



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 600 24 679 T2 2006.08.24

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 252 331 B1

(51) Int Cl.⁸: C12Q 1/68 (2006.01)

(21) Deutsches Aktenzeichen: 600 24 679.5

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/US00/33872

(96) Europäisches Aktenzeichen: 00 984 359.0

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 2001/044511

(86) PCT-Anmeldetag: 15.12.2000

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 21.06.2001

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 30.10.2002

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 07.12.2005

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 24.08.2006

(30) Unionspriorität:

171202 P 15.12.1999 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, IT, LI, LU, NL, SE

(73) Patentinhaber:

Gen-Probe Inc., San Diego, Calif., US

(72) Erfinder:

BRENTANO, T., Steven, Santee, US; LANKFORD, L., Roger, Coquitlam, CA

(74) Vertreter:

Viering, Jentschura & Partner, 80538 München

(54) Bezeichnung: METHODEN UND ZUSAMMENSETZUNGEN ZUR DETEKTION VON SPEZIES DES MYCOBACTERIUM AVIUM-KOMPLEXES

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelebt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung**GEBIET DER ERFINDUNG**

[0001] Diese Erfindung betrifft die diagnostische Detektion pathogener Bakterien in vitro, und betrifft insbesondere Zusammensetzungen und Assays zur Amplifikation der Nukleinsäure von Organismen des Mycobacterium avium Komplexes (MAC; zum Beispiel M. avium, M. intracellulare) mit Hilfe einer Nukleinsäureamplifikation in vitro.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Die Detektion von Mycobacterium Spezies des Mycobacterium avium Komplexes (MAC) in klinischen Proben ist wichtig als ein diagnostisches Werkzeug. Organismen des M. avium Komplexes umfassen M. avium, M. intracellulare und andere Spezies, die von diesen schwierig zu differenzieren sind, wie zum Beispiel M. paratuberculosis. MAC Organismen werden häufig in klinischen Proben gefunden und sind übliche verursachende Agenzen opportunistischer Infektionen in Patienten mit beeinträchtigtem (immunocompromised) Immunsystem, wie zum Beispiel Patienten mit einer HIV-Infektion oder Patienten, die sich einer Chemotherapie unterziehen oder die immunsuppressiven Arzneimittel verwenden (Good et al., 1982, J. Infect. Dis. 146: 829-833; Grill et al., 1985, J Clin. Microbiol. 22: 543-546). Daher sind Assays, die MAC Spezies detektieren und diese von anderen Spezies unterscheiden können, wichtig für die klinische Diagnose.

[0003] Klinische diagnostische Assays für Mycobacterium Spezies basieren oft auf zeitraubenden Verfahren, welche die physikalischen Charakteristika (zum Beispiel Färbung und mikroskopische Detektion), physiologischen Charakteristika (zum Beispiel Wachstum auf definierten Medien) und/oder biochemischen Charakteristika (zum Beispiel die Zusammensetzung der Membranlipide) der Bakterien analysieren. Derartige Verfahren erfordern oft relativ hohe Konzentrationen an Bakterien in der Probe und können ein hohes Maß an Erfahrung und Expertise erfordern, um die infektiösen Spezies genau zu bestimmen. Diagnostische Assays, welche ein in vitro Wachstum der Bakterien erfordern, sind kostenintensiv sowohl hinsichtlich einer verzögerten oder ungeeigneten frühen Behandlung des Patienten als auch hinsichtlich der Menge an Laborausrüstung und Laborraum, die zur Kultur von Mycobacterium erforderlich ist, welches in vitro oft schwierig anzuziehen ist.

[0004] Assays, die molekularbiologische Techniken verwenden, um die Gegenwart der Mycobacterium Nukleinsäure in der Probe zu detektieren, wurden zur Erhöhung der Sensitivität und der relativen Geschwindigkeit der Diagnose entwickelt (U.S. Patente Nr. 5,030,557, 5,567,587, 5,595,874, 5,601,984 und 5,677,128; PCT Nr. WO 95/06755). Dieses Assays können die in der Probe vorliegenden Nukleinsäuresequenzen direkt detektieren oder können auf einer in vitro Nukleinsäureamplifikation von in der Probe vorliegenden Nukleinsäuren vor den Detektionsschritt basieren (U.S. Patente Nr. 5,554,516, 5,766,849, 5,906,917 und 5,908,744; Europäische Patente Nr. EP 0528306 und EP 0818465; und PCT Nr. WO 96/36733 und WO 97/23618). Viele in vitro Nukleinsäureamplifikationsreaktionen erfordern Amplifikationsoligonukleotide, die als Primer für eine Polymerasereaktion dienen, welche die in der Probe vorliegende Nukleinsäure als Template verwendet. Die Detektion der amplifizierten Nukleinsäure erfordert häufig die Verwendung spezifischer Nukleinsäuresonden, die an die amplifizierten Sequenzen hybridisieren, um ein detektierbares Signal oder einen detektierbaren Komplex zu erzeugen.

[0005] Rogall et al. ("Towards a phylogeny and definition of species at the molecular level with the genus Mycobacterium", 1990, Int. J. Systemic Bacteriol. 40(4): 323-330) offenbarten 16S rRNA Sequenzen, die für neunzehn Mycobacterium Spezies erhalten wurden einschließlich M. tuberculosis, M. avium und M. intrazellulare. Aus einem Vergleich dieser Sequenzdaten wurden ein phylogenetischer Stammbaum und die phylogenetische Verwandtschaft der Spezies abgeleitet.

[0006] WO 95/06755 (Gen-Probe Incorporated, 1995) offenbarte Nukleinsäuresonden und Assays zur Detektion von einem Organismus des M. avium Komplexes unter stringenten Hybridisierungsbedingungen mit Hilfe der offebarten Sonden einschließlich von Helfer-Sonden. Ebenfalls offenbart wurden Verfahren zur Detektion eines MAC Organismus und zur Unterscheidung desselben von anderen Mycobacterium Spezies mit Hilfe spezifischer Nukleinsäuresonden unter stringenten Hybridisierungsbedingungen.

[0007] Kulsiki et al. ("Use of a multiplex PCR to detect and identify Mycobacterium avium and M. intracellulare in blood culture fluids of AIDS patients", 1995, J. Clin. Microbiol. 33(3): 668-674) beschrieben drei verschiedene Verfahren zur Extraktion mycobakterieller DNA aus flüssigen Blutproben (blood culture fluid) sowie eine Multiplex-Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Amplifikation von Regionen des MPB70 Gens von M. tubercu-

losis und von einer Region des 16S rRNA Gens von Vertretern der Gattung *Mycobacterium*, nämlich *M. intracellulare* oder *M. avium*, gefolgt von der Detektion der amplifizierten DNA-Produkte mittels Agarose-Gelektrophorese und Ethidiumbromidfärbung. Dies ermöglichte die Identifikation kultivierter Mycobakterien zu einem früheren Zeitpunkt als bei Standardverfahren, aber die zur Extraktion mycobakterieller DNA gewählte Methode war kritisch für die Bereitstellung sensibler und genauer PCR-Ergebnisse.

[0008] WO 99/35284 (Univ. Federal Minas Gerais, 1999) offenbarte ein Verfahren zur Diagnose, Identifikation und Charakterisierung von *M. tuberculosis* und anderen Mycobakterien unter Verwendung von PCR sowie von einem Shift Mobility-Assay (SMA), das die Kultur der Bakterien, die DNA Extraktion und die Amplifikation sowie einen SMA umfasste, der eine Harnstoff/Polyacrylamid-Gelektrophorese (UPAGE) verwendete. Dieses Verfahren basierte auf der Divergenz in den 16S rRNA Sequenzen zur Identifikation von Spezies, da ein Shift der Heteroduplex-Banden im Vergleich zu den Einzelstrang- und den Homoduplex-Banden in der UPAGE erhalten wurde.

[0009] Die vorliegende Erfindung stellt Zusammensetzungen und in vitro Nukleinsäureamplifikationsverfahren bereit, die relativ lange amplifizierte Nukleinsäuresequenzen erzeugen, um die Detektion von MAC Spezies zu ermöglichen, die in einer biologischen Probe enthalten sind.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

Primer, der die Sequenz von SEQ ID NR: 5 aufweist, und dem zweiten Primer, der die Sequenz von SEQ ID NR: 9 aufweist; dem ersten Primer, der die Sequenz von SEQ ID NR: 6 aufweist, und dem zweiten Primer, der die Sequenz von SEQ ID NR: 7 aufweist; dem ersten Primer, der die Sequenz von SEQ ID NR: 6 aufweist, und dem zweiten Primer, der die Sequenz von SEQ ID NR: 8 aufweist; und dem ersten Primer, der die Sequenz von SEQ ID NR: 6 aufweist, und dem zweiten Primer, der die Sequenz von SEQ ID NR: 9 aufweist. In anderen Ausführungsformen verwendet der Amplifikationsschritt eine Kombination aus mindestens einem ersten Primer, der eine Sequenz aufweist, die aus der Gruppe ausgewählt wird, welche aus SEQ ID NR: 1 bis SEQ ID NR: 3 besteht, und mindestens einem zweiten Primer, der eine Sequenz aufweist, die aus der Gruppe ausgewählt wird, welche aus SEQ ID NR: 7, SEQ ID NR: 8 und SEQ ID NR: 9 besteht. Einige bevorzugte Ausführungsformen verwenden eine Kombination, die aus der Gruppe ausgewählt wird, welche besteht aus: dem ersten Primer, der die Sequenz von SEQ ID NR: 1 aufweist, und dem zweiten Primer, der die Sequenz von SEQ ID NR: 7 aufweist; dem ersten Primer, der die Sequenz von SEQ ID NR: 1 aufweist, und dem zweiten Primer, der die Sequenz von SEQ ID NR: 8 aufweist; dem ersten Primer, der die Sequenz von SEQ ID NR: 1 aufweist, und dem zweiten Primer, der die Sequenz von SEQ ID NR: 9 aufweist; dem ersten Primer, der die Sequenz von SEQ ID NR: 2 aufweist, und dem zweiten Primer, der die Sequenz von SEQ ID NR: 7 aufweist; dem ersten Primer, der die Sequenz von SEQ ID NR: 2 aufweist, und dem zweiten Primer, der die Sequenz von SEQ ID NR: 8 aufweist; dem ersten Primer, der die Sequenz von SEQ ID NR: 2 aufweist, und dem zweiten Primer, der die Sequenz von SEQ ID NR: 9 aufweist; dem ersten Primer, der die Sequenz von SEQ ID NR: 3 aufweist, und dem zweiten Primer, der die Sequenz von SEQ ID NR: 7 aufweist; dem ersten Primer, der die Sequenz von SEQ ID NR: 3 aufweist, und dem zweiten Primer, der die Sequenz von SEQ ID NR: 8 aufweist; und dem ersten Primer, der die Sequenz von SEQ ID NR: 3 aufweist, und dem zweiten Primer, der die Sequenz von SEQ ID NR: 9 aufweist. In anderen Ausführungsformen verwendet der Amplifikationsschritt eine transkriptions-vermittelte Amplifikation und eine Kombination von Primern, die aus der Gruppe ausgewählt wird, welche besteht aus: dem ersten Primer, der die Sequenz von SEQ ID NR: 1 aufweist, und dem zweiten Primer, der die Sequenz von SEQ ID NR: 7 aufweist; dem ersten Primer, der die Sequenz von SEQ ID NR: 1 aufweist, und dem zweiten Primer, der die Sequenz von SEQ ID NR: 8 aufweist; dem ersten Primer, der die Sequenz von SEQ ID NR: 1 aufweist, und dem zweiten Primer, der die Sequenz von SEQ ID NR: 9 aufweist; dem ersten Primer, der die Sequenz von SEQ ID NR: 2 aufweist, und dem zweiten Primer, der die Sequenz von SEQ ID NR: 7 aufweist; dem ersten Primer, der die Sequenz von SEQ ID NR: 2 aufweist, und dem zweiten Primer, der die Sequenz von SEQ ID NR: 8 aufweist; dem ersten Primer, der die Sequenz von SEQ ID NR: 2 aufweist, und dem zweiten Primer, der die Sequenz von SEQ ID NR: 9 aufweist; dem ersten Primer, der die Sequenz von SEQ ID NR: 3 aufweist, und dem zweiten Primer, der die Sequenz von SEQ ID NR: 7 aufweist; dem ersten Primer, der die Sequenz von SEQ ID NR: 3 aufweist, und dem zweiten Primer, der die Sequenz von SEQ ID NR: 8 aufweist; und dem ersten Primer, der die Sequenz von SEQ ID NR: 3 aufweist, und dem zweiten Primer, der die Sequenz von SEQ ID NR: 9 aufweist.

[0011] Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft eine Zusammensetzung zur Amplifikation der 16S rRNA Sequenz oder der DNA, welche die 16S rRNA kodiert, aus mindestens einer Spezies des Mycobacterium avium Komplexes (MAC), welche ein oder mehrere Oligonukleotide umfasst, die eine Basensequenz aufweisen, die aus der Gruppe ausgewählt wird, welche aus SEQ ID NR: 1 bis SEQ ID NR: 9 besteht. In einer Ausführungsform umfasst die Zusammensetzung ferner mindestens ein Oligonukleotid zur Detektion der amplifizierten MAC 16S rRNA Sequenz oder der DNA, welche die 16S rRNA kodiert, und die ein oder mehrere Oligonukleotide umfasst, die eine Basensequenz aufweisen, die aus der Gruppe ausgewählt wird, welche aus SEQ ID NR: 11 bis SEQ ID NR: 18 besteht.

[0012] Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft einen Kit, der ein oder mehrere Oligonukleotide umfasst, die eine Basensequenz aufweisen, welche aus der Gruppe ausgewählt wird, die aus SEQ ID NR: 1 bis SEQ ID NR: 9 besteht. In einer Ausführungsform umfasst der Kit ferner ein oder mehrere Oligonukleotide, die eine Basensequenz aufweisen, welche aus der Gruppe ausgewählt wird, die aus SEQ ID NR: 11 bis SEQ ID NR: 18 besteht.

GENAUE BESCHREIBUNG

[0013] Diagnostische Assays, die auf einer in vitro Nukleinsäureamplifikation basieren, müssen die beabsichtigte Zielnukleinsäure (Targetnukleinsäure) spezifisch amplifizieren, während sie die Amplifikation kontaminierender Nukleinsäuren vermeiden, die sich in der Luft befinden können, oder die in Wasser, Reagenzien oder Laborartikeln vorliegen, welche in dem Assay verwendet werden. Die Amplifikation kontaminierender Nukleinsäuren könnten falsch-positive Ergebnisse zur Folge haben, die zu einer Fehldiagnose oder einer nicht notwendigen Behandlung des Patienten führen würden.

[0014] Falsch-positive Ergebnisse können vorkommen, falls die Probe eine Nukleinsäure enthält, die aus ei-

ner Nicht-MAC Mycobacterium Spezies oder anderen Bakterien stammt, welche ähnliche Sequenzen enthalten (zum Beispiel M. fortuitum), und die oft als Kontaminanten in der Umwelt vorliegen. Kontaminierende Nukleinsäuren sind im Allgemeinen partiell degradierte Sequenzen (i.e. relativ kurz) im Vergleich zu der Zielsequenz, die in dem intakten MAC Organismus enthalten ist, der in der biologischen Probe vorliegt. Falls relativ kurze MAC Sequenzen amplifiziert werden, können die kontaminierenden und/oder degradierten Sequenzen, die in der Probe enthalten sind, ebenfalls amplifiziert werden, was zu falsch-positiven Ergebnissen führt. Kontaminierende Sequenzen, die amplifiziert, aber in dem Assay nicht detektiert werden können, können ebenfalls mit dem MAC Target um Primer und/oder Nukleinsäure-Polymerisationssubstrate kompetitieren, was zu falsch-negativen Ergebnissen führt.

[0015] Um die Amplifikation einer kürzeren kontaminierenden Nukleinsäure zu vermeiden, verwendet die vorliegenden Erfindung Primer, welche spezifisch mit einer Zielsequenz hybridisieren, so dass eine relativ lange Sequenz (zum Beispiel größer als 200 Reste) amplifiziert wird, welche zwischen den Primerbindestellen liegt. Es besteht ein Bedarf für Zusammensetzungen und Verfahren, die relativ lange Bereiche zu detektierender MAC Zielsequenzen amplifizieren können, wodurch eine amplifizierte Nukleinsäure für eine zuverlässige Detektion von MAC Spezies in einer Probe erzeugt wird.

[0016] Die vorliegende Erfindung umfasst Amplifikationsoligonukleotide und Verfahren zur in vitro Nukleinsäureamplifikation, welche diese Oligonukleotide als Amplifikationsprimer verwenden, um MAC Spezies in einer Probe zu detektieren. Diese Oligonukleotidprimer amplifizieren in in vitro Amplifikationsverfahren spezifisch relativ lange Bereiche (etwa 280 bis 320 nt) der 16S ribosomalen RNA (rRNA) oder der genomischen DNA, welche ribosomale RNA Sequenzen kodiert. Biologische Proben, welche derartige Zielsequenzen enthalten können, stammen vorzugsweise von Menschen und sind noch bevorzugter behandelte (processed) Sputumproben. Die vorliegenden Verfahren können mit zusätzlichen Oligonukleotidzusammensetzungen und Verfahren kombiniert werden, welche die Amplifikation oder Detektion der amplifizierten MAC Sequenzen unterstützen. Beispielsweise können in der Probe enthaltenen MAC Zielsequenzen vor der Amplifikation mit Hilfe zusätzlicher Nukleinsäureoligomere partiell von anderen Komponenten der Probe gereinigt werden, um die MAC Sequenzen zu selektieren (manchmal als "Fängeroligonukleotide" bezeichnet). In ähnlicher Weise kann die Detektion der amplifizierten Nukleinsäuren auf markierten oder unmarkierten Nukleinsäureoligomeren basieren, welche spezifisch mit den amplifizierten MAC Nukleinsäuren hybridisieren ("Sonden" oder "markierte Sonden").

[0017] Die Nukleinsäuresequenzen der vorliegenden Erfindung sind zweckmäßig zur Amplifikation relativ langer Nukleinsäuresequenzen von MAC Spezies, wodurch die Detektion von MAC Spezies ermöglicht wird, während die Probleme vermieden werden, die mit der Amplifikation kurzer Segmente kontaminierender Nukleinsäuren assoziiert sind, wie oben beschrieben. Demzufolge sind die Zusammensetzungen und Verfahren der vorliegenden Erfindung zweckmäßig für die Detektion von Infektionen, welche durch MAC Organismen hervorgerufen werden, während sie das Auftreten von Falsch-Positivem limitieren, welche aus kontaminierenden Nukleinsäuren in der Probe resultieren können. Außerdem kann durch Amplifizieren relativ langer Zielsequenzen die amplifizierte Sequenz, selbst wenn sie partiell degradiert ist, nach wie vor spezifisch detektiert werden (i.e. eine ausreichend Sequenzinformation beibehalten), wodurch falsch-negative Ergebnisse vermieden werden. In ähnlicher Weise sind die relativ langen amplifizierten Sequenzen, welche durch die Zusammensetzungen und Verfahren der vorliegenden Erfindung erzeugt werden, zweckdienlicher für eine spezifische Detektion und Identifikation von MAC Spezies, die von anderen eng verwandten Mycobacterium Spezies unterschieden werden. Die nachfolgenden Definitionen dienen dem leichteren Verständnis der in der Beschreibung dieser Erfindung verwendeten Begriffe.

[0018] Als "biologische Probe" wird ein beliebiges Gewebe oder Material bezeichnet, das von einem lebenden oder toten Menschen stammt, und das eine Mycobacterium Nukleinsäure enthalten kann, oder eine beliebige bakterielle Kultur, die aus solch einem Material abgeleitet ist. Eine Probe kann beispielsweise Sputum sein, respiratorisches Gewebe oder Exudate, peripheres Blut, Plasma oder Serum, Proben cervikaler Abstriche, Biopsiegewebe, Gastrointestinalgewebe, Urin, Kot, Sperma oder andere Körperflüssigkeiten, Gewebe oder bakterielle Kulturen (in Flüssigkeit oder auf festen Medien). Um die Probe für die Analyse herzustellen, kann die biologische Probe behandelt werden, um die Zellstruktur physikalisch zu zerstören und intrazelluläre Nukleinsäuren in eine Lösung freizusetzen, die andere Komponenten enthalten kann (zum Beispiel Enzyme, Puffer, Salze, Detergenzien und dergleichen). Solche Verfahren sind im Stand der Technik bekannt (siehe zum Beispiel die U.S. Patente Nr. 5,374,522, 5,641,632 und 5,846,701).

[0019] Als "Nukleinsäure" wird eine multimere Verbindung bezeichnet, die Nukleoside oder Nukleosidanaloge umfasst, welche stickstoffhaltige heterozyklische Basen oder Basenanaloga aufweisen, wobei die Nukleoside

kovalent über eine Gerüststruktur ("backbone-Struktur") verknüpft sind, um ein Polynukleotid zu bilden. "Nukleinsäure" umfasst konventionelle Ribonukleinsäure (RNA) sowie Deoxyribonukleinsäure (DNA) und Analoga davon. Ein Nukleinsäuregerüst kann eine Vielzahl bekannter Verknüpfungen enthalten, einschließlich zum Beispiel einer oder mehrerer Zucker-Phosphodiesterverknüpfungen, Peptid-Nukleinsäurebindungen (PCT Nr. WO 95/32305), Phosphorothioatverknüpfungen, Methylphosphonatverknüpfungen oder Kombinationen davon. Die Zuckereinheiten der Nukleinsäure können Ribose oder Deoxyribose oder ähnliche Verbindungen sein, welche Substitutionen enthalten, zum Beispiel 2'-Methoxysubstitutionen und/oder 2'-Halidsubstitutionen. Stickstoffhaltige Basen können konventionelle Basen sein (A, G, C, T, U), bekannte Analoga davon (zum Beispiel Inosin (I) und andere, wie zum Beispiel diejenigen, die beschrieben sind in The Biochemistry of the Nucleic Acids 5-36, Adams et al., Hrsg., 11. Aufl., 1992) oder bekannte Derivate von Purin- oder Pyrimidinbasen (PCT Nr. WO 93/13121) und "abasische" Reste, bei denen das Gerüst an einem oder mehreren Resten keine stickstoffhaltige Base enthält (U.S. Patent Nr. 5,585,481). Eine Nukleinsäure kann nur konventionelle Zucker, Basen und Verknüpfungen umfassen, wie in RNA und DNA vorgefunden, oder kann sowohl konventionelle Komponenten als auch Substitutionen umfassen (zum Beispiel konventionelle Basen, die über ein Methoxy-Gerüst verknüpft sind, oder eine Nukleinsäure, die ein Gemisch aus konventionellen Basen und einem oder mehr Basenanaloga enthält). Für all die Sequenzen, die hier als DNA-Sequenzen dargestellt sind, ist es selbstverständlich, dass die offenbare Sequenz auch das RNA-Äquivalent (in dem T- Reste durch U substituiert sind), die reverse Sequenz und das reverse Komplement der offenbarten Sequenz offenbart.

[0020] Als "Oligonukleotid" oder "Oligomer" wird eine Nukleinsäure bezeichnet, die im Allgemeinen weniger als 1000 Reste aufweist, einschließlich Polymere in einem Größenbereich mit einem unteren Limit von etwa 2 bis 5 Nukleotidresten und einem oberen Limit von etwa 500 bis 900 Nukleotidresten. Bevorzugte Oligomere liegen in einem Größenbereich mit einem unteren Limit von etwa 5 bis etwa 15 Resten und einem oberen Limit von etwa 50 bis 600 Resten, noch bevorzugter in einem Bereich mit einem unteren Limit von etwa 10 Resten und einem oberen Limit von etwa 100 Resten. Oligomere können aus natürlich vorkommenden Quellen gereinigt werden, werden aber vorzugsweise mit Hilfe bekannter Verfahren synthetisiert.

[0021] Als "Amplifikationsoligonukleotid" oder "Amplifikationsoligomer" wird ein Oligonukleotid bezeichnet, das an eine Zielnukleinsäure oder deren Komplement hybridisiert und an einer *in vitro* Nukleinsäureamplifikationsreaktion teilnimmt. Vorzugsweise umfasst ein Amplifikationsoligonukleotid mindestens etwa 10 fortlaufende Basen, und noch bevorzugter mindestens etwa 12 fortlaufende Basen, die komplementär zu einer Region der Zielnukleinsäuresequenz sind (oder zu deren Komplement). Die fortlaufenden Basen sind vorzugsweise mindestens 80%, noch bevorzugter mindestens 90% komplementär zu der Stelle der Zielsequenz, an welche das Amplifikationsoligonukleotid bindet. Ein Amplifikationsoligonukleotid ist vorzugsweise etwa 10 bis etwa 60 Basen lang und kann modifizierte Nukleotide oder Basenanaloga oder modifizierte Verknüpfungen in der Gerüststruktur umfassen.

[0022] Amplifikationsoligonukleotide und -oligomere können als "Primer" oder "Promotorprimer" bezeichnet werden. Ein "Primer" bezeichnet im Allgemeinen ein Oligonukleotid, das an eine Templatenukleinsäure hybridisiert, und ein 3'-Ende aufweist, das in einer Polymerisationsreaktion, üblicherweise eine enzymvermittelte Reaktion, verlängert wird. Die 5'-Region des Primers kann nicht-komplementär zur Zielnukleinsäure sein und zusätzliche Basen umfassen, wie zum Beispiel eine Promotorsequenz (hier als "Promotorprimer" bezeichnet). Fachleute werden erkennen, dass ein beliebiges Oligomer, welches als Primer fungieren kann, modifiziert werden kann, um eine 5'-Promotorsequenz zu umfassen, und dadurch als ein Promotorprimer fungieren könnte. In ähnlicher Weise kann ein beliebiger Promotorprimer unabhängig von seinen Promotorfunktionen als Primer dienen.

[0023] Als "Amplifikation" wird ein beliebiges bekanntes *in vitro* Verfahren zum Erhalt multipler Kopien einer Zielnukleinsäuresequenz, ihres Komplements oder von Fragmenten davon bezeichnet, das auf einer polymerasevermittelten Verlängerung eines Amplifikationsoligonukleotids oder Primers basiert. *In vitro* Nukleinsäureamplifikation bezeichnet die Erzeugung amplifizierter Sequenzen, die weniger als die vollständige Sequenz der Targetregion oder ihres Komplements enthalten können. Solche Amplifikationsverfahren umfassen zum Beispiel die transkriptions-vermittelte Amplifikation (TMA), die replikase-vermittelte Amplifikation, die Polymerasekettenreaktion (PCR) Amplifikation und die Strang-Verdrängungsamplifikation (SDA, strand-displacement amplification). Die replikase-vermittelte Amplifikation verwendet selbst replizierende RNA-Moleküle und eine Replikase, wie zum Beispiel die QB-Replikase, die spezifisch für selbst replizierende RNA ist (U.S. Patent Nr. 4,786,600, PCT Nr. WO 90/14439). Die PCR Amplifikation verwendet DNA-Polymerase, Primer und eine Serie thermischer Zyklusreaktionen, um multiple Kopien der zwei komplementären Stränge von DNA oder cDNA zu synthetisieren (U.S. Pat. Nr. 4,683,195, 4,683,202 und 4,800,159; Methods in Enzymology, 1987, Vol. 155: 335-350). SDA verwendet einen Primer, der eine Erkennungsstelle für eine Restriktionsendonuklease enthält,

so dass die Endonuklease einen Strang eines halbmodifizierten DNA-Duplexes schneidet (nicks), der die Zielsequenz umfasst, gefolgt von einer Amplifikation in einer Serie von Primer Extensions- und Strangverdrängungsschritten (Walker et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 392-396; und U.S. Patent Nr. 5,422,252).

[0024] Als "transkriptions-vermittelte Amplifikation" oder "transkriptions-assoziierte Amplifikation" wird ein beliebiger Typ einer in vitro Nukleinsäureamplifikation bezeichnet, der eine RNA-Polymerase verwendet, um multiple RNA-Transkripte von einem Nukleinsäuretemplate zu erzeugen. Diese Verfahren verwenden im Allgemeinen eine RNA-Polymeraseaktivität, eine DNA-Polymeraseaktivität, Deoxyribonukleosidtriphosphate, Ribonukleosidtriphosphate und einen Promotorprimer und einen zweiten Nicht-Promotorprimer und können optional ein oder mehrere zusätzliche Oligonukleotide (manchmal als "Helfer" bezeichnet) umfassen. Diese Verfahren sind im Stand der Technik bekannt, wie an anderer Stelle im Detail offenbart (U.S. Pat. Nr. 5,399,491 and 5,554,516; U.S. Pat. Nr. 5,437,990; U.S. Pat. Nr. 5,130,238; U.S. Pat. Nr. 4,868,105 und 5,124,246; PCT Nr. WO 93/22461, WO 94/03472, WO 95/03430, WO 88/01302 und WO 88/10315). Obwohl die transkriptions-vermittelte Amplifikation (TMA) vorzugsweise in Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung verwendet wird, werden Fachleute erkennen, dass die Sequenzen der Oligonukleotidprimer der vorliegenden Erfindung einfach in anderen in vitro Amplifikationsverfahren verwendet werden können, welche auf Primer Extension durch eine Polymerase basieren. Bevorzugte TMA Verfahren wurden früher im Detail beschrieben (U.S. Pat. Nr. 5,399,491 and 5,554,516; PCT Nr. WO 93/22461, WO 94/03472 und WO 95/03430).

[0025] Als "Sonde" wird ein Nukleinsäureoligomer bezeichnet, das unter Bedingungen, welche die Hybridisierung fördern, spezifisch mit einer Zielsequenz in einer Nukleinsäure oder deren Komplement hybridisiert, vorzugsweise in einer amplifizierten Nukleinsäure, wodurch die Detektion der Nukleinsäure ermöglicht wird. Die Detektion kann entweder direkt erfolgen (i.e. resultierend aus einer Sonde, die direkt mit der Zielsequenz oder der amplifizierten Nukleinsäure hybridisiert) oder indirekt (i.e. resultierend aus einer Sonde, die mit einer intermediären molekularen Struktur hybridisiert, welche die Sonde mit der Zielsequenz oder der amplifizierten Nukleinsäure verknüpft). Ein "Target" einer Sonde bezeichnet im Allgemeinen eine Sequenz innerhalb (i.e. ein Teilbereich von) der amplifizierten Nukleinsäuresequenz, die spezifisch mit mindestens einem Teil eines Sondenoligomers mittels Wasserstoffbrückenbindungen hybridisiert (i.e. Basenpaarung). "Ausreichend komplementäre" Sequenzen erlauben eine stabile Hybridisierung eines Sondenoligomers mit einer Zielsequenz unter ausgewählten Hybridisierungsbedingungen, selbst wenn die beiden Sequenzen nicht 100% komplementär sind. Eine Sonde kann markiert oder unmarkiert sein, abhängig von der verwendeten Detektionsmethode.

[0026] Als "ausreichend komplementär" wird eine fortlaufende Nukleinsäurebasensequenz bezeichnet, die mit einer anderen Basensequenz mittels Wasserstoffbrückenbindungen zwischen einer Reihe komplementärer Basen hybridisiert. Komplementäre Sequenzen können an jeder Position mittels Standardbasenpaarung (zum Beispiel G:C, A:T oder A:U Paarung) komplementär sein oder können ein oder mehr Reste enthalten, die nicht mittels Standardbasenpaarung komplementär sind (einschließlich abasischer Reste), bei denen aber die komplementäre Sequenz spezifisch mit einer anderen Basensequenz unter geeigneten Hybridisierungsbedingungen hybridisiert. Fortlaufende Basen sind vorzugsweise mindestens zu etwa 80%, noch bevorzugter mindestens zu etwa 90% komplementär zu einer Sequenz, mit der das Oligomer hybridisiert. Geeignete Hybridisierungsbedingungen sind Fachleuten bekannt und können aufgrund der Sequenzzusammensetzung und der Bedingungen einfach vorhergesagt werden oder können empirisch durch Standardtestverfahren bestimmt werden (siehe Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989 in den §§ 1.90-1.91, 7.37-7.57, 9.47-9.51 und 11.47-11.57, insbesondere in den §§ 9.50-9.51, 11.12.-11.13, 11.45-11.47 und 11.55-11.57).

[0027] Unter "abtrennen" oder "reinigen" versteht man, dass eine oder mehrere Komponenten der biologischen Probe von einer oder mehreren anderen Komponenten in der Probe entfernt werden. Probenkomponenten umfassen Nukleinsäuren in einer im Allgemeinen wässrigen Lösung, die weitere Materialien enthalten kann (zum Beispiel Proteine, Kohlenhydrate, Lipide). Vorzugsweise entfernt ein Abtrenn- oder Reinigungsschritt für Nukleinsäuren mindestens etwa 70%, bevorzugter mindestens etwa 90% und noch bevorzugter mindestens etwa 95% der anderen Probenkomponenten.

[0028] Das Reinigen einer Zielnukleinsäure kann als "Einfangen des Targets" (target capture) bezeichnet werden (siehe PCT Nr. WO 98/50583). Als "Fängeroligonukleotid" oder "Fängeroligomer" oder "Fängersonde" wird mindestens ein Nukleinsäureoligomer bezeichnet, das Mittel zum spezifischen Verbinden einer Targetsequenz und eines immobilisierten Oligomers mittels Basenpaarhybridisierung bereitstellt. Als "immobilisierte Sonde" oder "immobilisierte Nukleinsäure" oder "immobilisiertes Oligomer" wird eine Nukleinsäure bezeichnet die ein Fängeroligomer direkt oder indirekt an einen festen Träger koppelt, um die Abtrennung der gebundenen Targetsequenz von ungebundenem Material in der Probe zu erleichtern.

[0029] Als "Markierung" wird eine molekulare Einheit oder Verbindung bezeichnet, die detektiert werden kann oder die zu einer detektierbaren Antwort führt. Eine Markierung wird direkt oder indirekt mit einer Nukleinsäure verbunden oder mit der zu detektierenden Nukleinsäure (zum Beispiel mit der amplifizierten Nukleinsäure). Eine direkte Markierung kann durch Bindungen oder Interaktionen erfolgen, welche die Markierung mit der Sonde verbinden (zum Beispiel kovalente Bindungen oder nicht-kovalente Interaktionen). Eine indirekte Markierung kann durch die Verwendung einer Brückeneinheit oder eines "Linkers" (zum Beispiel ein zusätzliches Oligonukleotid) erfolgen, der direkt oder indirekt markiert ist. Markierungen umfassen jegliche bekannte detektierbare Einheit (zum Beispiel ein Radionuklid, ein Ligand, wie zum Beispiel Biotin oder Avidin, ein Enzym oder Enzymsubstrat, eine reaktive Gruppe, ein Chromophor, wie zum Beispiel ein Farbstoff oder ein gefärbtes Partikel, eine lumineszierende Verbindung, wie zum Beispiel eine biolumineszierende, phosphoreszierende oder chemilumineszierende Verbindung oder eine fluoreszierende Verbindung). Vorzugsweise ist die Markierung auf einer markierten Sonde in einem homogenen Assaysystem detektierbar (i.e. in einem Gemisch, wobei die gebundenen markierte Probe verglichen mit der ungebundenen markierten Probe ein detektierbares Signal zeigt; siehe die U.S. Patente Nr. 5,283,174 und 5,639,604). Bevorzugte Markierungen für die Verwendung in einem homogenen Assay sind chemilumineszierende Verbindungen, noch bevorzugter Acridiniumester ("AE")-Verbindungen (U.S. Patente Nr. 5,656,207, 5,658,737 und 5,639,604). Verfahren zum Anbringen von Markierungen an Nukleinsäuren und zum Detektieren von Markierungen sind im Stand der Technik bekannt (siehe zum Beispiel Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989, Kap. 10; U.S. Pat. Nr. 5,658,737, 5,656,207, 5,547,842, 5,283,174 und 4,581,333; and EP Pat. Anm. Nr. 0 747 706).

[0030] Eine "homogene detektierbare Markierung" bezeichnet eine Markierung, deren Gegenwart auf der Grundlage davon detektiert werden kann, ob die Markierung sich auf einer Sonde befindet, die mit einer Zielsequenz hybridisiert hat. Das heißt, dass eine homogene detektierbare Markierung ohne physikalische Trennung der hybridisierten von den unhybridisierten Formen der markierten Sonde detektiert werden kann. Bekannte homogene detektierbare Markierungen und Verfahren zu deren Detektierung sind im Detail in den U.S. Patenten Nr. 5,283,174, 5,656,207 und 5,658,737 beschrieben.

[0031] Unter "im Wesentlichen bestehend aus" versteht man, dass (eine) zusätzliche Komponente (Komponenten), eine Zusammensetzung (Zusammensetzungen) oder ein Verfahrensschritt (Verfahrensschritte), welche die grundlegenden und neuen Charakteristika der vorliegenden Erfindung nicht materiell verändern, in die Zusammensetzungen und Verfahren der vorliegenden Erfindung eingeschlossen sind. Derartige Charakteristika umfassen die Fähigkeit zur Erzeugung relativ langer amplifizierter Mycobacterium Sequenzen, welche die spezifische Detektion von Sequenzen aus MAC Spezies ermöglichen. Komponenten, Zusammensetzungen oder Verfahrensschritte, die einen materiellen Effekt auf die grundlegenden Charakteristika der vorliegenden Erfindung haben, würden außerhalb dieses Begriffes fallen.

[0032] Sofern nicht anders definiert, haben alle hier verwendeten wissenschaftlichen und technischen Begriffe dieselbe Bedeutung, wie sie üblicherweise von Fachleuten verstanden wird. Allgemeine Definitionen vieler solcher Begriffe finden sich zum Beispiel im Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, 2. Aufl. (Singleton et al., 1994, John Wiley & Sons, New York, NY) oder im The Harper Collins Dictionary of Biology (Hale & Marham, 1991, Harper Perennial, New York, NY). Sofern nicht anders beschrieben, sind alle hier verwendeten oder in Erwägung gezogenen Techniken Standardverfahren, die Fachleuten bekannt sind.

[0033] Die vorliegende Erfindung umfasst Zusammensetzungen, insbesondere Nukleinsäureamplifikationsoligomere, einzeln oder in Kombinationen, die in in vitro Nukleinsäureamplifikationsverfahren zur Detektion von MAC Spezies verwendet werden. Die vorliegende Erfindung umfasst ferner Verfahren, die derartige Amplifikationsoligomere in einer in vitro Nukleinsäureamplifikation verwenden, um MAC Spezies zu detektieren. Optional können zusätzliche DNA-Sequenzen verwendet werden, um MAC Zielsequenzen vor der Amplifikation der MAC Sequenz aus einer biologischen Probe zu isolieren. Im Stand der Technik ist eine Vielzahl von Verfahren zur spezifischen Detektion einer amplifizierten Nukleinsäure bekannt. In Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung wird vorzugsweise eine markierte Sonde verwendet, um die amplifizierten MAC Nukleinsäuresequenzen zu detektieren. Noch bevorzugter detektiert die markierte Sonde die amplifizierte MAC Nukleinsäure in einem homogenen Detektionsassay.

[0034] Die Primersequenzen der vorliegenden Erfindung werden verwendet, um relativ lange Sequenzen zu amplifizieren, die innerhalb der 16S rRNA Sequenzen von Mycobacterium enthalten sind. Im Allgemeinen wurden die Primer durch Vergleich der bekannten 16S rRNA Sequenzen von *M. tuberculosis*, *M. avium* und *M. intracellulare* und Selektion der Regionen konzipiert, in denen die Sequenzen relativ konserviert und ausreichend voneinander entfernt waren, um die Amplifikation von mindestens 200 Resten der rRNA Sequenz zu

ermöglichen. Das heißt, die Sequenzen wurden anhand der übereinstimmenden (matching) Regionen der gleichen oder ähnlichen Sequenzen angeordnet, und die Sequenzen wurden mit Hilfe bekannter molekularbiologischer Verfahren verglichen. Obwohl Sequenzvergleiche durch die Verwendung von Computeralgorithmen erleichtert werden können, können Fachleute solche Vergleiche einfach manuell durchführen. Wenn die relativ konservierten Regionen der verglichenen Sequenzen selektiert wurden, wurden spezifische Oligomere konzipiert, die einen Teil der konservierten Sequenz enthielten, und die einen GC-Gehalt von etwa 40% bis 60%, eine T_m von mehr als 60°C und relativ wenig oder keine vorhergesagte Sekundärstruktur (zum Beispiel Hairpin-Strukturen) aufwiesen, wobei alle Parameter mit Hilfe von Standardverfahren bestimmt wurden. Die konzipierten Oligomere mit den Sequenzen von SEQ ID NR: 1 bis SEQ ID NR: 3 und SEQ ID NR: 7 bis SEQ ID NR: 9 wurden synthetisiert.

[0035] Die Amplifikation der MAC Zielregion mit Hilfe von mindestens zwei Primern kann durch eine Vielzahl bekannter Nukleinsäureamplifikationsreaktionen erreicht werden, aber bevorzugte Ausführungsformen verwenden eine isothermale transkriptions-vermittelte Amplifikationsreaktion (TMA; siehe die U.S. Patente Nr. 5,399,491 und Nr. 5,554,516). Mit Hilfe dieses Verfahrens werden viele Stränge der Nukleinsäure aus einer einzelnen Kopie der Zielnukleinsäure erzeugt, wodurch die Detektion des amplifizierten Targets mittels bekannter Detektionsverfahren ermöglicht wird. Kurz gesagt, TMA verwendet einen Promotorprimer, der eine 5'-Promotorsequenz enthält, einen zweiten Primer, eine Reverse Transkriptase, eine RNA-Polymerase, Substrate für die Nukleinsäurepolymerisation (dNTPS und rNTPs) und geeignete Salze und Puffer in Lösung, um multiple RNA-Transkripte aus einem Nukleinsäuretemplate zu erzeugen. Der Promotorprimer hybridisiert spezifisch mit der Target-RNA, und die Reverse Transkriptase erzeugt durch Verlängerung (Extension) vom 3'-Ende des Promotorprimers einen ersten Strang cDNA. Die cDNA hybridisiert mit dem zweiten Primer. Die Hybridisierung kann durch Denaturieren des RNA/DNA-Duplexes erleichtert werden oder durch die Verwendung einer RNase H-Aktivität, die mit der Reversen Transkriptase assoziiert ist, um die RNA aus dem RNA/DNA-Duplex zu entfernen. Der zweite Primer bindet distal des ersten Primers an die cDNA, und mit Hilfe der Reversen Transkriptase wird ein neuer Strang DNA vom 3'-Ende des zweiten Primers aus synthetisiert, wodurch eine doppelsträngige DNA mit einer funktionalen Promotorsequenz an einem Ende erzeugt wird. Die RNA-Polymerase bindet an die doppelsträngige Promotorsequenz, und die Transkription erzeugt multiple Transkripte, i.e. amplifizierte Produkte der Zielsequenz oder "Amplicons". Die Amplicons werden im Anschluss in dem TMA Prozess verwendet, dienen als ein Template für einen neuen Replikationszyklus, wodurch große Mengen einzelsträngiger amplifizierter Nukleinsäure generiert werden (i.e. etwa 100 bis 3000 Kopien von RNA-Transkripten, die von einem singulären Template synthetisiert werden).

[0036] Die Primersequenzen (SEQ ID NR: 1 bis SEQ ID NR: 9) binden spezifisch an eine MAC Zielsequenz oder ein Komplement einer MAC Zielsequenz, obwohl Primersequenzen Sequenzen enthalten können, welche nicht an die Zielsequenz oder deren Komplement binden. Insbesondere umfassen T7-Promotorprimer (SEQ ID NR: 1 bis SEQ ID NR: 3) eine 5' T7-Promotorsequenz (die separat in SEQ ID NR: 10 dargestellt ist), welche mit einer 3'-Sequenz verknüpft ist, welche die Zielsequenz oder deren Komplement bindet. Fachleute werden erkennen, dass eine target- spezifische Primersequenz mit oder ohne eine damit verknüpfte Promotorsequenz unter einer Vielzahl von in vitro Amplifikationsbedingungen als Primer zweckdienlich ist.

[0037] Die Assays der vorliegenden Erfindung umfassen, kurz gesagt, die Schritte: Bereitstellen einer biologischen Probe, die eine MAC Target-rRNA oder eine DNA enthält, welche eine 16S rRNA kodiert, optional durch "Fangen" des Targets (target capture), um das Target partiell zu reinigen, die in vitro Nukleinsäureamplifikation und die Detektion der amplifizierten Nukleinsäureprodukte. In bevorzugten Ausführungsformen, welche TMA verwenden, und die in den nachfolgenden Beispielen dargestellt sind, umfasst das Amplifikationsgemisch eine MAC Target-rRNA, mindestens einen Promotorprimer, der mit der Targetsequenz hybridisiert, mindestens einen zweiten Primer, der spezifisch mit einem ersten Strang cDNA hybridisiert, welcher unter Verwendung des T7-Promotorprimers aus der Zielsequenz erzeugt wurde, sowie Substrate und Cofaktoren für die enzymatische Polymerisierung mittels Reverser Transkriptase und T7 RNA-Polymerase.

[0038] Die amplifizierten Nukleinsäureprodukte können mit Hilfe einer Vielzahl bekannter Verfahren detektiert werden, einschließlich zum Beispiel einer Gelanalyse oder der Hybridisierung der amplifizierten Produkte oder von Teilen davon mit mindestens einer komplementären Sondensequenz. Die Sonde kann ein Oligonukleotid sein, das eine reverse komplementäre Sequenz einer Primersequenz enthält (SEQ ID NR: 11 bis SEQ ID NR: 16). Fachleute können einfach weitere Sondensequenzen bestimmen, welche mit amplifizierten MAC Sequenzen hybridisieren, die mit Hilfe der hier offenbarten Primer erzeugt werden (i.e. eine beliebige Sequenz, die spezifisch mit einem Teil der amplifizierten Zielsequenz hybridisiert, welche mit Hilfe zweier beliebiger funktionaler kompatibler Amplifikationsnukleotide der vorliegenden Erfindung erzeugt wurde). Zur Detektion der amplifizierten Nukleinsäure kann die Sonde markiert werden oder das Amplifikationsprodukt kann markiert wer-

den. Eine markierte Sonde kann zum Beispiel mit der amplifizierten Nukleinsäure hybridisiert und in einem homogenen System detektiert werden (siehe die U.S. Patente Nr. 5,185,439, 5,283,174, 5,585,481 und 5,639,604). In einem weiteren Beispiel können eine immobilisierte Sonde als Fängermolekül und markierte amplifizierte Nukleinsäuren verwendet werden, die dann im Anschluss im resultierenden Komplex aus markierter Nukleinsäure und immobilisierter Sonde detektiert werden.

[0039] Das Fangen des Targets wird optional in das Verfahren eingeschlossen, um die Konzentration oder Reinheit der MAC Zielnukleinsäure vor der in vitro Amplifikation zu erhöhen. Vorzugsweise beinhaltet das Fangen des Targets ein relativ einfaches Verfahren zur Hybridisierung und Isolierung der Zielnukleinsäure, wie es detailliert in PCT Nr. WO 98/50583 beschrieben ist. Kurz gesagt, ein Oligonukleotid, das mit einem festen Träger verbunden ist, wird mit der Zielnukleinsäure unter geeigneten Hybridisierungsbedingungen gemischt, um der Zielsequenz zu ermöglichen, freisetzbar mit dem festen Träger verbunden zu werden. Das Fangen des Targets kann aus der direkten Hybridisierung zwischen der MAC Nukleinsäure und dem immobilisierten Oligonukleotid auf dem festen Träger resultieren oder kann indirekt über ein oder mehrere Oligonukleotide erfolgen, die einen Hybridisierungskomplex ausbilden, welcher die MAC Nukleinsäure mit dem immobilisierten Oligonukleotid verknüpft. Ein bevorzugter fester Träger ist ein Partikel, das leicht aus der Lösung separiert werden kann (zum Beispiel ein paramagnetisches Partikel, das aus dem Gemisch durch Anlegen eines magnetischen Feldes an das Gefäß isoliert werden kann). Die MAC Zielnukleinsäure, die mit dem festen Träger verbunden ist, wird gewaschen und im Anschluss amplifiziert, indem sie in einer in vitro Amplifikationsreaktion geeigneten Primern, Substraten und Enzymen ausgesetzt wird.

[0040] Ein typischer Amplifikationsassay, der eine Ausführungsform der vorliegenden Erfindung darstellt, umfasst die folgenden Schritte und Bedingungen. Eine Probe enthält entweder eine bekannte Menge gereinigter rRNA, die aus *M. avium* isoliert wurde, in einer Pufferlösung oder enthält Bakterien (zum Beispiel 0.5 ml eines Sputum-Sediments oder einer bakteriellen Kultur). Bei Proben, die eine gereinigte rRNA Zielsequenz enthalten, wird der Assay direkt mit der in vitro Nukleinsäureamplifikation fortgesetzt, da keine Zelllyse erforderlich ist. Bei bakterien-enthaltenden Proben wird die Probe in einem Röhrchen mit einem Lysepuffer gemischt (zum Beispiel 10 mM HEPES, 0.25-0.5% (w/v) Lithiumlaurylsulfat, pH 8), und die intrazelluläre Nukleinsäure wird durch Standardverfahren (zum Beispiel Ultraschallbehandlung) freigesetzt. Zum Beispiel wurde eine 50 µl Probe eines Sputum- Sediments mit 200 µl des Lysepuffers gemischt, und die Probe wurde bei Raumtemperatur 15 min in einem Ultraschallwasserbad inkubiert, optional gefolgt vom Abtöten der verbliebenen Organismen durch Hitze durch Inkubieren bei 95°C für 15 min. Solche Verfahren zur Probenvorbereitung sind bekannt (U.S. Patent Nr. 5,364,763, 5,374,522 und 5,837,452).

[0041] Wenn ein Fangen des Targets optional eingeschlossen wird, um die MAC Zielnukleinsäure partiell von weiteren Probenbestandteilen im Gemisch zu reinigen, wird das Verfahren im Wesentlichen durchgeführt wie in PCT Nr. WO 98/50583 beschrieben. Kurz gesagt, 250 µl des bakteriellen Lysats werden mit demselben Volumen Puffer gemischt, der ein Targetfängeroligomer (üblicherweise 5 pMol) enthält, das komplementär zu einem Teil der zu amplifizierenden 16S rRNA Sequenz ist, sowie 50 µg paramagnetische Partikel (0.7-1.05 µ Partikel, Seradyn, Indianapolis, IN) an die eine immobilisierte Sonde geheftet ist, welche komplementär zu mindestens einem Teil des Targetfängeroligomers ist (z.B. Poly-dT₁₄₋₂₄). Das Targetfängergemisch wird erhitzt (z.B. 60-70°C für 15-20 min) und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt, um eine Hybridisierung zu ermöglichen, nach der ein magnetisches Feld angelegt wird (5 min), um die magnetischen Partikel mit dem angehefteten Komplex, der die MAC Target-RNA enthält, an eine Stelle des Reaktionsbehältnisses zu ziehen (U.S. Patent Nr. 4,895,650). Die Partikel wurden zweimal mit einem Waschpuffer (z.B. 1 ml 10 mM HEPES, 6.5 mM NaOH, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0,1% (w/v) Natriumlaurylsulfat) gewaschen und erneut getrennt. Die Partikel mit der daran angehefteten Zielsequenz können direkt in einer Nukleinsäureamplifikationsreaktion verwendet werden.

[0042] Die in vitro Nukleinsäureamplifikation mittels TMA wurde unter Verwendung der nachfolgenden Bedingungen durchgeführt (siehe auch die U.S. Patente Nr. 5,399,491 und 5,554,516). Im Allgemeinen wurde die Probe, welche die Zielsequenz (entweder gereinigte 16S rRNA, Zelllysat oder gewaschene Partikel) enthielt, mit einer Amplifikationsreagenzlösung (40 mM Tris-HCL, pH 7.5, 17.5 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 5% Polyvinylpyrrolidon, 1 mM eines jeden dNTP, 4 mM eines jeden rNTP) und mindestens zwei Primeroligomeren (mindestens ein Promotorprimer und ein zweiter Primer, in einer Konzentration von jeweils 2.5 bis 30 pM) gemischt und mit einer Schicht (200 µl) eines inerten Öls bedeckt, um eine Verdunstung zu verhindern. In einigen Assays wurden im Amplifikationsreagenzgemisch 74 mM Tris-HCl anstelle von 40 mM Tris-HCl, 6.15 mM MgCl₂ anstelle von 20 mM MgCl₂, 23 mM K-Aacetat anstelle von 20 mM KCl und 0.62 mM dNTP anstelle von 1 mM dNTP eingesetzt und 7.7% (v/v) DMSO zugefügt. Das Gemisch wurde bei 90-100°C für 15 min inkubiert, und anschließend bei 42°C für 5 min. Im Anschluss wurden 25 µl Enzymreagenz zugegeben (eine Lösung aus 250 U

MMLV Reverse Transkriptase und 500 U T7 RNA-Polymerase pro Reaktion in 50 mM HEPES, 1 mM EDTA, 10% (v/v) Triton™ X-100 oder Tween™-40, 120 mM KCl und 20% (v/v) Glycerin). Das Amplifikationsgemisch wurde vorsichtig geschüttelt und 1-2 h bei 42°C inkubiert. Die Negativkontrollen enthielten die gleichen Reagenzien, verwendeten aber dasselbe Volumen Wasser oder Puffer ohne MAC Nukleinsäure anstelle der MAC Zielsequenz.

[0043] Die amplifizierten Sequenzen wurden im Allgemeinen mit Hilfe einer mit einem Acridiniumester (AE) markierten Sonde detektiert (üblicherweise 5.5 pMol pro Reaktion), die durch Chemilumineszenz in einem geeigneten Luminometer (z.B. LEADER™ Luminometer, Gen-Probe Incorporated, San Diego, CA) detektiert und in relativen Lichteinheiten (relative light units, RLU) ausgedrückt, im Wesentlichen wie zuvor beschrieben (U.S. Pat. Nr. 5,658,737 in Spalte 25, Zeilen 27-46; Nelson et al., 1996, Biochem. 35: 8429-8438 auf Seite 8432). Im Allgemeinen wird der Durchschnitt (Mittelwert) der detektierten RLU für replizierte Assays dargestellt. Die Sonde war SEQ ID NR: 17 und die Helfersonde SEQ ID NR: 18.

[0044] Die nachfolgenden nicht einschränkenden Beispiele zeigen Aspekte der bevorzugten Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung.

BEISPIEL 1

In Vitro Amplifikation von M. avium rRNA mit verschiedenen Primern

[0045] Mit Hilfe der oben beschriebenen Verfahren zur Amplifikation und Detektion mit einer markierten Sonde wurden die Effizienzen der transkriptions-vermittelten Amplifikation mit verschiedenen Kombinationen und Konzentrationen von Promotorprimern und zweiten Primern getestet.

[0046] In einer ersten Serie von Reaktionen lagen der Promotorprimer und der zweite Primer in der Reaktion in der Konzentration von jeweils 7.5, 15 oder 30 pMol vor. Die Negativkontrollen für jede Serie von Bedingungen enthielten keine Target-RNA. Die verwendeten Primer waren ein T7 Promotorprimer entsprechend SEQ ID NR: 1 (GAAATTAATCGACTCACTATAAGGAGACCACCCGTAGGAGTCTGGGCCGTATCTCA) und ein zweiter Primer entsprechend SEQ ID NR: 7 (GCAAGTCGAACGGAAAGGCCTTTCGGAGGTA). Die Zielsequenzen waren gereinigte M. avium 16S rRNA, die in der Amplifikationsreaktion in einer Kopienzahl von 400 oder 2000 pro Reaktion vorlagen (1 fg bzw. 5 fg). Für jede Serie von Bedingungen wurden Dreifachassays durchgeführt. Die Amplifikation (2 h bei 42°C) wurde basierend auf den relativen Lichteinheiten (RLU) beurteilt, welche nach Hybridisierung der Amplifikationsprodukte mit einer AE-markierten Sonde (SEQ ID NR: 17) und mit einer unmarkierten Helfersonde (SEQ ID NR: 18) unter Verwendung der zuvor beschriebenen Detektionsverfahren detektiert wurden (U.S. Patente Nr. 5,595,874 und 5,639,604). Tabelle 1 stellt die mit diesen Kombinationen an Amplifikationsoligonukleotiden erhaltenen Ergebnisse dar. Jedes Ergebnis stellt den Durchschnittswert aus drei Essays für jede Bedingung dar.

Tabelle 1: Detektierte RLU (Mittelwerte) nach Amplifikation von M. avium rRNA mit SEQ ID NR: 1 und SEQ ID NR: 7

Primerkonzentration	0 Kopien der Target-RNA	400 Kopien der Target-RNA	2000 Kopien der Target-RNA
7.5 pMol	1.504	426.443	1.279.701
15 pMol	1.628	148.199	747.288
30 pMol	1.960	76.777	472.662

[0047] Diese Ergebnisse zeigen, dass alle Konzentrationen an Primern und Promotorprimern in den Amplifikationsreaktionen signifikant mehr detektierbare Amplifikationsprodukte erzeugten als in den Reaktionen der Negativkontrolle, die keine Target-RNA enthielten. Unter diesen Bedingungen ergab eine Konzentration von jeweils 7.5 pMol des Promotorprimers und des zweiten Primers für beide getesteten Konzentrationen der Zielsequenz die größte Menge an detektierbaren Amplifikationsprodukten.

[0048] Eine zweite Serie von Reaktionen wurde im Wesentlichen analog der ersten Serie durchgeführt, wobei die gleichen Primer- und Targetkonzentrationen, jedoch eine andere Kombination von Primersequenzen verwendet wurde. Der Promotorprimer war SEQ ID NR: 3 (GAAATTAATCGACTCACTATAAGGAGACCACAG-

CCCATTGTGCAATATTCCCCACT), und der zweite Primer war SEQ ID NR: 9 (GAGTGGCGAACGGGT-GAGTAACACGTG). Die Ergebnisse in Tabelle 2 zeigen die mittleren RLU, die für jede der Bedingungen in drei Essays pro Bedingung detektiert wurde.

Tabelle 2: Detektierte RLU (Mittelwerte) nach Amplifikation von M. avium rRNA mit SEQ ID NR: 3 und SEQ ID NR: 9

Primerkonzentration	0 Kopien der Target-RNA	400 Kopien der Target-RNA	2000 Kopien der Target-RNA
7.5 pMol	1.535	72.765	403.905
15 pMol	1.314	25.080	176.081
30 pMol	1.461	12.072	50.278

[0049] Diese Ergebnisse zeigen, dass eine andere Kombination von Primern im Vergleich zur Negativkontrolle die 16S MAC Zielsequenz ebenfalls effektiv amplifizieren kann, obwohl die Amplifikationsergebnisse mit dieser Kombination von Primern weniger amplifiziertes Produkt erzeugten als diejenigen, die in der ersten Serie von Experimenten verwendet wurden. Wie bei der ersten Kombination von Primern ergab die Kombination aus SEQ ID NR: 3 und SEQ ID NR: 9 bei Verwendung der geringsten verwendeten Primerkonzentration (jeweils 7.5 pMol) eine optimale Amplifikation.

BEISPIEL 2

In vitro Amplifikation von MAC rRNA mit verschiedenen Kombinationen von Primern

[0050] Mit Hilfe der Verfahren zur Amplifikation und Detektion mit einer markierten Sonde, im Wesentlichen wie in Beispiel 1 beschrieben, wurden die Effizienzen der transkriptionsvermittelten Amplifikation mit verschiedenen Kombinationen von Primern getestet: SEQ ID NR: 1 mit SEQ ID NR: 8 und SEQ ID NR: 1 mit SEQ ID NR: 9.

[0051] Bei der ersten Kombination war der T7-Promotorprimer SEQ ID NR: 1, und der zweite Primer war SEQ ID NR: 8 (CGAACGGAAAGGCCTTCGGAGGTACT), die in jeder Reaktion in einer Konzentration von jeweils 7.5, 15 oder 30 pMol vorlagen. Die negativen Kontrollreaktionen für jede Primerkonzentration enthielten keine Target-RNA. Die Zielsequenzen waren gereinigte M. avium 16S rRNA in einer Kopienzahl von 400 oder 2000 pro Reaktion. Für jede Serie von Bedingungen wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt. Bei der zweiten Kombination war der T7-Promotorprimer SEQ ID NR: 1 und der zweite Primer war SEQ ID NR: 9 (GAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTG), wobei jede Reaktion wie bei der ersten Kombination durchgeführt wurde. Für jede Bedingung wurden Dreifachassays durchgeführt. Tabelle 3 stellt die Ergebnisse (Mittelwerte RLU) dar, welche mit diesen Kombinationen von Amplifikationsoligonukleotiden erhalten wurden.

Tabelle 3: Detektierte amplifizierte MAC Nukleinsäure (Mittelwerte RLU)

Primer	Primer-konzentration	MAC Target rRNA (Kopien pro Reaktion)		
		0	400	2,000

SEQ ID NR: 1 SEQ ID NR: 8	7.5 pMol	2.040	456.230	1.189.819
SEQ ID NR: 1 SEQ ID NR: 8	15 pMol	1.745	500.643	1.190.691
SEQ ID NR: 1 SEQ ID NR: 8	30 pMol	2.967	187.108	745.976
SEQ ID NR: 1 SEQ ID NR: 9	7.5 pMol	2.264	19.442	62.938
SEQ ID NR: 1 SEQ ID NR: 9	15 pMol	2.086	16.694	74.514
SEQ ID NR: 1 SEQ ID NR: 9	30 pMol	2.023	18.989	79.188

[0052] Diese Ergebnisse zeigen, dass ein anderer zweiter Primer mit dem Primer entsprechend SEQ ID NR: 1 kombiniert werden kann, um die MAC Zielnukleinsäure in vitro zu amplifizieren. Die Kombination aus SEQ ID NR: 1 und SEQ ID NR: 8 war hinsichtlich der Amplifikation der gleichen Zielnukleinsäure effizienter als die Kombination aus SEQ ID NR: 1 und SEQ ID NR: 9. Für die erste Kombination schienen die Primerkonzentrationen von 7.5 und 15 pMol von den hier getesteten optimal zu sein.

BEISPIEL 3

In vitro Amplifikation von MAC rRNA mit verschiedenen Kombination von Primern.

[0053] Mit Hilfe der Verfahren zur Amplifikation und Detektion mit einer markierten Sonde, im Wesentlichen wie in Beispiel 1 beschrieben, wurden die Effizienzen der transkriptionsvermittelten Amplifikation mit verschiedenen Kombinationen von Primern getestet: SEQ ID NR: 1 mit SEQ ID NR: 9 und SEQ ID NR: 2 mit SEQ ID NR: 8.

[0054] Bei der ersten Kombination war der T7-Promoterprimer SEQ ID NR: 1, und der zweite Primer war SEQ ID NR: 9, wobei der Assay wie in Beispiel 2 durchgeführt wurde. Bei der zweiten Kombination war der T7-Primer SEQ ID NR: 2 (GAAATTAATCGACTCACTATAGGGAGACCACATGCCTCCGTAG-GAGTCTGGGCCGTATC), und der zweite Primer war SEQ ID NR: 8, die in jeder Reaktion in einer Konzentration von jeweils 7.5, 15 oder 30 pMol vorlagen. Die negativen Kontrollreaktionen für jede Primerkonzentration enthielten keine Target-RNA. Die Zielsequenzen waren gereinigte *M. avium* 16S rRNA in einer Kopienzahl von 400 oder 2000 pro Reaktion. Für jede Serie von Bedingungen wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt. Tabelle 4 stellt die Ergebnisse (Mittelwerte RLU) dar, die mit diesen Kombinationen aus Amplifikationsoligonukleotiden erhalten wurden. Zu beachten ist, dass die Negativkontrollen für die Serie von Assays, welche 15 pMol der Primer SEQ ID NR: 2 und SEQ ID NR: 8 verwendeten, die Ergebnisse von 2 Assays darstellen.

Tabelle 4: Detektierte amplifizierte MAC Nukleinsäure (Mittelwerte RLU)

Primer	Primer-konzentration	MAC Target rRNA (Kopien pro Reaktion)		
		0	400	2000
SEQ ID NR: 1 SEQ ID NR: 9	7.5 pMol	4.994	29.994	351.732
SEQ ID NR: 1 SEQ ID NR: 9	15 pMol	4.354	39.681	78.266
SEQ ID NR: 1 SEQ ID NR: 9	30 pMol	4.321	62.385	283.414
SEQ ID NR: 2 SEQ ID NR: 8	7.5 pMol	3.505	261.020	1.716.613
SEQ ID NR: 2	15 pMol	4.227	336.679	354.382
SEQ ID NR: 8				
SEQ ID NR: 2 SEQ ID NR: 8	30 pMol	4.364	108.722	870.807

[0055] Diese Ergebnisse zeigen, dass eine andere Kombination von Primern (SEQ ID NR: 2 und SEQ ID NR: 8) die MAC Zielnukleinsäure ebenfalls in vitro amplifiziert. In diesen Assays war die Kombination aus SEQ ID NR: 1 und SEQ ID NR: 9 hinsichtlich der Amplifikation effizienter als in den in Tabelle 3 dargestellten Experimenten.

BEISPIEL 4

In vitro Amplifikation von MAC rRNA unter Verwendung der Primer SEQ ID NR: 2 oder SEQ ID NR: 3 mit SEQ ID NR: 7 oder SEQ ID NR: 8

[0056] Mit Hilfe der Verfahren zur Amplifikation und Detektion mit einer markierten Sonde, im Wesentlichen wie in Beispiel 1 beschrieben, wurden die Effizienzen der transkriptionsvermittelten Amplifikation mit folgenden Primerkombinationen getestet: SEQ ID NR: 2 mit SEQ ID NR: 7, SEQ ID NR: 3 mit SEQ ID NR: 7 und SEQ ID NR: 3 mit SEQ ID NR: 8.

[0057] In einer ersten Serie von Reaktionen war der T7-Promotorprimer SEQ ID NR: 2 (siehe Beispiel 3), und der zweite Primer war SEQ ID NR: 7 (siehe Beispiel 1). Tabelle 5 zeigt die Ergebnisse (Mittelwerte RLU), die mit dieser Kombination von Amplifikationsoligonukleotiden erhalten wurden.

Tabelle 5: Detektierte RLU (Mittelwerte) nach MAC Nukleinsäureamplifikation mit SEQ ID NR: 2 und SEQ ID NR: 7

Primerkonzentration	0 Kopien der Target-rRNA	400 Kopien der Target-rRNA	2000 Kopien der Target-rRNA
7.5 pMol	3.415	113.620	626.584
15 pMol	4.192	117.838	496.104
30 pMol	4.071	74.159	302.984

[0058] Diese Ergebnisse zeigen, dass eine andere Kombination von Primern (SEQ ID NR: 2 und SEQ ID NR:

7) die MAC Zielnukleinsäure ebenfalls in vitro amplifiziert. Wie bei den in Beispiel 2 dargestellten Experimenten waren unter diesen Amplifikationsbedingungen die Primerkonzentrationen von 7.5 und 15 pMol am effektivsten.

[0059] In einer zweiten Serie von Experimenten mit einer anderen Präparation von Detektionsreagenzien wurde die Amplifikation von M. avium 16S rRNA mit den Kombinationen aus SEQ ID NR: 3 mit SEQ ID NR: 7 und SEQ ID NR: 3 mit SEQ ID NR: 8 getestet. Die Ergebnisse der Dreifachbestimmungen für jede Primerkombination und -konzentration sind in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: MAC Nukleinsäureamplifikation unter Verwendung von SEQ ID NR: 3 mit SEQ ID NR: 7 oder SEQ ID NR: 8

Primer	Primer-konzentration	MAC Target rRNA (Kopien pro Reaktion)		
		0	400	2,000
SEQ ID NR: 3 SEQ ID NR: 7	7.5 pMol	6.023	1.881.960	2.443.145
SEQ ID NR: 3 SEQ ID NR: 7	15 pMol	5.037	657.454	2.420.688
SEQ ID NR: 3 SEQ ID NR: 7	30 pMol	5.523	275.078	1.098.247
SEQ ID NR: 3 SEQ ID NR: 8	7.5 pMol	8.959	2.428.940	3.340.647
SEQ ID NR: 3 SEQ ID NR: 8	15 pMol	8.598	1.779.767	3.385.338
SEQ ID NR: 3 SEQ ID NR: 8	30 pMol	7.004	575.696	2.107.862

[0060] Diese Ergebnisse zeigen, dass eine andere Kombination von Primern effektiv in der MAC Amplifikation ist. Obwohl die Negativkontrolle (0 Kopien der Zielsequenz) und die experimentellen Assays (400 und 2000 Kopien der Zielsequenz) alle jeweils höhere RLU ergaben als in den vorangegangenen Experimenten, war die detektierte Menge an amplifizierter Nukleinsäure signifikant höher als in der Negativkontrolle. Wie mit den anderen getesteten Kombinationen unter diesen Bedingungen gezeigt, war die Konzentration von 7.5 pMol Primern im Allgemeinen effizienter hinsichtlich der Amplifikation als die untersuchten höheren Konzentrationen.

[0061] In ähnlichen Experimenten wurde die Kombination aus SEQ ID NR: 3 und SEQ ID NR: 7 in höheren Primerkonzentrationen pro Reaktion getestet (15, 30 oder 45 pMol), um 0, 100, 400 oder 1000 Kopien der MAC rRNA pro Reaktion zu amplifizieren. Unter diesen Bedingungen waren für alle getesteten Konzentrationen der Zielnukleinsäure die höheren Primerkonzentrationen (30 pMol und 45 pMol pro Reaktion) weniger effizient als 15 pMol für jeden Primer.

BEISPIEL 5

In vitro Amplifikation der MAC rRNA unter Verwendung verringelter Primer- und Targetkonzentrationen

[0062] Mit Hilfe der Verfahren zur Amplifikation und Detektion mit einer markierten Sonde, im Wesentlichen wie in Beispiel 1 beschrieben, wurden die Effizienzen der transkriptionsvermittelten Amplifikation mit folgenden Primerkonzentrationen getestet: SEQ ID NR: 1 mit SEQ ID NR: 7 und SEQ ID NR: 1 mit SEQ ID NR: 8. In diesen Assays wurden die Primer der Kombination jeweils in Konzentrationen von 2.5, 5.0, 7.5 oder 15 pMol verwendet. Für beide Kombinationen war der T7-Primer SEQ ID NR: 1 (siehe Beispiel 1). und der zweite Primer war entweder SEQ ID NR: 7 (siehe Beispiel 1) oder SEQ ID NR: 8 (siehe Beispiel 2). Die Zielsequenzen waren

gereinigte M. avium 16S rRNA in einer Kopienzahl von 0, 400 oder 1000 Kopien pro Reaktion. Für jede Serie von Reaktionsbedingungen wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt. Tabelle 7 stellt die Ergebnisse (Mittelwerte RLU) dar, die für diese Kombinationen aus Amplifikationsoligonukleotiden erhalten wurden.

Tabelle 7: Detektierte Amplifizierte MAC Nukleinsäure (Mittelwerte RLU) nach Amplifikation unter Verwendung verringelter Primer- und Targetkonzentrationen

Primer	Primer- konzentration	MAC Target rRNA (Kopien pro Reaktion)		
		0	400	1.000
SEQ ID NR: 1 SEQ ID NR: 7	2.5 pMol	3.029	212.560	1.068.251
SEQ ID NR: 1 SEQ ID NR: 7	5.0 pMol	2.900	88.446	578.234
SEQ ID NR: 1 SEQ ID NR: 7	7.5 pMol	2.502	13.566	241.774
SEQ ID NR: 1 SEQ ID NR: 7	15 pMol	2.586	8.999	216.854
SEQ ID NR: 1 SEQ ID NR: 8	2.5 pMol	3.230	239.390	916.512
SEQ ID NR: 1 SEQ ID NR: 8	5.0 pMol	3.172	254.414	360.817
SEQ ID NR: 1 SEQ ID NR: 8	7.5 pMol	3.075	190.152	667.024
SEQ ID NR: 1 SEQ ID NR: 8	15 pMol	3.576	109.758	661.296

[0063] Diese Ergebnisse zeigen, dass die Primerkonzentrationen bei Verwendung von weniger Primer als in den vorangegangenen Experimenten effektiv hinsichtlich der MAC Zielnukleinsäureamplifikation in vitro sind. In diese Assays war die Kombination aus SEQ ID NR: 1 und SEQ ID NR: 7 am effektivsten, wenn 2.5 pMol Primer pro Reaktion verwendet wurden. Die Kombination aus SEQ ID NR: 1 und SEQ ID NR: 8 war am effektivsten, wenn 2.5 oder 5 pMol Primer pro Reaktion verwendet wurden, zumindest für relativ wenige Kopien der Zielsequenz pro Reaktion (400). Für beide Kombinationen war die Amplifikation weniger effizient, wenn höhere Konzentrationen an Primern pro Reaktion verwendet wurden.

[0064] Ähnliche Experimente wurden mit der Kombination aus SEQ ID NR: 1 und SEQ ID NR: 8 mit höheren Konzentrationen für jeden Primer pro Reaktion durchgeführt (30 oder 45 pMol), um 0, 100, 400 oder 1000 Kopien der MAC rRNA pro Reaktion zu amplifizieren. Unter diese Bedingungen war eine Konzentration von 30 pMol Primern pro Reaktion effizienter hinsichtlich der Amplifikation der MAC Nukleinsäure als 45 pMol Primer pro Reaktion. Sowohl eine Konzentration von 30 pMol als auch von 45 pMol Primer war effektiv bei der Amplifikation von gerade 100 Kopien der Zielnukleinsäure pro Reaktion.

BEISPIEL 6

In vitro Amplifikation von MAC rRNA unter Verwendung verringelter Primer- und Targetkonzentrationen

[0065] Mit Hilfe der Verfahren zur Amplifikation und Detektion mit einer markierten Sonde, im Wesentlichen wie in Beispiel 5 beschrieben, wurden die Effizienzen der transkriptionsvermittelten Amplifikation mit folgenden Primerkonzentrationen getestet: SEQ ID NR: 3 mit SEQ ID NR: 7. SEQ ID NR: 3 mit SEQ ID NR: 8 und SEQ ID

NR: 2 mit SEQ ID NR: 8. Die Primer der Kombination wurden jeweils in einer Konzentration von 2.5, 5.0, 7.5 oder 15 pMol verwendet. In diesen Kombinationen war der T7-Promotorprimer SEQ ID NR: 1 (siehe Beispiel 1) oder SEQ ID NR: 2 (siehe Beispiel 3), und der zweite Primer war entweder SEQ ID NR: 7 (siehe Beispiel 1) oder SEQ ID NR: 8 (siehe Beispiel 2). Die Zielsequenzen waren gereinigte M. avium 16S rRNA in einer Kopienzahl von 0, 100, 400 oder 100 Kopien pro Reaktion. Für jede Serie von Reaktionsbedingungen wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt. Tabelle 8 zeigt die Ergebnisse (Mittelwerte RLU für Dreifachbestimmungen, außer wenn "zwei Assays" angegeben ist), die mit diesen Kombinationen von Amplifikationsoligonukleotiden erhalten wurden.

Tabelle 8: Detektierte amplifizierte MAC Nukleinsäure (Mittelwerte RLU) nach Amplifikation unter Verwendung verringter Primer- und Targetkonzentrationen

Primer	Primer-konzentration	MAC Target rRNA (Kopien pro Reaktion)			
		0	100	400	1.000
SEQ ID NR: 3 SEQ ID NR: 7	2.5 pMol	7.791	446.924	1.231.247	2.670.330
SEQ ID NR: 3 SEQ ID NR: 7	5.0 pMol	8.772	316.388	798.598	2.559.093
SEQ ID NR: 3 SEQ ID NR: 7	7.5 pMol	8.024	213.849	1.163.975	2.088.209
SEQ ID NR: 3 SEQ ID NR: 7	15 pMol	7.736	165.354	413.745	1.236.161
SEQ ID NR: 3 SEQ ID NR: 8	2.5 pMol	8.100	552.870	1.278.760	3.156.067
SEQ ID NR: 3 SEQ ID NR: 8	5.0 pMol	7.536	681.501	1.536.807	3.140.628

SEQ ID NR: 3 SEQ ID NR: 8	7.5 pMol	6.986 (zwei Assays)	248.578	2.061.581	3.335.045
SEQ ID NR: 3 SEQ ID NR: 8	15 pMol	7.072	247.913	576.368	2.618.135
SEQ ID NR: 2 SEQ ID NR: 8	2.5 pMol	5.696	192.462	666.008	1.414.693
SEQ ID NR: 2 SEQ ID NR: 8	5.0 pMol	6.650	210.100	1.124.522	1.702.789
SEQ ID NR: 2 SEQ ID NR: 8	7.5 pMol	5.670	318.640	1.559.311	2.585.336
SEQ ID NR: 2 SEQ ID NR: 8	15 pMol	5.756	312.377	2.010.870	3.013.663

[0066] Diese Ergebnisse zeigen, dass diese Kombinationen von Primern bei einer Konzentration von gerade

einmal 2.5 pMol für jeden Primer pro Reaktion effektiv hinsichtlich der Amplifikation der MAC Zielnukleinsäure in vitro sind. Diese Ergebnisse zeigen ferner, dass diese Primer gerade einmal 100 Kopien der MAC Zielnukleinsäure pro Reaktion amplifizieren können, um eine detektierbare amplifizierte Nukleinsäure zu erzeugen.

BEISPIEL 7

Frequenz von Falsch-Positiven bei der in vitro Amplifikation von MAC rRNA

[0067] Dieses Beispiel zeigt, dass Falsch-Positive bei den Amplifikationsreaktionen, wie sie in den Beispielen 1 bis 6 beschrieben sind, nicht in hoher Frequenz vorkommen. Eine Umweltkontamination kann aus der Gelegenheit von MAC Organismen oder Nukleinsäuren in Wasser, Reagenzien oder Laborartikeln (z.B. Röhrchen oder Pipettierzubehör), welche in dem Assay verwendet werden, resultieren oder kann aus einer Vielzahl von Quellen im Labor (z.B. Wasserbäder, Abflüsse, Aerosole) den Assay kontaminiert. Die Frequenz Falsch-Positiver aufgrund der Amplifikation von Umweltkontaminanten wurde ursprünglich basierend auf der Anzahl an Reaktionen geschätzt, die ein positives Signal lieferten (im Allgemeinen mehr als 100.000 RLU), wenn das Reaktionsgemisch keine MAC Target-RNA enthielt (i.e. die Kontrollreaktionen, die in den Beispielen 1 bis 6 beschrieben wurden). Die festgestellte Frequenz von Falsch-Positiven lag bei 1.4% (2 von 144 Reaktionen).

[0068] Diese wurde weiter ausgedehnt durch Verwendung der Primerkombination aus SEQ ID NR: 1 mit SEQ ID NR: 8, die in den Beispielen 1 und 5 beschrieben wurde, in den Verfahren zur Amplifikation und Detektion mit einer markierten Sonde, im Wesentlichen wie für die Negativkontrollen (i.e. ohne Zielnukleinsäure) beschrieben, in vier Serien von jeweils 40 Amplifikationsassays (insgesamt 160). Bei Fehlen der 16S rRNA aus einer MAC Spezies (*M. avium*) zeigten nur 3 der 160 Assays Amplifikationsergebnisse, die als falsch-positiv betrachtet werden konnten. Demzufolge zeigten diese Primer in diesen Untersuchungen eine Rate an Falsch-Positiven von etwa 1.8% bei Fehlen der MAC Zielnukleinsäure.

[0069] Die Rate an Falsch-Positiven in allen target-negativen Reaktionen (i.e. in den Beispielen 1 bis 7) lag bei 1.6% (5 von 304). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Zusammensetzungen und Verfahren der vorliegenden Erfindung keine hohe Frequenz an falsch-positiven Ergebnissen aufgrund einer falschen Umweltkontamination aufweisen.

BEISPIEL 8

In vitro Amplifikation von MAC rRNA mittels Polymerasekettenreaktion

[0070] Dieses Beispiel zeigt, dass Kombinationen der MAC Primer der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, um eine MAC-spezifische Sequenz mittels PCR Amplifikation zu amplifizieren. Für die Herstellung der Zielsequenz werden *M. intracellulare* und *M. avium* in vitro mit Hilfe mikrobiologischer Standardverfahren angezogen, etwa 106 Bakterien pro Milliliter werden durch Suspendieren der Bakterien in 10 mM HEPES, 0.5% (w/v) Lithiumlaurylsulfat, pH 8 lysiert, und im Anschluss wird das Röhrchen bei Raumtemperatur 15 min in einem Ultraschallwasserbad inkubiert. Für die Negativkontrolle zur Amplifikation wird dasselbe Volumen steriles Wasser anstelle der Zielsequenzlösung verwendet.

[0071] Die PCR Amplifikation wird für jede Zielsequenz mit jeder Kombination von Primern in 45 µl Reaktionen durchgeführt, von denen jede 50 mM KCl, 10 mM Tris (pH 8.3), 1.5 mM MgCl₂, 0.001% (w/v) Gelatine, 5% (v/v) Dimethylsulfoxid, 0.33 µM eines jeden Primers einer Primerkombination, 200 µM eines jeden dNTP und 0.75 U Taq Polymerase (AmpliTaqTM, Perkin-Elmer, Norwalk, Conn.) enthält. Es wird ein Temperaturzyklus (thermal cycling) durchgeführt, in dem ein erster Zyklus 5 min bei 94°C, dann 30 Zyklen 1 min bei 94°C, 1 min bei 55°C und 1 min bei 72°C und ein finaler Zyklus 10 min bei 72°C durchgeführt wird (in einem Perkin-Elmer 9600 Thermal Cycler).

[0072] Die getesteten Primerkombinationen umfassen: SEQ ID NR: 1 mit SEQ ID NR: 7; SEQ ID NR: 1 mit SEQ ID NR: 8; SEQ ID NR: 1 mit SEQ ID NR: 9; SEQ ID NR: 2 mit SEQ ID NR: 7; SEQ ID NR: 2 mit SEQ ID NR: 8; SEQ ID NR: 2 mit SEQ ID NR: 9; SEQ ID NR: 3 mit SEQ ID NR: 7; SEQ ID NR: 3 mit SEQ ID NR: 8; SEQ ID NR: 3 mit SEQ ID NR: 9; SEQ ID NR: 4 mit SEQ ID NR: 7; SEQ ID NR: 4 mit SEQ ID NR: 8; SEQ ID NR: 4 mit SEQ ID NR: 9; SEQ ID NR: 5 mit SEQ ID NR: 7; SEQ ID NR: 5 mit SEQ ID NR: 8; SEQ ID NR: 5 mit SEQ ID NR: 9; SEQ ID NR: 6 mit SEQ ID NR: 7; SEQ ID NR: 6 mit SEQ ID NR: 8; SEQ ID NR: 6 mit SEQ ID NR: 9.

[0073] Nach der PCR Amplifikation werden die Amplifikationsprodukte mittels Agarosegelektrophorese analysiert, um die Gegenwart oder das Fehlen einer DNA-Bande von etwa 250-300 nt relativ zu den bekannten Größenmarkern zu detektieren. Bei der Negativkontrolle ist keine Bande auf dem Gel sichtbar, aber für jede Primerkombination ist eine Bande der entsprechenden Größe sichtbar. Das heißt, für die Kombination aus SEQ ID NR: 1 oder SEQ ID NR: 7 oder SEQ ID NR: 8 ist die Bande der amplifizierten DNA etwa 280 nt lang; für die Kombination aus SEQ ID NR: 2 und SEQ ID NR: 7 oder SEQ ID NR: 8 ist die Bande der amplifizierten DNA etwa 285-290 nt lang; und für die Kombination aus SEQ ID NR: 3 und SEQ ID NR: 7 oder SEQ ID NR: 8 ist die Bande der amplifizierten DNA etwa 315 nt lang. Alle anderen getesteten Kombinationen erzeugten eine amplifizierte DNA von etwa 280-320 nt Länge, wie auf einem Gel relativ zu bekannten Größenmarkern detektiert wurde.

[0074] Nach der PCR Amplifikation werden die Amplifikationsprodukte ferner mittels Hybridisierung mit einer Sonde analysiert, welche das reverse Komplement mindestens eines der in der Kombination verwendeten Primer darstellt, und die entsprechend aus der Gruppe ausgewählt wird, welche aus SEQ ID NR: 11 bis SEQ ID NR: 16 besteht (i.e. komplementär zu mindestens einem in der Amplifikation verwendeten Primer ist). In allen Fällen hybridisiert die amplifizierte Nukleinsäure spezifisch mit der entsprechenden Sonde.

SEQUENZLISTE

<110> GEN-PROBE INCORPORATED
BRENTANO. Steven T.
LANKFORD. Roger L.

<120> VERFAHREN UND ZUSAMMENSETZUNGEN ZUR DETEKTION VON SPEZIES DES
MYCOBACTERIUM AVIUM KOMPLEXES

<130> GP119-PCT

<140> Noch zu bestimmen
<141> 2000-12-15

<150> 60/171.202

<151> 1999-12-15

<160> 18

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 59
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetischer Promotor-Primer

<220>

<221> Promotor
<222> (1) ... (33)

<400> 1

gaaattaata cgactcacta tagggagacc acacccgttag gagtctgggc cgtatctca 59

<210> 2
<211> 61
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetischer Promotor-Primer

<220>

<221> Promotor
<222> (1) ... (33)

<400> 2

gaaatataa cgactcacta tagggagacc acatgcctcc cgttaggagtc tggccgtat	60
c	61

<210> 3
<211> 57
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetischer Promotor-Primer

<220>
<221> Promotor
<222> (1) ... (33)

<400> 3
gaaatataa cgactcacta tagggagacc acagcccatt gtgcaatatt ccccaact 57

<210> 4
<211> 26
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetischer Primer

<400> 4
cccgtaggag tctggccgt atctca 26

<210> 5
<211> 28
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetischer Primer

<400> 5
tgcctccgt aggagtctgg gccgtatc 28

<210> 6
<211> 24
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetischer Primer

<400> 6	
gccccattgtg caatattccc cact	24
<210> 7	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> Künstliche Sequenz	
<220>	
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetischer Primer	
<400> 7	
gcaagtcgaa cgaaaaaggcc tcttcggagg ta	32
<210> 8	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Künstliche Sequenz	
<220>	
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetischer Primer	
<400> 8	
cgaacggaaa ggcctcttcg gaggtact	28
<210> 9	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Künstliche Sequenz	
<220>	
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetischer Primer	
<400> 9	
gagtggcgaa cgggtgagta acacgtg	27
<210> 10	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> Künstliche Sequenz	
<220>	
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Promotor	
<400> 10	
gaaattaata cgactcacta tagggagacc aca	33

<210> 11
<211> 59
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetische Sonde

<400> 11
tgagatacgg cccagactcc tacgggtgtg gtctccstat agtgagtcgt attaattc 59

<210> 12
<211> 61
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetische Sonde

<400> 12
gatacggccc agactcctac gggaggcatg tggtctccct atagttagtc gtattaattt 60
c 61

<210> 13
<211> 57
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetische Sonde

<400> 13
agtgggaat attgcacaat gggctgtggt ctccctatacg tgagtcgtat taattc 57

<210> 14
<211> 32
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetische Sonde

<400> 14
tacctccgaa gaggccttgc cgttcgactt gc 32

<210> 15
<211> 28
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetische Sonde

<400> 15
agtacctccg aagaggcctt tccgttcg

28

<210> 16
<211> 27
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetische Sonde

<400> 16
cacgtgttac tcacccgttc gccactc

27

<210> 17
<211> 19
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetische Sonde

<400> 17
ggacctcaag acgcattgtc

19

<210> 18
<211> 31
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetischer Helfer

<400> 18
ttttggtgga aagctttgc ggtgtggat g

31

Patentansprüche

1. Verfahren zur Detektion einer Spezies des Mycobacterium avium Komplexes (MAC), die in einer biologischen Probe vorhanden ist, das die Schritte umfasst:
– Amplifizieren der 16S rRNA oder der DNA, welche die 16S rRNA in Nukleinsäure kodiert, aus mindestens einer MAC Spezies, die aus der Gruppe ausgewählt wird, welche aus M. tuberculosis, M. avium, M. intracellu-

lare und M. paratuberculosis besteht, in einer biologischen Probe unter Verwendung eines in vitro Nukleinsäure-Amplifikationsgemisches, das mindestens eine Polymeraseaktivität umfasst und mindestens einen ersten Primer, der eine Sequenz aufweist, die aus der Gruppe ausgewählt wird, welche aus SEQ ID NR: 1 bis SEQ ID NR: 6 besteht, mit mindestens einem zweiten Primer, der eine Sequenz aufweist, die aus der Gruppe ausgewählt wird, welche aus SEQ ID NR: 7, SEQ ID NR: 8 und SEQ ID NR: 9 besteht, um eine amplifizierte Nukleinsäure zu erzeugen; und

– Detektieren der amplifizierten Nukleinsäure.

2. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei der Detektionsschritt ferner das Hybridisieren der amplifizierten Nukleinsäure an mindestens eine Sonde und das Detektieren eines Signals umfasst, das von der amplifizierten Nukleinsäure resultiert, die an die Sonde hybridisiert ist.

3. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2, wobei der Detektionsschritt mindestens eine markierte Sonde verwendet, die eine Sequenz umfasst, die zu einem Teil der amplifizierten Nukleinsäure komplementär ist.

4. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, das ferner den Schritt der Verwendung mindestens eines Fängeroligonukleotids umfasst, das spezifisch an die Nukleinsäure mindestens einer MAC Spezies hybridisiert, um die Nukleinsäure der MAC Spezies an eine immobilisierte Nukleinsäure zu binden, und die Nukleinsäure der MAC Spezies vor dem Amplifizierungsschritt von anderen Bestandteilen in der Probe zu reinigen.

5. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei der Amplifizierungsschritt eine Kombination aus mindestens einem ersten Primer, der eine Sequenz aufweist, die aus der Gruppe ausgewählt wird, welche aus SEQ ID NR: 1 bis SEQ ID NR: 3 besteht, und mindestens einem zweiten Primer verwendet, der eine Sequenz aufweist, die aus der Gruppe ausgewählt wird, welche aus SEQ ID NR: 7, SEQ ID NR: 8 und SEQ ID NR: 9 besteht.

6. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei der Amplifizierungsschritt eine transkriptions-vermittelte Amplifikation verwendet.

7. Zusammensetzung zum Amplifizieren einer 16S rRNA Sequenz oder einer DNA, die eine 16S rRNA kodiert, aus mindestens einer Spezies des Mycobacterium avium Komplexes (MAC) gemäß dem Verfahren nach Anspruch 1, die mindestens zwei Oligonukleotide zum Amplifizieren der 16S rRNA oder der DNA, welche die 16S rRNA kodiert, umfasst, wobei mindestens ein erster Primer eine Sequenz aufweist, die aus der Gruppe ausgewählt wird, welche aus SEQ ID NR: 1 bis SEQ ID NR: 6 besteht, und mindestens ein zweiter Primer eine Sequenz aufweist, die aus der Gruppe ausgewählt wird, welche aus SEQ ID NR: 7, SEQ ID NR: 8 und SEQ ID NR: 9 besteht.

8. Zusammensetzung gemäß Anspruch 7, die ferner mindestens ein Oligonukleotid zum Detektieren der amplifizierten MAC 16S rRNA Sequenz oder der DNA, welche die 16S rRNA kodiert, umfasst, und die ein oder mehr Oligonukleotide umfasst, die eine Basensequenz aufweisen, die aus der Gruppe ausgewählt wird, welche aus SEQ ID NR: 11 bis SEQ ID NR: 18 besteht.

9. Kit, der mindestens zwei Oligonukleotide enthält und der mindestens ein erstes Oligonukleotid umfasst, das eine Basensequenz aufweist, die aus der Gruppe ausgewählt wird, welche aus SEQ ID NR: 1 bis SEQ ID NR: 6 besteht, und mindestens ein zweites Oligonukleotid, das eine Basensequenz aufweist, die aus der Gruppe ausgewählt wird, die aus SEQ ID NR: 7, SEQ ID NR: 8 und SEQ ID NR: 9 besteht.

10. Kit gemäß Anspruch 9, der ferner ein oder mehr Oligonukleotide umfasst, die eine Basensequenz aufweisen, die aus der Gruppe ausgewählt wird, welche aus SEQ ID NR: 11 bis SEQ ID NR: 18 besteht.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen