

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

S . アウレウスにより重度にコロニー形成されているが S . アウレウス疾患の症状を一切示していない対象における S . アウレウス疾患の予測のための方法であって、該方法が、標準または参照対照と比較して該対象の生物学的試料中のアルファ溶血素レベルを決定する工程を含み、ここで、高められたアルファ溶血素レベルが S . アウレウス疾患の発症を示す、上記方法。

【請求項 2】

対象が、気管支炎、特に人工呼吸器関連気管支炎 (V A T)、肺炎、特に人工呼吸器関連肺炎 (V A P)、敗血症、特に重症の敗血症、または慢性創傷感染症の診断につながる臨床症状のいずれかである S . アウレウス疾患の症状を一切示していない、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

アルファ溶血素レベルが、気管支炎、特に V A T、肺炎、特に V A P、敗血症、特に重症の敗血症、または慢性創傷感染症からなる群より選択される S . アウレウス疾患の発症を示す、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

対象が、S . アウレウスを示す細菌もしくは細菌マーカーの存在を決定する方法により、好ましくは該マーカーを発現している遺伝子、該遺伝子の発現産物を決定する方法により、または標準的な微生物学的技法の使用により決定されるように、S . アウレウスによりコロニー形成されている、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の方法。

20

【請求項 5】

対象が鼻または鼻咽頭においてコロニー形成されており、かつ対象が挿管を受けている、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6】

対象が、機械式人工呼吸されている患者であり、かつ下気道において S . アウレウスにより重度にコロニー形成されている、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】

生物学的試料が、好ましくは、血液試料、便試料、皮膚試料、尿試料、脳脊髄液、および、気管内吸引物、胸膜液、肺タッブ、鼻スワブまたは痰のような呼吸気管標本からなる群より選択される体液または組織試料である、請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の方法。

30

【請求項 8】

アルファ溶血素レベルの決定が、アルファ溶血素の発現または活性の半定量的または定量的測定を含む、請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 9】

アルファ溶血素のレベルが、免疫アッセイ、好ましくは、E L I S A、C I A、R I A、I R M A、凝集アッセイ、免疫クロマトグラフィー、好ましくは、ディプスティック検査のようなラテラルフロー免疫クロマトグラフィーアッセイ、およびウェスタンブロットのいずれか、質量分析、N M R、またはアルファ溶血素を示す対応する D N A もしくは R N A を好ましくは核酸ハイブリダイゼーションアッセイもしくは核酸増幅アッセイを用いて決定する方法により決定される、請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載の方法。

40

【請求項 10】

標準または参照対照が、S . アウレウス疾患の発症もしくは疾患進行を示す予め決定されたアルファ溶血素レベル、または、低い、中程度のもしくは高いアルファ溶血素を発現する S . アウレウス株から得られた予め決定されたアルファ溶血素レベルである、請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の方法。

【請求項 11】

標準または参照対照が、アルファ溶血素を発現していない、または低レベルのアルファ溶血素を発現している S . アウレウスにより発現されるアルファ溶血素レベルよりも高い予め決定されたアルファ溶血素の量または活性である、請求項 1 ~ 10 のいずれかに記載

50

の方法。

【請求項 1 2】

S . アウレウスのコロニー形成を示す少なくとも 1 種類の追加のマーカの測定をさらに含む、請求項 1 ~ 1 1 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 3】

少なくとも 1 種類の追加のマーカの測定が、アルファ溶血素以外のいずれかの S . アウレウス特異的細菌構成要素を発現する遺伝子またはいずれかの S . アウレウス特異的細菌構成要素のそれぞれの遺伝子発現産物の決定を含み、それが好ましくは以下：

i) S . アウレウスプロテイン A ；

i i) S . アウレウス抗生物質耐性マーカ、好ましくは少なくとも P B P 2 a、m e c A 遺伝子または m e c A 遺伝子の発現産物のいずれか；

i i i) S . アウレウスの細胞毒、好ましくは P V L / L u k S F、L u k G H、ガンマ溶血素、L u k E D、を含むあらゆる他の S . アウレウス抗原；S . アウレウス病毒性因子、分泌タンパク質および表面タンパク質；またはリポテイコ酸のようなあらゆる S . アウレウス特異的化合物、ならびに

i i i i) 好ましくは追加のマーカとして少なくとも S . アウレウスプロテイン A および P B P 2 a を決定する、i)、i i) および / または i i i) の細菌構成要素のいずれかの組み合わせ；

からなる群より選択される、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 4】

S . アウレウスにより重度にコロニー形成されているが S . アウレウス疾患の症状を一切示していない対象における人工呼吸器関連呼吸器感染症、気管気管支炎または肺炎の発症に関するインビトロマーカとしてのアルファ溶血素の使用。

【請求項 1 5】

S . アウレウスにより重度にコロニー形成されているが S . アウレウス疾患の症状を一切示していない対象における人工呼吸器関連呼吸器感染症、気管気管支炎または肺炎の疾患発症を決定するためのアルファ溶血素に関する特異的検出分子を含む診断組成物の使用。

【請求項 1 6】

検出分子が、抗体、抗体断片、細胞受容体もしくはリガンド、またはアルファ溶血素遺伝子もしくは前記の遺伝子の発現産物にハイブリダイズするヌクレオチド配列からなる群より選択されるアルファ溶血素結合剤である、請求項 1 5 に記載の使用。

【請求項 1 7】

請求項 1 ~ 1 3 のいずれかに記載の方法におけるアルファ溶血素診断キットの使用であって、該キットがアルファ溶血素に関する特異的検出分子を含む、上記使用。

【請求項 1 8】

請求項 1 ~ 1 3 のいずれかに記載の方法におけるアルファ溶血素診断キットの使用であって、該診断キットが S . アウレウスアルファ溶血素発現産物と特異的に反応することができる 1 種類以上の試薬および / またはアルファ溶血素のレベルを決定するのに適した特異的検出分子を含み、それが貯蔵安定形態で、好ましくは包装された単位として提供される、上記使用。

【請求項 1 9】

診断キットが、以下：

a) S . アウレウスアルファ溶血素発現産物と特異的に反応することができる 1 種類以上の試薬および / またはアルファ溶血素のレベルを決定するのに適した特異的検出分子を含むキット；ならびに

b) アルファ溶血素以外の S . アウレウス特異的細菌構成要素を発現する遺伝子または S . アウレウス特異的細菌構成要素のそれぞれの遺伝子発現産物を決定するのに適した試薬および / または特異的検出分子を含むキットであって、それが好ましくは以下：

i) S . アウレウスプロテイン A ；

10

20

30

40

50

i i) S . アウレウス抗生物質耐性マーカー、好ましくは少なくとも P B P 2 a、m e c A 遺伝子または m e c A 遺伝子の発現産物のいずれか；

i i i) S . アウレウスの細胞毒、好ましくは P V L / L u k S F、L u k G H、ガンマ溶血素、L u k E D を含むあらゆる他の S . アウレウス抗原；S . アウレウス病毒性因子、分泌タンパク質および表面タンパク質；またはリボテイコ酸のようなあらゆる S . アウレウス特異的化合物、ならびに

i i i) 好ましくは追加のマーカーとして少なくとも S . アウレウスプロテイン A および P B P 2 a を決定する、i)、i i) および / または i i i) の細菌構成要素のいずれかの組み合わせ；

からなる群より選択されるキット；

10

を含む診断組み合わせキットである、請求項 18 に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、S . アウレウス (S . a u r e u s) によりコロニー形成されているがまだ疾患の症状を示していない対象において S . アウレウス疾患を予測するための方法に関する。

【背景技術】

【0002】

スタフィロコッカス・アウレウス (S t a p h y l o c o c c u s a u r e u s) は、通常は人々およびいくつかの動物種の皮膚上または鼻中で共生種として見付かる。それらの共生的特徴により暗示されるには、S . アウレウスの無症候性保有は一般に無害であると考えられるが、典型的な感染症は比較的軽微な皮膚疾患から生命を危うくする侵襲性感染症にまで及び得る。

20

【0003】

歴史的に、感染症は、広域スペクトル抗生物質、例えばメチシリンにより処置される。抗生物質の広範な使用により、標準治療の療法、例えばメチシリンならびに他のベータラクタム系抗生物質、例えばペニシリンおよびセファロスポリン類を用いた処置に耐性である特定の多剤耐性株が出現してきた。それらは、メチシリン耐性スタフィロコッカス・アウレウス (多剤耐性スタフィロコッカス・アウレウスまたは “ M R S A ” としても知られている) と呼ばれ、メチシリン感受性株 (M S S A) から分化した。

30

【0004】

S . アウレウス感染症は、M R S A を含め、皮膚、軟組織、骨、関節、手術創、血流、心臓弁、肺、または他の器官を含む広い範囲の体の部位に影響を及ぼす生命を危うくする可能性のある疾患の原因となる。従って、S . アウレウス感染症は、結果としてそれと関係する疾患状態をもたらす可能性があり、それは、致命的である可能性のある疾患、例えば壊死性筋膜炎、心内膜炎、敗血症、毒素性ショック症候群、および壊死性肺炎を含む様々な形態の肺炎、ならびにフルンケル症およびカルブンケル症における毒素生成である。S . アウレウス感染症は、患者がしばしば免疫無防備であり、(外傷) 手術または侵襲性デバイス、例えばカテーテル、ドレーナージおよび気管チューブの使用を伴う他の処置を受ける病院または三次治療施設設定では、管理するのが特に困難である。そのような患者は、一般大衆よりもはるかに大きい感染症に関するリスクがある。

40

【0005】

機械式人工呼吸されている患者は、気管気管支炎 (V A T) または肺炎 (V A P) として顕在化する人工呼吸器関連呼吸器感染症へと進行し得る細菌コロニー形成の高いリスクがある。両方の病気は、長引く人工呼吸および集中治療室 (I C U) における滞在、増大した健康管理の費用に寄与し、そして V A P は死亡率の増大と関係している [1 - 4] 。最近、疾患管理への新規のアプローチが、気管内吸引物 (E T A) の一連の微生物分析を用いて実行されており、それは、下気道にコロニー形成している細菌を同定および定量化するために実施される。呼吸器病原体 (単数または複数) の半定量的気管内吸引物 (S Q

50

- E T A) における + + + (または 3 +) の増殖または 10^5 コロニー形成単位 (C F U) / m l 以上の定量的 E T A として定義される重度のコロニー形成は、 V A T および / または V A P への進行に関するリスク因子である [4 - 6] 。特定の細菌病原体の検出は、より早い標的化された抗生物質処置および抗生物質管理の努力の助けになる [7] 。

【 0 0 0 6 】

S . アウレウスの病毒性および発病は、動物モデルにおいて広範囲にわたって研究されてきたが、ヒトの疾患の発病における病毒性因子の役割は、よく理解されていない [8 、 9] 。関連する病毒性因子およびバイオマーカーの同定は、より有効な予防戦略および高リスク患者のより早期の療法の開始を支持するであろう。

【 0 0 0 7 】

S . アウレウスの発病の特徴の 1 つは、赤血球、好中球、顆粒球および他の免疫細胞、ならびに肺または皮膚の上皮細胞を含むいくつかの異なる細胞型を殺し得る多数の分泌される毒素 (外毒素、細胞毒または細胞溶解素) の産生である。さらに、これらの毒素のほとんどは、免疫細胞を活性化し、強力な炎症促進性シグナルとして作用する。S . アウレウスの細胞毒の有名なメンバーは、アルファ溶血素 (H l a 、アルファ毒素、 - 溶血素、 - 毒素とも呼ばれる) であり、それは、ヒトの気管支および肺胞上皮細胞ならびにマクロファージおよびリンパ球の溶解において非常に強力であり、炎症促進性プロセスの誘導に関わっていることが示されている [1 0] 。S . アウレウス肺炎の発病におけるその有力な役割が、いくつかの異なる動物モデルにおいて実証されている [1 0] 。H l a は、いくつかの S . アウレウス疾患の概念実証動物モデルにおけるワクチン抗原およびモノクローナル抗体標的としての有望性も示しており、現在能動免疫処置および受動免疫処置の両方のヒトの試験において評価されている [1 1 - 1 4] 。

【 0 0 0 8 】

国際公開第 2 0 1 3 / 1 5 6 5 3 4 A 1 号は、S . アウレウスのアルファ毒素および 2 構成要素毒素の少なくとも 1 つに対して交差反応結合性である S . アウレウス抗体を記載している。

【 0 0 0 9 】

国際公開第 2 0 1 2 / 1 0 9 2 8 5 A 2 号は、キット、例えば酵素結合免疫吸着アッセイ (E L I S A) において用いられることができる、S . アウレウスのアルファ毒素に特異的に結合する抗体を記載している。

【 0 0 1 0 】

国際公開第 2 0 1 1 / 0 1 8 2 0 8 A 1 号は、S . アウレウスのアルファ毒素に対するヒトのモノクローナル抗体および膿瘍形成の処置または予防におけるその使用を記載している。

【 0 0 1 1 】

国際公開第 2 0 1 0 / 1 2 1 2 9 8 A 1 号は、S . アウレウスの o r f x 遺伝子の核酸中の配列に相補的なプライマーおよび S . アウレウスの o r f x 遺伝子の核酸中の配列に相補的であり S . アウレウスの S C C m e c カセットの核酸中の配列にも相補的である別のプライマーを用いてメチシリン感受性 (M S S A) および / またはメチシリン耐性スタフィロコッカス・アウレウス (M R S A) を検出する方法を記載している。

【 0 0 1 2 】

国際公開第 2 0 1 0 / 0 8 9 5 6 9 A 1 号は、質量分光分析、特にバイオマーカープロファイル、例えば S . アウレウスに関するバイオマーカープロファイルの質量分光分析を利用した細菌感染症またはコロニー形成の検出または診断のための方法を記載している。

【 0 0 1 3 】

S . アウレウスによる気道コロニー形成は、しばしば M R S A または M S S A に誘導される人工呼吸器関連気管支炎 (V A T) および / または肺炎 (V A P) の発症に関する前兆である。しかし、コロニー形成から肺炎への進行を促進する S . アウレウスの病原体関連因子に関してはほとんど知られていない。V A P を引き起こす高い傾向を有する S

10

20

30

40

50

・アウレウス分離株の検出および簡単、好感度かつ特異的なバイオマーカーの同定は、VATおよびVAPに関する予防またはより早期の抗生物質療法の開始を大きく支援するであろう。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0014】

【特許文献1】国際公開第2013/156534 A1号

【特許文献2】国際公開第2012/109285 A2号

【特許文献3】国際公開第2011/018208 A1号

【特許文献4】国際公開第2010/121298 A1号

【特許文献5】国際公開第2010/089569 A1号

【発明の概要】

【0015】

本発明の目的は、S・アウレウスにより重度にコロニー形成されている対象において疾患の症状を示す前にS・アウレウス疾患の発生のリスクを評価するための新規のバイオマーカーを発見することであった。具体的には、疾患の発症前に適切な療法を開始するためにリスクを示すマーカーを決定する試験を提供することが、目的であった。

【0016】

その目的は、本発明の態様の提供により達成される。

本発明によれば、S・アウレウスにより重度にコロニー形成されているがS・アウレウス疾患の症状を一切示していない対象におけるS・アウレウス疾患の予測のための方法が提供され、前記の方法は、標準または参照対照と比較した前記の対象の生物学的試料中のアルファ溶血素のレベルを決定する工程を含み、ここで、高められたアルファ溶血素のレベルは、S・アウレウス疾患の発症、特に、疾患または疾患の進行の診断につながる症状の速い出現を示している。

【0017】

具体的には、対象は、S・アウレウスにより重度にコロニー形成されており、かつ無症状であるかまたは全身性疾患の症状を示していない。そのような症状は、特にS・アウレウス感染症または疾患、特にS・アウレウス疾患、例えば肺炎、特に人工呼吸器関連肺炎(VAP)、気管支炎、特に人工呼吸器関連気管支炎(VAT)、敗血症、特に重症の敗血症、または慢性創傷感染症の診断につながる臨床症状の1以上である。

【0018】

S・アウレウスにより重度にコロニー形成された対象におけるS・アウレウス疾患の診断につながる典型的な臨床症状は、本明細書においてS・アウレウス疾患特異的的症状とも呼ばれ、特にVATおよびVAPに関して、白血球増加、発熱または低体温、化膿性気道分泌物、胸部X線写真またはCTスキャンにおける新規または進行性の浸潤の存在を含む。急性感染症の一般的な症状は、急性感染症の全ての重要な側面を含むAPACHE-IIスコア(すなわち、年齢、直腸温、平均動脈圧、心拍数、動脈pH、呼吸数、ナトリウムおよびカリウム、クレアチニンの血清レベル、ヘマトクリット、白血球数ならびにグラスゴーコーマスケール)により定義される。その症状は、S・アウレウスにより、例えば標準的な微生物学的方法または培養により決定されるようなS・アウレウスのコロニー形成により引き起こされる場合、S・アウレウス特異的であると考えられる。

【0019】

S・アウレウス疾患特異的的症状は、S・アウレウスにコロニー形成された患者が患い得る他の非特異的な基礎となる生理学的状態とは区別される。例えば、ICU中の人口呼吸されている患者は、結果として無防備な免疫系をもたらず病気、例えば悪性病変を患っている可能性があり、または臓器移植を受けている可能性があり、S・アウレウスにより重度にコロニー形成されていると同定された場合、S・アウレウス疾患/感染症を発現するリスクがあると考えられ得る。

【0020】

10

20

30

40

50

具体的には、アルファ溶血素のレベルは、S . アウレウス疾患の発症の可能性を示しており、その疾患は、気管支炎、特にV A T、肺炎、特にV A P、敗血症、特に重症の敗血症、または慢性創傷感染症からなる群より選択される。特に、アルファ溶血素のレベルは、そのようなS . アウレウス疾患の診断につながる1以上の症状の速い出現を示している。

【0021】

アルファ溶血素のレベルは、特に、機能的アッセイもしくは細胞ベースのアッセイにおいて決定されるようなアルファ溶血素活性のレベル、またはアルファ溶血素の遺伝子発現もしくは発現産物のレベル、例えば翻訳もしくは転写産物、例えばmRNA、もしくはセンスもしくは相補的アンチセンスにおいてそのような発現産物のヌクレオチド配列に相補的であるもの、もしくはアルファ溶血素タンパク質もしくはアルファ溶血素の一部/断片もしくはアルファ溶血素のあらゆる天然もしくは人工試薬との反応産物のレベルである。特に、アルファ溶血素のレベルは、生体外で対象の試料において、従って適切なインビトロアッセイにより決定される。

10

【0022】

そのレベルは、適切にはアルファ溶血素の含有量もしくは濃度(w/vまたはw/w)または活性(単位/vまたは単位/w)として決定される。そのような決定の数値結果に対する代替として、アルファ溶血素のレベルは、例えば半定量的アッセイにおけるカットオフ値または閾値もしくは参照値より上の特定のスコアまたは特定のレベルとして決定されることもできる。

20

【0023】

特定の側面によれば、対象は、S . アウレウスにより重度にコロニー形成されており、それは特に、標準的な微生物学的試験により決定されるような前記の対象の生物学的試料中の 10^5 CFU/mL以上のレベルおよび/または生物学的試料、例えばETA流体試料中のS . アウレウスの中程度もしくは重度(+++(3+)または++++(4+))の細菌増殖により定められる。

【0024】

具体的には、対象は、S . アウレウスによりコロニー形成されており、場合により、S . アウレウスを示す細菌もしくは細菌マーカーの存在、またはおそらくS . アウレウス疾患の発症を決定する方法により、好ましくは前記のマーカーを発現している遺伝子、前記の遺伝子の発現産物を決定する方法により、または標準的な微生物学的技法を用いて決定されるように、S . アウレウス疾患を患っているリスクがある。標準的な微生物学的技法の典型的な方法は、アルファ溶血素活性を実証する血液寒天アッセイである。

30

【0025】

特定の側面によれば、患者は、S . アウレウス、特にMSSAまたはMRSA、好ましくはMSSAによりコロニー形成されており、および/またはそれに感染している。

具体的には、対象は、鼻または鼻咽頭においてコロニー形成されており、そして対象は挿管を受けている。本明細書に記載されるアルファ溶血素レベルの決定に基づいて、高度に溶血性の株が、挿管の前に鼻または鼻咽頭において検出されることができ、それは、疾患進行のリスク評価および挿管の際の下気道におけるコロニー形成を予防する特異的な前処置手段を可能にする。そのようなコロニー形成は、通常は無症候性に鼻または鼻咽頭にコロニー形成しているであろうが、細菌は、挿管の際に下気道中に持ち込まれて対象を重度の下気道コロニー形成および関連疾患を発症するリスクに晒す可能性がある。同様に、本方法は、既に挿管されている対象の鼻または鼻咽頭における本明細書に記載されるアルファ溶血素レベルの決定および高度に溶血性の株の検出を提供し、疾患進行のリスク評価を可能にする。

40

【0026】

具体的には、対象は、人工呼吸されており場合により人工呼吸器関連感染症、例えばVATもしくはVAPのリスクがある集中治療室(ICU)患者、または皮膚および軟組織感染症(SSTI)のリスクがある患者である。具体的には、対象は、機械式人工呼吸さ

50

れている患者であり、かつ下気道において、例えば気管または肺においてS・アウレウスにより重度にコロニー形成されている。

【0027】

特定の側面によれば、生物学的試料は、体液または組織試料、好ましくは血液試料、便試料、皮膚試料、尿試料、脳脊髄液、および呼吸気管標本、例えば気管内吸引物、胸膜液、肺タップ (lung tap)、鼻スワブまたは痰からなる群より選択されるあらゆる試料である。

【0028】

具体的には、生物学的試料は、その生物学的試料に由来するS・アウレウス分離株を生成するために処理され、その分離株は、そのMSSAまたはMRSAの遺伝子型または表現型、および/またはアルファ溶血素発現のレベルに関してさらに特性付けられることができる。細菌分離株を生成するための好ましい試料調製法は、細菌の富化および培養工程を利用している。

10

【0029】

具体的には、生物学的試料は、試料においてアルファ溶血素レベルを直接決定するために処理され、場合によりその後マトリックス効果を低減するためおよび試験の特異性および感度を増大させるための富化または精製の予備工程が行われる。予備工程は、標準的な培養手順に従う生物学的標本の培養を含み、それは例えば、排他的にそうであるわけではないが、ルーチン的な微生物実験室において実施されるような標準的な細菌増殖培地中での血液培養ならびに標本の固体寒天上での培養 (表現型決定 - すなわちアンチバイオグラム (antibiogram) を含む) である。細菌は、病毒性因子の発現を増進するため (例えば、鉄の含有量が低く高栄養培地よりも正確にインピボ条件に似ており、従って外毒素および他の細菌性病毒性因子の発現を増進するRPMI-CAS) の異なる増殖培地 (標準的な培地および/または化学的に定められた培地; 高栄養、低栄養、限定増殖培地組成) 中でのCFUの拡張のために継代培養されることができる。細菌懸濁液は、可能性のあるマトリックス効果を除去するために、標準的な緩衝溶液中で調製および洗浄されることができる。

20

【0030】

別の特定の側面によれば、前記のアルファ溶血素レベルの決定は、アルファ溶血素の発現または活性の半定量的または定量的測定を含む。

30

具体的には、参照または対照は、予め決定されたアルファ溶血素のレベルであるか、または参照もしくは対照値 (例えばカットオフ値または閾値または参照値) を、生物学的物質、例えば予め決定されたS・アウレウス疾患のリスクを有する対象の比較可能な生物学的試料から得られた、もしくは特定のレベルのアルファ溶血素を発現するS・アウレウス株から得られた予め決定されたアルファ溶血素のレベルに対して較正することにより得られる。

【0031】

特定の側面によれば、前記の参照は、疾患もしくは疾患進行を示す予め決定されたアルファ溶血素のレベルであり、または低い、中程度の、もしくは高いアルファ溶血素を発現するS・アウレウス株から得られる。

40

【0032】

具体的には、前記の標準または参照対照は、S・アウレウス疾患の発症もしくは疾患の進行を示す予め決定されたアルファ溶血素のレベルであり、または低い、中程度の、もしくは高いアルファ溶血素を発現するS・アウレウス株から得られる。

【0033】

具体的には、標準または参照対照は、アルファ溶血素を発現していない、または低レベルのアルファ溶血素を発現しているS・アウレウス株により発現されるアルファ溶血素のレベルよりも高い予め決定されたアルファ溶血素の量または活性である。

【0034】

好ましくは、特定の株が、参照を提供するために用いられ、それは、低発現株である、

50

または低レベルの溶血を示す溶血プロフィールを有することが決定されている。試験を較正するための参照または手段の役目を果たすことができるであろうアルファ溶血素を発現しない、もしくは低レベルのアルファ溶血素を発現する、または溶血活性を発現しない典型的な株は、以下の株である：アルファ溶血素の非発現：M R S A 2 5 2 と名付けられた S . アウレウス株 (A T C C から入手可能、カタログ参照番号 A T C C B A A - 1 7 2 0)。低レベルのアルファ溶血素 (1 +) : N e w m a n D 2 C と名付けられた S . アウレウス株 (英国公衆衛生庁細菌コレクションから入手可能、カタログ参照番号 N C T C 1 0 8 3 3)。

【 0 0 3 5 】

S . アウレウス株を、本発明の方法に対する参照として、または本発明の方法を較正するために用いることが好ましい。具体的には、生物学的試料中のアルファ溶血素のレベルが低発現株の参照よりも高い場合、そのようなレベルは、S . アウレウス疾患の発症を示している。生物学的試料中のアルファ溶血素のレベルが低発現株または非溶血性株の参照よりも少なくとも 2 倍高い場合、強い疾患の徴候が存在する。決定されたレベルが参照よりも少なくとも 3 倍、または少なくとも 4 倍、または少なくとも 5 倍高い場合、徴候はさらに強く、急速に発症および進行している疾患の高いリスクを示している。

10

【 0 0 3 6 】

ヒツジ血液 C O S 寒天プレート法 (図 1) に基づいて、非溶血性分離株と比較した場合の 2 + 以上の半定量的評価の溶血プロフィールが用意されることができ、それは、中程度の (2 +) ~ 高い H l a (3 + , 4 +) 発現に関する指標および可能性のある S . アウレウス疾患の発症の強いマーカーの役目を果たすことができるであろう。

20

【 0 0 3 7 】

参照物質、例えば参照対照は、アッセイ中に、例えば参照標準、例えばアルファ溶血素の定められた含有量または濃度を有する標準アルファ溶血素調製物として好都合に含められることができ、その標準は、比較のための内部もしくは外部対照として、または参照値、参照読み出しもしくは参照曲線として用いられる。標準アルファ溶血素調製物は、精製された (例えば S . アウレウス株または分離株から精製された) アルファ溶血素または組み換えアルファ溶血素調製物を含有する、または本質的にそれからなることができる。

【 0 0 3 8 】

具体的には、アルファ溶血素のレベルは、免疫アッセイ、好ましくは E L I S A 、 C I A 、 R I A 、 I R M A 、凝集アッセイ、免疫クロマトグラフィー、特にラテラルフロー免疫クロマトグラフィーアッセイ (例えばディプスティック検査) 、ウェスタンブロットのいずれか、質量分析、核磁気共鳴 (N M R) 、またはアルファ溶血素もしくはアルファ溶血素レベルを示す対応する D N A もしくは R N A を好ましくは核酸ハイブリダイゼーションアッセイもしくは核酸増幅アッセイを用いて決定する方法の少なくとも 1 つにより決定される。

30

【 0 0 3 9 】

特定の態様によれば、その方法はさらに、S . アウレウスまたは S . アウレウスのコロニー形成もしくは感染を示す少なくとも 1 種類の追加のマーカーの測定を含む。

具体的には、前記の少なくとも 1 種類の追加のマーカーの測定は、アルファ溶血素以外のいずれかの S . アウレウス特異的細菌構成要素を発現する遺伝子またはいずれかの S . アウレウス特異的細菌構成要素のそれぞれの遺伝子発現産物の決定を含み、それは好ましくは以下：

40

i) S . アウレウスプロテイン A ;

i i) S . アウレウスの抗生物質耐性マーカー、好ましくは少なくとも P B P 2 a 、 m e c A 遺伝子または m e c A 遺伝子の発現産物のいずれか ;

i i i) S . アウレウスの細胞毒、好ましくはパントン・バレンタインロイコシジン (P V L / L u k S F) 、 L u k G H (L u k A B) 、ガンマ溶血素、L u k E D を含むあらゆる他の S . アウレウス抗原 ; S . アウレウス病毒性因子、分泌タンパク質および表面タンパク質 ; またはあらゆる S . アウレウス特異的化合物、例えばリボテイコ酸、ならび

50

に

i i i) 好ましくは追加のマーカーとして少なくとも S . アウレウスプロテイン A および P B P 2 a を決定する、 i)、 i i) および / または i i i) の細菌構成要素のいずれかの組み合わせ ;
からなる群より選択される。

【 0 0 4 0 】

具体的には、前記の少なくとも 1 種類の追加のマーカーの測定は、いずれかの細胞毒、 S . アウレウスの病毒性因子、分泌タンパク質および表面タンパク質を発現する遺伝子のいずれか、またはいずれかの S . アウレウス特異的化合物、またはそれぞれの遺伝子の発現産物、特に S . アウレウスの病毒性因子、 S . アウレウスの抗生物質耐性マーカーおよび S . アウレウス特異的細菌構成要素、ならびに好ましくは少なくとも P B P 2 a、 m e c A 遺伝子もしくは m e c A 遺伝子の発現産物もしくは S . アウレウス特異的プロテイン A タンパク質もしくはこのタンパク質をコードする遺伝子のいずれかの決定を含む。

10

【 0 0 4 1 】

好ましいアッセイの組み合わせは、以下 :

a) 疾患バイオマーカー、特にアルファ溶血素 ; ならびに

b) S . アウレウスの検出 (プロテイン A) および耐性マーカー (例えば P B P 2 a) ; ならびに場合によりさらなるマーカー ;
に関する試験を含む。

【 0 0 4 2 】

具体的には、定量的もしくは定性的免疫アッセイまたは質量分析が、アルファ溶血素マーカーを含む 1 以上のマーカーを決定するために用いられることができる。 S . アウレウスのさらなるマーカー、 S . アウレウス疾患もしくは疾患の進行、または病原体の同定もしくは耐性のマーカーが、アルファ溶血素マーカーの他に決定される場合、定性的、半定量的または定量的アッセイが、用いられることができる。そのような決定は、アルファ溶血素レベルの決定と連続的、並行、または同時であることができ、従って別々の生物学的試料中または同じ試料、反応混合物もしくは格納容器中であることができる。

20

【 0 0 4 3 】

具体的には、定量的 P C R アッセイまたは半定量的 P C R アッセイ、場合により多重化されたアッセイが、アルファ溶血素のレベル、特に遺伝子または遺伝子発現のレベル、および疾患もしくは疾患の進行の少なくとも 1 種類のさらなるマーカーまたは試料中の S . アウレウスの特性付け (例えば抗生物質耐性プロフィール、 S . アウレウスの存在の確認) を決定するために用いられることができる。

30

【 0 0 4 4 】

好ましくは、 M S S A または M R S A と関係する S . アウレウスのさらなるマーカーが決定される。そのようなさらなるマーカーは、ペニシリン結合タンパク質 2 a (P B P 2 a)、またはその同族遺伝子 (m e c A) もしくは m e c A 遺伝子の発現産物からなる群より選択され、それは M R S A に関する決定要因である。

【 0 0 4 5 】

好ましくは、 S . アウレウスの同定と関係する S . アウレウスのさらなるマーカーが決定される。そのようなさらなるマーカーは、細胞壁構成要素、例えばリポテイコ酸もしくは細胞壁テイコ酸、または細胞表面タンパク質、例えば S . アウレウス特異的プロテイン A からなる群より選択される。

40

【 0 0 4 6 】

特定の側面によれば、本発明はさらに、 S . アウレウスにより重度にコロニー形成されているが S . アウレウス疾患の症状を一切示していない対象における人工呼吸器関連呼吸器感染症、気管気管支炎または肺炎の発症に関するインビトロマーカーとしてのアルファ溶血素の使用を提供する。

【 0 0 4 7 】

別の特定の側面によれば、本発明はさらに、 S . アウレウスにより重度にコロニー形成

50

されているがS・アウレウス疾患の症状を一切示していない対象における人工呼吸器関連呼吸器感染症、気管気管支炎または肺炎の疾患発症を決定するための診断組成物の調製のためのアルファ溶血素に関する特異的な検出分子の使用を提供する。

【0048】

特定の側面によれば、本発明は、S・アウレウスにより重度にコロニー形成されているがS・アウレウス疾患の症状を一切示していない対象における人工呼吸器関連呼吸器感染症、気管気管支炎または肺炎の疾患発症を決定するためのアルファ溶血素に関する特異的な検出分子を含む診断組成物の使用を提供する。

【0049】

そのような診断組成物は、生物学的試料との反応混合物において使用準備済の試薬、またはそのような試薬の保存された形態、例えば貯蔵安定形態、例えば凍結乾燥形態；（例えば液体窒素中での）急速凍結形態、超低温貯蔵（例えば-70 および-80）、冷蔵（例えば-20 ~ 5）および制御された室温（例えば15 ~ 27）；例えばグリセロールストック、組織パラフィンブロック、（バツカル）スワブおよび他の標準的な生物学的試料貯蔵法のような標準的な試料貯蔵であることができ、その試薬の保存された形態は、使用準備済の試薬を得るために再構成または調製されることができる。そのような試薬は、典型的には水溶液、特に（生理学的）緩衝条件（例えばEDTAで緩衝されたもの、リン酸緩衝液、HBSS、クエン酸緩衝液等）の形態である。

【0050】

具体的には、検出分子は、抗体、抗体断片、細胞受容体もしくはリガンド、またはアルファ溶血素遺伝子もしくは前記の遺伝子の発現産物にハイブリダイズするヌクレオチド配列からなる群より選択されるアルファ溶血素結合剤である。この点に関して、ハイブリダイゼーション条件は、従来のプロトコルに従って確立されることができる。

【0051】

別の特定の側面によれば、本発明はさらに、本発明の方法におけるアルファ溶血素診断キットの使用を提供する。例えば、例えば血液寒天プレートを含む標準的な微生物学技法によりアルファ溶血素レベルを決定するためのキットが、本発明に従って用いられることができる。

【0052】

アルファ溶血素診断キットは、好ましくは、アルファ溶血素レベルを決定するのに適したアルファ溶血素に関する特異的な検出分子を用いている。

本発明によれば、貯蔵安定形態である新規のアルファ溶血素診断キットがさらに提供される。そのようなキットは、好ましくは生物学的試料中のアルファ溶血素レベルを決定するための全ての必須の構成要素を、場合により一般的または非特異的な物質または構成要素、例えば水、緩衝剤または賦形剤を除いて含む。貯蔵安定なキットは、好ましくは少なくとも6ヵ月間、より好ましくは少なくとも1または2年間貯蔵されることができる。それは、乾燥した（例えば凍結乾燥された）構成要素で構成されていることができ、および/または保存剤を含むことができる。

【0053】

具体的には、アルファ溶血素診断キットは、S・アウレウスアルファ溶血素発現産物と特異的に反応することができる1種類以上の試薬および/またはアルファ溶血素のレベルを決定するのに適した特異的な検出分子を含み、それは、貯蔵安定形態で、好ましくは包装された単位として提供される。

【0054】

好ましいアルファ溶血素診断キットは、包装された、または予め包装された単位として提供され、例えばここで、その構成要素は、1つのみの包装中に収容されており、それはルーチン的な実験を促進する。そのような包装は、例えば一連の生物学的試料の試験を実施するのに適した1以上の試験に必要な試薬を含むことができる。そのキットはさらに、標準または参照対照としてH1a調製物を含有することができる。

【0055】

10

20

30

40

50

具体的には、本発明は、本発明に従う方法におけるアルファ溶血素診断キットの使用を提供し、ここで、その診断キットは、S・アウレウスアルファ溶血素発現産物と特異的に反応することができる1種類以上の試薬および/またはアルファ溶血素のレベルを決定するのに適した特異的な検出分子を含み、それは、貯蔵安定形態で、好ましくは包装された単位として提供される。

【0056】

具体的には、診断キットは、本発明の方法に従って用いられ、ここで、その診断キットは、本明細書でさらに記載される診断組み合わせキットである。

別の特定の側面によれば、本発明はさらに、生物学的試料中のアルファ溶血素レベルの決定のための診断キットを提供し、それは、前記の生物学的試料中のアルファ溶血素レベルを定量化するためにアルファ溶血素特異的検出分子およびアルファ溶血素参照物質、例えば標準アルファ溶血素調製物を含む。

10

【0057】

具体的には、本発明は、アルファ溶血素を含有することが疑われる生物学的試料中のアルファ溶血素のレベルを検出する方法に言及し、それは、以下の工程を含む：

- 基質を含む反応混合物を提供し、ここで、その基質は、少なくとも1種類のアルファ溶血素結合剤を含み；

- 生物学的試料を反応混合物と接触させ；そして

- 結合剤により認識されたアルファ溶血素の量に対応する検出信号を検出する。

20

【0058】

具体的には、陰性対照または参照対照組成物が、本発明に従うキットにおいて用いられることができる。そのような場合、検出信号は、対照組成物により生成される信号の量に対応する対照信号に対して標準化され、それにより生物学的試料中のアルファ溶血素の存在またはレベルを検出することができる。検出信号の標準化は、対照信号を検出信号から減算することを含むことができる。

【0059】

別の特定の側面によれば、本発明はさらに、アルファ溶血素レベルの決定のための診断キットを含み、かつさらにさらなるS・アウレウスマーカーを決定するためのキットを含む診断組み合わせキットを提供する。

【0060】

具体的には、本発明は、特にアルファ溶血素レベルおよびS・アウレウス、またはS・アウレウスのコロニー形成もしくは感染を示す少なくとも1種類の追加のマーカーを同じ対象の同じまたは別々の生物学的試料(単数または複数)において決定するための診断組み合わせキットを提供し、それは以下を含む：

30

a) S・アウレウスアルファ溶血素発現産物と特異的に反応することができる1種類以上の試薬および/またはアルファ溶血素のレベルを決定するのに適した特異的な検出分子を含むキット；ならびに

b) 好ましくは以下：

i) S・アウレウスプロテインA；

ii) S・アウレウス抗生物質耐性マーカー、好ましくは少なくともPBP2a、mecA遺伝子またはmecA遺伝子の発現産物のいずれか；

40

iii) S・アウレウス細胞毒、好ましくはPVL/LukSF、LukGH(LukAB)、ガンマ溶血素、LukED；S・アウレウス病毒性因子、分泌および表面タンパク質；またはあらゆるS・アウレウス特異的化合物、例えばリポテイコ酸を含むあらゆる他のS・アウレウス抗原、ならびに

iii) 好ましくは追加のマーカーとして少なくともS・アウレウスプロテインAおよびPBP2aを決定する、i)、ii)および/またはiii)の細菌構成要素のいずれかの組み合わせ；

からなる群より選択される、アルファ溶血素以外のS・アウレウス特異的細菌構成要素を発現する遺伝子またはS・アウレウス特異的細菌構成要素のそれぞれの遺伝子発現産物を

50

決定するのに適した試薬および/または特異的な検出分子を含むキット。

【0061】

例えばPBP2a、mecA遺伝子またはmecA遺伝子の発現産物のいずれかであるMRSAマーカーは、MRSAまたはMSSAの存在または非存在を示すと考えられ、従って、さらなる結論が、疾患または疾患進行の予測および患者に与えられるべき処置計画に対して引き出され得る。

【0062】

例えばS・アウレウスプロテインAであるS・アウレウス特異的細菌マーカーは、S・アウレウスの存在または非存在を示すと考えられ、従って、さらなる結論が、他の特異的な細菌同定試験の非存在下で、疾患または疾患進行の予測および患者に与えられるべき処置計画に対して引き出され得る。

10

【0063】

具体的には、キットは、本発明の方法を実施するための1種類以上の試薬を含む。

【図面の簡単な説明】

【0064】

【図1】図1．ヒツジ血液寒天プレート上でのS・アウレウス分離株の溶血性表現型。S・アウレウス株が、ヒツジ血液寒天プレート上にまかれ、分離株が、半定量的評価に基づいてコロニーの周囲の透明なハローの直系に従って、アルファ溶血素発現に特徴的な強い～弱いベータ溶血またはベータ溶血なし(4+から-まで)に分類された。コロニーの周囲の濁ったハローは、ベータ溶血素(H1b)を発現しているコロニーに関して考えられた。

20

【図2】図2．S・アウレウス培養上清によるヒト肺胞上皮細胞の細胞溶解は、アルファ溶血素により媒介される。A549細胞が、S・アウレウス株の培養上清と共にインキュベートされ、細胞毒性が、方法において記載されたように測定された。同じ分離株の独立した生物学的複製を用いて得られた平均値+/-SEMが、示されている。A：USA300 TCH1516野生型および同質遺伝子的h1a株；B：高H1a活性を有する4つの分離株に関する培養上清が、66.7nMのH1a中和モノクローナル抗体および対応するイソ型の対照mAbの存在または非存在下での中毒のために用いられた。パーセント細胞生存度が、モック処理された細胞に対して比較して決定された。

30

【図3】図3：H1aに誘導されるヒツジ血液寒天溶血プロフィールは、ヒト肺胞上皮細胞に対するインビトロでの検出可能な細胞毒性と相関している。A：ヒツジ血液寒天プレートにおけるそれらの溶血プロフィール(図1)に基づいて選択されたS・アウレウス分離株が、方法において記載されているように決定されるそれらのA549細胞に対する細胞毒性に関して試験された。B．MSSA分離株の細胞毒性指数が、示されているような異なる患者の群において示されている。それぞれの患者は、最初の入手可能な分離株により表されている。横線は、群の中央値を示している。個々の群は、ウィルコクソンの順位検定により統計的に比較された(p値として示されている)。

【図4】図4：S・アウレウス毒素配列：USA300 TCH1516株(Genbank、受入番号CP000730)から得られた代表的なアルファ溶血素配列。他の株は、1以上の点変異を含み得る。

40

【0065】

SEQ ID 1：USA300 TCH1516株(Genbank、受入番号CP000730)のh1aヌクレオチド配列。

SEQ ID 2：USA300 TCH1516株のH1aアミノ酸配列。

【発明を実施するための形態】

【0066】

用語“アルファ溶血素”は、本明細書で用いられる際、S・アウレウスのアルファ毒素を指すものとし、それは、アルファ毒素タンパク質(例えば、図4において示されているアミノ酸配列、SEQ ID 2、または少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列により同定されるその天然存在もしくは非天然存在もしくは人工バリエーションを有す

50

る) またはそのようなタンパク質の診断的に関連する部分もしくは断片、アルファ溶血素の天然もしくは人工試薬もしくは反応産物との複合体、h1a 遺伝子(例えば図4において示されている核酸、SEQ ID 1) またはタンパク質性もしくは遺伝性分子、例えばRNA、mRNA、もしくはDNA(一本鎖もしくは二本鎖、センスもしくはアンチセンス核酸もしくはポリヌクレオチド、またはそれに対する相補的核酸もしくはポリヌクレオチドのどれでもよい) であり得る遺伝子発現産物として理解されている。核酸分子またはポリヌクレオチドは特に、単離された形態で決定される。例えば、単離されたRNA分子は、DNA分子のインビボまたはインビトロRNA転写産物を含む。

【0067】

用語“生物学的試料”は、本明細書で用いられる際、対象、例えばヒトから得られるあらゆる物質を指すものとし、それは、S.アウレウスを含有し得る生物学的物質を含有するか、または含有する可能性がある。生物学的試料は、組織、流体または細胞培養試料であることができる。本発明に従う使用のための試料の例は、患者試料、例えば組織または体液、特に呼吸気管標本、例えば気管内吸引物、胸膜液、肺タップ、鼻スワブもしくは痰、血液試料、便試料、皮膚および尿試料または脳脊髄液を含むが、それらに限定されない。

10

【0068】

生物学的試料は、典型的には複合的な生物学的マトリックス、例えば多数のタイプの生物学的な小さい有機分子を含有する複合的な粘性の生物学的流体、例えばタンパク質物質に富む粘液性滲出液を含む。適切な添加剤または抽出手順が、試料中のマトリックスと関係している可能性のある非特異的な結合を低減するために、ならびに/または試料マトリックスの粘性もしくは固体構成要素を可溶化および/もしくは分解することによりマトリックスの粘性を低下させるために用いられることができる。マーカーを有機体から遊離させる、ならびに/またはマトリックスを分解および/もしくは液化する試料調製法が、用いられることができる。分析されることができる生物学的マトリックスは、粘液含有試料、例えば鼻分泌物、痰、喀痰、咽頭滲出液、尿道または膺分泌物、およびそのような膜表面の洗浄液を含む。

20

【0069】

適切な試料調製法は、アッセイにおける生物学的マトリックスの作用を低減するための方法工程を含む。そのような方法工程は、例えば捕捉、クロマトグラフィー、遠心分離および透析を含み得るが、それらに限定されない。

30

【0070】

対象から得られた物質は、細菌分離株の形態、例えば分離されたS.アウレウスを培養するための細胞培養物または細胞培養生成物の形態であることもできる。培地は、S.アウレウス集団のみを富化するために選択的であることができ、または非選択的であることもできる。

【0071】

細菌分離株の調製は、典型的には、S.アウレウスの増殖を増進し、それにより試料中のS.アウレウス集団を富化する条件で試料を維持する培養工程を含む。

一度分離株が得られたら、細菌は、例えばMSSAまたはMRSAのタイプ、および発現されるアルファ溶血素のレベルを決定するために、生化学的および/または血清学的試験によりさらに調べられることができる。いくつかのタイピング法が、S.アウレウス株を研究するために利用可能である。これらの方法は、典型的には、血清型分類、毒素型分類、多座位配列タイピング(MLST)、spaタイピング、パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)を含む遺伝的関係/系統発生に関する標準的なタイピングを含む。他のタイピング法は、病毒性因子および他の重要なブドウ球菌性因子の、例えばPCR、多重PCR、マイクロアレイ、ノーザン/サザンブロッティングによる遺伝子型分類、ならびにタンパク質ベースの方法、例えばELISA、ウェスタンブロットおよび質量分析を含む。典型的には、抗生物質耐性プロファイルは、アンチバイオグラムを用いて調べられる。

40

50

【0072】

用語“アルファ溶血素結合剤”は、本明細書で用いられる際、アルファ溶血素のあらゆる有用な結合剤を指すものとする。特に、アルファ溶血素結合剤は、アルファ溶血素タンパク質（H1a）またはh1a遺伝子もしくはその発現産物、例えばペプチドもしくはポリペプチド、RNAもしくはDNAを認識する。それは、アルファ溶血素および試薬（天然または人工試薬のどちらでもよい）の複合体の形態で存在するアルファ溶血素への結合のように、直接的または間接的に結合することができる。

【0073】

結合剤は、直接標識されることができ、または結合剤は間接的に標識されることもできる。間接標識は、アルファ溶血素に対する結合剤と複合体を形成する標識された結合剤を含むことができる。

10

【0074】

ある態様において、結合剤または検出分子は、検出可能な標識にコンジュゲートしており、それは、それら自体が検出可能である分子（例えば蛍光性部分、電気化学的標識、金属キレート剤等）ならびに検出可能な反応産物の生成により（例えば酵素、例えばホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ等）、またはそれ自体が検出可能であることができる特異的結合分子により（例えばビオチン、ジゴキシゲニン、マルトース、オリゴヒスチジン、2,4-ジニトロベンゼン、フェニルアルセネート、ssDNA、dsDNA等）間接的に検出されることができ分子を含むことができる。

【0075】

用語“アルファ溶血素結合剤”は、特に選択的または特異的アルファ溶血素試薬および/または検出分子を包含するように理解されている。

20

一態様において、結合剤は、検出分子である。

【0076】

特異的なアルファ溶血素結合剤または検出分子は、合成により生成されることができ、または細胞もしくは細菌由来であることもでき、または例えば単離および部分的もしくは実質的に精製された生物学的試料中に存在することもできる。そのような単離された構成要素は、典型的にはその天然環境から分離されている。特異的なアルファ溶血素結合剤は、機能アッセイにおいてアルファ溶血素と反応する細胞または細胞性構成要素である。

【0077】

一態様において、結合剤は、反応混合物中のアルファ溶血素を認識する。結果として生じる結合剤-アルファ溶血素複合体は、次いで複合体に結合する別の検出分子と接触させられることができる。その検出分子は、結合剤および/またはアルファ溶血素を介して複合体に結合することができる。

30

【0078】

適切なアルファ溶血素結合剤には、例えば抗体、抗体断片、例えばFab、F(ab)₂、F(ab)′、Fv、scFv、または単鎖抗体、抗体様骨格（scaffolds）があり、ここで、骨格は、典型的には、定常部分および標的抗原またはそのエピトープの構造に相補的である可変部分からなる（例えばアプタマー）。アルファ溶血素結合剤のさらなる例は、細胞受容体、例えば疾患の発病に関わる細胞受容体、例えばタンパク質性および非タンパク質性毒素特異的受容体（例えばADAM-10）、リガンド、例えば疾患の発病に関わる可溶性リガンド、例えば（脱落した）膜小胞、アルファ溶血素遺伝子もしくは前記の遺伝子の発現産物に特異的にハイブリダイズするヌクレオチド配列、例えばオリゴヌクレオチドもしくはプローブ、特に発現産物と反応するためのプライマー配列を含むオリゴヌクレオチドもしくはプローブ、またはそれぞれの発現産物を捕捉するプローブである。

40

【0079】

当業者は、アルファ溶血素に特異的な核酸配列の増幅のためのプライマーを、公開された文献から、または公的なデータベースから設計することができる。検出分子として用いられ得る核酸分子は、RNA、例えばmRNAの形態、または例えば標準的なDNA調製

50

法、クローニングにより得られる、もしくは合成により生成されるDNAおよびゲノムDNAを含むDNAの形態であることができる。DNAまたはRNAは、二本鎖または一本鎖であることができる。一本鎖DNAまたはRNAは、センス鎖としても知られているコード鎖であることができ、またはそれはアンチセンス鎖とも呼ばれる非コード鎖であることもできる。

【0080】

本発明の実施は、別途示されない限り、免疫学、生化学、化学、分子生物学、微生物学、細胞生物学、ゲノム科学および組み換えDNAの従来技法を用い、それは当該分野の技術の範囲内である。例えば、Sambrook, Fritsch and Maniatis, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 第2版(1989)を参照。

10

【0081】

特異的にのみハイブリダイズする配列の検出は、通常はストリンジェントなハイブリダイゼーションおよび洗浄条件、例えば65°Cにおける0.1×SSC、0.1%SDSを必要とするであろう。当該技術で周知であるように、決定されるべきヌクレオチド配列の長さおよび核酸の組成は、ハイブリダイゼーション条件のさらなるパラメーターを構成する。

【0082】

“特異的結合”または“選択的結合”は、本明細書で用いられる際、結合剤、例えば抗体またはその抗原結合断片が、不均質な分子の集団においてアルファ溶血素またはそれぞれのエピトープもしくはヌクレオチド配列に関する感知できる程の親和性を示すことを意味する。従って、示された条件（例えば免疫アッセイまたはハイブリダイゼーション条件）下では、結合剤は、標的アルファ溶血素に特異的に結合し、試料中に存在する他の分子には有意な量では結合しない。特異的結合は、結合が、選択されたような標的同一性、高い、中程度の、または低い結合親和性または結合活性に関して選択的であることを意味する。選択的結合は、通常は、別の標的と比較した場合に結合定数または結合力学が少なくとも10倍異なる（少なくとも1対数の差として理解される）場合に達成され、好ましくはその差は少なくとも100倍であり（少なくとも2対数の差として理解される）、より好ましくは少なくとも1000倍である（少なくとも3対数の差として理解される）。

20

【0083】

用語“特異性”または“特異的結合”は、1種類以上の分子に結合する結合剤、例えば交差特異性結合剤にも適用されることが理解されている。少なくとも2種類の異なる標的もしくはそのような標的のエピトープもしくはヌクレオチド配列を標的とする、または少なくとも2種類の異なる標的上の交差反応性エピトープもしくはヌクレオチド配列を標的とする好ましい交差特異性（多特異性または交差反応性とも呼ばれる）結合剤は、実質的に類似の結合親和性で、例えば100倍未満の差またはさらには10倍未満の差で標的に特異的に結合する。

30

【0084】

用語“検出分子”は、本明細書で用いられる際、特異的な特徴または標識を通して、例えばアルファ溶血素に対する特異的結合反応において検出可能である分子または分子の複合体を指すものとする。検出分子によるそのような結合反応は、直接的かつ即時であることができ、または別個のアルファ溶血素結合剤により媒介されることもできる。標識は、典型的にはアッセイにおいて検出され得る分子または分子の一部である。典型的な標識は、発色団、蛍光色素、または放射性分子である。

40

【0085】

検出分子は、それ自体が特異的なアルファ溶血素結合剤であることができ、またはそのアルファ溶血素結合剤との結合反応を通してアルファ溶血素を検出する分子であることもでき、例えばアルファ溶血素またはそれぞれの結合剤またはアルファ溶血素-結合剤複合体を捕捉することができる。検出分子は、両方（アルファ溶血素結合剤および検出分子）が1分子中にあることができる。標識は、アルファ溶血素結合剤の一部であることができ、または別々の標識として、もしくはアルファ溶血素結合剤とは分離した検出分子上で用

50

いられることもできる。

【0086】

好ましい検出分子は、内因性標識により、または例えばその分子にコンジュゲートしている別個の標識により標識されている特異的アルファ溶血素結合剤である。

用語“診断キット”は、本明細書で用いられる際、キットまたは部分のセットを指し、それは、組み合わせまたは混合物で、1種類以上の分析物もしくはマーカーの測定/検出を実施して疾患もしくは疾患状態を決定する、または疾患および特に疾患の発症もしくは疾患の進行を予測するために用いられることができる。特に、キットは、少なくとも検出分子および/または結合剤を含有し、ここで、検出分子および/または結合剤は、分析物もしくはマーカーまたはそのような分析物もしくはマーカーの反応産物を特異的に認識する。加えて、様々な試薬またはツールが、キット中に含まれることができる。診断キットは、マイクロビーズまたは平面状のアレイもしくはウェルのような支持体、バイオマーカーの単離のための試薬、特異的な標的に向けられた検出分子、核酸の配列決定または増幅のためのプライマーのような試薬、核酸ハイブリダイゼーションのためのアレイ、検出可能な標識、溶媒または緩衝剤等、様々なリンカー、様々なアッセイ構成要素、ブロッキング剤等を含め、対象の方法を実施するためのあらゆる有用な試薬を含むことができる。

10

【0087】

キットは、診断法における使用のための説明書も含むことができる。そのような説明書は、例えば、キット中に含まれるデバイス、例えば診断目的のために生物学的試料を調製する、例えばマーカーを決定する前に細胞および/またはタンパク質含有画分を分離するためのツールまたはデバイス上で提供されることができる。キットは、貯蔵安定形態で好都合に提供されることができる（例えば少なくとも6ヵ月間の貯蔵寿命を有する商業的なキット）。

20

【0088】

特定の診断キットは、対象のマーカーに対して向けられた検出分子を含む、または検出分子の固定されたパターン化されたアレイを有する、好ましくは第1マーカーに対して向けられた第1結合試薬を含有する第1領域および第2マーカーに対して向けられた第2結合試薬を含有する第2領域を含む固体支持体も含む。

【0089】

特に、サンドイッチ形式が用いられることができる。例えば、1種類以上の結合剤が、生物学的試料との接触の前に支持体にコンジュゲートしている。1種類以上の結合剤は、検出分子の役目を果たすために検出可能標識にコンジュゲートしていることができる。他の態様において、1種類以上の結合剤は、検出可能標識にコンジュゲートしている。この構成において、1種類以上の結合剤は、捕捉剤の役目を果たすために生物学的試料との接触の前に支持体にコンジュゲートしていることができる。さらに、1種類以上の結合剤は、生物学的試料との接触の前に支持体にコンジュゲートしていることができ、および/または1種類以上の結合剤は、検出可能標識にコンジュゲートしている。そのような場合、1種類以上の結合剤は、捕捉剤および検出剤のどちらかまたは両方の役目を果たすことができる。

30

【0090】

1種類より多くの分析物またはマーカーが検出される場合、キットは、診断組み合わせキットとして提供されることができ、それは、全ての分析物またはマーカーを1つのキットで測定するのに適した試薬およびツールを組み合わせることが理解されている。そのような組み合わせキットは、1より多くの部分からなることができ、ここで、第1部分は、第1分析物またはマーカーを測定するのに適した検出分子を含むことができ、そして追加の部分（単数または複数）は、追加の分析物またはマーカーを測定するのに適した検出分子を含むことができる。

40

【0091】

診断キットは、特に免疫アッセイにおける使用のために提供され、ここで、検出分子は、免疫反応により分析物またはマーカーに結合する特異的な結合剤である。そのような結

50

合剤は、標的抗原に結合する抗体または抗体断片または抗体様骨格であることができる。

【0092】

適切な免疫アッセイは、ELISA、CIA、RIA、IRMA、凝集アッセイ、免疫クロマトグラフィー、ラテラルフロー免疫クロマトグラフィーアッセイ（例えばディプスティックアッセイ）およびウェスタンブロットのいずれかである。特異的なS.アウレウス表面抗原の存在によりS.アウレウスを同定するための商業的な凝集アッセイが、例えば一夜培養試料に関して利用可能であり、それはクランピング因子またはプロテインA（例えばDry Spot Staphylect Plus、Oxoid; Pastorex Staph Plus検査、Bio-Rad; Slidex Staph-KitおよびSlidex Staph Plus検査、bioMerieux）およびMRSA特異的タンパク質PBP2a（例えばMRSAラテックス検査、Hardy Diagnostics; MRSAスクリーニング検査、Denka Seiken Co. Ltd）の検出を含む。

10

【0093】

当業者には、アルファ溶血素レベルに関する測定のためのそのようなアッセイおよび試験系は、容易に得られる、または生成されることができるとは、明らかである。対応する試験系およびアッセイは、その試験を高められたアルファ溶血素レベルの測定に関して標準化するための対応する調整および評価を必要とする。

【0094】

標的分析物がタンパク質またはポリペプチドを含む態様において、標的の測定は、質量分析ベースのスクリーニング法または質量分析（MS）、ペプチドマスフィンガープリンティング（PMF; タンパク質フィンガープリンティング）、配列決定、N末端アミノ酸分析、C末端アミノ酸分析、エドマン分解、クロマトグラフィー、電気泳動、（二次元）ゲル電気泳動（2Dゲル）、NMR、抗体アレイ、および免疫アッセイの使用を含むことができる。

20

【0095】

特定の診断キットは、関連するオリゴもしくはポリヌクレオチドまたは核酸のレベルを決定するのに適している分子遺伝学アッセイにおける使用のために提供される。一態様において、標的分析物またはマーカーに対応する、またはそれに特異的な核酸配列の増幅は、遺伝子チップマイクロアレイまたはPCRによる。別の態様において、増幅は、RNAのRT-PCRによるか、またはイムノPCRによる。別の態様において、増幅は、カスケード増幅による。別の態様において、増幅は、リガーゼ連鎖反応による。

30

【0096】

特定の態様において、増幅産物の検出は、ゲル電気泳動、例えばアガロースゲル電気泳動による。別の態様において、増幅産物の検出は、核酸プローブまたは他のプローブを用いたハイブリダイゼーションによる。ハイブリダイゼーションは、固相または液相であることができる。ハイブリダイゼーションは、核酸プローブまたは他のプローブを用いたドットハイブリダイゼーションであることができる。ドットハイブリダイゼーションは、放射性ドットプロットまたは非放射性ドットプロットであることができる。ドットハイブリダイゼーションは、ドットプロット微量法または別の方法であることができる。

40

【0097】

別の特定の態様において、増幅産物の検出は、リアルタイム蛍光測定による。別の態様において、増幅産物の検出は、抗RNA:DNAハイブリッド抗体を用いる免疫酵素アッセイによる。別の態様において、増幅産物の検出は、蛍光色素を用いる核酸プローブアッセイおよび/または蛍光色素測光法による。別の態様において、増幅産物の検出は、固定された核酸プローブの使用による。核酸プローブが固定されることができるとは、支持体の例は、マイクロプレート、膜フィルター、細片（strip）、チューブまたはマイクロチップを含む。一態様において、DNAプローブは、固相またはキャリアーに結合している。次いで、標識された増幅産物を、DNAプローブに結合させる。増幅産物は、例えばビオチン、比色定量プローブまたは蛍光色素により標識されることができるとは、次いで、増幅産

50

物の存在が、標識の検出により、または適用可能である場合は標識された増幅産物に結合するかもしくはそれと反応する二次標識（例えばホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、標識された抗ビオチン抗体（ストレプトアビジン）、アビジン、アビジン - ビオチン複合体またはアビジン - ストレプトアビジン複合体）の検出により、検出されることができる。

【0098】

マーカーまたはアルファ溶血素マーカーに関連する用語“レベル”は、本明細書において、好都合には標準レベル、すなわち標準により生成されるレベル、または参照対照レベル、すなわち参照対照により生成されるレベルである参照値よりも大きい生物学的試料中のそのようなマーカーのレベルとして理解され、そのような参照値は、マーカーのカットオフ値であることができる。

10

【0099】

高められたレベルは、例えば参照値より有意に高い。本明細書で用いられるアルファ溶血素マーカーの過剰発現に関する用語“有意な”は、標準偏差の少なくとも2倍高い量、好ましくは少なくとも3倍の差を指すものとする。好ましい定量的決定法において、マーカーの発現は、例えば内部対照として用いられる1以上の参照遺伝子の発現の中央値に対して標準化される。

【0100】

例えば標準、トレーニングデータまたは閾値に由来する特定の参照値に関して、有意に高められた、または増大した量は、少なくとも1.5倍高い量、好ましくは少なくとも2または3倍の差を指すことが理解されている。

20

【0101】

本明細書で用いられる際、用語“カットオフ値”は、疾患または疾患状態を患っている対象をその疾患または疾患状態を患っていない患者および/または対象から区別する、特に疾患または疾患進行の高いリスクのある対象をそのような疾患または疾患進行の高いリスクのない患者および/または対象と区別する閾値を指す。

【0102】

S. アウレウスにより重度にコロニー形成されている対象におけるS. アウレウス疾患または疾患の発症の予測の状況において、アルファ溶血素の高められたレベルは、典型的にはカットオフ値より大きく、アルファ溶血素の高められていないレベルは、カットオフ値未満であるかそれに等しく、それは例えば比較可能な設定において非溶血性株（低発現株も含む）により発現されるアルファ溶血素を反映した値である。

30

【0103】

本明細書で用いられる際、用語“参照”または“対照”は、結論が観察された差または類似性に基づいて合理的に引き出されることができるようなそのような診断アッセイの結果に対する比較を可能にする因子または値であることができる。適切な値は、例えば疾患または疾患進行に関する予測可能性の予め決定されたレベル、例えば後に重篤な疾患の症状または疾患進行を発現した患者の生物学的試料から得られたレベルである。これに関して、陽性の予測値または陰性の予測値が、参照値として用いられることができる。

【0104】

本発明に従って用いられる参照または対照は、特に、無症候性であるがS. アウレウスにより重度にコロニー形成されている（そして抗生物質処置を施される前に経験していた可能性のある）S. アウレウス（特定の場合ではMSSA）によりコロニー形成されている患者からの生物学的試料中のアルファ溶血素のレベルおよび/または濃度を指し、そのような患者は、症候性疾患、特にVATまたはVAPを発症しないことが決定されている。そのような参照または対照の決定は、どれが適切な参照値かを決定するための一連の試料および患者の病歴の評価を含むことができる。対照は、好都合には内部対照または外部対照であることができる。

40

【0105】

レベルは、定量的または半定量的アッセイにおいて決定されることができる。そのよう

50

なアッセイは、典型的には濃度（(w/w)または(w/v)）またはその代わりに参照と比較した結果を示す値、例えば百分率、もしくは“+”、“++”、もしくは“+++”である読み出しを有し、より高い“+”の数は、より高い値を示す。

【0106】

さらなる態様は、アルファ溶血素レベルを測定するための機能アッセイを指す。そのようなアッセイは、標準的な微生物学の方法を用いてヒツジ血液寒天プレート上で培養されたS・アウレウス分離株の溶血パターンを測定することを含み得ると考えられ、ヒツジ血液寒天プレート上での高いベータ溶血パターン(2+、3+または4+)は、ベータ溶血なしまたは低いベータ溶血(1+)と比較して高いH1a活性を示す。

【0107】

アルファ溶血素レベルの決定は、典型的には定性的アッセイのみによるのではなく、これは、その発現レベルの決定を伴わないアルファ溶血素遺伝子の存在または非存在の検出は、疾患または疾患進行の予測にならないと考えられるためである。従って、生物学的試料中またはS・アウレウス分離株中のh1a遺伝子の存在のみを決定するためのアッセイだけでは、患者の疾患または疾患進行のリスクを予測するために十分ではないであろう。しかし、遺伝子産物の発現または過剰発現(すなわち、参照よりも高い発現)は、結果として定量的または半定量的方法により決定されることができそのような予測を示すアルファ溶血素タンパク質レベルをもたらしと考えられ、従って重度にS・アウレウスによりコロニー形成されている患者における疾患発症を予測するであろう。

【0108】

“バイオマーカー”とも呼ばれる本明細書における用語“マーカー”は、疾患の状態または発現を反映する生物学的指標を指すものとするが、必ずしも疾患プロセス自体に含まれない可能性がある。ある早期のS・アウレウス患者において、抗細菌療法は、非常に有効であり、有意に向上した疾患の治癒を提供することができる。そのような療法から最も利益を得られるであろう患者の亜集団を同定するのを助けることができるマーカーを同定および検証するための研究努力がなされている。そのような予測マーカーの利点に加えて、マーカーは、S・アウレウス療法の開発、臨床評価およびモニタリングにおいて重要な役割を果たしている。マーカーは、そのようなマーカーの存在または程度に基づいて層別化およびリスク評価を可能にすることにより患者の選択を助けることができ、処置応答を予測することができる可能性がある。本発明のアルファ溶血素マーカーは、リスクのある患者を可能な限り早期に同定するために好都合に用いられることができる。

【0109】

本発明のアルファ溶血素マーカーは、予測マーカーとして、例えば独立した診断手段として、またはさらなる診断手段、例えば(例えば診断組み合わせキット中の)さらなるマーカーの決定との組み合わせで用いられることができる。

【0110】

特に、本発明のアルファ溶血素マーカーは、モニタリングまたは監視のために用いられることができる。例えば、アルファ溶血素マーカーは、医師が疾患の進行を予測またはモニターするのを支援する監視目的のために用いられることができる。

【0111】

アルファ溶血素マーカーは、アルファ溶血素マーカーおよびさらなるS・アウレウスマーカー、例えばPbp2aおよび/またはSpAの決定を用いる診断組み合わせキットにおいて用いられることもでき、それは独立した診断として提供される(すなわち、それはさらなる診断手段を用いない診断を提供する)。

【0112】

試験試料中のアルファ溶血素レベルがより高いほど、疾患の速い発症の可能性がより高い。例えば、驚くべきことに、(ベースライン値と比較して)より高いアルファ溶血素発現は、VAPまたはVATのより急速な発症と明確に相関していることが分かった。本発明の別の重要な基礎は、アルファ溶血素レベルおよび疾患の発症の相関は、MSSAによりコロニー形成されている患者において高度に有意であるようであることである。従って

10

20

30

40

50

、本発明の方法は、特にS・アウレウスクローンがMSSAであることが(予め)決定されている、またはさらなるMSSAの指標もしくはマーカーもしくはMRSAの指標もしくはマーカーの非存在を示す患者に適用される。

【0113】

用語“疾患の発症”は、特に、対象が診断につながる疾患の症状を発現する時点として理解されている。疾患の発症を予測することにより、対象が疾患が診断される前にそれぞれの療法を受けることができるような、高いリスクを有する疾患にかかりやすい対象を同定する当業者の能力を提供するリスク決定が提供される。

【0114】

マーカーは、マーカーレベルを決定し得るアッセイにより標的とされる分析物として直接決定されることができる。アルファ溶血素は特に、特にMSSAによりコロニー形成されている患者におけるS・アウレウス疾患発症のインビトロマーカーとして理解されている。そのようなインビトロマーカーは、好都合にはインビトロの方法により、例えば患者の生物学的試料において生体外で決定される。

10

【0115】

アルファ溶血素マーカーの他に、定性的、半定量的または定量的アッセイにより、例えば診断組み合わせ法またはキットによりさらに決定される、処置を助けるためのS・アウレウスまたは関係する疾患の発症もしくは疾患の特性付けの他のマーカーが存在することができる。他のマーカーには、病毒性因子、例えば外毒素、内毒素もしくは表面タンパク質、抗生物質耐性マーカー、例えばSCCmecによりコードされるメチシリン、主に可動遺伝要素、例えばベータラクタマーゼ、カナマイシン耐性、エリスロマイシン耐性等の(水平)遺伝子伝播由来の他の耐性遺伝子、特定の細菌構成要素、非タンパク質性因子、例えばWTAおよびLTA、莢膜多糖、細胞毒、病毒性因子、分泌タンパク質および表面タンパク質のいずれかを発現する遺伝子、またはそれぞれの遺伝子発現産物がある。

20

【0116】

S・アウレウスの病毒性は、数多くの病毒性因子の組み合わせにより、それは、細菌が真核細胞膜に接着することを可能にする表面関連タンパク質、莢膜多糖およびそれをオプソニン化貪食作用から保護する表面タンパク質A(SpA)、ならびにいくつかの外毒素を含む。S・アウレウスは、主に分泌型病毒性因子、例えば溶血素、エンテロトキシンおよびトキシックショック症候群毒素の産生により疾患を引き起こす。これらの(分泌型)病毒性因子は、宿主中の多くの細胞性および体液性免疫機序を不活性化することにより免疫応答を抑制し、細胞および組織の破壊を引き起こし、感染の確立を助ける。後者は、例えば一群の孔形成毒素により成し遂げられ、その最も有名なものがHlaである。

30

【0117】

S・アウレウスは、多種多様なさらなる病毒性因子および毒素を産生し、それはこの細菌が異なる種類の免疫細胞、特に体の主要な防御系を構成する白血球の亜集団による攻撃を中和し、それに抵抗することを可能にする。これらの病毒性因子および毒素の産生は、S・アウレウスが病原性状態を維持することを可能にする。これらの病毒性因子の中で、S・アウレウスはいくつかの2構成要素ロイコトキシンを産生し、それは、(例えば栄養素の獲得のために)宿主の防御細胞および赤血球の膜を2つの関連しないタンパク質またはサブユニットの相乗作用により傷害する。これらの2構成要素毒素の中で、ガンマ溶血素(HlgABおよびHlgCB)、LukGH(LukAB)およびLukSF/PVLが、最もよく特性付けられている。

40

【0118】

ロイコシジン類の哺乳類細胞に対する毒性は、2つの構成要素の作用を含む。第1サブユニットは、クラスS構成要素と名付けられており、第2サブユニットは、クラスF構成要素と名付けられている。SおよびFサブユニットは、相乗的に作用して例えば(まとめて食細胞として知られている)単球、マクロファージ、樹状細胞および好中球を含む白血球上に孔を形成する。S・アウレウスにより産生される2構成要素ロイコトキシンのレパートリーは、FおよびS構成要素の同族および非同族の対を含むことが知られており、そ

50

れは例えば H I g A B、H I g C B、L u k S F、L u k E D、L u k G H、L u k S - H I g B、L u k S D、H I g A - L u k D、H I g A - L u k F、L u k G - H I g A、L u k E F、L u k E - H I g B、H I g C - L u k D または H I g C - L u k F を含むガンマ溶血素、P V L 毒素および P V L 様毒素である。

【0119】

一態様において、アルファ溶血素レベルが決定され、加えて M S S A を示す、または M R S A の非存在を示す別のマーカーが決定される。例えば、他のマーカーは、ペニシリン結合タンパク質 2 a (P B P 2 a)、またはその同族遺伝子 (m e c A) もしくは m e c A 遺伝子の発現産物であることができると考えられ、それは M R S A の決定因子である。そのような他のマーカーの非存在は、患者が M S S A によりコロニー形成されていることを示しているであろう。従って、アルファ溶血素レベルが疾患発症の指標として測定され、他のマーカーが S . アウレウスが M S S A であることを示している場合、抗細菌療法の必要が強く示されるであろう。さらなる態様は、生物学的試料中のコロニー形成している細菌が S . アウレウスであることを確認するための、特定の S . アウレウスマーカー、例えば S . アウレウスプロテイン A の別個の検出または並行検出を含む。アルファ溶血素自体が S . アウレウス特異的タンパク質であるが、さらなる S . アウレウスマーカー、例えば S . アウレウスプロテイン A を含めることは、アルファ溶血素に関する陽性信号の非存在下でコロニー形成している細菌としての S . アウレウスの存在を確認するための ' 陽性対照 ' または ' 代替マーカー ' の役目を果たすであろう。

【0120】

用語 " S . アウレウス感染 " は、以下のように理解されている：スタフィロコッカス・アウレウスは、ファーミキューテス門 (F i r m i c u t e s) のメンバーであるグラム陽性球菌であり、ヒトの呼吸気管中および皮膚上で高頻度で見付かる。それはカタラーゼおよび硝酸還元に関して陽性である。S . アウレウスによる無症候性の鼻コロニー形成は一般的であるが、S . アウレウスの保有は院内感染の重要な決定因子である。(M A S S A および M R S A を含む) S . アウレウスの拡散は、一般に人同士の接触による。病原体の伝染は、医療従事者の衛生または消毒 / 汚染除去戦略のどちらかが不十分である医療設定において促進される。細菌の血流中への導入は、心内膜炎、髄膜炎、そしてそれが広範囲に及ぶ場合は敗血症を含むがそれらに限定されない様々な合併症をもたらし得る。

【0121】

V A T は、48 時間以上挿管および機械式人工呼吸されている患者における肺実質組織を含まない気管支樹の急性感染症として定義されている。2 つの条件が存在しなければならない：(i) S . アウレウスの 10^5 C F U / m L 以上に関する陽性 E T A 培養物または中程度もしくは重度 (+ + + (3 +) または + + + + (4 +)) の細菌増殖ならびに (i i) 以下の感染の臨床徴候および症状の少なくとも 2 つ：白血球増加、発熱または低体温、および化膿性呼吸器分泌物。

【0122】

V A P は、最低 48 時間挿管および機械式人工呼吸されている患者における肺実質の急性感染症を表す。3 つの条件が存在しなければならない：(i) S . アウレウスの 10^5 C F U / m L 以上に関する陽性 E T A 培養物または中程度もしくは重度 (+ + + (3 +) または + + + + (4 +)) の細菌増殖、(i i) 以下の感染の臨床徴候および症状の少なくとも 2 つ：白血球増加、発熱または低体温、および化膿性気道分泌物、ならびに (i i i) 胸部 X 線写真または C T スキャンにおける新規の進行性の浸潤の存在。

【0123】

S . アウレウス疾患は、特に S . アウレウス感染により引き起こされる疾患として理解されている。V A T および V A P に加えて、そのような疾患は、局所性および全身性疾患を含む。疾患の重篤な症例は、例えば菌血症、敗血症および敗血症性ショック、肺炎および慢性創傷感染症である。

【0124】

一般に、S . アウレウスにより引き起こされる菌血症は、既知の従来抗細菌療法、例

10

20

30

40

50

えば抗生物質、ステロイド系および非ステロイド系の炎症の阻害剤、ならびに/または免疫療法、例えば1種類以上のS・アウレウス毒素を特異的に認識する抗体を用いる免疫療法、抗細菌もしくは抗炎症剤を用いた処置によりうまく処置されることができ。S・アウレウス感染を有する患者を処置するために用いられる典型的な抗生物質は、チゲサイクリン、リネゾリド、メチシリンおよび/またはバンコマイシンである。

【0125】

しかし、最近の抗生物質耐性細菌の株の出現により、この性質の菌血症の処置は、著しくより難しくなっている。S・アウレウス疾患を発症する患者は、より長い病院およびICU滞在、高い死亡率、およびS・アウレウス疾患を有しない患者よりも大きい医療コストを有する。患者がS・アウレウスにより重度にコロニー形成されている場合にS・アウレウス疾患を(処置するよりむしろ)予防することにより、患者のケアが向上する可能性があり、院内感染が低減する可能性がある。

10

【0126】

用語“対象”は、本明細書で用いられる際、温血哺乳類、特にヒトまたは非ヒト動物を指すものとする。S・アウレウスは、決定的に重要なヒトの病原体であり、それは獣医学においても懸念になりつつある。それは、広い範囲の非ヒト動物種に存在する。従って、用語“対象”は、特にイヌ、ネコ、ウサギ、ウマ、ウシ、ブタおよび家禽を含む動物も指し得る。特に、本発明またはそれぞれの処置の方法の医学的使用は、S・アウレウス感染と関係する疾患状態の予防または処置を必要とする対象に適用される。対象は、S・アウレウス感染のリスクのある、または早期もしくは後期の疾患を含む疾患を患っている患者であることができる。用語“患者”は、予防的または療法的処置のどちらかを受けるヒトおよび他の哺乳類の対象を含む。従って、用語“処置”は、予防および療法的処置の両方を含むことを意味する。

20

【0127】

対象は、例えばS・アウレウス疾患状態の予防または療法のために処置される。特に、感染もしくはそのような疾患の発現もしくは疾患の再発のいずれかのリスクのある対象、またはそのような感染および/もしくはそのような感染と関係する疾患を患っている対象が、処置される。

【0128】

具体的には、用語“予防”は、発病の開始の防止を包含することが意図されている防止手段または発病のリスクを低減するための予防手段を指す。

30

具体的には、処置は、病気の起因としてのS・アウレウスの病態形成を妨げることによってでき、ここで、発病は、対象の細胞膜上に例えば特定の病毒性因子または毒素により孔を形成する工程を含む。

【0129】

従って、本発明は、専門家が、重度にコロニー形成されている患者がS・アウレウス感染症を発現しそうであるかどうか、そしてコロニー形成している細菌により引き起こされる疾患が速いか遅いか、またはS・アウレウスのコロニー形成が速いもしくは遅い疾患発症の可能性を有するかどうかを判定するための方法および診断ツールを提供する。生物学的試料およびS・アウレウス分離株のアルファ溶血素レベルは、病毒性を驚くほど予測することが分かった。これは、S・アウレウスによりコロニー形成された患者(ヒトならびにヒトではない患者)の医学的状态を改善するために取られる臨床的手段は、どのようにその疾患が発現または進行するであろうかの可能な限り早期の予測に依存するため、特に重要である。要するに、本発明は、アルファ溶血素レベル(および/またはMSSAの指標)およびS・アウレウスにより引き起こされる疾患の発症の間の明確かつ強い相関が引き出され得るという教示を提供する。

40

【0130】

S・アウレウスにより重度にコロニー形成されている人工呼吸されている患者の一連の試料採取により得られた気管内吸引物(ETA)からのS・アウレウス分離株は、VATまたはVAPの発症を示し得ることが分かった。一例によれば、人工呼吸されている患者

50

液、肺タップ、鼻スワブまたは痰からなる群より選択される体液または組織試料である方法。

【0139】

7. 定義1～6のいずれかの方法であって、前記の該アルファ溶血素レベルの決定が、アルファ溶血素の発現または活性の半定量的または定量的測定を含む方法。

8. 定義1～7のいずれかの方法であって、アルファ溶血素のレベルが、免疫アッセイ、好ましくはELISA、CIA、RIA、IRMA、凝集アッセイ、免疫クロマトグラフィー、ラテラルフロー免疫クロマトグラフィーアッセイ（例えばディプスティックアッセイ）およびウェスタンブロットのいずれか、質量分析、NMR、またはアルファ溶血素を示す対応するDNAもしくはRNAを好ましくは核酸ハイブリダイゼーションアッセイもしくは核酸増幅アッセイを用いて決定する方法により決定される方法。

10

【0140】

9. 定義1～8のいずれかの方法であって、前記の標準または参照対照が、S. アウレウス疾患の発症もしくは疾患進行を示す、または低い、中程度のもしくは高いアルファ溶血素を発現するS. アウレウス株から得られた、予め決定されたアルファ溶血素レベルである方法。

【0141】

10. 定義9の方法であって、該標準または参照対照が、アルファ溶血素を発現していない、または低レベルのアルファ溶血素を発現しているS. アウレウスにより発現されるアルファ溶血素レベルよりも高い予め決定されたアルファ溶血素の量または活性である方法。

20

【0142】

11. 定義1～10のいずれかの方法であって、S. アウレウスのコロニー形成を示す少なくとも1種類の追加のマーカーの測定をさらに含む方法。

12. 定義11の方法であって、前記の少なくとも1種類の追加のマーカーの測定が、アルファ溶血素以外のいずれかのS. アウレウス特異的細菌構成要素を発現する遺伝子またはいずれかのS. アウレウス特異的細菌構成要素のそれぞれの遺伝子発現産物の決定を含み、それが好ましくは以下：

i) S. アウレウスプロテインA；

ii) S. アウレウスの抗生物質耐性マーカー、好ましくは少なくともPBP2a、mecA遺伝子またはmecA遺伝子の発現産物のいずれか；

30

iii) S. アウレウスの細胞毒、好ましくはPVL/LukSF、LukGH(LukAB)、ガンマ溶血素、LukEDを含むあらゆる他のS. アウレウス抗原；S. アウレウス病毒性因子、分泌タンパク質および表面タンパク質；またはあらゆるS. アウレウス特異的化合物、例えばリポテイコ酸、ならびに

iii) 好ましくは追加のマーカーとして少なくともS. アウレウスプロテインAおよびPBP2aを決定する、i)、ii)および/またはiii)の細菌構成要素のいずれかの組み合わせ；

からなる群より選択される方法。

【0143】

13. S. アウレウスにより重度にコロニー形成されているがS. アウレウス疾患の症状を一切示していない対象における人工呼吸器関連呼吸器感染症、気管気管支炎または肺炎の発症に関するインビトロマーカーとしてのアルファ溶血素の使用。

40

【0144】

14. S. アウレウスにより重度にコロニー形成されているがS. アウレウス疾患の症状を一切示していない対象における人工呼吸器関連呼吸器感染症、気管気管支炎または肺炎の疾患発症を決定するための診断組成物の調製のためのアルファ溶血素に関する特異的検出分子の使用。

【0145】

15. 定義14の使用であって、該検出分子が、抗体、抗体断片、細胞受容体もしくは

50

リガンド、またはアルファ溶血素遺伝子もしくは前記の遺伝子の発現産物にハイブリダイズするヌクレオチド配列からなる群より選択されるアルファ溶血素結合剤である使用。

【0146】

16. 定義1~12のいずれかの方法におけるアルファ溶血素診断キットの使用であって、好ましくは該キットがアルファ溶血素に関する特異的検出分子を含む使用。

17. S. アウレウスアルファ溶血素発現産物と特異的に反応することができる1種類以上の試薬および/またはアルファ溶血素のレベルを決定するのに適した特異的検出分子を含むアルファ溶血素診断キットであって、貯蔵安定形態で、好ましくは包装された単位として提供されるアルファ溶血素診断キット。

【0147】

本発明は、以下の実施例によりさらに説明される(それに限定されない)。

【実施例】

【0148】

実施例1：メチシリン感受性S. アウレウスのアルファ溶血素活性は、人工呼吸器関連肺炎を予測する

h1a発現を欠く同質遺伝子的S. アウレウス遺伝子欠失変異体の生成

同質遺伝子的S. アウレウスh1a遺伝子欠失変異体が、配列決定されたUSA300 CA-MRSA株TCH1516(ATCC(登録商標)BAA1717(商標)、LGC Standards、テディントン、英国)において、以前に公開された方法[15]に基づく相同組み換えにより、表1において列挙されているプライマー対および以前に報告された大腸菌およびS. アウレウスに関するシャトルベクターであるpKFT遺伝子欠失ベクター[16]を用いて生成された。

【0149】

【表1】

表1：用いられたプライマー(酵素制限部位：下線；フュージョンオーバーラップ：斜

体)

目的	座位タイプ	プライマー	ヌクレオチド配列(5'-3')
遺伝子型分類	hla	LST_0001	CTGTCGCTAATGCGCAGATTC (SEQ ID 3)
		LST_0002	GAAGTCCAGTGCAATTGGTAGTC (SEQ ID 4)
遺伝子削除	hla	ko-LST_0041	CCGCGGATCCCTATTAGATATTTCTATGTAATGGC (SEQ ID 5)
		ko-LST_0042	CCCATCCACTAAACTTAAACACATCATCCTTCTATTTTTTAAACG (SEQ ID 6)
		ko-LST_0043	TGTTTAAGTTTAGTGGATGGGGTAAATTATTTGTTTCATGTACAAA (SEQ ID 7)
		ko-LST_0044	TGGCACCCGGGCGTTAATTTCCAATCATTAATAAACCC (SEQ ID 8)

【0150】

血液寒天溶血試験

S. アウレウス分離株を、5%ヒツジ血液を含有するコロンビア寒天(COS、bio Merieux、マルシーレトワール、フランス)上で37℃において16時間培養した。溶血プロフィールを、その後の48℃において24時間のインキュベーション後に評価した。この試験は、同じ分離株の3つの異なるクローンを用いて実施され、結果は異なる3人により評価された。

【0151】

ヒト肺胞上皮細胞株A549を用いたS. アウレウス培養上清の細胞毒性の評価

細胞毒性アッセイを、ヒト肺胞上皮細胞株(A549 ATCC(登録商標)CCL-185(商標)、LGC Standards、テディントン、英国)およびトリブチッ

10

20

30

40

50

クソイブロス (TSB、Sigma-Aldrich、シュタインハイム、ドイツ) 中で一夜増殖させた細菌の細菌培養上清を用いて実施した。

【0152】

細胞を、 175 cm^2 組織培養処理済み細胞培養フラスコ中で、 $1\times$ ペニシリン-ストレプトマイシン溶液 ($10\times$ ストック、PAA Laboratories、バッシング、オーストリア) および 10% ウシ胎児血清 (FCS、Sigma-Aldrich) を補ったハム F12-K 培地 (Gibco (登録商標)、Life Technologies、パイズリー、英国) 中で接着培養として増殖させた。細胞毒性アッセイのために、 2×10^4 個の細胞を、実験の 16 時間前に 96 ウェルハーフエリアプレート中に細胞培養培地中でまいた。実験の日に、細胞培養培地を除去し、 $50\ \mu\text{l}$ の細菌培養上清 (TSB 中での系列希釈) を添加した。細胞を培養 (3 時間、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$) した後培地を除去し、 $100\ \mu\text{l}$ の細胞培養培地で洗浄し、 $50\ \mu\text{l}$ の新しい細胞培養培地 (F12-K 培地 + $5\% \text{FCS}$) 中で培養した (3 時間、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$)。細胞生存度を、マイクロプレートリーダー (Synergy HT、BioTek、バート・フリードリヒスハル、ドイツ) において $590/35\text{ nm}$ で測定した (Cell Titer-Glo (登録商標) 発光細胞生存度アッセイキット、Promega、米国 Wisconsin マディソン)。アッセイデータを “細胞溶解性指数” として表し、これは、Prism 6 (GraphPad、米国カリフォルニア州ラホヤ) ソフトウェアパッケージを用いて決定された力価測定曲線に基づいて計算された最大値の半分の細胞溶解に達するために必要とされる培養上清の希釈倍率を表す。統計分析は、Prism 6 ソフトウェアパッケージを用いて実施された。クラスカル・ワオリス (ノンパラメトリック) 検定を、有意性に関する包括的な検定として適用した。 $P < 0.05$ が包括的な検定により得られた (p 値として示された) 場合、個々の群を、ウィルコクソンの符号順位検定により統計的に比較した。H1a 阻害実験のために、細菌培養上清を細胞とのインキュベーションの前に一定濃度 ($10\ \mu\text{g}/\text{ml}$; $66.67\ \text{nM}$) の単一特異性モノクローナル抗 H1a 抗体 (Arsanis Biosciences、ウィーン、オーストリア; あるいは、いずれかの特異的な抗アルファ溶血素モノクローナル抗体または商業的に入手可能な、例えば IBT からカタログ番号 04-0010 で入手可能な抗溶血素抗体が、用いられることができる) と共にプレインキュベートした。パーセント細胞生存度をモック処理した細胞と比較して計算し、組み換え H1a およびイソ型を合わせた対照 mAb がそれぞれ陽性および陰性アッセイ対照として含まれた。

10

20

30

【0153】

ヒツジ血液寒天溶血パターン

S. アウレウス分離株をヒツジ血液寒天上で培養した際、我々は、広い範囲の溶血活性を検出した (図 1)。分離株の大部分は、ベータ溶血を引き起こすアルファ溶血素 (H1a) に特徴的な溶血パターンおよびヒツジ血液寒天プレート上での透明なハローを示した。少数の分離株は、濁ったハローを伴う溶血を示し、それは S. アウレウスのベータ溶血素 (H1b) 産生に典型的である。これらの分離株における機能する h1b 遺伝子の存在は、PCR により確認された (データは示していない)。報告されたヒツジ血液寒天溶血試験は、アルファ溶血素活性を測定するためにルーチン的な微生物学実験室において実施

40

【0154】

S. アウレウス培養上清中の H1a 活性は、ヒト肺上皮細胞株を用いる細胞毒性アッセイにより特異的に決定されることができる

H1a のインビトロ活性を決定するため、我々は、H1a に関する A549 細胞毒性アッセイの特異性を評価した。これは、以下: (i) h1a 遺伝子欠失変異体 S. アウレウス株 (TCH1516、USA300) による細胞溶解の喪失により (図 2A)、および (ii) ヒツジ血液寒天アッセイにより決定されるような種々の強くベータ溶解性の S. アウレウスクローンの培養上清を用いて H1a 中和モノクローナル抗体の存在下で (図 2B); の 2 つの方法で実証された。

50

【0155】

これらのデータは、H1a活性に向けられたA549細胞毒性の特異性を反映しており、従って、それは、S.アウレウス分離株のH1aに誘導される病毒性に関するバイオマーカーとしてのH1a活性の評価を支持することができる。

【0156】

S.アウレウスのH1a活性は、ヒツジ血液寒天溶血アッセイおよびA549細胞毒性アッセイの両方により測定され、相互に関連付けられることができる。

ヒツジ血液寒天上でのベータ溶血プロフィールをアルファ溶血素活性と相互に関連付けるため、我々は、系列希釈されたS.アウレウス分離株からの一夜培養上清の細胞溶解能力を、ヒト肺胞上皮細胞株(A549)を用いて決定した。

10

【0157】

血液寒天溶血に類似して、A549生存度アッセイにおいて測定されたアルファ溶血素活性における大きなバリエーションが、S.アウレウス分離株の間で観察され、重要なことに、それは2種類のアッセイの間で良好な相関を有していた(図3A)。

【0158】

VAP患者から得られたMSSA株は、群の中央値に基づいてVAT($P = 0.0313$)またはコロニー形成された患者(図3B)から得られた株よりも細胞毒性が大きいことが分かり、後者に関して、ノンパラメトリッククラスカル・ワオリス検定により評価した場合、おそらく低い試料数のために統計的有意性に達していなかった。

20

【0159】

これらの結果は、高度に溶血性の株の保有は、VAPに関する強い相関因子であることの証拠を提供する。

VAPの診断は、VATと明確に区別されていない。特にVAPの診断(VATに加えて胸部X線写真上の新規または進行性の浸潤の診断)は困難である可能性があり、時々強固な診断を見出すために数人の専門家による胸部X線写真の解釈を必要とする。さらに、それぞれのVAPまたはVATの診断に関するデータの提供において地域差が存在する。従って、本発明の主題は、VAPおよび/またはVATに言及する。

【0160】

データは、さらに、H1aの活性が(i)ヒツジ血液寒天溶血ならびにA549肺上皮細胞アッセイにより良好な相関を伴って決定されることができ、そして(ii)MSSA分離株によりコロニー形成された人工呼吸されている患者におけるVAPに関する強力な予測因子の役目を果たすという発見を支持する。本結果は、(例えば重度のコロニー形成において)増進された疾患が、高度に溶血性のMSSA株と強く関係しているという証拠を提供する。特定の症例において、MRSA株は高レベルの毒素(単数または複数)も発現している可能性がある。従って、本結果は、高度に溶血性のMRSA株との相関をさらに支持するであろう。

30

【0161】

これらの発見は、標的化された抗生物質療法のより早期の使用による患者の転帰を向上させるためのより早期の療法の開始を促進することができ、それは向上した患者の転帰、例えば人工呼吸器日数およびICU滞在の長さの短縮に変換され得る。

40

【0162】

検出可能な重度の気道コロニー形成は、疾患の発現に関する必要条件である。従って、対応する症状を示していない無症候性の患者でさえも、なおそのような症状および疾患を発現する高いリスクがある可能性がある。そのようなリスクが早い時点で検出されることができ、それは早期の診断および処置の開始を著しく支援する。

【0163】

実施例2：生物学的試料の調製

患者から得られた痰または気管内吸引物試料の評価の前に、試料をN-アセチルシステインを含有する緩衝液中で安定化してムコイドを低減する。ヒトの血液および血清試料は、標準的な採血手順により、場合により抗凝固剤、例えばLi-ヘパリンまたはK₂-E

50

D T A が補われた無菌の採取チューブ中に得られる。尿および便試料は、それらが患者から採取されたままで直接用いられることができる。アルファ溶血素の検出のため、試料は、下流の適用、例えばタンパク質検出および/またはヌクレオチド検出法に適した緩衝液中で希釈されることができる。

【0164】

実施例3：アルファ溶血素アッセイ

アルファ溶血素タンパク質のE L I S A ベースの検出

この手順は、細菌試料、例えば培養物（上清）および/またはヒトの生物学的試料、例えば気管内吸引物からのタンパク質（H1a）としてのアルファ溶血素のE L I S A ベースの検出を例示する。

10

【0165】

H1aの検出のため、適切な平底96ウェルプレート（例えばMaxiSorp（登録商標）、Nunc）を、対応する試料物質の系列倍率希釈物および精製された組み換え発現されたH1a（定量化のため）で2通りまたは3通りでコートする。希釈物は、コーティング緩衝液、例えばリン酸緩衝生理食塩水（PBS）中で調製される。最適なコーティング効率を可能にするために、プレートを4でおおよそ16時間インキュベートする。コーティング溶液を除去した後、プレートをブロッキング溶液（例えば200 μ lのPBS中2%ウシ血清アルブミン（BSA））の添加および室温で少なくとも1時間のインキュベーションによりブロッキングする。3回の洗浄サイクル（例えば3回の200 μ lのPBS中0.005%Tween）の後、プレートを抗H1a mAb希釈液（例えば0.05% Tweenを補った1% BSA中で1 μ g/mlで希釈したmAbを100 μ l）と共に室温で1時間インキュベートする。3回の洗浄サイクル（上記の手順と同じ手順）の後、二次検出抗体（抗H1a mAb（例えば、あらゆる特異的な抗アルファ溶血素モノクローナル抗体または商業的に入手可能な、例えばIBTからカタログ番号04-0010で入手可能な抗溶血素抗体）の定常ドメインに種が合っており、かつ例えばホースラディッシュペルオキシダーゼ（HRP）または蛍光色素とコンジュゲートしている二次検出抗体；例えば0.05% Tweenを補った1% BSA中で1:5000希釈したものを100 μ l）を、室温で1時間のインキュベーションのために用いる。別の洗浄サイクル（上記の手順と同じ手順）の後、(i) 現像溶液（例えばHRPとの酵素反応に関してABTS）を添加し、室温で暗所において20分間インキュベートし、反応を硫酸で停止した後、405nmにおける呈色反応の吸収を読み取るか、または(ii) 蛍光強度を直接測定するか（吸収および発光スペクトルは、抗体コンジュゲーションのために用いられた蛍光色素に依存する）のどちらかを行う。用いられた組み換えH1aによる標準校正から得られた信号に線形回帰分析を適用して、試験試料中のH1aの量が定量化されることができる。

20

30

【0166】

アルファ溶血素遺伝子およびその発現の（定量的リアルタイムRT-）PCRベースの検出

h1a（遺伝子および/または転写産物）の（定量的リアルタイムRT-）PCRベースの検出のための鑄型として、DNAまたはRNAを、S.アウレウスから単離する（コロニーPCRを直接適用するか、または高品質精製法を適用した後鑄型をPCRにかけることによる）。遺伝子特異的プライマー（当該技術で既知であるような分子生物学技法を用いて設計された、h1a遺伝子およびハウスキーピング遺伝子、例えば16S RNAを増幅するためのプライマー）をPCRベースの増幅反応において用いて、h1a遺伝子が増幅されることができ、アンプリコンが（例えば反応をアガロースゲル上で進ませてインターカレートするDNA色素で染色することにより）可視化されることができる。定量的（q）-PCRに関して、h1aの転写産物（RNA）が転写されてcDNAになり（逆転写、RT）、続いて増幅される。q-PCR工程における定量化のため、蛍光プローブ（例えばSYBRグリーン、TaqManプローブ）が用いられ、ここで、指数関数的増幅の間に得られる蛍光信号は、リアルタイムで増幅されているDNAの量と相関してい

40

50

る。この定量化は、異なる生物学的試料中の h l a 遺伝子の特異的発現プロファイリングを可能にするが、試験される可能性のある S . アウレウスの異なる増殖相および異なる増殖条件における h l a 遺伝子の特異的発現プロファイリングも可能にする。

【 0 1 6 7 】

アルファ溶血素タンパク質の検出のための機能アッセイ

H l a の発現を識別および半定量化する機能アッセイ試験は、血液寒天溶血の決定の詳細な記載に則している。このアッセイにおいて、H l a 活性が容易に測定されることができ、2 +、3 +、または 4 + の読み出し (図 1) は、高い H l a 活性を示しており、疾患進行に相互に関連付けられることができる。

【 0 1 6 8 】

実施例 4 : 診断組み合わせキット

診断組み合わせキットは、S . アウレウス感染および疾患と関係するタンパク質性および非タンパク質性細菌因子の検出のために用いられることができる。この診断キットは、例えば、以下のように例示されるラテラルフロー免疫クロマトグラフィーアッセイ (例えばディップスティック試験) 形式において用いられることができる。

【 0 1 6 9 】

組み合わせられた形式において試験されるべき可能性のある細菌抗原標的は、(i) 重度にコロニー形成された患者における S . アウレウス感染症の重症度および S . アウレウス疾患の発症に関する予測に関するバイオマーカーとしてのアルファ溶血素、(i i) M S S A および M R S A 株の間の識別を可能にするメチシリン耐性マーカーである P B P 2 a、ならびに (i i i) 採取された試料中で検出され得る他のグラム陽性病原体に同時感染している患者からの S . アウレウスのコロニー形成の確証および / または S . アウレウスの特異的検出も可能にする細胞壁構成要素、例えばリポテイコ酸もしくは細胞壁テイコ酸、または細胞表面の S . アウレウス特異的プロテイン A であり得る。これらの抗原は、例えば集中治療室中の人工呼吸されている患者から気管支肺胞洗浄によりルーチンの採取されている E T A 試料中で検出される可能性がある。代替りの設定では、その抗原は、血液、血清、痰、尿および便を含む病院設定においてルーチ的に採取されている他の体液からも検出され得る。特異的なモノクローナル抗体が、上記で列挙された抗原の存在または非存在を検出するために単独または組み合わせのどちらかで用いられるであろう。

【 0 1 7 0 】

ディップスティック形式において、試験細片は、検出されるべき S . アウレウス抗原と特異的に反応する物質または試薬、例えば単一特異性のモノクローナル抗体を含浸させたパッドを有する紙またはプラスチックで作られたリボンからなることができる。ラテラルフローアッセイが正しく機能していることを確認するために、分析されている体液に特異的な抗原の検出を可能にする陽性対照が含まれることができるであろう。ディップスティックは、S . アウレウス関連因子の存在または非存在のみを決定する定性的細片、または定性的読み出しの提供に加えて呈色反応が試料中の試験されている物質の濃度におおよそ比例している定量的な結果の推定も提供する半定量的細片として用いられ得る。細片を、分析されている体液の十分に混合された試料中に部分的または完全に短時間浸し、容器から取り出し、細片の縁をその口の上で支えて過剰な試料を除去する。この後、室温で数分間インキュベートした後、その色を細片と一緒に提供されたカラースケールに対して比較することにより、結果を読み取る。半定量的読み出しのため、例えば呈色反応の強度を細片と一緒に提供された標準化されたカラースケールに対して比較し、例えば微量、1 +、2 +、3 + および 4 + ならびに / またはそれぞれの検出された因子の例えばミリグラム / デシリットルでの推定量として報告することができる。

【 0 1 7 1 】

特定のアッセイ形式 (例えばラテラルフロー形式) において、細片を、分析されている体液の十分に混合された試料中に部分的に短時間浸し、容器から取り出す。この後、試料が含浸させたパッドへと流れることを可能にするために室温で数分間インキュベートした後、結果を読み取る。結果は、操作者により読み取られ、S . アウレウスマーカーが、例

10

20

30

40

50

えばアッセイ細片上の指定された位置における目に見えるバンドとして定性的に検出される。

【 0 1 7 2 】

特定のアッセイ形式において、読み出しは、例えばアッセイの読み出しとしてデジタル化されたシステムを用いて自動化されることもでき、従って診療所において高度に標準化されることもできる。一例として、試験試料は、試験細片に吸収されて毛細管力により反応領域に輸送され - ここで反応（大抵は化学反応）が起こり、この反応により生成された電子が電気化学的に決定される（電流測定または比色分析）。

【 0 1 7 3 】

あるいは、検出抗体は、“センサー”上に固定され、分析物を直接検出する。

10

参考文献

【 0 1 7 4 】

【 化 1 】

1. Bassetti M, Taramasso L, Giacobbe DR, Pelosi P. Management of ventilator-associated pneumonia: epidemiology, diagnosis and antimicrobial therapy. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2012; 10:585-596.

2. Valencia M, Torres A. Ventilator-associated pneumonia. *Curr Opin Crit Care* 2009; 15:30-35. Review.

3. Kollef MH, Hamilton CW, Ernst FR. Economic impact of ventilator-associated pneumonia in a large matched cohort. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2012; 33:250-256.

20

4. Craven DE, Lei Y, Ruthazer R, Sarwar A, Hudcova J. Incidence and outcomes of ventilator-associated tracheobronchitis and pneumonia. *Am J Med* 2013; 126:542-549.

5. Dallas J, Skrupky L, Abebe N, Boyle WA 3rd, Kollef MH. Ventilator-associated tracheobronchitis in a mixed surgical and medical ICU population. *Chest* 2011; 139:513-518.

30

6. Grgurich PE, Hudcova J, Lei Y, Sarwar A, Craven DE. Diagnosis of ventilator-associated pneumonia: controversies and working toward a gold standard. *Curr Opin Infect Dis* 2013; 26:140-150.

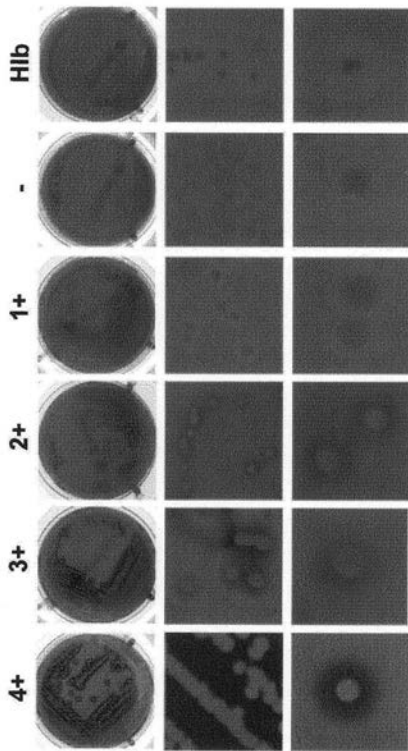
【 0 1 7 5 】

【化 2】

7. Nseir S, Favory R, Jozefowicz E, Decamps F, Dewavrin F, Brunin G, Di Pompeo C, Mathieu D, Durocher A. Antimicrobial treatment for ventilator-associated tracheobronchitis: a randomized, controlled, multicenter study. *Crit Care* 2008; 12:R62.
8. Watkins RR, David MZ, Salata RA. Current concepts on the virulence mechanisms of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol* 2012; 61:1179-1193.
9. Tong SY, Chen LF, Fowler VG Jr. Colonization, pathogenicity, host susceptibility, and therapeutics for *Staphylococcus aureus*: what is the clinical relevance? *Semin Immunopathol* 2012; 34:185-200. 10
10. Berube BJ, Bubeck Wardenburg J. *Staphylococcus aureus* α -toxin: nearly a century of intrigue. *Toxins (Basel)* 2013; 5:1140-1166.
11. Bubeck Wardenburg J, Schneewind O. Vaccine protection against *Staphylococcus aureus* pneumonia. *J Exp Med* 2008; 205:287-294.
12. Foletti D, Strop P, Shaughnessy L, Hasa-Moreno A, Casas MG, Russel M, Bee C, Wu S, Pham A, Zeng Z, Pons J, Rajpal A, Shelton D. Mechanism of action and *in vivo* efficacy of a human-derived antibody against *Staphylococcus aureus* α -hemolysin. *J Mol Biol* 2013; 425:1641-1654. 20
13. Hua L, Hilliard JJ, Shi Y, Tkaczyk C, Cheng LI, Yu X, Datta V, Ren S, Feng H, Zinsou R, Keller A, O'Day T, Du Q, Cheng L, Damschroder M, Robbie G, Suzich J, Stover CK, Sellman BR. Assessment of anti-alpha toxin mAb for prevention and treatment of *Staphylococcus aureus* induced pneumonia. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 58:1108-1117
14. Cheung GYC, Otto M. The potential use of toxin antibodies as a strategy for controlling acute *Staphylococcus aureus* infections. *Expert Opin Ther Targets* 2012; 16:601-612. 30
15. McNamara PJ. Genetic Manipulation of *Staphylococcus aureus*. In: Lindsay JA, editor. *Staphylococcus: Molecular Genetics*, 1st ed., Norfolk, UK: Caister Academic Press; 2008. p. 100-102.
16. Kato K, Sugai M. A simple method of markerless gene deletion in *Staphylococcus aureus*. *J. Microbiol. Methods* 2011; 87:76-81.

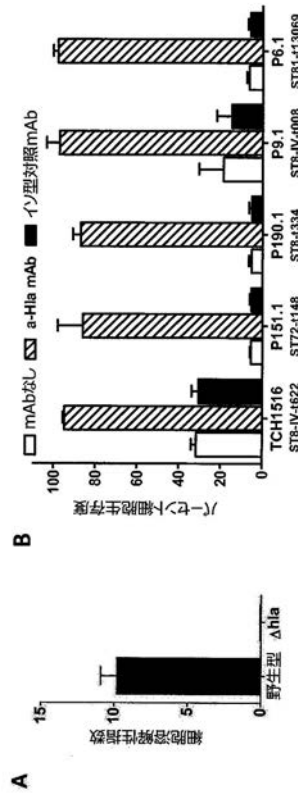
【 図 1 】

Fig. 1



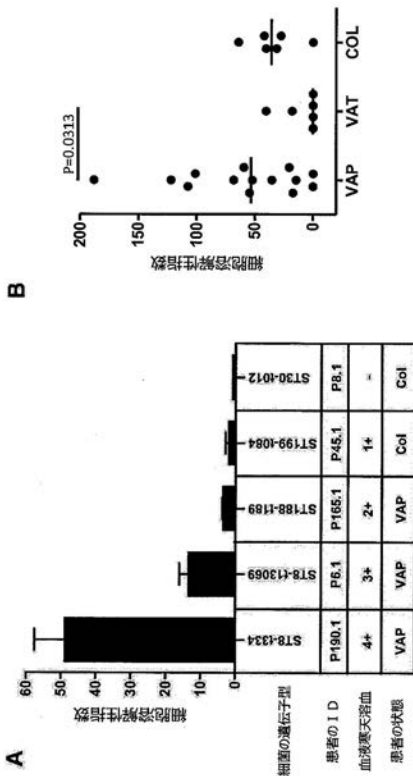
【 図 2 】

Fig. 2



【 図 3 】

Fig. 3



【 図 4 】

Fig. 4

SEQ ID 1

```

ATGAAAACACGTATAGTCAGCTCAGTAACAACAACACTATTGCTAGGTTCCATATT
AATGAATCCTGTGCCTAATGCCGAGATTCTGATTAATATATAAACCGGTACTA
CAGATATTGGAAGCAATACTACAGTAAAAACAGGTGATTTAGTCACTTATGATAAA
GAAAAATGCGATGCACAAAAAGTATTTTATAGTTTATCGATGATAAAAATCATAAT
AAAAACTGCTAGTTATTAGAAGCAAAAGTACCATTGCTGGTCAATATAGAGTTTA
TAGCGAAGAAGGTGCTAACAAAAGTGGTTTAGCCTGGCCTTCAGCCTTTAAGGTA
CAGTTGCAACTACCTGATAATGAAGTAGCTCAAAATCTGATTACTATCCAAGAAA
TTGATTGATACAAAAGAGTATATGAGTACTTTAACTTATGGATTCAACGGTAATGT
TACTGGTGATGATACAGAAAAATTGGCGCCTTATTGGTCAAAATGTTTCGATTG
GTCATACACTGAAATATGTTCAACCTGATTTCAAAAATTTAGAGAGCCCAACT
GATAAAAAAGTAGGCTGGAAAGTGATATTAACAATATGGTGAATCAAAATGGGG
ACCATATGATAGAGATTCTTGAACCCGGTATATGGCAATCAACTTTTCATGAAAA
CTAGAAATGGCTCTATGAAAGCAGCAGATAACTTCCTTGATCCTAACAAAGCAAGT
TCTCTATTATCTTCAGGGTTTTCACCAGACTTCGCTACAGTTATTACTATGGATAGA
AAAGCATCCAAAACAACAATAATAGATGTAATATACGAACGAGTTCGTGATGA
CTACCAATTGCACTGGACTTCAACAAATGGAAAGGTACCAATACTAAAGATAAAT
GGATAGATCGTTCTTCAGAAAAGATATAAAATCGATTGGGAAAAAGAAATGACA
AATTA

```

SEQ ID 2:

```

MKTRIVSSVTTLLLSILMNPVANAADSDINIKTGTTDGSNTTVKTGDLVTDYKENG
MHKVFYYSFIDDKNHKLLVIRTGTIAGQYRVYSEEGANKSGLAWPSAFKVLQLLP
DNEVAQISDYPRNSIDTKEYMSTLTYGFNGNVTGDDTGKIGLIGANVSIGHTLKYV
QPDFKTILESPTDKKVGWVIFNNMVNQNWGPYDRDSWNPVYGNLQFMKTRNGSM
KAADNFDPNKASSLLSSGFSPDFATVITMDRKASKQQTNIIDVIYERVDYQLHWTS
TNWKGNTNKDKWIDRSSERYKIDWEKEEMTN*

```

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2015/068536

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/569 C12Q1/68 ADD.		
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) G01N C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, COMPENDEX, EMBASE, FSTA, INSPEC		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	STULIK LUKAS ET AL: "[alpha]-Hemolysin activity of methicillin-susceptible Staphylococcus aureus predicts ventilator-associated pneumonia", AMERICAN JOURNAL OF RESPIRATORY AND CRITICAL CARE MEDICINE, AMERICAN THORACIC SOCIETY, UNITED STATES, vol. 190, no. 10, 15 November 2014 (2014-11-15), pages 1139-1148, XP008174843, ISSN: 1535-4970, DOI: 10.1164/RCCM.201406-10120C the whole document ----- -/--	1-19
<input checked="" type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of Box C.	<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents :		
<p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>		<p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
Date of the actual completion of the international search 6 October 2015		Date of mailing of the international search report 19/10/2015
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Adida, Anne

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2015/068536

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	ARROLIGA ALEJANDRO C ET AL: "Back to the future: [alpha]-hemolysin activity on blood agar to predict ventilator-associated pneumonia caused by Staphylococcus aureus", AMERICAN JOURNAL OF RESPIRATORY AND CRITICAL CARE MEDICINE, AMERICAN THORACIC SOCIETY, UNITED STATES, vol. 190, no. 10, 15 November 2014 (2014-11-15), pages 1086-1088, XP008174842, ISSN: 1535-4970, DOI: 10.1164/RCCM.201410-1886ED the whole document	1-19
A	WO 2012/109285 A2 (MEDIMMUNE LLC [US]; SELLMAN BRET [US]; TKACZYK CHRISTINE [US]; HUA LEI) 16 August 2012 (2012-08-16) cited in the application page 79, paragraph 3 - page 81, paragraph 1 pages 63,64	1-19
A	ANA TAVARES ET AL: "Insights into Alpha-Hemolysin (Hla) Evolution and Expression among Staphylococcus aureus Clones with Hospital and Community Origin", PLOS ONE, vol. 9, no. 7, 17 July 2014 (2014-07-17), page e98634, XP055169077, DOI: 10.1371/journal.pone.0098634 abstract paragraph [discussion]	1-15
A	DENNIS L STEVENS ET AL: "Impact of Antibiotics on Expression of Virulence-Associated Exotoxin Genes in Methicillin-Sensitive and Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus", THE JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES, vol. 11, 18 December 2006 (2006-12-18), pages 195-202, XP055168873, abstract page 204, left-hand column, paragraph 3 - paragraph 4	1-19

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2015/068536

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>A. CONWAY MORRIS ET AL: "Diagnostic importance of pulmonary interleukin-1 and interleukin-8 in ventilator-associated pneumonia", THORAX, vol. 65, no. 3, 12 October 2009 (2009-10-12), pages 201-207, XP055168881, ISSN: 0040-6376, DOI: 10.1136/thx.2009.122291 the whole document -----</p>	1-15
A	<p>NELE BRUSSELAERS ET AL: "Value of lower respiratory tract surveillance cultures to predict bacterial pathogens in ventilator-associated pneumonia: systematic review and diagnostic test accuracy meta-analysis", INTENSIVE CARE MEDICINE, vol. 39, no. 3, 1 March 2013 (2013-03-01), pages 365-375, XP055169057, ISSN: 0342-4642, DOI: 10.1007/s00134-012-2759-x the whole document -----</p>	1-15
A	<p>CHEUNG G Y C AND OTTO M: "The potential use of toxin antibodies as a strategy for controlling acute Staphylococcus aureus infections", EXPERT OPINION ON THERAPEUTIC TARGETS, INFORMA HEALTHCARE, UK, vol. 16, no. 6, 1 June 2012 (2012-06-01), pages 601-612, XP009175171, ISSN: 1472-8222, DOI: 10.1517/14728222.2012.682573 the whole document -----</p>	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2015/068536

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2012109285 A2	16-08-2012	CA 2826566 A1	16-08-2012
		CN 103443285 A	11-12-2013
		EP 2673373 A2	18-12-2013
		JP 2014508748 A	10-04-2014
		KR 20140019344 A	14-02-2014
		RU 2013141134 A	20-03-2015
		SG 192212 A1	30-09-2013
		US 2014072577 A1	13-03-2014
		WO 2012109285 A2	16-08-2012

フロントページの続き

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(74) 代理人 100163784

弁理士 武田 健志

(72) 発明者 ナギー, エスター

オーストリア国 1070 ウィーン, ヴェストバーンシュトラッセ 32 - 34 / イー / 12

(72) 発明者 ストゥリク, ルーカス

オーストリア国 1160 ウィーン, ザントライテンガッセ 17 / 1 / 5

(72) 発明者 ルーハ, ハラルド

オーストリア国 1220 ウィーン, シュッタウシュトラッセ 48 / トップ 14

(72) 発明者 マギヤリックス, ゴルターン

オーストリア国 1110 ウィーン, ヴィルヘルム - ウェーバー - ヴェーク 4 トップ 3 / 2

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA19 QQ03 QQ06 QQ42 QQ53 QR08 QR62 QS25 QX02

专利名称(译)	金黄色葡萄球菌病的预测		
公开(公告)号	JP2017524943A	公开(公告)日	2017-08-31
申请号	JP2017507722	申请日	2015-08-12
[标]申请(专利权)人(译)	阿尔萨尼斯生物科学有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	Arusanisu生物科学的法理社会美图-Beshurenkuteru-有限公司		
[标]发明人	ナギーエスター ストゥリクルーカス ルーハハラルド マギヤリックスゾルターン		
发明人	ナギー,エスター ストゥリク,ルーカス ルーハ,ハラルド マギヤリックス,ゾルターン		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/53 G01N33/543 C12Q1/68		
CPC分类号	G01N33/56938 G01N2469/10 G01N2800/50 C12Q1/14 C12Q1/689 C12Q2600/118 C12Q2600/158		
FI分类号	G01N33/569.C G01N33/53.D G01N33/543.501.A C12Q1/68.ZNA.Z		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ06 4B063/QQ42 4B063/QQ53 4B063/QR08 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QX02		
代理人(译)	山本修 宫前彻 中西 基晴 武田健		
优先权	2014180606 2014-08-12 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及筛选受金黄色葡萄球菌严重定植但未显示金黄色葡萄球菌病任何症状的受试者中金黄色葡萄球菌的方法。涉及用于葡萄球菌疾病的预测，其特征在于，相对于标准或参考控制该方法包括确定在生物样品中的α-溶血素水平的受试者的步骤，其特征在于，升高的一个方法阿尔法溶血素水平或活动指示金黄色葡萄球菌疾病的发作。

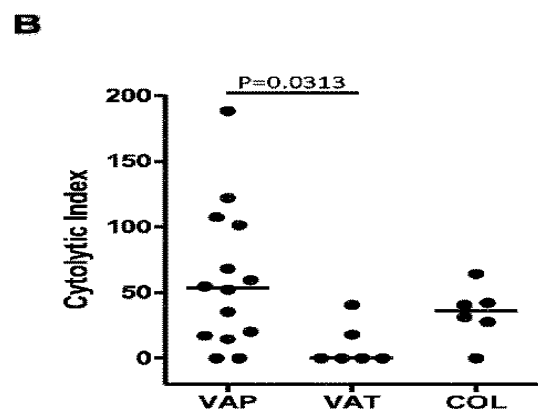


Fig. 3