

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2010-145416

(P2010-145416A)

(43) 公開日 平成22年7月1日(2010.7.1)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	N 4 B 0 6 4
C 1 2 P 19/04 (2006.01)	C 1 2 P 19/04	C 4 B 0 6 5
C 1 2 N 1/20 (2006.01)	C 1 2 N 1/20	A
GO 1 N 33/569 (2006.01)	GO 1 N 33/569	E
C 1 2 R 1/445 (2006.01)	C 1 2 N 1/20	A

審査請求 有 請求項の数 9 O L 外国語出願 (全 42 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2010-18353 (P2010-18353)	(71) 出願人	596005333
(22) 出願日	平成22年1月29日 (2010.1.29)		ブラッコ エッセ ビ ア
(62) 分割の表示	特願2000-530802 (P2000-530802) の分割		イタリア国 ミラノ ヴィア エ. フォッ リ 50
原出願日	平成11年2月1日 (1999.2.1)	(74) 代理人	100078662
(31) 優先権主張番号	M198A000197		弁理士 津国 肇
(32) 優先日	平成10年2月3日 (1998.2.3)	(74) 代理人	100116919
(33) 優先権主張国	イタリア (IT)		弁理士 齋藤 房幸
		(74) 代理人	100146422
			弁理士 田中 聖
		(72) 発明者	タレル, マリア クリスティーナ
			イタリア国、イ-20134 ミラノ、ヴ ィア・エ・フォッリ、50

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 プロテアーゼ感染の決定のための方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】血液試料またはその他の生物学的流体試料から、病原性ブドウ球菌株により産生される多糖と反応する抗体を検出しプロテアーゼ感染の決定を行う方法を提供する。

【解決手段】プロテアーゼ感染の実験的決定のための方法が記載される。患者から単離された生物学的液体に対して実施される、この方法は、プロテアーゼ装置にコロニーを形成する細菌により産生される多糖に特異的な抗体の検出に基づいている。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

血液試料又はその他の生物学的流体試料から、病原性ブドウ球菌株 (Staphylococcal strain) により産生される多糖と反応する抗体を検出することを含む、少なくとも一つのスタフィロコッカス (Staphylococcus) 株が関与しているプロテアーゼ感染の決定のための方法。

【請求項 2】

抗体が Ig G 及び Ig M である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

病原性ブドウ球菌株がコアグラーゼ (coagulase) 陰性種又は陽性種の株である、請求項 1 又は 2 記載の方法。 10

【請求項 4】

該種がスタフィロコッカス・エピデルミディス (Staphylococcus epidermidis) 又はスタフィロコッカス・アウレウス (Staphylococcus aureus) である、請求項 3 記載の方法。

【請求項 5】

病原性ブドウ球菌株が DSMZ No. 11942 である、請求項 3 記載の方法。

【請求項 6】

多糖が以下の工程、

- a) 4 ~ 6 日間改変 H H W 培地中でブドウ球菌株を培養する工程、 20
 - b) 生理学的緩衝液中で細菌細胞をホモジナイズする工程、
 - c) 15 分間 13,000 × g で遠心分離し、上清を分離する工程、
 - d) 12 kDa のカットオフ値を有する膜を用いて透析により上清を脱塩する工程、
 - e) d) で得られた溶液を凍結し、凍結乾燥する工程、
 - f) 凍結乾燥した材料を脱タンパク質溶液中に懸濁する工程、
 - g) f) で得られた溶液を 30,000 × g で遠心分離し、エタノールの添加により上清を分離する工程、
 - h) 多糖を得るため、工程 g) の上清を 20,000 × g で遠心分離する工程、
 - i) 沈降した多糖を無水エタノールで洗浄し、真空下で脱水し、それを無菌 H₂O 中に懸濁する工程 30
- により得られる、請求項 1 ~ 5 記載の方法。

【請求項 7】

E L I S A、ゲル免疫沈降、免疫拡散、向流免疫電気泳動 (contro-immunoelectrophoresis)、ラジオイムノアッセイ、補体結合の形態である、請求項 1 ~ 6 記載の方法。

【請求項 8】

- a) 4 ~ 6 日間改変 H H W 培地中でブドウ球菌株を培養する工程、
 - b) 生理学的緩衝液中で細菌細胞をホモジナイズする工程、
 - c) 15 分間 13,000 × g で遠心分離し、上清を分離する工程、
 - d) 12 kDa のカットオフ値を有する膜を用いて透析により上清を脱塩する工程、
 - e) d) で得られた溶液を凍結し、凍結乾燥する工程、 40
 - f) 凍結乾燥した材料を脱タンパク質溶液中に懸濁する工程、
 - g) f) で得られた溶液を 30,000 × g で遠心分離し、エタノールの添加により上清を分離する工程、
 - h) 多糖を得るため、工程 g) の上清を 20,000 × g で遠心分離する工程、
 - i) 沈降した多糖を無水エタノールで洗浄し、真空下で脱水し、それを無菌 H₂O 中に懸濁する工程
- を含む、スタフィロコッカス培養物から多糖を調製するための方法。

【請求項 9】

請求項 6 の方法により入手可能な多糖。

【請求項 10】

媒体、賦形剤、添加剤、保存料、又は安定剤と組み合わせられた多糖、抗体、及び検出試薬を適当な容器中に含む、請求項 1 ~ 5 記載の方法における使用のためのキット。

【請求項 1 1】

陽性対照血清及び陰性対照血清と共に抗原で予め感作されたマイクロタイター・ストリップを含む、請求項 8 記載のキット。

【請求項 1 2】

プロテアーゼ感染の決定のための免疫化学的アッセイにおける、病原性ブドウ球菌株により産生される多糖の使用。

【請求項 1 3】

多糖が請求項 9 の多糖である、請求項 1 2 記載の使用。

10

【請求項 1 4】

受託番号 1 1 9 4 2 で D S M Z に寄託されているブドウ球菌株。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、少なくとも一つのスタフィロコッカス (Staphylococcus) 株が関与しているプロテアーゼ感染の決定のための方法に関する。その方法は、血液試料又はその他の生物学的液体試料からの、病原性ブドウ球菌株 (Staphylococcal) により産生される粘液 (slime) 多糖と反応する抗体の検出に基づいている。

【0002】

20

本発明は、病原性ブドウ球菌株の培養物から出発して、前記方法において用いるための多糖を調製するための方法を提供し、さらに、引用された方法により得られる多糖自体も提供する。

【0003】

プロテアーゼ感染は、一般的な外科、心臓血管外科、整形外科、眼科、及び歯科、生体材料 (biomaterials) の導入が日常的に行われている全ての分野において重大な問題となっている。プロテアーゼ装置は、人工栄養及び化学療法のため腫瘍学においても広く用いられている。

【0004】

プロテアーゼ感染の最も重要な面は、以下の通りである。

30

- 生体材料の最初の導入後の罹患率は、症例の 2 から 6 % であると一般的に報告されている。

- 感染の結果として生体材料が新しいものと交換された場合、再感染の罹患率は約 60 % である。

- 感染は、症例の 25 から 45 % において、臓器もしくはそれらの一部の機能的損失、又は患者の死亡すらも引き起こす可能性があるが、心臓外科のようないくつかの特定の症例においては死亡率はそれよりもはるかに高く、例えば歯科のようないくつかの医学領域においては死亡率は通常プロテアーゼ感染と関連していない。

- 患者の入院は非常に長く高価であることが多い。

- 特異的な臨床的徴候がほぼ全く存在しないため、これらの感染の診断は困難である。

40

- これらの感染の最大部分 (85 % 超) は、コアグララーゼ (coagulase) 陰性ブドウ球菌により (そして、それよりも少ない程度で、コアグララーゼ陽性ブドウ球菌により) 引き起こされるが、腸内細菌、シュードモナス属の種、及び腸球菌のようなその他の微生物も (しばしば少なくとも一つのブドウ球菌株と関連して) 様々な症例において単離されうる。

【0005】

これらの感染を引き起こす間、細菌は生体材料の表面に強力に接着し、生体材料の表面をほぼ完全に覆い、時間の経過と共に、その組織の統合性を偏らせる可能性があるバイオフィルム (biofilm) へと進展するコロニーを形成する。

【0006】

吸着後、細菌は、重要な代謝的改変を受け、その複製速度を減少させるが、高い生合成

50

活性は維持している。この活性の主生成物は、化学物質、放射線、貪食細胞、及び抗体から細菌細胞を防御する厚い高密度線維質層を形成する細胞外多糖である（一般的に粘液と表示される）。

【0007】

生体材料上で増殖する粘液に埋め込まれた細菌は、抗生物質に曝されたとき、細菌が生体材料の非存在下で増殖した場合に得られる対応する値よりも数百倍も高い可能性がある、最少阻止濃度及び最少殺菌濃度を示す。

【0008】

バイオフィームが一定の臨界量に達すると、それは、生体材料の新たな表面に移動してコロニーを形成する可能性がある、小さな細菌細胞塊を、周囲の液体環境に放出する。

10

【0009】

プロテゼ感染は、軽症のウイルス性エピソードと混同されることが最も多く、通常の抗生物質治療後に消失した後、ある時間の後に再び出現する、稀少かつ非特異的な臨床的徴候により特徴付けられることが多い。これらのエピソードは、一般的に、血中を循環している間は宿主の免疫防御により容易に認識されて発熱を引き起こし、プランクトン様の形態で通常の抗生物質により容易に殺傷されるため、感染の根絶に類似している、バイオフィームからの小さな細菌塊の放出による。臨床的徴候は、感染の進行期に、移植片周囲の柔組織の大きな腫脹もしくはフィステルの形成、又は一般的なコンプロミッション (compromission) の明白な徴候により明白となる。

【0010】

20

この独特の特徴のため、固着細菌が *in vitro* の培養条件に迅速に適合することができないという事実により、培養微生物学的分析の後の偽陰性の高い発生率の結果としてすら、初期の診断は極めて困難である。

【0011】

現在までのところ、血管移植片感染の診断は、客観的な臨床的パラメータ、血液パラメータ、並びに超音波検査、コンピュータ連動断層撮影、磁気共鳴、食道胃十二指腸検査、及び放射性標識白血球の注入後のシンチグラフィにより得られる機器データの分析に基づいている。このように、不十分な感度、又はデータ及び画像の解釈のよく定義された基準の欠如のため、ほとんどの症例において、感染の初期を明らかにすることは不可能である。

30

【0012】

全般的に、実際の診断可能性は、治療の成功にとってより好適な疾患の初期においては特に、絶対的に不十分である。

【0013】

血清試料又はその他の生物学的液体に容易に適用されうる信頼性のある安価な方法が、進展の初期においてすら、プロテゼ装置が関与する感染の存在を明らかにすることができることを見出され、これが、本発明の目的である。この方法は、任意の種類のプロテゼ装置の導入により治療された、特にブドウ球菌により引き起こされる感染のリスクが高い患者の継続的なモニタリングのため、日常的に実施されうる。

【0014】

40

この方法は、病原性ブドウ球菌株から抽出された細胞外多糖に対する特異的な抗体の存在の定量的測定にある。

【0015】

さらに、本発明は、適切に増殖したブドウ球菌細胞から、これらの細胞外多糖を調製及び精製するための方法を提供する。

【0016】

この方法のために用いられうるブドウ球菌株は、コアグラーゼ陰性及び陽性両方の、病原性であるか、又はとにかく粘液を産生することができる株である。特に、病原性のスタフィロコッカス・エピデルミディス (*Staphylococcus epidermidis*) 株又はスタフィロコッカス・アウレウス (*Staphylococcus aureus*) 株が好ましい。

50

【 0 0 1 7 】

これらの株は、プロテゼ感染に罹患した患者、又は参照株の標準的なカルチャー・コレクション (culture collection) のいずれかから直接的に得られうる。そのような典型的な株の特徴は、下記の実施例 1 に報告されている。D S M Z N o . 1 1 9 4 2 で本出願人により寄託されたスタフィロコッカス・アウレウス株を用いて実施された実験も示されている。

【 0 0 1 8 】

細菌は、下記の実施例 2 に報告されたようないくつかの改変を有する、Hussain et al., J. Med. Microbiol. 34:143 - 147, 1991 に記載された液体培地 (H H W 培地) 中で増殖させる。

【 0 0 1 9 】

本発明に係る多糖を調製するための手法は、以下の工程を実質的に含む。

- a) 4 ~ 6 日間改変 H H W 培地中でブドウ球菌株を培養する工程、
- b) 生理学的緩衝液中で細菌細胞をホモジナイズする工程、
- c) 15 分間 13,000 × g で遠心分離し、上清を分離する工程、
- d) 12 kDa のカットオフ値を有する膜を用いて透析により上清を脱塩する工程、
- e) d) で得られた溶液を凍結させ、凍結乾燥させる工程、
- f) 凍結乾燥した材料を脱タンパク質溶液、例えばトリクロロ酢酸中に懸濁する工程、
- g) f) で得られた溶液を 30,000 × g で遠心分離し、エタノールの添加により上清を分離する工程、
- h) 多糖を得るため、工程 g) の上清を 20,000 × g で遠心分離する工程、
- i) 沈降した多糖を無水エタノールで洗浄し、真空下で脱水し、それを無菌 H₂O 中に懸濁する工程。

【 0 0 2 0 】

精製された多糖の定量は、例えば、Pelkonen et al., Journal of Bacteriology 170, 2646, 1988 により記載された方法に従い実施されうる。

【 0 0 2 1 】

前記の方法に従い得られる多糖は、プロテゼ装置が挿入された患者由来の血清又はその他の生物学的液体中の抗体の決定のためのアッセイにおいて用いられる。

【 0 0 2 2 】

好ましくは、アッセイは、例えば酵素結合イムノソルベント・アッセイ (E L I S A)、ゲル免疫沈降、免疫拡散もしくは向流免疫電気泳動 (counter-immunoelectrophoresis)、ラジオイムノアッセイ、補体結合、及び受動血球凝集のような従来 of 免疫化学的手法後に、I g G クラス及び / 又は I g M クラスの抗体の存在を決定する。

【 0 0 2 3 】

多糖が、例えばマイクロタイター・ウェルのような固体表面に固定化され、次に、免疫複合体の形成にとって適当な条件下で試料と反応させる固相法が、好ましい。免疫複合体が形成された後、それは、例えば、放射性同位体、化学発光物質もしくは色原性物質で標識された、又は比色定量反応を触媒する酵素及びその他の類似の物質とカップリングした、抗体又はそれらの免疫能を有する断片のような適当な分子との反応により、明らかにされうる。

【 0 0 2 4 】

本発明により開示される方法の有効性は、以下の実験により確認された。

【 0 0 2 5 】

第一の実験セットにおいては、血管移植片感染を有する 15 人の患者由来の血清を分析した。これらの患者におけるプロテゼ感染の存在は、プロテゼ周囲組織から採取された試料及び外科的交換後の移植片自体の試料両方の微生物学的分析により確認された。各試料から少なくとも一つのブドウ球菌株が単離された。

【 0 0 2 6 】

これらの 15 人の患者のうち 11 人が、感染の明確な臨床的徴候を示し、4 人は、感染

10

20

30

40

50

の非特異的な臨床的徴候しか有しなかったが、^{99m}Tc 標識白血球の注入後のシンチグラフィにおいては陽性であった。

【0027】

10人の男女の成人健常対象由来の血清を陰性対照として用いた。

【0028】

以下のものに対する血清の反応性をELISAフォーマットでアッセイした。

a - 小さなポリプロピレン・シリンダー(0.5 × 1mm)上に形成された異なるブドウ球菌株(臨床的単離物及び参照株の両方)により形成された単一特異的なバイオフィルム

b - 小さなポリプロピレン・シリンダー(0.5 × 1mm)上に形成された異なるブドウ球菌株(臨床的単離物及び参照株の両方)により形成された複数特異的(polyspecific)なバイオフィルム

c - 異なるブドウ球菌株の培養物から抽出された表面タンパク質

d - スタフィロコッカス・アウレウスDSM 11942及びスタフィロコッカス・エピデルミディスSA1545(この株の特徴決定については実施例1を参照のこと)の培養物から抽出された、本発明において記載された多糖。

【0029】

実験は、以下の結果を与えた。

a - 単一特異的又は複数特異的なブドウ球菌バイオフィルム又はブドウ球菌表面及び分泌タンパク質に対するIgG抗体力価及びIgM抗体力価はいずれも、感染患者と非感染患者とで有意に異ならなかった。

b - 本発明のブドウ球菌多糖に対するIgG抗体力価及びIgM抗体力価はいずれも、感染患者と非感染患者とで有意に異なっていた。それらは、さらに、明確に症候性の感染患者と乏症候性(pauci-symptomatic)シンチグラフィ陽性患者とを区別することも可能にした。

【0030】

表1. マイクロタイター・ウェルを感作するためS.アウレウスDSM 11942の培養物から抽出された多糖を用いて、症候性血管移植片感染を有する11人の患者、乏症候性血管移植片感染を有する^{99m}Tc 標識白血球の注入後のシンチグラフィは陽性であった4人の患者、及び10人の健常対照対象の血清試料に対して実施されたELISAアッセイにおいて得られたIgG力価及びIgM力価両方の範囲、平均値、及び標準偏差。

【0031】

【表1】

表1

患者カテゴリ (n)	DSM 11942					
	IgG 1/160 範囲	IgG 1/160 平均	IgG 1/160 SD*	IgM 1/160 範囲	IgM 1/160 平均	IgM 1/160 SD*
症候性感染患者 (11)	0.262-1 .06	0.66	0.25	0.32-1. 032	0.66	0.27
非感染患者 (10)	0.177-0 .266	0.17	0.03	0.101-0 .195	0.14	0.04
乏症候性シンチ グラフィ陽性感 染患者(4)	0.251-0 .457	0.32	0.09	0.332-0 .56	0.47	0.09

*標準偏差

【0032】

10

20

30

40

50

表 2 . マイクロタイターウェルを感作するため S . エピデルミディス S A 1 5 4 5 の培養物から抽出された多糖を用いて、症候性血管移植片感染を有する 1 1 人の患者、乏症候性血管移植片感染を有するが^{99m}Tc 標識白血球の注入後のシンチグラフィは陽性であった 4 人の患者、及び 1 0 人の健常対照対象の血清試料に対して実施された E L I S A アッセイにおいて得られた I g G 力価及び I g M 力価両方の範囲、平均値、及び標準偏差。

【 0 0 3 3 】

【表 2】

表 2

患者カテゴリ (n)	S A 1 5 4 5					
	IgG 1/160 範囲	IgG 1/160 平均	IgG 1/160 SD*	IgM 1/160 範囲	IgM 1/160 平均	IgM 1/160 SD*
症候性感染患者 (11)	0.173-0.971	0.47	0.21	0.31-1.07 1	0.56	0.2
非感染患者 (10)	0.11-0.2 65	0.15	0.05	0.126-0.2 43	0.16	0.03
乏症候性シンチグラフィ陽性感染患者 (4)	0.202-0.445	0.29	0.11	0.287-0.4 83	0.37	0.06

*標準偏差

【 0 0 3 4 】

第二の実験セットにおいては、マイクロタイター・ウェルを感作するため本発明の多糖のみを用いて実施された E L I S A 試験において、I g G 力価及び I g M 力価両方を決定するため、より多数の血清をアッセイした。これらの全ての試験において、(実施例 1 に記載されている) S A 1 5 4 5 株の培養物から抽出された多糖を用いた。

【 0 0 3 5 】

これらの試験においては全部で 9 7 個の血清を試験した。これらの 9 7 個の血清のうち 1 9 個は感染しておらず血管移植片を保有しない対照患者から得られ、3 個は感染はしていないが血管移植片を保有している対照患者から得られ、5 個はグラム陰性細菌に感染した血管移植片を保有している患者から得られ、1 3 個は感染はしていないが血管移植片を保有しておりスタフィロコッカス s p p . により引き起こされた血管移植片感染の過去の履歴を有する患者から得られ、5 7 個はスタフィロコッカス s p p . に感染した血管移植片を保有している患者から得られた。

【 0 0 3 6 】

血清の 1 / 1 6 0 希釈物及び 1 / 3 2 0 希釈物を用いて、これらの血清全てにおいて、I g G 力価及び I g M 力価両方を決定した。アッセイの実験内及び実験間の再現性を調査するため、2 重の測定を 2 セット実施した。E L I S A アッセイは実施例 4 に記載のようにして実施した。

【 0 0 3 7 】

この第二の実験セットにおいて得られた結果を表 3 に要約する。

【 0 0 3 8 】

表 3 . S . エピデルミディス S A 1 5 4 5 の多糖調製物を用いて実施された酵素結合免疫ソルベント・アッセイ (E L I S A) の結果。

【 0 0 3 9 】

統計的評価に用いられた各血清試料の I g M 力価は、2 つの異なる実験において得られた 4 つの異なる測定の平均値であった。統計的評価に用いられた各血清試料の I g G 力価

10

20

30

40

50

は、1つの実験において得られた2つの異なる測定の平均値であった。

【0040】

【表3】

表3

患者カテゴリ	平均 IgM 力価 (1:160) (範囲)	平均 IgM 力価 (1:320) (範囲)	平均 IgG 力価 (1:160) (範囲)	平均 IgG 力価 (1:320) (範囲)
A1) 感染しておらず 血管移植片を保有し ない対照患者 (n = 19)	0.189±0.037 (0.148-0.250)	0.136±0.024 (0.116-0.155)	0.923±0.18 (0.744-1.469)	0.692±0.21 (0.293-1.198)
A2) 感染はしていな いが血管移植片を保 有している対照患者 (n = 3)	0.153±0.018 (0.134-0.167)	0.111±0.006 (0.105-0.116)	1.083±0.410 (0.706-1.585)	0.823±0.356 (0.476-1.243)
A) 感染していない全 対照患者 (n = 7)	0.184±0.037 (0.134-0.250)	0.133±0.024 (0.105-0.155)	0.945±0.022 (0.076-1.585)	0.709±0.23 (0.293-1.243)
B) グラム陰性細菌に 感染した血管移植片 を保有している患者 (n = 5)	0.227±0.063 (0.128-0.291)	0.142±0.038 (0.084-0.174)	1.041±0.265 (0.763-1.480)	0.700±0.259 (0.420-1.117)
C) 感染はしていな いが血管移植片を保 有しておりスタフィロ コッカス spp. により 引き起こされた血管 移植片感染の過去の 履歴を有する患者 (n = 13)	0.254±0.076 (0.185-0.379)	0.169±0.055 (0.107-0.325)	1.152±0.424 (0.513-1.689)	0.894±0.527 (0.317-1.652)
D) スタフィロコッカ ス spp. に感染した血 管移植片を保有して いる患者 (n = 57)	0.642±0.516 (0.258->2.5)	0.377±0.396 (0.127-2.448)	1.532±0.278 (0.765-1.976)	1.303±0.332 (0.522-2.013)

10

20

30

【0041】

血清希釈 = 1 : 160 で測定された IgM 力価の比較のための、スチューデント T 検定の結果：

40

A (A1 + A2) vs. D : $p = 1.7 \times 10^{-15}$

B vs. D : $p = 2.0 \times 10^{-4}$

C vs. D : $p = 7.2 \times 10^{-8}$

A + B + C vs. D : $p = 5.3 \times 10^{-23}$

A + C vs. B : $p = 0.142$

A vs. C : $p = 2.07 \times 10^{-11}$

【0042】

血清希釈 = 1 : 320 で測定された IgG 力価の比較のための、スチューデント T 検定の結果：

A (A1 + A2) vs. D : $p = 4.5 \times 10^{-21}$

50

B vs. D : $p = 7.5 \times 10^{-8}$
 C vs. D : $p = 8.0 \times 10^{-7}$
 A + B + C vs. D : $p = 3.1 \times 10^{-21}$
 A + C vs. B : $p = 0.265$
 A vs. C : $p = 0.024$

【0043】

注釈：

S・エピデルミディス SA1545 の粘液多糖 (SP) に対して検出可能な抗体力価は、病歴が異なる患者群において有意差を示した。

【0044】

スタフィロコッカス spp. に感染した血管移植片を保有している患者においては、i) 血管移植片を保有していても、又はしていなくても、そのような感染の履歴がない対照患者、ii) グラム陰性細菌に感染した血管移植片を保有している患者、iii) 感染していない血管移植片を保有しているが、スタフィロコッカス spp. による血管移植片感染の過去の履歴を報告している患者と比較して、SA1545-SP に対する有意に高い抗体力価が見出された。これらのデータは、全体として、スタフィロコッカス spp. により引き起こされる血管移植片感染が、SP に対する特異的な体液性免疫反応を誘導すること、及びこの反応が、本特許出願において記載されたような SA1545 SP 調製物で感作された固相を用いた酵素イムノアッセイにより検出されうることを示している。

【0045】

上記患者群における抗 SA1545 SP のアイソタイプ反応の分析は、IgG 抗体力価及び IgM 抗体力価両方の有意差を示した。IgM 力価は、スタフィロコッカス spp. により引き起こされる活動性感染の状態と最も密接に関連していた。

【0046】

感染患者の力価と非感染患者の力価との間の統計的有意差の存在は、感染過程の存在の高い確率を定義することが可能なブレイクポイント値を確立することを可能にする。さらに、追跡における特異的参照値として移植時に測定された抗体力価を用いて、移植片の挿入後に患者をモニターするため、この方法を用いることが可能である。

【0047】

前記の方法は、実施が容易であり、安価であり、そして他の全ての利用可能な方法がしばしば明瞭な診断的情報を与えることができない感染の初期においてすら (侵襲的手法の必要なしに) 信頼性のある結果を得ることを可能にするため、この領域における従来の診断法と比較して、いくつかの利点を有することは明らかであると考えられる。さらに、この方法は、潜伏感染の発生に関する患者の定期的モニタリングを可能にし、治療結果に関する信頼性のある情報を与えることができる。

【0048】

本発明は、最後に、媒体、賦形剤、並びに保存料及び安定剤のような添加剤と共に、適切な容器中に多糖調製物、標準抗体、及び検出のための試薬を含む、アッセイを実施するためのキットを提供する。

【0049】

好ましくは、キットは、(元の力価を有する) 陽性対照血清及び陰性対照血清と共に抗原で予め感作されたマイクロタイター・ストリップを含むであろう。

【0050】

以下の実施例は、本発明をより明解にするためのものである。

【0051】

実施例 1

アッセイにとって適切な細菌株の特徴決定

API 20 STAPH 同定システムを用いて同定のため試験されたとき数字コード 6704773 を与える、SA1545 と表示されるスタフィロコッカス・エピデルミディス株を、成人男性から外植された大動脈・両側大腿動脈 (aorto-bifemoral) 移植片から

10

20

30

40

50

単離した。

【 0 0 5 2 】

単離物は、5%脱線維ヒツジ血液を追加されたコロンビア寒天 (Columbia Agar) プレート上で増殖させたとき、コロニーの明白な二形性を示した。それは、マンニトール塩寒天上で増殖させたとき、マンニトール発酵に関して陰性であり、コロニーは37で18hのインキュベーションの後1mm未満の直径を示した。

【 0 0 5 3 】

単離物は、キルビー・パウエル (Kirby Bauer) アッセイを用いて調査したとき、以下の抗生物質：ゲンタマイシン、バンコマイシン、オフロキサシン、エリトロマイシン、イミペネム、セファロチン、アモキシシリン (Amoxicillin) + クラブラン酸、セフォペラゾン (cefoperazone) に対して感受性であった。

10

【 0 0 5 4 】

単離物の生化学的パターンは以下の通りであった。

発酵	グルコース	+	
発酵	フルクトース	+	
発酵	マルトース	+	
発酵	ラクトース	+	
発酵	トレハロース	-	
発酵	マンニトール	-	
発酵	キシリトール	-	20
発酵	メリビオース	-	
発酵	ラフィノース	-	
発酵	キシロース	-	
発酵	サッカロース	+	
産生	硝酸塩	-	
産生	アルカリホスファターゼ	-	
産生	アセトイン	-	
産生	N - アセチル - グルコサミニダーゼ	-	
産生	アルギニンヒドロラーゼ	+	
産生	ウレアーゼ	+	30

20

30

【 0 0 5 5 】

他の多くの症例において、類似の特徴を示し、本発明のアッセイに用いるのに適した株が単離されている。

【 0 0 5 6 】

実施例 2

培養培地の調製

培養培地は1リットル当たり以下の化合物を含む。

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 (2\text{H}_2\text{O})$	10 g	
KH_2PO_4	3 g	
L - アスパラギン酸	150 mg	40
L - アラニン	100 mg	
L - アルギニン	100 mg	
L - シスチン	50 mg	
グリシン	100 mg	
L - グルタミン酸	150 mg	
L - ヒスチジン	100 mg	
L - イソロイシン	150 mg	
L - リジン	100 mg	
L - ロイシン	150 mg	
L - メチオニン	100 mg	50

40

50

L - フェニルアラニン	1 0 0 mg	
L - プロリン	1 5 0 mg	
L - セリン	1 0 0 mg	
L - トレオニン	1 5 0 mg	
L - トリプトファン	1 0 0 mg	
L - チロシン	1 0 0 mg	
L - バリン	1 5 0 mg	
グルコース	1 0 g	
M g S O ₄ (7 H ₂ O)	5 0 0 mg	
ビオチン	0 . 1 mg	10
ニコチン酸	2 mg	
D - パントテン酸	2 mg	
ピリドキサル	4 mg	
ピリドキサミン	4 mg	
リボフラビン	2 mg	
チアミン	2 mg	
アデニン	2 0 mg	
グアニン	2 0 mg	
C a C l ₂ (6 H ₂ O)	1 0 mg	
M n S O ₄	5 mg	20
(N H ₄) ₂ S O ₄ F e S O ₄ (6 H ₂ O)	6 mg	

【 0 0 5 7 】

培地の組成は、調製に関して以下の改変を有する、Hussain, Hastings, White, J. Med. Microbiol. 34:143 - 147, 1991に記載のものに相当する。全ての培地成分を計量した後、M g S O ₄ (7 H ₂ O) を蒸留水に溶解し、次に絶えず振とうしながら残りの全ての成分を一度に添加した。L - シスチンは、培地への添加の前に、2 ~ 3 滴の 5 N N a O H に溶解させなければならない。

【 0 0 5 8 】

(少量の沈殿物が残存していてもよいが) 全ての成分が溶解した後、蒸留水で容量を 1 l に調整し、0 . 2 μ m の多孔性膜を通す濾過により滅菌する。

30

【 0 0 5 9 】

実施例 3

多糖の調製

1 0 0 0 ml の改変 H H W 培地中で 3 7 で 6 日間、振とうしながら株を増殖させた。

【 0 0 6 0 】

細菌ペレットを、4 で 1 5 分間 1 3 , 0 0 0 × g での遠心分離により収集し、2 0 ml の無菌氷冷生理食塩水 (N a C l 0 . 9 %) 中に懸濁し、- 2 0 で 2 h 凍結した。次に、細菌懸濁液を室温にて解凍し、3 0 秒間隔で 3 0 秒間 1 0 回ホモジナイズした。

【 0 0 6 1 】

次に、ホモジネートを、4 で 1 5 分間 1 3 , 0 0 0 × g で遠心分離した。得られた上清を 4 で保存し、得られたペレットを、2 0 ml の無菌氷冷生理食塩水中に再び懸濁させ、前記と同様にホモジナイズした。第二のホモジナイゼーション工程から得られた上清を、先に得られたものに添加し、1 2 kDa のカットオフ値を有する透析膜を用いて、4 で 2 h、1 , 0 0 0 容量の蒸留水に対する透析により脱塩した。次に、試料を - 8 0 で凍結し、凍結乾燥し、5 % (W / V) トリクロロ酢酸中に懸濁し、4 で 1 5 分間インキュベートした。

40

【 0 0 6 2 】

次に、試料を、4 で 3 0 分間 3 0 , 0 0 0 × g で遠心分離した。次に、4 容量の氷冷無水エタノールを上清に添加し、それをさらに 4 8 h 4 でインキュベートした。次に、バルクの多糖を、4 で 3 0 分間 2 0 , 0 0 0 × g での遠心分離により収集し、0 . 5 容

50

量の氷冷無水エタノールで洗浄し、真空下で脱水し、最後に2mlの無菌蒸留水に懸濁させた。前記のようにして得られた多糖を、適切な希釈の後、マイクロタイター・ウェルを感作するために用いた（典型的には50 μ lずつ）。

【0063】

実施例4

E L I S A アッセイの実行

マイクロタイター・プレートのウェルを、実施例3に従い調製し、無菌蒸留水で1/80に希釈した50 μ lの多糖で感作し、適切に密封し、4 $^{\circ}$ Cで18~24hインキュベートした。インキュベーション後、ウェルを空にし、100 μ lの0,05%トウイーン20を含むリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で5回洗浄した。

10

【0064】

次に、ウェルを空にし、200 μ lの10%豆乳を含むPBSで飽和し、適切に密封し、37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートした。次に、ウェルを空にし、前記と同様に洗浄し、希釈された血清を50 μ lずつ添加した。一つの陽性対照及び一つの陰性対照を含む血清を、典型的には、1/160及び1/320にPBSで希釈した。血清の添加後、ウェルを適切に密封し、37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートした。次に、ウェルを空にし、前記と同様に洗浄し、50 μ lの「ペルオキシダーゼ結合ウサギ抗ヒトIgG」（例えば、DAKO cod.P0214）（10%豆乳を含むPBSで1/15,000に希釈）又は「ペルオキシダーゼ結合ウサギ抗ヒトIgM」（例えば、DAKO cod.P0215）（10%豆乳を含むPBSで1/1,500に希釈）のいずれかを添加した。次に、ウェルを適切に密封し、37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートし、空にし、前記と同様に洗浄した。

20

【0065】

最後の洗浄後、ペルオキシダーゼの色原性基質（例えば、BM Blue POD Substrate Boehringer Mannheim, cod 1484281）を50 μ l、各ウェルに添加した。

【0066】

次に、ウェルを、37 $^{\circ}$ Cで10分間インキュベートし、次に、50 μ lの0.5N H₂SO₄を添加することにより反応を停止させた。次に、ブランクとして100 μ lの0.5N H₂SO₄を含む未処理の1ウェルを用いて、マイクロタイター・プレート・リーダーを用いて、各ウェルのOD_{450nm}を評価した。

【0067】

概して、陽性対照のOD_{450nm}は、1.5という値を超えるべきではない。

30

【0068】

これが起こった場合には、ペルオキシダーゼ基質のインキュベーション時間を減少させ、アッセイを繰り返さなければならない。

【0069】

【表 4】

INTERNATIONALES FORMBLATT

BRACCO S.p.A.
Via Folli, 50
I-20134 Milano

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG.
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

10

I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS	
Vom HINTERLEGER zugewiesenes Bezugszeichen: 6538P	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugewiesene EINGANGSNUMMER: DSM 11942
II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG	
Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde <input type="checkbox"/> eine wissenschaftliche Beschreibung <input checked="" type="checkbox"/> eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung eingereicht. (Zurechtfindendes ankreuzen).	
III. EINGANG UND ANNAHME	
Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I. bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 1998-01-20 (Datum der Erstinbringung)* eingegangen ist.	
IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG	
Der unter I. bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser internationalen Hinterlegungsstelle am 1998-01-20 eingegangen (Datum der Erstinbringung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Erstinbringung in eine Hinterlegung gemäß Budapester Vertrag ist am 1998-01-20 eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung).	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascher Weg 1b D-38124 Braunschweig	Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle benötigten Person(en) oder das (der) vom ihr ermächtigten Bediensteten: V. Wekes Datum: 1998-01-22

20

30

40

* Falls Regel 6.4 Buchstabe a zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Stamm einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist.

Formblatt DSMZ-OP/4 (einrige Seite) 0196

【手續補正書】

【提出日】平成22年3月16日(2010.3.16)

【手續補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも一つのスタフィロコッカス (Staphylococcus) 株が関与しているプロテアーゼ感染の決定のための方法であって、

a) スタフィロコッカス・エピデルミディス (Staphylococcus epidermidis) 又はスタフィロコッカス・アウレウス (Staphylococcus aureus) から選ばれる病原性ブドウ球菌株 (Staphylococcal strain) により産生される多糖を、以下の工程、

i) 4 ~ 6 日間改変 H H W 培地中で該ブドウ球菌株を培養する工程、

ii) 生理学的緩衝液中で細菌細胞をホモジナイズする工程、

iii) 15 分間 13,000 × g で遠心分離し、上清を分離する工程、

iv) 12 kDa のカットオフ値を有する膜を用いて上清を透析する工程、

v) iv) で得られた溶液を凍結し、凍結乾燥する工程、

vi) 凍結乾燥した材料を脱タンパク質溶液中に懸濁する工程、

vii) vi) で得られた溶液を 30,000 × g で遠心分離し、エタノールの添加により上清を分離する工程、

viii) 多糖を得るため、工程vii) の上清を 20,000 × g で遠心分離する工程、

ix) 沈降した多糖を洗浄し、場合により真空下で脱水し、それを無菌 H₂O 中に懸濁する工程

により調製すること、

b) 血液試料又はその他の生物学的流体中の、a) で調製された多糖と反応する抗体を検出すること

を含む方法。

【請求項 2】

工程 b) における抗体が、I g G 及び / 又は I g M である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

病原性ブドウ球菌株が、D S M Z N o . 1 1 9 4 2 である、請求項 1 ~ 2 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 4】

E L I S A、ゲル免疫沈降、免疫拡散、向流免疫電気泳動 (contro-immunoelectrophoresis)、ラジオイムノアッセイ、補体結合の形態である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 5】

スタフィロコッカス培養物から多糖を調製するための方法であって、

a) 4 ~ 6 日間改変 H H W 培地中でブドウ球菌株を培養する工程、

b) 生理学的緩衝液中で細菌細胞をホモジナイズする工程、

c) 15 分間 13,000 × g で遠心分離し、上清を分離する工程、

d) 12 kDa のカットオフ値を有する膜を用いて上清を透析する工程、

e) d) で得られた溶液を凍結し、凍結乾燥する工程、

f) 凍結乾燥した材料を脱タンパク質溶液中に懸濁する工程、

g) f) で得られた溶液を 30,000 × g で遠心分離し、エタノールの添加により上清を分離する工程、

h) 多糖を得るため、工程 g) の上清を 20,000 × g で遠心分離する工程、

i) 沈降した多糖を無水エタノールで洗浄し、真空下で脱水し、それを無菌 H₂O 中に懸濁する工程

を含む方法。

【請求項 6】

請求項 5 の方法により入手可能な多糖。

【請求項 7】

請求項 6 に記載の多糖、抗体及び検出試薬を適当な容器中に、媒体、賦形剤、添加剤、保存料又は安定剤と組み合わせて含む、請求項 1 ~ 4 記載の方法における使用のためのキット。

【請求項 8】

該多糖が、陽性対照血清及び陰性対照血清と共に予め感作されたマイクロタイター・ストリップ上へ存在する、請求項 7 記載のキット。

【請求項 9】

受託番号 1 1 9 4 2 で D S M Z に寄託されているブドウ球菌株。

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
C 1 2 R 1:445

(72)発明者 ロッソリーニ, ジャンマリア
イタリア国、イ - 2 0 1 3 4 ミラノ、ヴィア・エ・フォッリ、5 0

(72)発明者 セラン, ラウラ
イタリア国、イ - 2 0 1 3 4 ミラノ、ヴィア・エ・フォッリ、5 0

(72)発明者 パッサリエッロ, クラウディオ
イタリア国、イ - 2 0 1 3 4 ミラノ、ヴィア・エ・フォッリ、5 0

Fターム(参考) 4B064 AF11 CA02 CE02 CE03 CE06 CE17 DA13
4B065 AA53X AC14 BA22 BB01 CA22 CA27 CA46

【外国語明細書】

1. Title of Invention

**METHOD FOR THE DETERMINATION OF PROSTHETIC
INFECTIONS**

2. Detailed Description of Invention

The present invention refers to a method for the determination of prosthetic infections in which at least one *Staphylococcus* strain is involved. The method is based on the detection of antibodies reacting with a slime polysaccharide produced by virulent staphylococcal strains, from blood samples or other biological fluid samples.

The invention also provides a process for preparing a polysaccharide to use in the above method, starting from cultures of virulent staphylococcal strains, as well as the polysaccharide itself which is obtained by the cited process.

Prosthetic infections represent a severe problem in general surgery, cardiovascular surgery, orthopedics, ophthalmology and odontology, all sectors in which the introduction of biomaterials has become routinary. Prosthetic devices are also widely used in oncology for artificial nutrition and chemotherapy.

The most significant aspects of prosthetic infections are the following:

- their incidence is generally reported to be 2 to 6% of the cases, following the first introduction of the biomaterial;
- when a biomaterial is substituted by a new one, as a consequence of an infection, the incidence of re-infections is about 60%;
- infections may cause functional loss of organs or their parts or even death of the patient in 25 to 45% of the cases, although in some particular cases, as for cardiac surgery, mortality is much higher and in some fields of medicine, as for example odontology, no mortality is usually associated with prosthetic

infections;

- hospitalization of patients is frequently very long and expensive;
- diagnosis of these infections is difficult for the almost complete absence of specific clinical signs;
- the greatest part of these infections (over 85%) is caused by coagulase negative staphylococci (and to a lesser extent by coagulase positive staphylococci), although other microorganisms, as enteric bacteria, pseudomonads and enterococci, can also be isolated in various cases (frequently in association with at least one staphylococcal strain).

While causing these infections bacteria are strongly glued to the surface of biomaterials, forming colonies that evolve with time in biofilms that may almost entirely cover the surface of the biomaterial, biasing its tissue integration.

Following adhesion bacteria undergo important metabolic modifications, reducing their replicative rate, though maintaining a high biosynthetic activity. The main products of this activity are extracellular polysaccharides (generally indicated as slime) that form a thick and dense fibrous layer protecting bacterial cells from chemicals, radiations, phagocytes, and antibodies.

Slime-embedded bacteria, growing on biomaterials, when exposed to antibiotics, exhibit minimal inhibitory and minimal bactericidal concentrations that can be even hundreds of times higher than the corresponding values obtained when bacteria are grown in the absence of the biomaterial.

When a biofilm reaches a determined critical mass, it releases in the surrounding liquid environment little aggregates of bacterial cells that may

move to colonize new surfaces of the biomaterial.

Prosthetic infections are frequently characterized by scarce and non specific clinical signs, that are most often confused with minor viral episodes, and that disappear following common antibiotic therapy to manifest again after some time. These episodes are generally due to the release of small bacterial aggregates from the biofilm, that while circulating in blood are easily recognized by the immune defenses of the host, causing fever, and that, being in the planktonic form, are easily killed by common antibiotics, thus mimicking the eradication of the infection. Clinical signs become evident in the advanced phases of the infection, with formation of large tumefactions of the soft tissues surrounding the graft, or fistulas, or evident signs of general compromission.

Due to this peculiar characteristics early diagnosis is extremely difficult, even as a consequence of the high incidence of false negatives following cultural microbiological analyses, depending on the fact that sessile bacteria are not able to rapidly adapt to in vitro cultural conditions.

Till now diagnosis of vascular graft infections has been based on the analysis of objective clinical parameters, blood parameters, and instrumental data obtained by ultrasonography, computed tomography, magnetic resonance, esophago-gastro-duodenoscopy, and scintigraphy following injection with radio-labelled leukocytes. This way it is in most cases not possible to reveal the early phases of infection for the insufficient sensitivity or for the lack of well defined criteria of interpretation of data and images.

Overall the actual diagnostic possibilities are absolutely inadequate, particularly in the early phases of the disease that are more favourable for a successful therapy.

It has now been found, and this is the object of the present invention,

a reliable and unexpensive method, that can be easily applied to serum samples or other biological fluids, able to reveal the presence of infections involving prosthetic devices even in the early phases of development. This method can be routinely performed for the constant monitoring of patients that were treated with the introduction of any kind of prosthetic device and are at risk for infection, especially caused by staphylococci.

This method consists in the quantitative determination of the presence of antibodies, specifically directed against extracellular polysaccharides, extracted from virulent strains of staphylococci.

Furthermore, the present invention provides a method for preparing and purifying these extracellular polysaccharides from adequately grown staphylococcal cells.

Staphylococcal strains that may be used for this method are both coagulase-negative and positive, either virulent ones or anyway able to produce slime. In particular, virulent *Staphylococcus epidermidis* or *Staphylococcus aureus* strains are preferred.

These strains can be obtained either directly from patients suffering from a prosthetic infection or from standard culture collections of reference strains. The characteristics of such a typical strain are reported in the following Example 1. Experiments were also indicative when performed using the *Staphylococcus aureus* strain deposited by the applicant at DSMZ No. 11942.

Bacteria are grown in the liquid medium described in Hussain et al., J.Med.Microbiol. 34:143-147, 1991 (HHW medium), with some modifications as reported in the following Example 2.

The procedure to prepare the polysaccharides according to the invention essentially involves the following steps:

- a) culturing the staphylococcal strains in the modified HHW

- medium for a period of 4-6 days;
- b) homogenizing the bacterial cells in a physiological buffer
 - c) centrifugating at 13,000 x g for 15 minutes and separating the surnatant;
 - d) desalting by dialysis the surnatant using membranes with a cut-off of 12 kDa;
 - e) freezing and lyophilizing the solution obtained in (d);
 - f) suspending the lyophilized material in a deproteinizing solution, for example trichloroacetic acid;
 - g) centrifugating at 30,000 x g the solution obtained (f) and separating the surnatant with addition of ethanol;
 - h) centrifugating the surnatant of step (g) at 20,000 x g to obtain the polysaccharide;
 - i) washing the precipitated polysaccharide with absolute ethanol, dehydrating in vacuo and suspending it in sterile H₂O.

Quantification of the purified polysaccharide could for example be performed according to the method described by Pelkonen et al., *Journal of Bacteriology* 170, 2646, 1988.

The polysaccharide obtained according to the above described method is used in the assay for the determination of antibodies in serum or other biological fluids from patients having a prosthetic device inserted.

Preferably the assay determines the presence of antibodies of the class IgG and/or IgM, following conventional immunochemical procedures, as for example enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), gel immuno-precipitation, immuno-diffusion or counter-immuno-electrophoresis, radioimmunoassay, complement fixation, and passive haemoagglutination.

A solid phase method is preferred in which the polysaccharide is immobilized to a solid surface, as for example microtiter wells and then

allowed to react with the sample, in conditions appropriate for the formation of the immune complex. Once the immune complex has formed it can be revealed by reaction with appropriate molecules, as for example antibodies or their immunocompetent fragments, labelled with radioactive isotopes, chemiluminescent or fluorogenic substances, or coupled to enzymes catalyzing colorimetric reactions and other similar substances.

The efficiency of the method disclosed by the invention was confirmed by the following experiments.

In a first set of experiments sera from 15 patients with a vascular graft infection were analyzed. The presence of a prosthetic infection in these patients was confirmed by microbiological analyses of both samples taken from the periprotetic tissues and of the grafts themselves after their surgical substitution. At least one staphylococcal strain was isolated from each sample.

Of these fifteen patients 11 showed overt clinical signs of infection while 4 had only non specific clinical signs of infection but were positive at scintigraphy after injection of ^{99m}Tc -labelled leukocytes.

Sera from 10 adult, healthy subjects of both sex were used as negative controls.

Reactivity of the sera was assayed in an ELISA format, against:

- a- monospecific biofilms formed by different staphylococcal strains (both clinical isolates and reference strains) formed on small polypropilene cylinders (0.5 x 1 mm);
- b- polispecific biofilms formed by different staphylococcal strains (both clinical isolates and reference strains) formed on small polypropilene cylinders (0.5 x 1 mm);
- c- surface proteins extracted from cultures of different staphylococcal strains.

- d- the polysaccharides described in the present invention, extracted from cultures of *Staphylococcus aureus* DSM 11942 and of *Staphylococcus epidermidis* SA 1545 (see example 1 for characterization of this strain).

Experiments yielded the following results:

- a- both IgG and IgM antibody titers against monospecific or polispecific staphylococcal biofilms or staphylococcal surface and secretory proteins were not significantly different in either infected and non infected patients;
- b- both IgG and IgM antibody titers of against the staphylococcal polysaccharide of the invention were significantly different in infected and non infected patients; they moreover allowed to differentiate between overtly symptomatic infected patients and pauci-symptomatic, scintigraphy positive patients.

Table 1. Range, Mean and standard deviation of both IgG and IgM titers obtained in ELISA assays performed on serum samples of 11 patients with a symptomatic vascular graft infection, 4 patients with a pauci-symptomatic vascular graft infection but positive for scintigraphy after injection of ^{99m}Tc labelled leukocytes, and 10 healthy control subjects, using the polysaccharide extracted from cultures of *S.aureus* DSM 11942 to sensitize microtiter wells.

Table 1

		DSM 11942							
Patient Category (n.)	IgG 1/160 Range	IgG 1/160 Mean	IgG 1/160 SD*	IgM 1/160 Range	IgM 1/160 Mean	IgM 1/160 SD*			
Infected Symptomatic (11)	0.262-1.06	0.66	0.25	0.32-1.032	0.66	0.27			
Non Infected (10)	0.177-0.266	0.17	0.03	0.101-0.195	0.14	0.04			
Infected pauci-symptomatic scintigraphy + (4)	0.251-0.457	0.32	0.09	0.332-0.56	0.47	0.09			

*Standard deviation

Table 2. Range, Mean and standard deviation of both IgG and IgM titers obtained in ELISA assays performed on serum samples of 11 patients with a symptomatic vascular graft infection, 4 patients with a paucisymptomatic vascular graft infection but positive for scintigraphy after injection of ^{99m}Tc labelled leukocytes, and 10 healthy control subjects, using the polysaccharide extracted from cultures of *S.epidermidis* SA 1545 to sensitize microtiter wells.

Table 2

		SA 1545					
Patient Category (n.)	IgG 1/160 Range	IgG 1/160 Mean	IgG 1/160 SD*	IgM 1/160 Range	IgM 1/160 Mean	IgM 1/160 SD*	
Infected Symptomatic (11)	0.173-0.971	0.47	0.21	0.31-1.071	0.56	0.2	
Non Infected (10)	0.11-0.265	0.15	0.05	0.126-0.243	0.16	0.03	
Infected pauci-symptomatic scintigraphy + (4)	0.202-0.445	0.29	0.11	0.287-0.483	0.37	0.06	

*Standard deviation

In a second set of experiments a larger number of sera was assayed to determine both IgG and IgM titers in ELISA tests performed using only the polysaccharide of the invention to sensitize microtiter wells. All throughout these experiments the polysaccharide extracted from strain SA1545 (described in example 1) was used.

A total of 97 sera were tested in these experiments. Of these 97 sera, 19 were obtained from control patients not infected and not carrying a vascular graft, 3 were obtained from control patients not infected but carrying a vascular graft, 5 were obtained from patients carrying a vascular graft infected by Gram-negative bacteria, 13 were obtained from patients not infected but carrying a vascular graft and with a previous history of vascular graft infection caused by *Staphylococcus* spp., and 57 were obtained from patients carrying a vascular graft infected by *Staphylococcus* spp.

Both IgG and IgM titers were determined in all these sera using 1/160 and 1/320 dilutions of the sera; two sets of duplicate determinations were performed to assess intra-experiment and inter-experiment reproducibility of the assay. ELISA assays were performed as described in example 4.

Results obtained in this second set of experiments are summarized in table 3.

Table 3. Results of Enzyme Linked Immunosorbent Assays (ELISA) performed using the polysaccharide preparation of *S. epidermidis* SA1545 on 97 serum samples.

The IgM titres of each serum sample used for the statistical evaluation were mean values of four different determinations obtained in two different experiments. The IgG titres of each serum sample used for the statistical evaluation were mean values of two different determinations obtained in one experiment.

Table 3

Patient category	Mean IgM titre (1:160) (range)	Mean IgM titre (1:320) (range)	Mean IgG titre (1:160) (range)	Mean IgG titre (1:320) (range)
A1) Control patients not infected and not carrying a vascular graft (n = 19)	0.189 ± 0.037 (0.148 – 0.250)	0.136 ± 0.024 (0.116 – 0.155)	0.923 ± 0.18 (0.744 – 1.469)	0.692 ± 0.21 (0.293 – 1.198)
A2) Control patients not infected but carrying a vascular graft (n = 3)	0.153 ± 0.018 (0.134 – 0.167)	0.111 ± 0.006 (0.105 – 0.116)	1.083 ± 0.410 (0.706 – 1.585)	0.823 ± 0.356 (0.476 – 1.243)
A) Total control patients not infected (n = 7)	0.184 ± 0.037 (0.134 – 0.250)	0.133 ± 0.024 (0.0.105 – 0.155)	0.945 ± 0.22 (0.706 – 1.585)	0.709 ± 0.23 (0.293 – 1.243)

CONTINUED

CONTINUED TABLE 3

B) Patients carrying a vascular graft infected by Gram-negative bacteria (n = 5)	0.227 ± 0.063 (0.128 - 0.291)	0.142 ± 0.038 (0.084 - 0.174)	1.041 ± 0.265 (0.763 - 1.480)	0.700 ± 0.259 (0.420 - 1.117)
C) Patients not infected but carrying a vascular graft and with a previous history of vascular graft infection caused by <i>Staphylococcus</i> spp. (n = 13)	0.254 ± 0.076 (0.185 - 0.379)	0.169 ± 0.055 (0.107 - 0.325)	1.152 ± 0.424 (0.513 - 1.689)	0.894 ± 0.527 (0.317 - 1.652)
D) Patients carrying a vascular graft infected by <i>Staphylococcus</i> spp. (n = 57)	0.642 ± 0.516 (0.258 - >2.5)	0.377 ± 0.396 (0.127 - 2.448)	1.532 ± 0.278 (0.765 - 1.976)	1.303 ± 0.332 (0.522 - 2.013)

Results of Student T test for comparison of IgM titres measured at serum dilution = 1:160:

$$A(A1+A2) \text{ vs. D: } p = 1.7 \times 10^{-15}.$$

$$B \text{ vs. D: } p = 2.0 \times 10^{-4}.$$

$$C \text{ vs. D: } p = 7.2 \times 10^{-8}.$$

$$A+B+C \text{ vs. D: } p = 5.3 \times 10^{-23}.$$

$$A+C \text{ vs. B: } p = 0.142.$$

$$A \text{ vs. C: } p = 2.07 \times 10^{-11}.$$

Results of Student T test for comparison of IgG titres measured at serum dilution 1:320:

$$A(A1+A2) \text{ vs. D: } p = 4,5 \times 10^{-21}.$$

$$B \text{ vs. D: } p = 7.5 \times 10^{-8}.$$

$$C \text{ vs. D: } p = 8.0 \times 10^{-7}.$$

$$A+B+C \text{ vs. D: } p = 3.1 \times 10^{-21}.$$

$$A+C \text{ vs. B: } p = 0.265.$$

$$A \text{ vs. C: } p = 0.024.$$

Comments:

- The antibody titres detectable against the slime polysaccharide (SP) of *S. epidermidis* SA1545 showed significant differences in groups of different subjects, according to their clinical history.

- Significantly higher antibody titres against the SA1545-SP were found in patients carrying vascular grafts infected by *Staphylococcus* spp., as compared to: i) control subjects with no history of such infection, either carrying a vascular graft or not; ii) patients carrying a vascular graft infected by Gram-negative bacteria; iii) subjects carrying a vascular graft not infected, but reporting a previous history of vascular graft infection by *Staphylococcus* spp. These data overall indicate that vascular graft infection caused by *Staphylococcus*

spp. elicit a specific humoral immune response against the SP, and that this response can be detected by enzyme immunoassays using a solid phase sensitized with the SA1545 SP preparation, as described in the patent application.

- Analysis of the isotypic response anti-SA1545 SP in the above groups of subjects showed significant differences of both IgM and IgG antibody titres. The IgM titres were most closely related with the state of active infection caused by *Staphylococcus* spp.

The existence of a statistically significant difference between titers of infected and non infected patients allows to establish a break point value over which it is possible to define a high probability of the existence of an infective process. It is moreover possible to use this method to monitor the patient after insertion of the graft, using the antibody titer measured at the time of implantation as a specific reference value in the follow up.

It appears clear that the above described method has several advantages, as compared to conventional diagnostic methods in this field, since it is easy to perform, inexpensive and allows to obtain reliable results (with no need of invasive procedures) even in the early phases of infection, when all the other available methods frequently fail to give clear diagnostic informations; this method moreover allows a periodic monitoring of patients for the occurrence of latent infections and could give reliable informations on therapeutic outcomes.

The invention finally provides a kit to perform the assay, which includes the polysaccharide preparation, standard antibodies and reagents for detection in adequate containers together with vehicles, excipients and additives like preservatives and stabilizers.

Preferably the kit will contain microtiter strips pre-sensitized with the antigen together with positive and negative control sera (with their original

titres).

The following examples are intended to better clarify the invention.

Example 1

Characterization of a bacterial strain adequate for the assay.

A *Staphylococcus epidermidis* strain, indicated as SA1545 – yielding the numeric code 6704773 when tested for identification with the API 20 STAPH identification system, was isolated from an aorto-bifemoral graft explanted from an adult male.

The isolate showed an evident dimorphism of colonies when grown on Columbia Agar plates supplemented with 5% defibrinated sheep blood. It was negative for mannitol fermentation when grown on mannitol salt agar, with colonies showing a 1 mm or less of diameter after 18 h of incubation at 37°C.

The isolate was sensitive to the following antibiotics, as assessed using the Kirby Bauer assay: Gentamycin, Vancomycin, Ofloxacin, Erytromycin, Imipenem, Cephalotin, Amoxicillin+clavulanic acid, cefoperazone.

The biochemical pattern of the isolate is as follows:

Fermentation	Glucose	+
Fermentation	Fructose	+
Fermentation	Maltose	+
Fermentation	Lactose	+
Fermentation	Trealose	-
Fermentation	Mannitol	-
Fermentation	Xylitol	-
Fermentation	Melibiose	-
Fermentation	Raffinose	-
Fermentation	Xylose	-

Fermentation	Saccharose	+
Production	Nitrates	-
Production	Alkaline phosphatase	-
Production	Acetoine	-
Production	N-acetyl-glucosaminidase	-
Production	Arginine hydrolase	+
Production	Urease	+

In many other cases strains showing similar characteristics and adequate to be used for the assay of the invention have been isolated.

Example 2

Preparation of the culture medium

The culture medium contains the following compounds per 1 liter:

Na ₂ HPO ₄ (2H ₂ O)	10 g
KH ₂ PO ₄	3 g
L-aspartic Acid	150 mg
L-alanine	100 mg
L-arginine	100 mg
L-cystine	50 mg
Glycine	100 mg
L-glutammic Acid	150 mg
L-hystidine	100 mg
L-isoleucine	150 mg
L-lysine	100 mg
L-leucine	150 mg
L-metionine	100 mg
L-phenylalanine	100 mg
L-proline	150 mg
L-serine	100 mg

L-threonine	150 mg
L-tryptophane	100 mg
L-tyrosine	100 mg
L-valine	150 mg
Glucose	10 g
MgSO ₄ (7H ₂ O)	500 mg
Biotine	0,1 mg
nicotinic Acid	2 mg
D-pantotenic Acid	2 mg
Pyridoxal	4 mg
Pyridoxamine	4 mg
Riboflavin	2 mg
Tiamine	2 mg
Adenine	20 mg
Guanine	20 mg
CaCl ₂ (6H ₂ O)	10 mg
MnSO ₄	5 mg
(NH ₄) ₂ SO ₄ FeSO ₄ (6H ₂ O)	6 mg

The formulation of the medium corresponds to the one described in Hussain, Hastings, White, J. Med. Microbiol. 34:143-147, 1991, with the following modifications, pertaining to the preparation: after all components of the medium are weighed, MgSO₄(7H₂O) is dissolved in distilled water, then all remaining components are added singularly, under continuous shaking. L-cystine prior to addition to the medium must be dissolved in 2-3 drops of 5N NaOH.

Once all components are dissolved (though a small amount of precipitate can persist) the volume is adjusted to 1l with distilled water and sterilized by filtration through 0,2µm porous membranes.

Example 3

Preparation of the polysaccharide.

Strains are grown in 1000 ml of modified HHW medium for 6 days at 37°C with shaking.

The bacterial pellet is collected by centrifugation at 13,000 x g for 15 minutes at 4°C, suspended in 20 ml of sterile ice-cold physiological saline (NaCl 0.9%), and freeze-dried at -20°C for 2h. The bacterial suspension is then thawed at room temperature and homogenized 10 times for 30 seconds with 30 seconds intervals.

The homogenate is then centrifuged at 13,000 x g for 15 minutes at 4°C; the resulting supernatant is stored at 4°C, while the resulting pellet is again suspended in 20 ml of sterile ice-cold saline and homogenized as above described. The supernatant resulting from the second homogenization step is added to the previously obtained one and desalted by dialysis against 1,000 volumes of distilled water at 4°C for 2 h, using dialysis membranes with a cut-off of 12 kDa. The sample is then freeze-dried at -80°C, lyophilized, suspended in 5% (W/V) trichloroacetic acid and incubated 15 minutes at 4°C.

The sample is then centrifuged at 30,000 x g for 30 minutes at 4°C; 4 volumes of ice-cold absolute ethanol are then added to the supernatant, that is further incubated at 4°C for 48h. The bulk polysaccharide is then collected by centrifugation at 20,000 x g for 30 minutes at 4°C, washed with 0.5 volumes of ice-cold absolute ethanol, dehydrated under vacuum and finally suspended in 2 ml of sterile distilled water. The polysaccharide obtained as above described is used to sensitize microtiter wells after adequate dilution (typically in 50 µl aliquots).

Example 4

Execution of the ELISA assay.

The wells of a microtiter plate are sensitized with 50 μ l of the polysaccharide prepared according to example 3 and diluted 1/80 in sterile distilled water, adequately sealed and incubated 18-24 hours at 4°C. After incubation the wells are emptied and washed 5 times with 100 μ l of 0,05% tween 20 in phosphate buffered saline (PBS).

Wells are then emptied, saturated with 200 μ l of 10% soy milk in PBS, adequately sealed and incubated at 37°C for 1 hour. Wells are then emptied, washed as above described, and 50 μ l aliquots of the diluted sera are added. Sera, including one positive control and one negative control, are typically diluted 1/160 and 1/320 in PBS. After addition of the sera the wells are adequately sealed and incubated at 37°C for 1 hour. Wells are then emptied, washed as above described, and 50 μ l of either "Peroxidase-Conjugated Rabbit Anti-human IgG" (for example DAKO cod. P0214) (diluted 1/15,000 in 10% soy milk in PBS) or "Peroxidase Conjugated Rabbit anti-Human IgM" (for example DAKO cod. P0215) (diluted 1/1,500 in 10% soy milk in PBS) are added. Wells are then adequately sealed, incubated at 37°C for 1 hour, emptied and washed as above described.

Following last washing 50 μ l of the chromogenic substrate for peroxidase (for example BM Blue POD Substrate Boehringer Mannheim, cod 1484281) are added to each well.

The wells are then incubated 10 minutes at 37°C and the reaction is then stopped by adding 50 μ l of 0.5N H₂SO₄. The OD_{450nm} of each well is then evaluated using a microtiter plate reader using one untreated well containing 100 μ l of 0.5N H₂SO₄ as the blank.

As a general rule OD_{450nm} for positive control should not be over the value 1.5.

Should this happen the assay must be repeated, reducing the time of incubation of the peroxidase substrate.

INTERNATIONALES FORMBLATT

BRACCO S.p.A.
Via Folli, 50

I-20134 Milano

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG.
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS	
Vom HINTERLEGER zugewiesenes Bezugszeichen: 6538P	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugewiesene EINGANGSNUMMER: DSM 11942
II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG	
Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde <input type="checkbox"/> eine wissenschaftliche Beschreibung <input checked="" type="checkbox"/> eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung eingereicht. (Zurechtfindendes ankreuzen).	
III. EINGANG UND ANNAHME	
Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 1998-01-20 (Datum der Erstinbringung) ¹ eingegangen ist.	
IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG	
Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser internationalen Hinterlegungsstelle am <input type="checkbox"/> eingegangen (Datum der Erstinbringung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Erstinbringung in eine Hinterlegung gemäß Budapester Vertrag ist am <input type="checkbox"/> eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung).	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheröder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle benötigten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten: <i>V. Wechs</i> Datum: 1998-01-22

¹ Falls Regel 6.4 Buchstabe d zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist.

1. A method for the determination of prosthetic infections in which at least one *Staphylococcus* strain is involved, which comprises detecting from blood samples or other biological fluid samples antibodies reacting with a polysaccharide produced by a virulent staphylococcal strain.
2. A method according to claim 1, in which the antibodies are IgG and IgM.
3. A method according to claims 1-2, in which the virulent staphylococcal strain is a strain of coagulase negative or positive species.
4. A method according to claim 3, in which said species is *Staphylococcus epidermidis* or *Staphylococcus aureus*.
5. A method according to claim 3, in which the virulent staphylococcal strain is DSMZ No. 11942.
6. A method according to claims 1-5, in which the polysaccharide is obtained by the following steps:
 - a) culturing the staphylococcal strains in modified HHW medium for a period of 4-6 days;
 - b) homogenizing the bacterial cells in a physiological buffer;
 - c) centrifugating at 13,000 x g for 15 minutes and separating the supernatants;
 - d) desalting by dialysis the supernatant using membranes with a cut-off of 12 kDa;
 - e) freezing and lyophilizing the solution obtained in (d);
 - f) suspending the lyophilized material in a deproteinizing solution;
 - g) centrifugating at 30,000xg the solution obtained in (f) and separating the supernatant with addition of ethanol;
 - h) centrifugating the supernatant of step (g) at 20,000xg to obtain the

polysaccharide;

- i) washing the precipitated polysaccharide with absolute ethanol, dehydrating in vacuo and suspending it in sterile H₂O.

7. A method according to claims 1-6, which is in form of ELISA, gel immuno-precipitation, immuno-diffusion, contro-immunoelectrophoresis, radioimmunologic assay, complement fixation.

8. A process for preparing a polysaccharide from *Staphylococcus* cultures which comprises:

- a) culturing the staphylococcal strains in modified HHW medium for a period of 4-6 days;
- b) homogenizing the bacterial cells in a physiological buffer;
- c) centrifugating at 13,000 x g for 15 minutes and separating the surnatants;
- d) desalting by dialysis the surnatant using membranes with a cut-off of 12 kDa;
- e) freezing and lyophilizing the solution obtained in (d);
- f) suspending the lyophilized material in a deproteinizing solution;
- g) centrifugating at 30,000xg the solution obtained in (f) and separating the surnatant with addition of ethanol;
- h) centrifugating the surnatant of step (g) at 20,000xg to obtain the polysaccharide;
- i) washing the precipitated polysaccharide with absolute ethanol, dehydrating in vacuo and suspending it in sterile H₂O.

9. A polysaccharide obtainable by the process of claim 6.

10. A kit for use in a method according to claims 1-5, containing the polysaccharide, the antibodies and the detection reagents in suitable containers in combination with vehicles, excipients, additives, preservatives or stabilizers.

11. A kit according to claim 8, containing microtiter strips pre-sensitized with the antigen together with positive and negative control sera.
12. Use of a polysaccharide produced by virulent staphylococcal strains in an immunochemical assay for the determination of prosthetic infections.
13. Use according to claim 12, wherein the polysaccharide is that of claim 9.
14. Staphylococcal strain deposited at DSMZ under deposit No. 11942.

1. Abstract

A method for the laboratory determination of prosthetic infections is described. This method, performed on biological fluids isolated from patients, is based on the detection of antibodies specific for the polysaccharides produced by bacteria colonizing prosthetic devices.

2. Representative Drawing

None

专利名称(译)	测定假体感染的方法		
公开(公告)号	JP2010145416A	公开(公告)日	2010-07-01
申请号	JP2010018353	申请日	2010-01-29
[标]申请(专利权)人(译)	伯拉考成像股份公司		
申请(专利权)人(译)	布拉科爱喜同行		
[标]发明人	タレルマリアクリスティーナ ロツソリーニジャンマリア セララウラ パッサリエツロクラウディオ		
发明人	タレル,マリア クリスティーナ ロツソリーニ,ジャンマリア セラ,ラウラ パッサリエツロ,クラウディオ		
IPC分类号	G01N33/53 C12P19/04 C12N1/20 G01N33/569 C12R1/445 C12Q1/14		
CPC分类号	C12P19/04 G01N33/56938		
FI分类号	G01N33/53.N C12P19/04.C C12N1/20.A G01N33/569.E C12R1/445		
F-TERM分类号	4B064/AF11 4B064/CA02 4B064/CE02 4B064/CE03 4B064/CE06 4B064/CE17 4B064/DA13 4B065/AA53X 4B065/AC14 4B065/BA22 4B065/BB01 4B065/CA22 4B065/CA27 4B065/CA46		
代理人(译)	津国 肇 田中 圣		
优先权	101998900653433 1998-02-03 IT		
其他公开文献	JP4934729B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供一种通过检测抗体与从血液样品或另一种生物液体样品中的致病性葡萄球菌菌株产生的多糖发生反应的抗体来检测蛋白水解感染的方法。描述了一种用于实验确定假体感染的方法。该方法对从患者身上分离出的生物液体进行检测，该方法基于对定植在假体装置中的细菌产生的多糖特异的抗体的检测。 [选择图]无

	DSM 11942					
	IgG	IgG	IgG	IgM	IgM	IgM
患者カテゴリー (n)	1/160 範囲	1/160 平均	1/160 SD*	1/160 範囲	1/160 平均	1/160 SD*
症候性感染患者 (11)	0.262-1 .06	0.66	0.25	0.32-1. 032	0.66	0.27
非感染患者 (10)	0.177-0 .266	0.17	0.03	0.101-0 .195	0.14	0.04
乏症候性シンチグラフィ陽性感染患者 (4)	0.251-0 .457	0.32	0.09	0.332-0 .56	0.47	0.09