCTTGATTCCATTAGTTTAAATTTAAATTTTCATCATCAATTTCT  
 TAATTTAATTGTAGTTCATAATCAATATAATTTGTACAGTTATTATATATT  
 CTAGATCATCAATAGTTGAAAAATGGTTTATTAAACACTCTATAAACATCGT  
 ATGATATTGCAAGGTATAATCCAATATTTTCATATATGTAATTCCTCCACATC  
 TCATTAAATTTTAAATTATACACAACCTAATTTTATGTTTATTTATGATA  
 CGCTTCT<sup>orfx</sup> orfx →

**RE7:**

CAAAAAATATATTTACTTTAGTCAAATCATCTTCACTAGTGTAATTATCGAA  
 TGATTTATAACTAACATTTTCTAATTTATTTAACATAAAATCAATCCTTTTT  
 ATATTTAAAAATATATTATACACAATCCGTTTTTTAGTTTTATTTATGATACG  
 CCTCT<sup>orfx</sup> orfx →

**orfx (配列番号:77):**

CCACGCATAATCTTAAATGCTCTGTACACTTGTTCAATTAACACAACCCGCA  
 TCATTTGATGTGGGAATGTCATTTTGCTGAATGATAGTGCCTAGTTACTGCG  
 TTGTAAGACGTCCTTGTGCAGGCCGTTTGATCCGCCAATGACGAATACAAAG  
 TCGCTTTGCCCTTGGGT<sup>orfx</sup> CATGCGTTGGTTCAATTCTTGGGCCAATCCTTCGG  
 AAGATAGCATCTTTCCTTGTTATTTCTAATGTAATGACTGTTGATTGT

**Fig. 1**

(配列番号: 86)

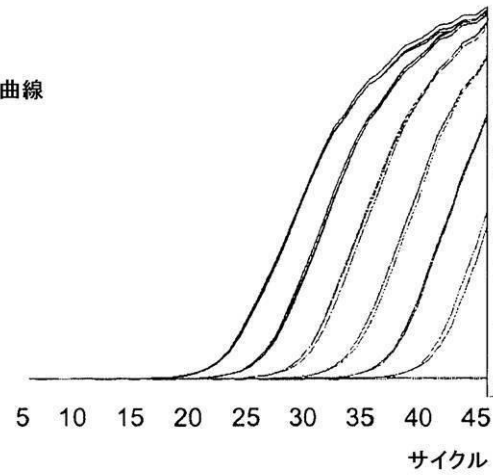
**Fig. 2**

【図3】

Fig. 3

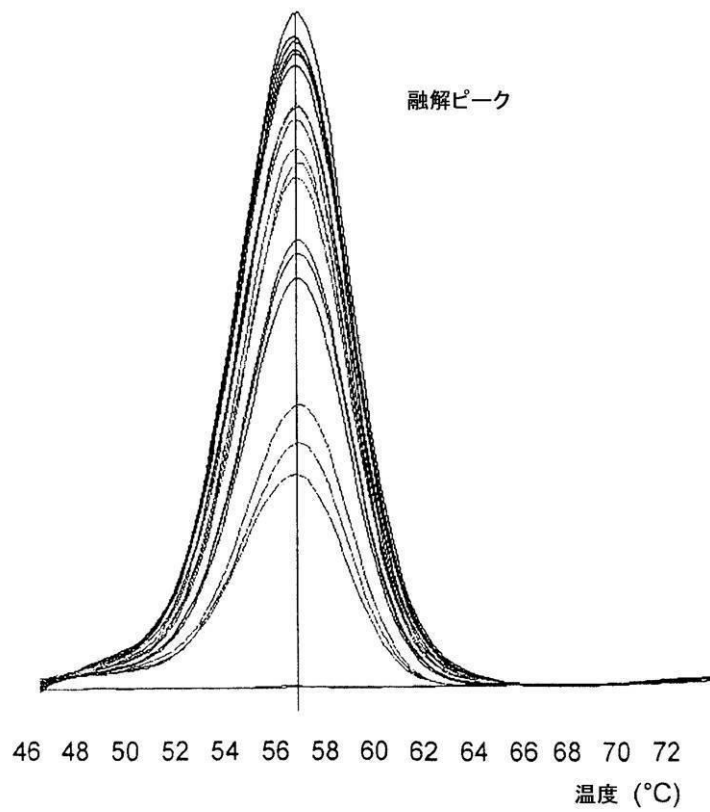
A

増幅曲線



B

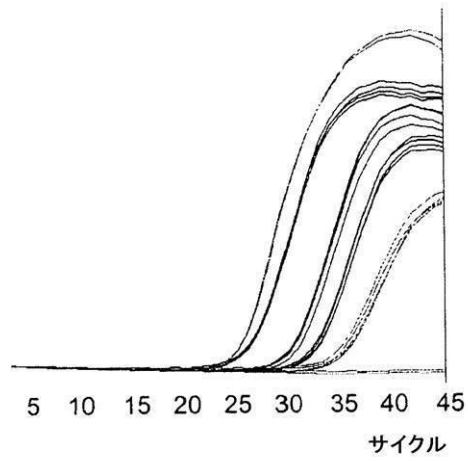
融解ピーク



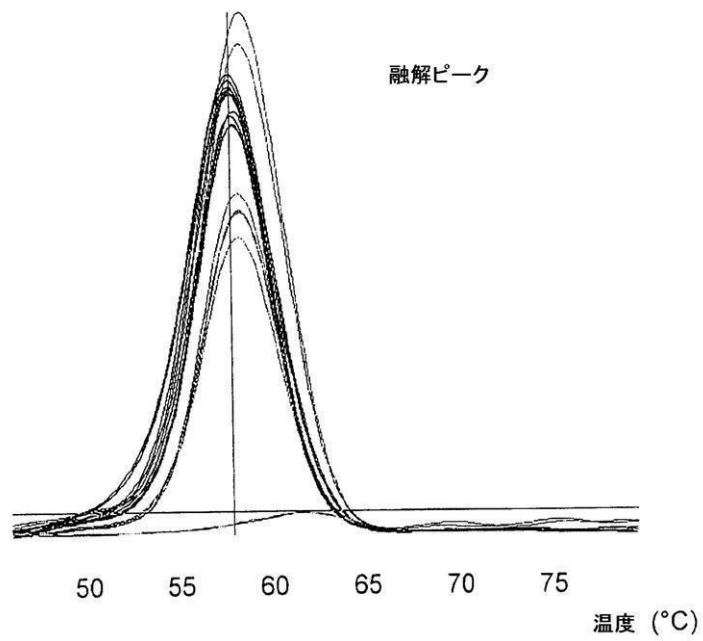
【図 4】

Fig. 4

A



B

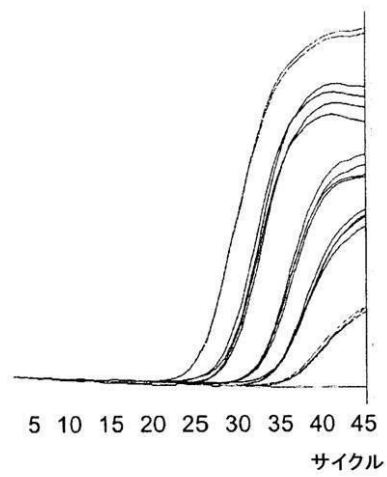


【図5】

Fig. 5

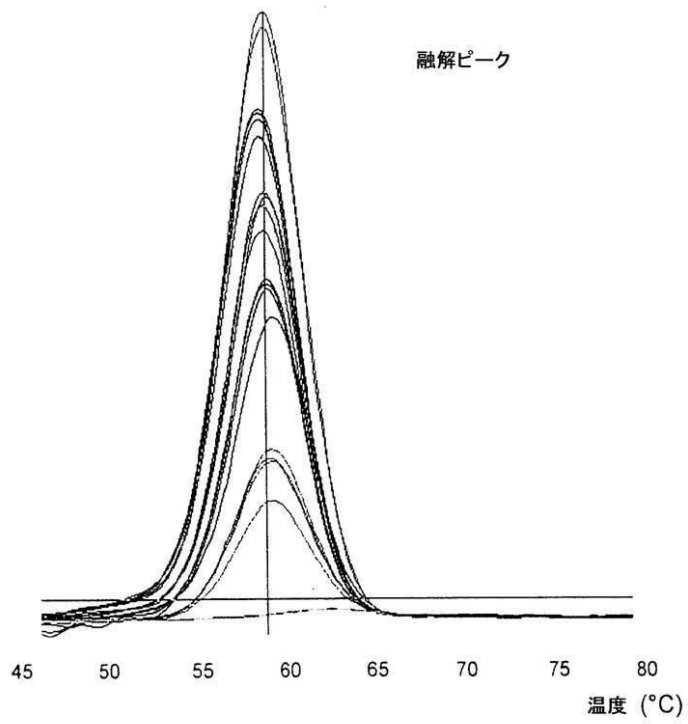
A

増幅曲線



B

融解ピーク



【配列表】

0005203387000001.app

## フロントページの続き

(74)代理人 100095832

弁理士 細田 芳徳

(72)発明者 アイヒンガー, クリスチャン

ドイツ連邦共和国 ミュンヘン 8 1 3 7 9 ギジスシュトラッセ 7

(72)発明者 ライザー, アストリート

ドイツ連邦共和国 アントドルフ 8 2 3 8 7 シュライヤー - ヴェーク 2 0

(72)発明者 ウール, ジェイムス, アール.

アメリカ合衆国 ミネソタ 5 5 9 0 2 ロチェスター, 9 ティーエイチ ストリート エスダブリュ 7 1 1

(72)発明者 コクリル, フランクリン, アール.

アメリカ合衆国 ミネソタ 5 5 9 0 5 ロチェスター, 9 ティーエイチ アベニュー エスダブリュ 7 0 9

審査官 小暮 道明

(56)参考文献 欧州特許出願公開第 0 1 5 2 9 8 4 7 ( E P , A 1 )

国際公開第 0 2 / 0 9 9 0 3 4 ( W O , A 1 )

Pathologie Biologie, 54(2006) p.477-481

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C12N15/

C12Q1/

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq