



MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM,
TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト
(規則 5.2(a))

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

明 細 書

発明の名称：大腸菌B2-ST131クローンの検査方法

技術分野

[0001] 本発明は、大腸菌B2-ST131クローンを識別するための検査方法、大腸菌B2-ST131クローンを識別するためのポリヌクレオチド又は抗体、当該ポリヌクレオチド又は抗体を含む試薬組成物、当該試薬組成物を含む試薬キット、および大腸菌B2-ST131クローンを識別するためのバイオマーカーに関する。

[0002] 本出願は、参照によりここに援用されるところの日本出願、特願2015-053351号優先権を請求する。

背景技術

[0003] 近年、さまざまな薬剤耐性菌が次々と出現する事態が生じており、薬剤耐性菌の対策に対する注目度が国際的に増している。特に腸内細菌科は経口感染によりヒト腸管内に定着しやすく、医療環境や食品環境等での感染拡大が懸念される。腸内細菌科による感染症治療には、 β ラクタム系であるカルバペネムまたはセフトジジム、フルオロキノロン系およびアミノグリコシド系の薬剤が最も汎用性の高い抗菌薬として使用されている。しかしながら、これらの抗菌薬に対する耐性を示す株について多数報告がされており、薬剤耐性菌の伝播の制御が極めて困難な状況となりつつある。

[0004] 薬剤耐性菌として、基質特異性拡張型 β ラクタマーゼ（Extended-spectrum- β -lactamase）（以下単に「ESBL」と称する。）を産生する大腸菌（*Escherichia coli*）の増加が著しいことが報告されている。病院内のみならず、市中においても蔓延が確認されている。ESBL産生大腸菌の増加の主たる原因は、ESBL産生大腸菌のB2-ST131クローンのパンデミックである。ESBL産生大腸菌B2-ST131クローンは尿路感染症の起因菌として知られており、症状が悪化した場合は敗血症などの重篤な症状を呈し、死亡に至ることもある。ESBL産生大腸菌B2-ST131クローンは、フルオロキノロン系薬剤に対してほぼ100%耐性を示し、アミノグリコシド系抗生物質に対しても耐性を示すため、高耐性

かつ高病原性の株とされ、疫学上問題視されている (Benjamin A. Rogers, Hanna E. Sijabat and David L. Paterson, 2011. J. Antimicrob. Chemother. 66: 1-14)。

[0005] またカルバペネマーゼを産生する大腸菌についても報告がある。日本においては、まだ1%未満の分離頻度でしか報告されていないが、欧州等の一部の地域・施設においてはアウトブレイクも多く報告されている。カルバペネマーゼを産生する大腸菌は、2013年以降急増し、世界レベルでは蔓延しつつある薬剤耐性菌として知られている。カルバペネマーゼ産生菌は、ESBL産生株には効果を示すカルバペネム系抗菌薬にも耐性を示し、肺炎や尿路感染症などを引き起す。その症状の重篤化、致死率の高さから、カルバペネマーゼ産生菌は世界中で脅威となっている。またカルバペネマーゼを産生する大腸菌のおよそ半分を、大腸菌B2-ST131クローンが占めているとの報告がされている (中村彰宏ら、当院における過去4年間のカルバペネマーゼ産生腸内細菌科の検出状況と分子疫学的特徴、第26回日本臨床微生物学会総会、2015年1月31日、東京。)。

[0006] 大腸菌B2-ST131クローンの同定には、multilocus sequence typing (以下単に「MLST」と称する) 解析が用いられている。しかしながら、MLST解析は操作が煩雑かつ高価な検査法であり、加えて検査結果が得られるまで長時間を要する。よってMLST解析による大腸菌B2-ST131クローンの同定は、感染症初期治療決定ツールとしては実用性が乏しいものである。医療関連感染などでは迅速な対応が必須であり、臨床上、大腸菌B2-ST131クローンを迅速に識別する検査方法が切望されているものの、未だ開発はなされていない。大腸菌B2-ST131クローンを迅速に識別する検査方法が開発されれば、感染症治療の方針決定のための革新的ツールになると考えられ、世界的なパンデミックを制御できる可能性も秘めている。

[0007] 非特許文献1 (Matsumura Y, Yamamoto M, Nagao M, Tanaka M, Machida K, Ito Y, Takakura S, Ichiyama S. 2014. J. Clin. Microbiol. 52: 1034-1040.) には、ESBL産生大腸菌B2-ST131クローンをMALDI-TOF MSを用いて検出

する方法が開示されているが、7,650m/zのピークについての開示はない。特許文献1および2（国際公開第W02010/22400号および米国特許第8160819号）には、大腸菌のペリプラズムタンパク質として、34番目のアミノ酸がグルタミン酸であるYah0タンパク質を検出したことが開示されている。具体的には、大腸菌（E.coli 0157、K-12株）由来のYah0タンパク質のアミノ酸配列とそのMSフラグメント（7,707m/z）が開示されている。また、34番目のアミノ酸がアラニンであるYah0タンパク質（GenBank Accession No. WP_000691950）が大腸菌から単離されたことが報告されている（非特許文献2（URL：http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gquery/?term=WP_000691950））。しかしながら、Yah0タンパク質における34番目のアミノ酸のアラニンへの置換と、大腸菌B2-ST131クローンとの関連性については、開示されていない。

先行技術文献

特許文献

[0008] 特許文献1：国際公開第W02010/22400号

特許文献2：米国特許第8160819号

非特許文献

[0009] 非特許文献1：Matsumura Y, Yamamoto M, Nagao M, Tanaka M, Machida K, Ito Y, Takakura S, Ichiyama S. 2014. J. Clin. Microbiol. 52: 1034-1040

非特許文献2：URL：http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gquery/?term=WP_000691950

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0010] 本発明は、大腸菌B2-ST131クローンを迅速かつ簡便に識別する検査方法や検査のためのポリヌクレオチドや抗体といった検出手段を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0011] 本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討を重ねた結果、Yah0タンパク質を構成するアミノ酸配列のうち、配列番号1の34番目のグルタミン酸のアラニンへの変異が、大腸菌B2-ST131クローンに特異的であることに着目し、当該アミノ酸の変異を検出することにより、大腸菌B2-ST131クローンを迅速かつ効率的に検出可能であること見出し、本発明を完成した。

[0012] すなわち本発明は、以下よりなる。

1. Yah0タンパク質を構成するアミノ酸配列のうち、配列番号1に示すアミノ酸配列における第34番目のアミノ酸のアラニンへの変異を検出することを特徴とする、大腸菌B2-ST131クローンを識別するための検査方法。

2. 前記第34番目のアラニンへの変異の検出が、以下のi)～iii)より選択されるいずれかにより行われる、前項1に記載の検査方法：

i) 被検試料について、前記第34番目のアミノ酸を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの塩基配列を解析すること；

ii) 被検試料について、配列番号1に示すアミノ酸配列のうち、第34番目のアミノ酸を含むポリペプチドのアミノ酸配列を解析すること；

iii) 被検試料について、前記第34番目のアミノ酸を含むポリペプチドの分子量を測定すること。

3. 前記第34番目のアラニンへの変異の検出が、以下のi)～iii)より選択されるいずれかにより行われる、前項2に記載の検査方法。

i) 被検試料について、前記第34番目のアミノ酸を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの塩基配列を、核酸増幅反応により解析すること；

ii) 被検試料について、配列番号1に示すアミノ酸配列のうち、第34番目のアミノ酸を含むポリペプチドのアミノ酸配列を、免疫学的手法により解析すること；

iii) 被検試料について、前記第34番目のアミノ酸を含むポリペプチドの分子量を、質量分析計を用いて測定すること。

4. Yah0タンパク質を構成するアミノ酸配列のうち、配列番号1に示すアミノ酸配列における第34番目のアミノ酸のアラニンへの変異を示す塩基を検出

するための、少なくとも15ヌクレオチドの長さを有するポリヌクレオチド。

5. 前記ポリヌクレオチドが、前記第34番目のアミノ酸を含むポリペプチドをコードする塩基配列の部分配列又は当該部分配列に相補的な配列とハイブリダイズし得る、前項4に記載のポリヌクレオチド。

6. 前記ポリヌクレオチドが、前記第34番目のアミノ酸のアラニンへの変異を示す塩基を含む部分配列又は当該部分配列に相補的な配列を特異的に増幅し得るプライマーである、前項4又は5に記載のポリヌクレオチド。

7. 前記ポリヌクレオチドが、配列番号13に示す5'-GAATTTGAAAARGTYGC-3'の塩基配列を含むものである、前項5～6のいずれか1に記載のポリヌクレオチド。

8. 前項4～7のいずれか1に記載のポリヌクレオチドをプライマーとして含む、プライマーセット。

9. Yah0タンパク質を構成するアミノ酸配列のうち、配列番号1に示すアミノ酸配列における第34番目のアミノ酸のアラニンへの変異を検出するための、前記第34番目のアミノ酸を含むポリペプチドを特異的に認識する、抗体。

10. 前記抗体が、前記第34番目のアミノ酸としてアラニンを含むポリペプチド又は前記第34番目のアミノ酸としてグルタミン酸を含むポリペプチドのいずれかを特異的に認識する、前項9に記載の抗体。

11. 前項4～7のいずれか1に記載のポリヌクレオチド、前項8に記載のプライマーセット、又は前項9～10のいずれか1に記載の抗体を含む、大腸菌B2-ST131クローン識別用試薬組成物。

12. 前項11に記載の大腸菌B2-ST131クローン識別用試薬組成物を含む、大腸菌B2-ST131クローン識別用試薬キット。

13. 前項4～7のいずれか1に記載のポリヌクレオチド、前項8に記載のプライマーセット、前項9～10のいずれか1に記載の抗体、前項11に記載の大腸菌B2-ST131クローン識別用試薬組成物、又は前項12に記載の大腸菌B2-ST131クローン識別用試薬キットを用いて、Yah0タンパク質を構成するアミノ酸配列のうち、配列番号1に示すアミノ酸配列における第34番目のア

ミノ酸のアラニンへの変異を検出することを特徴とする、大腸菌B2-ST131クローンを識別するための検査方法。

14. 大腸菌B2-ST131クローンが、基質特異性拡張型 β ラクタマーゼ (ESBL) 産生大腸菌又はカルバペネマーゼ産生大腸菌を含む、前項1～3及び前項13のいずれか1に記載の検査方法。

15. 以下のa) またはb) から選択される大腸菌B2-ST131クローンを識別するためのバイオマーカー：

a) Yah0タンパク質を構成するアミノ酸配列のうち、配列番号1に示すアミノ酸配列における第34番目のアミノ酸がアラニンに変異したアミノ酸配列を含むポリペプチドからなるバイオマーカー；

b) a) に記載の前記第34番目のアミノ酸がアラニンに変異したアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドからなるバイオマーカー。

発明の効果

[0013] 本発明によれば、大腸菌B2-ST131クローンを迅速かつ簡便に識別することが可能となる。また本発明によるESBL産生大腸菌B2-ST131クローンに対する感度および特異度は、各々100%および89.7%と極めて高い。さらに本発明によるカルバペネマーゼ産生大腸菌B2-ST131クローンに対する感度および特異度も、各々95%および88%と極めて高い。本発明により、大腸菌B2-ST131クローンを正確に検出することが可能となる。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]臨床検体由来のESBL産生大腸菌B2-ST131クローン群と他のSTクローン群の各々の培養液から抽出したタンパク質について、MALDI-TOF MS解析を行った結果を示す図である。なお、質量分析器は (A) Burkert社製MALDI Biotyperおよび (B) Applied Biosystems社製Voyager-DE-1000の2種を使用した。(実施例1)

[図2]プロテオミクス解析により、7,650Daまたは7,707Daのタンパク質として同定されたYah0タンパク質のアミノ酸配列を示す図である。(実施例2)

[図3]ESBL産生大腸菌B2-ST131クローン群と他のSTクローン群由来の (A) Ya

h0遺伝子の塩基配列および（B）Yah0タンパク質のアミノ酸配列のアライメントを示す図である。矢印は置換部位を示す。（実施例3）

[図4]配列番号13のプライマーを用いたリアルタイムPCRにより、ESBL産生大腸菌B2-ST131クローン群を検出した結果を示す図である。（実施例4（1））

[図5]配列番号13のプライマーを用いたPCRおよび電気泳動により、ESBL産生大腸菌B2-ST131クローン群を検出した結果を示す図である。（実施例4（2））

発明を実施するための形態

[0015] 本発明は、大腸菌B2-ST131クローンを識別するための検査方法に関するものであり、Yah0タンパク質を構成するアミノ酸配列のうち、配列番号1に示すアミノ酸配列における第34番目のアミノ酸のアラニンへの変異を検出することを特徴とする。

[0016] 大腸菌は、血清型（O抗原及びH抗原への免疫学的反応による分類）や、系統発生群解析（phylogenetic groups）により分類される。本発明の検査方法において識別される大腸菌B2-ST131クローンは025:H4血清型、B2群に分類される。従来、大腸菌B2-ST131クローンの最終的な同定は、MLST解析により、Sequence type（ST）を決定することにより行われていた。MLST解析は、細菌の5～7領域のハウスキーピング遺伝子についてそれぞれ400～600塩基を解読し、これらの配列を比較することでタイピングを行うものである（木村凡 モダンメディア 52 巻 7 号 2006 [分子疫学] 209、http://www.eiken.co.jp/modern_media/backnumber/pdf/MM0607-01.pdf）。大腸菌B2-ST131クローンは、上記分類方法により分類される一群の菌株であり、同一株のみならず、複数種の株を含む。大腸菌B2-ST131クローンは、大腸菌B2-ST131クローン群と称することもできる。なお以下「大腸菌B2-ST131クローン」を「B2-ST131クローン」もしくは「B2-ST131クローン群」と称することもある。

[0017] 本発明の検査方法において識別される大腸菌B2-ST131クローンは、薬剤耐性を示す大腸菌B2-ST131クローンである。薬剤耐性を示す大腸菌B2-ST131ク

ローンは、薬剤に対して高耐性かつ高病原性の株であり、多剤耐性大腸菌として特に警戒されている。薬剤耐性を示す大腸菌B2-ST131クローンには、 β ラクタマーゼを産生する大腸菌が含まれる。 β ラクタマーゼを産生する大腸菌には、ESBLを産生する大腸菌や、カルバペネマーゼを産生する大腸菌が含まれる。ESBLは、ペニシリンなどの β ラクタム環を持つ抗生物質を分解する。ESBL産生菌は、 β ラクタマーゼ産生遺伝子（TEM型、SHV型、CTX-M型）の突然変異により、分解可能な薬剤の種類が拡大した β ラクタマーゼを産生するようになったものであり、多剤耐性を示す。ESBLを産生する遺伝子は、薬剤プラスミド（Rプラスミド）上にコードされているため、同菌種間はもとより、腸内細菌科の異なる菌種間に伝達されることから、大腸菌のみならず、多菌種に広がってきている。またカルバペネマーゼ産生菌は、カルバペネム系抗菌薬を含むほぼすべての β ラクタム系抗菌薬を分解する。カルバペネマーゼ産生菌は、主にIMP型、VIM型、NDM型、KPC型、GES型およびOXA-48型の6種類が知られており、いずれも高度な多剤耐性を示す。カルバペネマーゼはカルバペネム系抗菌薬を分解することができ、ESBLと同様に伝達性のプラスミド上に位置することから、今後様々な菌種に急速に拡散する危険性がある。

[0018] 本発明においては、大腸菌B2-ST131クローンと、大腸菌B2-ST131以外の他のSTクローン（本明細書において単に「他のSTクローン」と称することもある）から、タンパク質を抽出し、質量分析計を用いて網羅的に解析を行った結果、大腸菌B2-ST131クローンに特異的なピーク7,650m/zが検出されることが見出された。さらにプロテオミクス解析と遺伝子解析とを併せて研究を進めた結果、ピーク7,650m/zを示すタンパク質は、機能が未決定であるYah0タンパク質と同定された。一方、他のSTクローンにおいては、7,650m/zが検出されず、7,707m/zのピークが検出された。両者のピークのm/z差の57m/zは分子量の差であり、Yah0タンパク質のアミノ酸配列の34番目のグルタミン酸のアラニンへの置換（E34A）に起因することを明らかにした。すなわち、Yah0タンパク質のアミノ酸配列の34番目のグルタミン酸のアラニンへの置換（E34A）は、大腸菌B2-ST131クローンに特異的であることを明らかにした。

[0019] 本発明は、Yah0タンパク質を構成するアミノ酸配列のうち、配列番号1の34番目のグルタミン酸(E)のアラニンへ(A)の置換(以下「E34A」と示す)を検出することにより、大腸菌 B2-ST131クローンを識別するものである。大腸菌(E. coli 0157、K-12株)由来のYah0タンパク質の全長アミノ酸配列を以下の配列番号1に示す。配列番号1のアミノ酸配列では、34番目のアミノ酸はグルタミン酸であるが、大腸菌B2-ST131クローンにおいては、かかる34番目のグルタミン酸がアラニンに置換している。

配列番号1: MKIISKMLVGALALAVTNVYAAELMTKAEFEKVESQYEKIGDISTSNEMSTADAKED
LIKKADEKGAADVLTSGQTDNKHGTANIYKKK (UniProtKB Accession No. P75694)

[0020] また、配列番号1に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列を、以下の配列番号2に示す。大腸菌B2-ST131クローンにおいては、配列番号2のグルタミン酸をコードする100~102番目のコドンが、アラニンをコードするコドンに置換している。

配列番号2: ATGAAAATAA TCTCTAAAAT GTTAGTCGGT GCGTTAGCGT TAGCCGTTAC CA
ATGTCTAT GCCGCTGAAT TGATGACCAA AGCGGAATTT GAAAAAGTTG AATCGCAGTA TGAAA
AAATA GGTGATATTT CAACCAGCAA TGAAATGTCTG ACTGCAGATG CAAAAGAAGA TTTGATCA
AA AAAGCGGATG AAAAAGGGGC TGATGTGTTG GTACTGACCT CCGGTCAAAC TGACAATAAG
ATCCACGGCA CGGCAAATAT TTATAAGAAG AAGTAA (GenBank Accession No. U00096
)

[0021] 配列番号1におけるE34A変異の検出は、Yah0タンパク質およびYah0遺伝子の全長を解析してもよいが、部分断片を解析することにより行うのが簡便であり好ましい。E34A変異の検出は、いかなる手法により行ってもよいが、例えば以下のi)~iii)より選択されるいずれかにより行うことができる。

i) 被検試料について、前記第34番目のアミノ酸を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの塩基配列を解析すること。

ii) 被検試料について、配列番号1に示すアミノ酸配列のうち、第34番目のアミノ酸を含むポリペプチドのアミノ酸配列を解析すること。

iii) 被検試料について、前記第34番目のアミノ酸を含むポリペプチドの分子

量を測定すること。

[0022] なお本発明において「ポリペプチド」とは、2以上のアミノ酸が結合してなるペプチドおよびタンパク質を指す。また本発明における「ポリヌクレオチド」とはオリゴヌクレオチドを含む概念であり、塩基・糖・リン酸からなるヌクレオチドが2以上リン酸エステル結合した生体高分子を指し、DNAおよびRNA等の核酸を含む。ポリペプチドまたはポリヌクレオチドの長さは、検査に用いる解析手法により検出可能な程度であればよい。例えば、抗体の結合特異性を利用してアミノ酸配列を解析する場合、ポリペプチドの長さは抗体がアミノ酸配列を特異的に認識し得る程度の長さであればよく、少なくとも3～15アミノ酸程度の長さであればよい。質量分析計により分子量を測定する場合、ポリペプチドの大きさは質量分析計が測定可能な程度であればよく、例えば質量分析計としてMALDI-TOF MSを用いる場合は、2000Da～20000Daのポリペプチドであればよい。PCR法やLAMP法等の核酸増幅反応を用いて塩基配列を解析する場合は、ポリヌクレオチドの長さは増幅反応の鋳型となり得る程度の長さであればよく、100～1000塩基程度の長さである。

[0023] 上記 i) の塩基配列の解析は、34番目のアミノ酸をコードする塩基配列を検出し得る遺伝子変異解析方法であればいかなる手法により行ってもよいが、例えば、シーケンス解析、PCR法やLAMP法等の核酸増幅反応、ハイブリダイゼーション法などが挙げられる。

[0024] 塩基配列の解析には、Yah0タンパク質を構成するアミノ酸配列のうち、配列番号1に示すアミノ酸配列における第34番目のアミノ酸置換を示す塩基を検出するための、ポリヌクレオチドを用いることができる。当該ポリヌクレオチドは、少なくとも15ヌクレオチド（塩基）、好ましくは17ヌクレオチド（塩基）の長さを有するものである。当該ポリヌクレオチドはプライマー又はプローブとして機能するものである。当該ポリヌクレオチドは、前記第34番目のアミノ酸を含むポリペプチドをコードする塩基配列の部分配列又は当該部分配列に相補的な配列と特異的にハイブリダイズし得るポリヌクレオチドであることが好ましく、さらに、前記第34番目のアミノ酸のアラニンへの

変異を示す塩基を含む部分配列又は当該部分配列に相補的な配列と特異的にハイブリダイズし得るポリヌクレオチドであることが好ましい。当該ポリヌクレオチドの塩基配列は、前記第34番目のアミノ酸のアラニンへの変異を示す塩基を含む部分配列又は当該部分配列に相補的な配列に100%相補的な配列である必要はなく、1塩基～5塩基ほど（好ましくは1～4塩基ほど、より好ましくは1～2塩基ほど）欠失していてもよいし、相補的でない塩基が置換、挿入又は付加されていてもよい。また、ポリヌクレオチドがプライマーである場合は17～25ヌクレオチド程度とすることが好ましく、プローブである場合は10～30ヌクレオチド程度とすることが好ましい。

[0025] プライマー及びプローブは、公知のプライマー又はプローブ設計ソフトウェアを用いて設計することができる。公知のソフトウェアとしては例えば、OLIGO Primer Analysis Software (Molecular Biology Insights社)、Beacon Designer (PREMIER Biosoft社)、Primer Expressソフトウェア（ライフテクノロジーズ社）等を利用することができる。

[0026] またポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチドの合成法として当技術分野で公知の方法、例えば、ホスホトリエチル法、ホスホジエステル法等により、通常用いられるDNA自動合成装置を利用して合成することができる。

[0027] シークエンス解析は、自体公知の手法により行うことができる。例えば、アミノ酸置換を示す塩基の5'側数十塩基の位置に設計したプライマーを使用してシークエンス反応を行い、その解析結果から、該当する位置がどの種類の塩基であるかを決定することができる。なお、シークエンス解析を行う場合には、予めアミノ酸置換を示す塩基を含む断片をPCR法などの核酸増幅反応によって増幅しておくことが好ましい。核酸増幅反応に用いるプライマーは、目的を達成し得るものであればいかなるものであってもよいが、例えば以下のプライマーが例示される。

forward primer : 5'-TAGTCGGTGCGTTAGCGTT-3' (配列番号 1 1)

reverse primer : 5'-TGCCGTGGATCTTATTGTCA-3' (配列番号 1 2)

[0028] アミノ酸置換を示す塩基を含むポリヌクレオチドを増幅し、増幅産物の電

気泳動における移動度の違いによって当該塩基の種類を確認することもできる。例えば、PCR-SSCP (single-strand conformation polymorphisms法) (Genomics, 1992 Jan 1; 12(1): 139-146.) を用いることができる。アミノ酸置換を示す塩基が制限酵素認識配列に含まれる場合は、制限酵素による切断の有無によって解析することもできる (RFLP法)。さらにハイブリダイゼーション法では、アミノ酸置換を示す塩基に対応するプローブを用いて、当該プローブにハイブリダイズするか否かを調べることによって、塩基の種類を解析することも可能である。

[0029] また、PCR法、LANP法 (特許第3313358号)、NASBA法 (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification; 特許2843586号)、ICAN法 (特開2002-233379号公報) などの核酸増幅反応を行い、増幅の有無を調べることにより解析することもできる。核酸増幅反応を用いた解析は以下の工程により行うことができる。

(1) 被検試料から、ポリヌクレオチドを抽出する工程。

(2) 抽出したポリヌクレオチドを鋳型として、34番目のアミノ酸置換を示す塩基を含む塩基配列を増幅し得るプライマーにより、核酸増幅反応を行う工程。

(3) 増幅産物を検出する工程。

[0030] 例えばPCR法では、前記第34番目のアミノ酸置換 (好ましくはアラニンへの変異) を示す塩基を含む部分配列又は当該部分配列に相補的な配列と特異的にアニーリングし得るポリヌクレオチドであることが好ましい。一般的にアミノ酸は、3つの塩基からなるトリプレットコドンにより指定されるが、本明細書における「アミノ酸置換を示す塩基」とはトリプレットコドンのうち、少なくとも1塩基以上、好ましくは2塩基以上である。PCR法では、アミノ酸置換を示す塩基を含む領域に特異的にアニーリングし得るプライマーと、当該プライマーと対になって核酸断片を増幅し得るプライマーとをセットで用意する。かかるプライマーセットを用いてPCRを行い、増幅産物の有無によってアミノ酸置換を示す塩基の有無を検出することができる。また、アミノ

酸置換を示す塩基を含む断片を増幅可能なプライマーセットを用いてPCRを行い、増幅産物を解析することにより、アミノ酸置換を示す塩基の有無を検出することができる。アミノ酸置換を示す塩基を含む領域である部分配列に特異的にハイブリダイズし得るプライマーはforwardプライマーであっても、reverseプライマーであってもよいが、例えば以下に示すオリゴヌクレオチドからなるforwardプライマーを用いることができる。

forward primer : 5'-GAATTTGAAAARGTYGC-3' (配列番号 13)

配列番号 13 のforwardプライマーを含むプライマーセットを用いてPCRを行った場合、増幅産物の有無はシーケンス解析による解析結果と100%一致する。配列番号 13 のプライマーによる変異に対する特異度は極めて高く、正確な検出を行うことができる。

[0031] PCR法による増幅産物の有無の検出は、増幅産物をアガロースゲル電気泳動により分離し、エチジウムブロマイド、SYBR Green Iなどのインターカラーターにより染色することにより行うことができる。配列番号 13 のforwardプライマーを用いた検出では、PCR増幅産物のバンドが観察された場合に、被検試料中に大腸菌B2-ST131クローンが存在することを意味し、PCR増幅産物のバンドが観察されない場合に、被検試料中に大腸菌B2-ST131クローンが存在しないことを意味する。

リアルタイムPCR法を用いて、E34Aの検出を行うことも可能である。公知のリアルタイムPCR装置を用いることにより自動的に短時間で増幅産物の有無を確認することができる。リアルタイムPCR法では、SYBR Green Iを用いて、SYBR Green Iが二本鎖DNAに結合したときに発する蛍光値から増幅産物量をサイクル毎にモニターすることが可能である。さらに、PCR後に融解曲線分析を行うことにより増幅産物が目的の増幅産物であるかどうかを確認できる。配列番号 13 のforwardプライマーは、リアルタイムPCRにも適用可能であり、約30分程度でE34Aの有無を検出することができる。

[0032] 本発明は、前記第34番目のアミノ酸置換を示す塩基の検出を可能にするポリヌクレオチド、プライマー、プローブ、又はプライマーセットも包含する

。また、本発明は当該ポリヌクレオチド、プライマー、プローブ又はプライマーセットを含む試薬組成物をも包含する。さらに本発明は当該試薬組成物を含む試薬キットも包含する。本発明の試薬組成物又は試薬キットは、大腸菌B2-ST131クローンの識別のためのものであり、本発明の検査方法に用いられるものである。

[0033] 上記ポリヌクレオチド、プライマー、プローブ又はプライマーセットは、乾燥した状態もしくはアルコール沈澱の状態、固体として試薬組成物として提供することもできるし、水、生理食塩水、もしくは適当な緩衝液（例：TE緩衝液等）中に溶解した状態で、試薬組成物として提供することができる。試薬組成物には、添加剤（例えば担体、賦形剤、希釈剤等）、安定化剤等が含有されていてもよい。安定化剤としては、グルコース等の単糖類、サッカロース、マルトース等の二糖類、マンニトール、ソルビトール等の糖アルコール、塩化ナトリウム等の中性塩、グリシン等のアミノ酸、ポリエチレングリコール、ポリオキシエチレンーポリオキシプロピレン共重合体（プルロニック）、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル（トウイーン）等の非イオン系界面活性剤、ヒトアルブミン等が例示され、1～10w/v%程度が添加されていることが好ましい。

[0034] また上記試薬キットは、上記ポリヌクレオチド、プライマー、プローブ又はプライマーセットを含む試薬キット等が例示される。プライマーセットは塩基配列解析を行うことができるものであればいかなるものであってもよいが、少なくとも2種以上のプライマーを含み、核酸増幅反応に用いられるものが好ましい。プライマーセットは前記第34番目のアミノ酸を含むアミノ酸配列をコードする変異部位を示す塩基を含む領域に特異的にハイブリダイズし得るプライマーを含むセットがより好ましい。当該試薬キットには、核酸増幅反応に必要な試薬、例えば、DNA合成酵素、緩衝液、dNTPミックスや、インターカレーター、塩化マグネシウム、使用説明書より選択される1つ以上を含めることができる。またリアルタイムPCRによる増幅産物の検出を行うために、蛍光物質等で標識されたプローブを含んでもよい。あるいは、当該ポ

リヌクレオチドは、適当な固相に固定化された状態で提供することもできる。固相としては、例えば、ガラス、シリコン、プラスチック、ニトロセルロース、ナイロン、ポリビニリデンジフロリド等が挙げられるが、これらに限定されない。また、固定化手段としては、予め核酸にアミノ基、アルデヒド基、SH基、ビオチンなどの官能基を導入しておき、一方、固相上にも該核酸と反応し得る官能基（例：アルデヒド基、アミノ基、SH基、ストレプトアビジンなど）を導入し、両官能基間の共有結合で固相と核酸を架橋したり、ポリアニオン性の核酸に対して、固相をポリカチオンコーティングして静電結合を利用してポリヌクレオチドを固定化するなどの方法が挙げられるが、これらに限定されない。

[0035] 上記ii) のアミノ酸配列の解析は、34番目のアミノ酸を検出し得るものであればいかなる手法により行ってもよいが、ウェスタンブロッティング法、ELISA法、及びラテックス凝集免疫法等の抗原抗体反応検出法や、アミノ酸配列決定法により行うことができる。

[0036] アミノ酸配列の解析には、前記第34番目のアミノ酸を含むポリペプチド、好ましくは前記第34番目のアミノ酸がアラニンであるポリペプチドを特異的に認識する抗体を用いることができる。当該抗体は、前記第34番目のアミノ酸を含むポリペプチドや当該ポリペプチドの抗原性を有する部分ペプチドを免疫原として用い、既存の一般的な製造方法によって製造することができる。

[0037] 抗体作製のための免疫原は、前記第34番目のアミノ酸を含むポリペプチドを菌から分離精製して調製することができる。また、前記以外に遺伝子工学的手法により作製した組換えポリペプチドを免疫原として用いることもできる。さらに、前記で得られた免疫原をトリプシンなどのプロテアーゼで処理して得られるペプチドフラグメントや合成ペプチドを免疫原として用いることもできる。

[0038] 本発明の前記第34番目のアミノ酸を含むポリペプチドに特異的なポリクローナル抗体は、以下の方法により作製することができる。ウサギ、マウス、

ラットなどの哺乳動物を、上記のようにして作製して精製した前記第34番目のアミノ酸を含むポリペプチドを、抗原（免疫原）として用いて免疫する。投与手段としては、腹腔内注射、静脈注射、皮下注射などが採用され、場合により皮内注射も採用される。追加免疫を数回繰り返し、最終免疫後3～10日目に哺乳動物の採血を行い、抗血清（ポリクローナル抗体）を得る。上記工程により前記第34番目のアミノ酸を含むポリペプチドを用いて抗血清を得た後、それら抗血清と前記第34番目のアミノ酸を含むポリペプチドの類縁タンパクとを混合して、類縁タンパクと反応する抗体を除去し、前記第34番目のアミノ酸を含むポリペプチドに対して特異的なポリクローナル抗体を作製することができる。前記第34番目のアミノ酸がアラニンであるポリペプチドに対して特異的なポリクローナル抗体を作製する場合は、類縁タンパクとして前記第34番目のアミノ酸がグルタミン酸であるポリペプチドを用いることができる。

[0039] 本発明の前記第34番目のアミノ酸を含むポリペプチドを特異的に認識し結合するモノクローナル抗体は、ケーラーとミルステインの方法（Kohler, G. and Milstein, C., Nature, 256, 495-497, 1975）等の公知の方法により作製し得る。ポリクローナル抗体の作製と同様にして、前記第34番目のアミノ酸を含むポリペプチドを免疫原として用いることができる。免疫原は、市販のフロイント完全アジュバント又はフロイント不完全アジュバント等の適当なアジュバントと共に投与するのが望ましい。また、被免疫動物としては、マウス、ラット、モルモット等が利用可能であるが、通常はマウスが汎用される。調製した免疫原は、動物の皮下、腹腔内、静脈内、筋肉内、皮内等いずれのルートを通して投与することができる。免疫の間隔は特に限定されないが、例えば1～2週間隔で、2～5回免疫するのが望ましい。また、1回当たりの投与量も限定されないが、例えば上述のように調製した免疫原を適当なアジュバントと混合し、数十 μ l～数百 μ lの量を投与すればよい。

[0040] 最終免疫後、3～10日後に、被免疫動物から抗体産生細胞を採取する。抗体産生細胞としては、脾臓細胞、リンパ節細胞、胸腺細胞、末梢血細胞等が

挙げられるが、脾臓細胞を用いるのが一般的である。調製した抗体産生細胞を骨髓腫細胞と細胞融合させる。骨髓腫細胞としては、当業者が入手可能な株化細胞を用いることができ、Sp2/0-Ag14[ATCC CRL-1581;Nature, 276, 271(1978)]、P3X63Ag8[ATCC TIB-9;Nature, 265, 495-497(1978)]、P3X63 Ag8U.1(P3U1)[ATCC CRL-1580;Current Topics in Microbiology and Immunology, 81, 1-7(1978)]、P3X63Ag8.653[ATCC TIB-18;European J.Immunology, 6, 511-519(1976)]、P2/NSI/1-Ag4-1[ATCC CRL-1581;Nature, 276, 269-270(1978)]等のマウス骨髓腫細胞株が挙げられる。細胞融合は、動物細胞培養用培地中で $10^7 \sim 10^8$ 細胞/mlの骨髓腫細胞と抗体産生細胞とを、混合比1 : 1 ~ 1 : 10で、融合促進剤や融合ウイルス等を用いて、30~37℃で1~3分間細胞同士を接触させることにより効率的に行うことができる。

[0041] 細胞融合処理後に選択培地を用いて細胞培養を行い、ハイブリドーマを選別する。選別されたハイブリドーマについて、限界希釈法、軟寒天法、フィブリンゲル法、蛍光励起セルソーター法等によりクローニングを行う。細胞の培養上清について、前記第34番目のアミノ酸を含むポリペプチドに対する抗体の産生があるか否かを検定し、前記第34番目のアミノ酸を含むポリペプチドを特異的に認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマをスクリーニングする。モノクローナル抗体について1次スクリーニングとして、前記第34番目のアミノ酸を含むポリペプチドと反応し結合するモノクローナル抗体を含む培養上清を選別し、さらに2次スクリーニングとして類縁タンパクと反応しないモノクローナル抗体を含む培養上清を選別し、前記第34番目のアミノ酸を含むポリペプチドを特異的に認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマをスクリーニングすることができる。前記第34番目のアミノ酸がアラニンであるポリペプチドに対して特異的なモノクローナル抗体を作製する場合は、類縁タンパクとして前記第34番目のアミノ酸がグルタミン酸であるポリペプチドを用いることができる。

[0042] 前記第34番目のアミノ酸を含むポリペプチドを特異的に認識するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマから通常の細胞培養法により、モノクローナ

ル抗体を採取することができる。細胞培養法においては、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを動物細胞培養用培地中で、通常の培養条件（例えば、37℃、5 %CO₂濃度）で2～14日間培養し、その培養上清から抗体を取得することができる。また腹水形成法においては、骨髓腫細胞由来の動物と同種の動物の腹腔内にモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを投与し、ハイブリドーマを大量に増殖させ、1～4週間後に腹水または血液を採集して抗体を取得することができる。また、モノクローナル抗体をコードする遺伝子をハイブリドーマから単離し、遺伝子工学的手法により組換えタンパク質として作製することもできる。抗体の精製が必要とされる場合は、硫安塩析法、DEAEセルロース等の陰イオン交換体を利用するイオン交換クロマトグラフィー、分子量や構造によってふるいわけ分子ふるいクロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー等の公知の方法を適宜に選択して、またはこれらを組み合わせることにより精製することができる。

[0043] 前記第34番目のアミノ酸を含むポリペプチドを特異的に反応する抗体を用いて、前記第34番目のアミノ酸を含むポリペプチドを検出することが可能である。抗体を検出試薬に用いるために標識を行う場合、標識物質は限定されない。具体的には、酵素、放射性同位元素、蛍光色素、ビオチン、染料ゾルおよび金コロイドやラテックス粒子等の不溶性担体を用いることができる。また、標識は公知の方法で行うことができるが、標識物質を抗体に結合させていてもよい。

[0044] 本発明は、前記第34番目のアミノ酸を含むポリペプチドの検出を可能にする前記第34番目のアミノ酸を含むポリペプチドを特異的に認識するモノクローナル抗体、又はポリクローナル抗体、これらの抗体のいずれか1つを含む試薬組成物、当該試薬組成物を含む試薬キットも包含する。本発明の試薬組成物又は試薬キットは、大腸菌B2-ST131クローンの識別のためのものであり、本発明の検査方法に用いられるものである。

[0045] 上記抗体は生理食塩水、緩衝液等で希釈した状態で試薬組成物として提供してもよいし、凍結乾燥形態等の長期間保存可能な試薬組成物として提供し

てもよい。上記抗体は、添加剤（例えば担体、賦形剤、希釈剤等）、安定化剤等を含有する溶液に溶解した後、凍結乾燥されてもよい。安定化剤の具体例は上述した通りである。また上記抗体を含む試薬キットは、適宜、ブロッキング溶液、反応溶液、反応停止液、試料を処理するための試薬等を含んでいてもよい。

[0046] 上記iii) のポリペプチドの分子量の測定は、いかなる手法により行ってもよいが、例えば自体公知の質量分析計や電気泳動法を用いることにより行うことができる。質量分析計としては、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析装置（MALDI-TOF MS）、表面増強レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析装置（SELDI-TOF-MS）、液体クロマトグラフィー質量分析装置、タンデム質量分析装置（MS-MS）、エレクトロスプレーイオン化質量分析装置（ESI-MS）、脱離エレクトロスプレーイオン化質量分析装置（DESI）を用いることができるが、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析装置（MALDI-TOF MS）を用いることが好ましい。使用可能なMALDI-TOF MSは特に限定されないが、Burker社製MALDI Biotyperや、Applied Biosystems社製Voyager-DE-1000等が例示される。

[0047] 質量分析計を用いた測定手法により、7650Daのポリペプチドが検出された場合（実施例1の手法により7,650m/zのピークが検出された場合）は、大腸菌B2-ST131クローンが被検試料または検体に含まれていることを示す。一方、7650Daのポリペプチドが検出されない場合は、大腸菌B2-ST131クローンが被検試料または検体に含まれていないことを示す。なお、7707Daのポリペプチド（実施例1の手法により検出される7,707m/zのピーク）が検出された場合は、大腸菌B2-ST131クローン以外の他のSTクローンが被検試料または検体に含まれていることを示す。

[0048] 本発明において、検査の対象となる被検試料は、検体そのものであってもよいが、検体から調製されたものであることが好ましい。検体は、大腸菌B2-ST131クローンの含有可能性のあるものであれば特に限定されない。検体は、患者を含む被検者等の生体から採取した検体であってもよいし、医療関連感

染を媒介し得る医療器具、医療機器、食物等から採取した検体であってもよい。生体から採取した検体としては、例えば尿、糞便、膿などの滲出物、喀痰、リンパ節、扁桃、皮膚、リンパ液、血液、粘膜、膀胱や大腸等の臓器や組織などが例示される。本発明において被検試料は、好ましくは、検体からヒト由来細胞や、菌株由来のタンパク質以外のタンパク質を除去して調製されたものである。被検試料の調製はいかなる方法により行ってもよいが、例えば検体から菌株を単離して培地で培養したものを被検試料とすることができる。培地は、LB培地、ブロス、平板培地など自体公知のものを用いることができる。本発明の検査方法においては、被検試料からさらに、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドを抽出して調製して解析に用いてもよい。ポリペプチドまたはポリヌクレオチドの抽出方法は自体公知の核酸抽出方法、タンパク質抽出方法により行えばよい。

[0049] 本発明は、以下の a) または b) から選択される大腸菌B2-ST131クローンを識別するためのバイオマーカーをも包含する。

a) Yah0タンパク質を構成するアミノ酸配列のうち、配列番号 1 に示すアミノ酸配列における第34番目のアミノ酸がアラニンに変異したアミノ酸配列を含むポリペプチドからなるバイオマーカー。

b) a) に記載の前記第34番目のアミノ酸がアラニンに変異したアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドからなるバイオマーカー。

a) のポリペプチドは、Yah0タンパク質を構成するアミノ酸配列のうち、配列番号 1 に示すアミノ酸配列における第34番目のアミノ酸がアラニンに変異したアミノ酸配列を含むものであればよく、Yah0タンパク質の部分断片であっても、全長であってもよい。同様に、b) のポリヌクレオチドは、Yah0タンパク質をコードする遺伝子の塩基配列のうち、34番目のアミノ酸置換を示す塩基を含むものであればよく、部分断片であっても、全長であってもよい。

実施例

[0050] 本発明の理解を助けるために、以下に参考例および実施例を示して具体的

に本発明を説明するが、本発明はこれらに限定されるものでないことはいうまでもない。なお以下の参考例および実施例は、天理よろづ相談所病院の倫理委員会の承認を得て行なったものである。

[0051] (参考例1) 臨床検体由来の菌株の解析

2011年に天理よろづ相談所病院にて、臨床検体より分離されたESBL産生大腸菌 (*E. coli*) 74株 (B2-ST131クローン16株、他のSTクローン58株) を使用した。これらの株についてまず、系統学的グループの解析を行い、MLSTとパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) を行った。

系統学的グループの解析として、chuA、yjaA、およびTSPE4.C2の3つの遺伝子について、トリプレックスPCR (triplex PCR) を行った。MLSTとしては、7つのハウスキーピング遺伝子 (adk、fumC、gyrB、icd、mdh、purA、およびrecA) をPCRダイレクトシーケンシング (PCR-direct sequencing) を行った。また、制限酵素XbaI (Roche Diagnostics, Inc., Tokyo, Japan) を用いたPFGEを、CHEF-Dr II system (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA) にて行った。

得られた結果に基づき、Fingerprinting Plus Version 1.12, により系統樹を作成し、80%以上の類似性 (UPGMA algorithm on Dice similarity coefficients) を示す場合に、同一PFGEクラスタであると判断した。

[0052] これらの解析から得られた結果を表1に示す。

[表1]

表1

Group	PFGE cluster (similarity $\geq$ 80%)	Clonal group ^a
B2-ST131 (n=16)	I	B2-ST131 (5)
	II	B2-ST131 (2)
	III	B2-ST131 (2)
	Non-cluster formation	B2-ST131 (7)
other ST (n=58)	IV	D-ST38 (3)
	V	D-ST1485 (12)
	VI	A-ST23 (2)
	VII	D-ST393 (2)
	VIII	B1-ST533 (2)
		D-ST405 (4), D-ST648 (4), A-ST10 (4), D-ST38 (3), A-ST93 (3), B1-ST58 (2)
	Non-cluster formation	A-ST580, A-ST716, B1-ST533, B1-ST2787, B2-ST12, B2-ST95, B2-ST550, B2-ST3510, D-ST57, D-ST59, D-ST69, D-ST70, D-ST117, D-ST354, D-ST362, D-ST2847, D-ST4248 (1 each)

^a Numbers in parentheses are strains.

[0053] (実施例1) MALDI-TOF MSによる解析

(MALDI-TOF MSによる測定)

上記参考例1と同様の臨床検体由来の菌株を、5% [v/v]ヒツジ血液含有コロンビア血液寒天にて、37℃で16～24時間培養した。培養後の菌株から、エタノール-ギ酸抽出法により、タンパク質を抽出した。300 μ LのミリQ水に菌株を懸濁後、900 μ Lのエタノールを加え、13,000gで2分間遠心し、上清を捨てペレットを乾燥させた。乾燥したペレットに20 μ Lの70%ギ酸を加え、ボルテックス後、20 μ Lのアセトニトリルを加え、再度ボルテックス後、13,000 gで2分間遠心した。上清1 μ Lをターゲットプレートにアプライし、MALDI-TOF MS解析を行った。MALDI-TOF MS解析は、MALDI Biotyper (Bruker Daltonik, GmbH) およびMALDI Biotyper v3.1 softwareを用いて行った。マトリックスは α -cyano-4-hydroxy-cinnamic acid (CHCA)を使用した。菌株同定に推奨されている設定 (linear positive mode, 20-Hz laser frequency, 20-kV acceleration voltage, 18.5-kV IS2 voltage, 250 ns extraction delay, and 2000 to 20,000-m/z range) により、解析を行った。キャリブレーターとして、Bruker Bacterial Test Standard (Bruker)を用いた。また上述と同様のタンパク質抽出方法により抽出したサンプルについて、同様のマトリックスを使用し、MALDI Biotyperの代わりに他の質量分析器Voyager-DE-1000 (Applied Biosystems社製)を用いて、Linear modeにより測定を行った。

[0054] (MALDI-TOF MSにより得られたデータの解析)

MALDI-TOF MSにより得られたスペクトルを、B2-ST131クローン群と他のSTクローン群に分け、ClinProTools v2.2とFlexAnalysis v3.4 software (Bruker)を用いて多変量解析を行い、B2-ST131クローン群のバイオマーカーを探索した。

[0055] MALDI-TOF MSの解析結果を以下の表2に示す。

[表2]

表2

Index	Mass	Dave	PTTA	PWKW	PAD	Ave1	Ave2	StdDev ₁	StdDev ₂	CV1	CV2
84	7706.75	2.94	<0.000001	0.0000681	0.0000788	3.96	1.02	2.02	0.45	50.97	44.54
83	7650.27	2.49	<0.000001	0.00000792	<0.000001	1.54	4.03	1.14	1.01	73.89	25.02
94	8349.44	5.6	0.0000776	0.00204	0.00037	6.97	12.57	4.91	3.01	70.37	23.95
114	10693.1 2	0.54	0.0000825	0.00152	0.0026	0.89	0.34	0.57	0.27	64.3	79.14
30	4173.7	3.71	0.000105	0.00118	0.00052	4.15	7.86	2.83	2.17	68.08	27.63

Index, peak index or isolate number; mass, m/z value; Dave, difference between the maximum and minimum average peak area/intensity of all classes; PTTA, P-value of t-test; PWKW, P-value of Wilcoxon test; PAD, P-value of Anderson-Darling test; Ave1 and Ave2, peak area/intensity average of class 1 (other ST clonal group) and class 2 (B2-ST131 clonal group), respectively; SD1 and SD2, standard deviation of the peak area/intensity average of class 1 and class 2, respectively; CV1 and CV2, coefficient of variation (in percent) of class 1 and class 2, respectively.

[0056] 解析の結果、B2-ST131クローン群に特異的なピーク7,650m/zを検出した（図1（A））。他のSTクローン群には、ピーク7,650m/zは検出されず、7,707m/zが検出された。またMALDI Biotyperの代わりに、Voyager-DE-1000を用いた場合も、同様のピークが確認された（図1（B））。7,650m/zをバイオマーカーとした場合、表3に示す通り、感度は100%、特異度は89.7%と高い値が得られた。

[表3]

表3

Peaks	B2-ST131 (n=16)	other ST (n=58)	Sensitivity ^a (%)	Specificity ^a (%)
7650-m/z peak-positive, 7707-m/z peak-negative	16	6 ^b	100	89.7
7650-m/z peak-negative, 7707-m/z peak-positive	0	47		
7650-m/z peak-negative, 7707-m/z peak-negative	0	5 ^c		

^a Indicates sensitivity and specificity of detection ability of the B2-ST131 clonal group.

^b One B2-ST12, B2-ST550, B2-ST3510, D-ST117, D-ST354 and D-ST4248 isolate were included.

^c One A-ST93, D-ST38, D-ST59 isolate and two D-ST648 isolates were included.

[0057] （実施例2）バイオマーカーとなるタンパク質の同定と解析

実施例1において特定された7650Daのタンパク質を、bottom-up proteomicsおよびエドマン分解によるN末端アミノ酸配列解析を行うことにより同定した。まず、参考例1と同様の臨床検体由来のB2-ST131クローン群の菌株から、以下のようにしてタンパク質を精製した。まず、菌株をLB培地で増殖させた後、回収して超音波破碎し、80%硫酸沈殿、オープンカラムDEAEセルロース、オープンカラムCMセルロールにより段階的に精製し、その後HPLC（TSKgel

Protein C4-300 (Tosoh Corporation, Tokyo, Japan)) により分取した。分取後、各画分を乾燥させて濃縮し、MALDI-TOF MSにより確認を行い、7650Daのタンパク質が溶出した画分を特定した。特定した画分に溶出したタンパク質について、Tricine SDS-PAGEを行い、silver染色後、ゲルを切り出した。切り出したゲルは、トリプシンにより消化後、LCMS-IT-TOF (Shimazu Corporation, Kyoto, Japan)を用いて、解析した。得られたスペクトルを、Mascot MS/MS Ion Search (Matrix Science K.K., Tokyo, Japan)により解析し、SwissProt databaseによりペプチドを同定した。同時に、N末端アミノ酸配列解析を行い、bottom-up proteomicsによるペプチドの同定結果と併せて、タンパク質を同定した。

[0058] LCMS-IT-TOFの結果を以下の表4に示す。

[表4]

表4

Observed	Expected	Calculated	Miss	Score	Peptide
617.3484	616.3411	616.3432	0	20	K.EDLIK.K
508.7786	1015.5426	1015.5451	0	18	K.IHGTANIYK.K
759.3944	1516.7742	1516.7733	0	104	K.GADVILVTSGQTDNK.I
506.603	1516.7871	1516.7733	0	(5)	K.GADVILVTSGQTDNK.I
820.3718	1638.7291	1638.7407	0	79	K.IGDISTSNEMSTADAK.E
828.3742	1654.7339	1654.7356	0	(64)	K.IGDISTSNEMSTADAK.E + Oxidation (M)
746.6949	2237.0628	2237.0733	1	105	K.IGDISTSNEMSTADAKEDLIK.K
752.0245	2253.0518	2253.0682	1	(30)	K.IGDISTSNEMSTADAKEDLIK.K + Oxidation (M)

Observed, the m/z value of the precursor; Expected, the mass of peptide calculated based on the m/z value and charge of the precursor; Calculated, theoretical value of the mass of peptide on the database side; Score, degree of certainty of peptide; Peptide, amino acid sequence of peptide.
The database used is Mascot (Matrixscience).

表4の結果と、N末端アミノ酸配列解析の結果により、7650Daのタンパク質が、機能不明のYah0タンパク質であることがわかった(図2)。図2中の下線部は、LCMS-IT-TOFにより得られたアミノ酸配列であり、四角で囲った部分はN末端アミノ酸配列解析により得られたアミノ酸配列である。

[0059] (実施例3) バイオマーカーとなる遺伝子についての解析

実施例2において同定されたアミノ酸配列から、forward primer: 5'-TAGT CGGTGCGTTAGCGTT-3' (配列番号11)とreverse primer: 5'-TGCCGTGGATCTTA TTGTCA-3' (配列番号12)を設計し、B2-ST131クローン群と他のSTクロー

ン群について、PCRダイレクトシーケンスによって塩基配列とアミノ酸配列の比較を行った。

まず実施例 1 と同様に、臨床検体由来の B2-ST131 クローン群の菌株を培地で増殖させた後、回収した。菌株を回収後、定法に従って DNA を抽出した。抽出した DNA について、上記配列番号 1 1 と配列番号 1 2 のプライマーを用いて、PCR を行った。PCR には Applied Biosystems Veriti 96 Thermal Cycler (Life Technologies) を用い、DNA 配列決定には Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer (Thermo Fisher Scientific) を用いた。また理論上の分子量 (Mw) を Compute pI/Mw tool (http://web.expasy.org/compute_pi/) を用いて算出した。

[0060] その結果、B2-ST131 クローン群に特異的なピーク 7,650m/z と、他の ST クローン群に確認されるピーク 7,707m/z との分子量の差は、E34A のアミノ酸変異が原因であることが明らかとなった (図 3)。また、E34A 検出による ESBL 産生大腸菌 B2-ST131 クローン検出の感度および特異度は下記の表 5 に示すとおりであった。

[表5]

表5

YahO gene	B2-ST131 (n=16)	other ST (n=58)	Sensitivity ^a (%)	Specificity ^a (%)
E34A substitution-positive	16	6 ^c	100	89.7
E34A substitution-negative	0	48		
YahO gene-negative ^b	0	4 ^d		

^a Indicates sensitivity and specificity of detection ability of the B2-ST131 clonal group.

^b Could not be detected by the designed primer.

^c One B2-ST12, B2-ST550, B2-ST3510, D-ST117, D-ST354 and D-ST4248 isolate were included.

^d One A-ST93, D-ST59 isolate and two D-ST648 isolates were included.

[0061] (実施例 4) PCR法を用いたESBL産生大腸菌B2-ST131の検出

(1) まず、上記参考例 1 と同様の臨床検体由来の菌株を培地で増殖させた後、回収した。菌株を回収後、定法に従って DNA を抽出した。抽出した DNA について、以下のプライマーセットを用いて、リアルタイムPCRを行った。

forward primer : 5'-GAATTTGAAAARGTYGC-3' (配列番号 1 3)

reverse primer : 5'-TGCCGTGGATCTTATTGTCA-3' (配列番号 1 2)

forward primerは配列番号2がE34Aをコードするよう変異した塩基配列の85～101番目、reverse primerは配列番号2の231～250番目にアニーリングするように設計されたものである。

PCR機器はLightCycler 2.0 system (Roche Diagnostics, Inc., Tokyo, Japan)、試薬はLightCycler FastStart DNA Master SYBR GreenI (Roche) を用いて、次のように行った。すなわち、初期変性を95℃で7分間行った後、95℃で1秒間、63～53℃ (step size 0.5℃/cycle) で5秒間、及び72℃で8秒間、蛍光測定 (PCRによる増幅産物の測定) を1サイクルとし、これを40サイクル行い、続いて増幅産物の融解曲線分析のために、95℃で1秒、75℃で15秒後、0.15℃/秒の速度で95℃まで昇温させると同時に連続的な蛍光測定により各温度に対する増幅産物の二本鎖DNA量を測定し、最後に40℃まで降温させた。PCR終了後、融解曲線解析を同PCR装置のソフトウェアで行ない、増幅産物のT_m値を求めることで特異的な増幅産物の有無を判定した。

[0062] 結果を図4に示す。増幅産物がある場合は、T_m値として82.5℃付近ピークを示すことがわかった。また、以下の表6にリアルタイムPCRによるYahO遺伝子の変異検出の特異度を示す。表6において、「This PCR+」はT_m値のピークが認められたもの、「This PCR-」は、T_m値のピークが認められなかったものである。

[表6]

YahO gene	This PCR +	This PCR -
E34A +	22	0
E34A -	0	48
YahO -	0	4

[0063] (2) また上記配列番号13のforward primerと、配列番号12のreverse primerを用いてPCRを行い、増幅産物の有無について電気泳動による確認を行った。PCRのサイクルは上述の(1)と同様であり、Mupidミニゲル泳動槽 (A

DVANCE社)を用いてアガロースゲルにより電気泳動を行い、エチジウムブロマイド溶液でゲルを染色して、目的の増幅バンドの有無を確認した。

[0064] 結果を、図5に示す。図5中、NCはネガティブコントロールである。上記プライマーを用いてPCRを行い、増幅産物をアガロースゲル電気泳動により確認することにより、B2-ST131クローン群を検出可能であることがわかった。

[0065] (実施例5) MALDI-TOF MSを用いたカルバペネマーゼ産生大腸菌B2-ST131の検出

天理よろづ相談所病院にて保有している、臨床検体より分離されたカルバペネマーゼ産生大腸菌 (*E. coli*) 28株 (B2-ST131クローン20株、他のSTクローン8株) を使用した。これらの株は、系統学的グループの解析として、chuA、yjaA、およびTSPE4.C2の3つの遺伝子についてのトリプレックスPCR (triplex PCR)、MLSTとして、7つのハウスキーピング遺伝子 (adk、fumC、gyrB、icd、mdh、purA、およびrecA) をPCRダイレクトシーケンシング (PCR-direct sequencing)、制限酵素XbaI (Roche Diagnostics, Inc., Tokyo, Japan) を用いたPFGEを、CHEF-Dr II system (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA) にて行い、得られた結果に基づき、Fingerprinting Plus Version 1.12, により系統樹を作成し、80%以上の類似性 (UPGMA algorithm on Dice similarity coefficients) を示す場合に、同一PFGEクラスタであると判断し、分類を行ったものである。

[0066] 上記臨床検体由来の菌株28株について、実施例1と同様にして、菌株を培養し、タンパク質を抽出し、MALDI-TOF MSによりスペクトルを得た。その結果を、以下の表7に示す。

カルバペネマーゼ産生B2-ST131クローン群には、特異的なピーク7,650m/zが検出され、他のSTクローン群には、ピーク7,650m/zは検出されず、7,707m/zが検出された。感度は95%、特異度は88%と高い値であった。

[表7]

表7 7650 m/zバイオマーカー解析結果

Biomarker peak	B2-ST131 (n=20)	Other ST (n=8)	Sensitivity (%)	Specificity (%)
7650 m/z positive	19	1	95	88
7650 m/z negative	1	7		

[0067] (実施例6) PCR法を用いたカルバペネマーゼ産生大腸菌B2-ST131の検出

参考例5と同様の菌株について、実施例4と同様にして、菌株を培地にて増殖させて回収し、定法に従ってDNAを抽出し、抽出したDNAについてリアルタイムPCRを行った。

[0068] 結果として、表8にリアルタイムPCRによるYahO遺伝子の変異検出の感度と特異度を示す。上記リアルタイムPCRにより、カルバペネマーゼ産生B2-ST131クローン群を感度95%、特異度88%と高い値で検出可能であることがわかった。

[表8]

表8 yahO E34A解析結果

yahO gene	B2-ST131 (n=4)	Other ST (n=6)	Sensitivity (%)	Specificity (%)
E34A positive	19	1	95	88
E34A negative	1	7		

産業上の利用可能性

[0069] 本発明は、迅速かつ簡便に大腸菌B2-ST131クローンを識別することを可能とするものである。本発明の検査方法は、感度および特異度も優れており、迅速かつ効率的にB2-ST131クローンを識別することができる。臨床において、本発明によりB2-ST131クローンを迅速かつ正確に識別することができることから、医療関連感染等の原因を速やかに特定することができ、感染症初期治療決定ツールとして非常に有用である。さらに本発明の検査方法は、世界的なパンデミックの制御に寄与する可能性もあり、感染症治療を飛躍的に前進させることが期待される。

請求の範囲

- [請求項1] Yah0タンパク質を構成するアミノ酸配列のうち、配列番号1に示すアミノ酸配列における第34番目のアミノ酸のアラニンへの変異を検出することを特徴とする、大腸菌B2-ST131クローンを識別するための検査方法。
- [請求項2] 前記第34番目のアラニンへの変異の検出が、以下のi)～iii)より選択されるいずれかにより行われる、請求項1に記載の検査方法：
- i) 被検試料について、前記第34番目のアミノ酸を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの塩基配列を解析すること；
 - ii) 被検試料について、配列番号1に示すアミノ酸配列のうち、第34番目のアミノ酸を含むポリペプチドのアミノ酸配列を解析すること；
 - iii) 被検試料について、前記第34番目のアミノ酸を含むポリペプチドの分子量を測定すること。
- [請求項3] 前記第34番目のアラニンへの変異の検出が、以下のi)～iii)より選択されるいずれかにより行われる、請求項2に記載の検査方法：
- i) 被検試料について、前記第34番目のアミノ酸を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの塩基配列を、核酸増幅反応により解析すること；
 - ii) 被検試料について、配列番号1に示すアミノ酸配列のうち、第34番目のアミノ酸を含むポリペプチドのアミノ酸配列を、免疫学的手法により解析すること；
 - iii) 被検試料について、前記第34番目のアミノ酸を含むポリペプチドの分子量を、質量分析計を用いて測定すること。
- [請求項4] Yah0タンパク質を構成するアミノ酸配列のうち、配列番号1に示すアミノ酸配列における第34番目のアミノ酸のアラニンへの変異を示す塩基を検出するための、少なくとも15ヌクレオチドの長さを有するポリヌクレオチド。
- [請求項5] 前記ポリヌクレオチドが、前記第34番目のアミノ酸を含むポリペプチ

ドをコードする塩基配列の部分配列又は当該部分配列に相補的な配列とハイブリダイズし得る、請求項4に記載のポリヌクレオチド。

[請求項6] 前記ポリヌクレオチドが、前記第34番目のアミノ酸のアラニンへの変異を示す塩基を含む部分配列又は当該部分配列に相補的な配列を特異的に増幅し得るプライマーである、請求項4又は5に記載のポリヌクレオチド。

[請求項7] 前記ポリヌクレオチドが、配列番号13に示す5'-GAATTTGAAAARGTYGC-3'の塩基配列を含むものである、請求項5～6のいずれか1に記載のポリヌクレオチド。

[請求項8] 請求項4～7のいずれか1に記載のポリヌクレオチドをプライマーとして含む、プライマーセット。

[請求項9] Yah0タンパク質を構成するアミノ酸配列のうち、配列番号1に示すアミノ酸配列における第34番目のアミノ酸のアラニンへの変異を検出するための、前記第34番目のアミノ酸を含むポリペプチドを特異的に認識する、抗体。

[請求項10] 前記抗体が、前記第34番目のアミノ酸としてアラニンを含むポリペプチド又は前記第34番目のアミノ酸としてグルタミン酸を含むポリペプチドのいずれかを特異的に認識する、請求項9に記載の抗体。

[請求項11] 請求項4～7のいずれか1に記載のポリヌクレオチド、請求項8に記載のプライマーセット、又は請求項9～10のいずれか1に記載の抗体を含む、大腸菌B2-ST131クローン識別用試薬組成物。

[請求項12] 請求項11に記載の大腸菌B2-ST131クローン識別用試薬組成物を含む、大腸菌B2-ST131クローン識別用試薬キット。

[請求項13] 請求項4～7のいずれか1に記載のポリヌクレオチド、請求項8に記載のプライマーセット、請求項9～10のいずれか1に記載の抗体、請求項11に記載の大腸菌B2-ST131クローン識別用試薬組成物、又は請求項12に記載の大腸菌B2-ST131クローン識別用試薬キットを用いて、Yah0タンパク質を構成するアミノ酸配列のうち、配列番号1に示

すアミノ酸配列における第34番目のアミノ酸のアラニンへの変異を検出することを特徴とする、大腸菌B2-ST131クローンを識別するための検査方法。

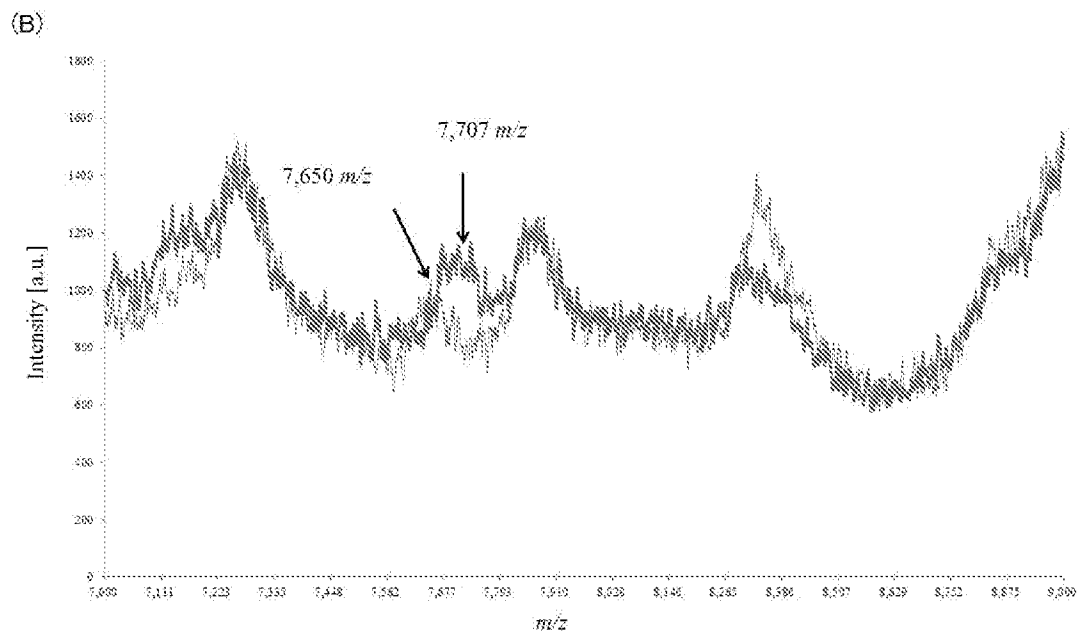
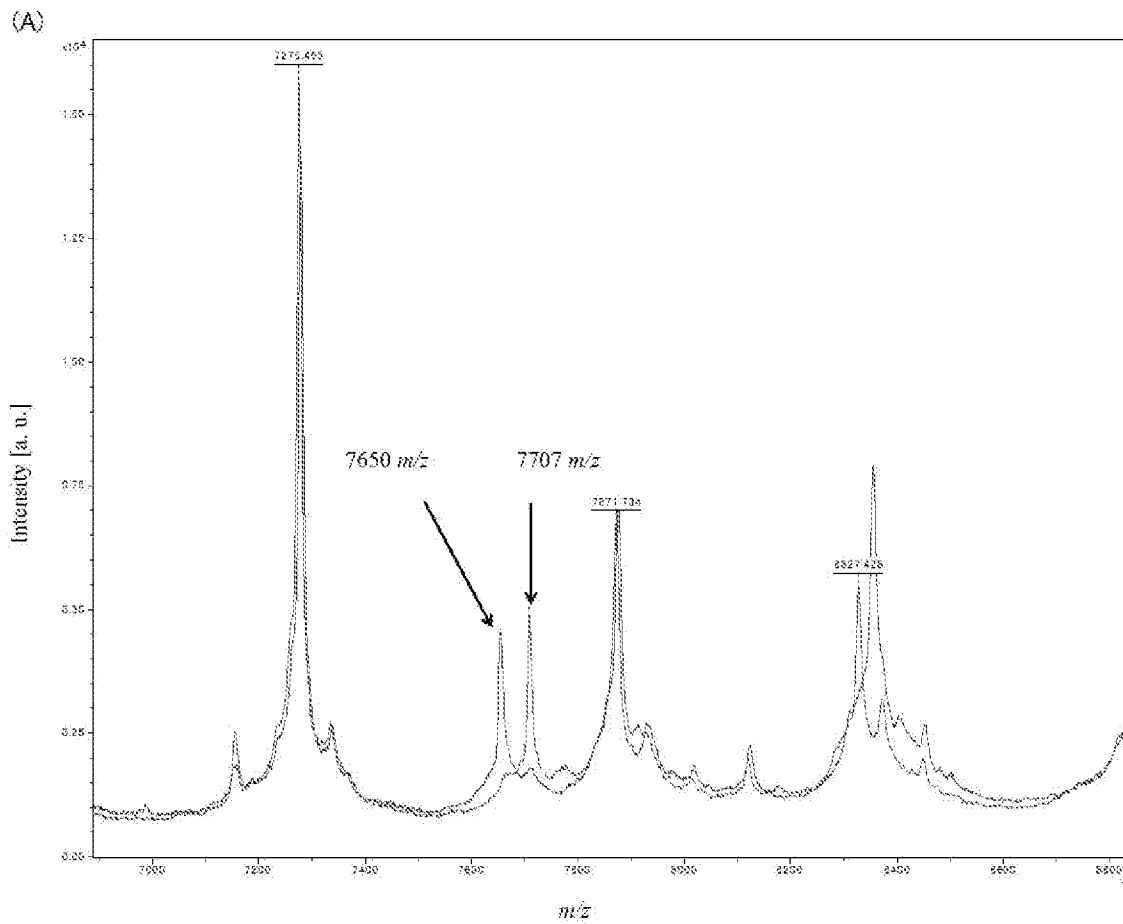
[請求項14] 大腸菌B2-ST131クローンが、基質特異性拡張型 β ラクタマーゼ（ESBL）産生大腸菌又はカルバペネマーゼ産生大腸菌を含む、請求項1～3及び請求項13のいずれか1に記載の検査方法。

[請求項15] 以下のa) またはb) から選択される大腸菌B2-ST131クローンを識別するためのバイオマーカー：

a) Yah0タンパク質を構成するアミノ酸配列のうち、配列番号1に示すアミノ酸配列における第34番目のアミノ酸がアラニンに変異したアミノ酸配列を含むポリペプチドからなるバイオマーカー；

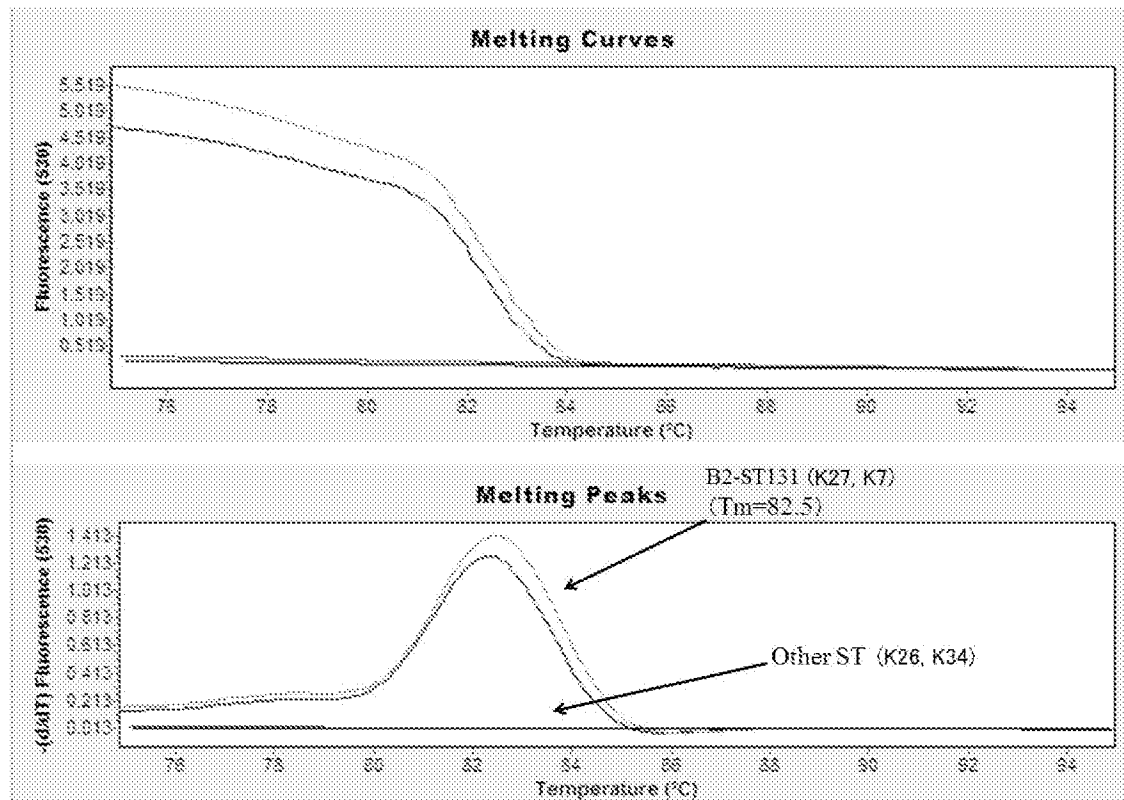
b) a) に記載の前記第34番目のアミノ酸がアラニンに変異したアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドからなるバイオマーカー。

[図1]

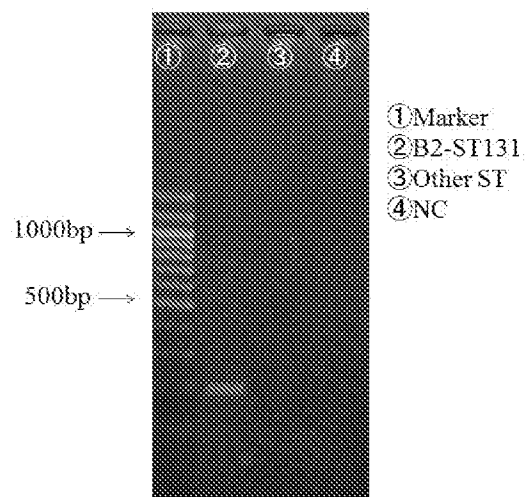


61
 K-12 YahO (U00096) RADEKGAADVLTSGQTQDNK IGTANIYKK * (配列番号1)
 B2-ST131 R17 (LC015798) RADEKGAADVLTSGQTQDNK IGTANIYKK * (配列番号3)
 B2-ST131 K27 (LC015799) RADEKGAADVLTSGQTQDNK IGTANIYKK * (配列番号5)
 D-ST405 R72 (LC015800) RADEKGAADVLTSGQTQDNK IGTANIYKK * (配列番号7)
 A-ST10 R115 (LC015801) RADEKGAADVLTSGQTQDNK IGTANIYKK * (配列番号9)

[図4]



[図5]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/058463

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, C07K16/12(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N27/62(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N33/569(2006.01)i

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)

C12N15/09, C07K16/12, C12Q1/68, G01N27/62, G01N33/53, G01N33/569

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2016	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2016

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAPplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), UniProt/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y/A	Escherichia coli strain RM2008 hypothetical protein (yahO) gene, complete cds. [online]. 2010-JUN-11 uploaded. NCBI Nucleotide, ACCESSION No.GU391860 (GI:289152316) [Retrieved on 2016-JUN-03]. Retrived from the internet: <URL:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/289152316/>, FEATURES, ORIGIN	15/4-8/1-3, 11-14

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family 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 application or patent 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
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
06 June 2016 (06.06.16)

Date of mailing of the international search report
14 June 2016 (14.06.16)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/058463

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y/A	FAGERQUIST C.K., ET AL, Rapid Identification of Protein Biomarkers of Escherichia coli O157:H7 by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time-of-Flight-Time-of-Flight Mass Spectrometry and Top-Down Proteomics., Anal. Chem., 2010, Vol.82, No.7, p.2717-2725 & Supporting Information [online], [retrieved on 2016.06.02], Retrieved from the Internet:<URL:http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac902455d><DOI:10.1021/ac902455d>, Table S-2,S-3	9-10/4-8/ 1-3,11-14
A	MATSUMURA Y., ET AL, Detection of extended-spectrum- β -lactamase-producing Escherichia coli ST131 and ST405 clonal groups by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry., J. Clin. Microbiol., 2014, Vol.52, No.4, p.1034-1040, Abstract	1-15

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, C07K16/12(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N27/62(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N33/569(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N15/09, C07K16/12, C12Q1/68, G01N27/62, G01N33/53, G01N33/569

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2016年
日本国実用新案登録公報	1996-2016年
日本国登録実用新案公報	1994-2016年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), UniProt/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X/Y/A	Escherichia coli strain RM2008 hypothetical protein (yah0) gene, complete cds. [online]. 2010-JUN-11 uploaded. NCBI Nucleotide, ACCESSION No. GU391860 (GI:289152316) [Retrieved on 2016-JUN-03]. Retrived from the internet:<URL:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/289152316/>, FEATURES, ORIGIN	15/4-8/1-3, 11-14

☑ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

06.06.2016

国際調査報告の発送日

14.06.2016

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

柴原 直司

4 N

3 5 3 4

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X/Y/A	FAGERQUIST C.K., ET AL, Rapid Identification of Protein Biomarkers of Escherichia coli 0157:H7 by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time-of-Flight-Time-of-Flight Mass Spectrometry and Top-Down Proteomics., Anal. Chem., 2010, Vol.82, No.7, p.2717-2725 & Supporting Information [online], [retrieved on 2016.06.02], Retrieved from the Internet:<URL:http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac902455d> <DOI:10.1021/ac902455d>, Table S-2, S-3	9-10/4-8/1-3 , 11-14
A	MATSUMURA Y., ET AL, Detection of extended-spectrum - β -lactamase-producing Escherichia coli ST131 and ST405 clonal groups by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry., J. Clin. Microbiol., 2014, Vol.52, No.4, p.1034-1040, Abstract	1-15