

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-503248
(P2004-503248A)

(43) 公表日 平成16年2月5日(2004.2.5)

(51) Int.Cl.⁷

C12Q 1/70
C12N 15/09
C12Q 1/68
GO1N 33/50
GO1N 33/53

F 1

C12Q 1/70
C12Q 1/68
GO1N 33/50
GO1N 33/53
GO1N 33/53

テーマコード(参考)

2 G 04 5
4 B 02 4
4 B 06 3
D
M

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 41 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-510708 (P2002-510708)
(86) (22) 出願日 平成13年6月15日 (2001.6.15)
(85) 翻訳文提出日 平成14年12月13日 (2002.12.13)
(86) 國際出願番号 PCT/EP2001/006735
(87) 國際公開番号 WO2001/096595
(87) 國際公開日 平成13年12月20日 (2001.12.20)
(31) 優先権主張番号 100 28 837.5
(32) 優先日 平成12年6月15日 (2000.6.15)
(33) 優先権主張国 ドイツ(DE)

(71) 出願人 591003013
エフ. ホフマンーラ ロシュ アーゲー
F. HOFFMANN-LA ROCHE
E AKTIENGESELLSCHAFT
スイス・シーエイチ-4070バーゼル・
グレンツアーヘルストラツセ124
(74) 代理人 100091096
弁理士 平木 祐輔
(74) 代理人 100118773
弁理士 藤田 節
(74) 代理人 100096183
弁理士 石井 貞次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】インフルエンザAウイルスおよび/またはインフルエンザBウイルスの検出方法

(57) 【要約】

本発明は、インフルエンザAウイルスおよび/またはインフルエンザBウイルスによる感染を検出する方法に関し、該方法は、i) 唾液サンプルを得るステップ、ii) 検出反応のために唾液サンプルを調製するステップ、およびiii) 唾液サンプル中のインフルエンザAウイルスおよび/またはインフルエンザBウイルスを検出するステップ、を含んでなる。さらに、本発明は、インフルエンザAウイルスおよび/またはインフルエンザBウイルスによる感染を検出するためのテストキットに関し、該キットは、i) 唾液サンプルを採取するための装置、およびii) インフルエンザAウイルスおよび/またはインフルエンザBウイルスの検出のための試薬および/または補助試薬、を含んでなる。さらにまた、本発明は、インフルエンザAウイルスおよび/またはインフルエンザBウイルスによる感染を検出するためのサンプル材料としての唾液の使用に関する。 10

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

インフルエンザAウイルスおよび/またはインフルエンザBウイルスによる感染を検出する方法であって、以下のステップ：

i) 唾液サンプルを得るステップ、

i i 検出のために唾液サンプルを調製するステップ、および

i i i) 唾液サンプル中のインフルエンザAウイルスおよび/またはインフルエンザBウイルスを検出するステップ、

を含む、上記方法。

【請求項 2】

ステップi)で得られる唾液サンプルが、自然に形成された唾液であることを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

ステップi)で得られる唾液サンプルが、ウイルス特異的な富化を行うことなく唾液採取装置で得られることを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項 4】

ステップi i)において、インフルエンザAウイルスおよび/またはインフルエンザBウイルスのRNAを唾液サンプルから単離し、ステップi i i)においてRT-PCRによって増幅し検出することを特徴とする、請求項1~3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 5】

ステップi i i)において、唾液サンプルを、インフルエンザAウイルスおよび/またはインフルエンザBウイルスの存在について免疫学的に調べることを特徴とする、請求項1~3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 6】

ステップi i)において、唾液サンプルを、インフルエンザAウイルスおよび/またはインフルエンザBウイルスのウイルス核タンパク質が放出されるように溶解バッファーで処理し、ステップi i i)において、この核タンパク質を免疫学的に検出することを特徴とする、請求項5に記載の方法。

【請求項 7】

インフルエンザAウイルスおよび/またはインフルエンザBウイルスによる感染を検出するためのテストキットであって、以下のもの：

i) 唾液サンプルを採取するための装置、および

i i) インフルエンザAウイルスおよび/またはインフルエンザBウイルスの検出のための試薬および/または補助試薬、

を含んでなる上記キット。

【請求項 8】

インフルエンザAウイルスおよび/またはインフルエンザBウイルスによる感染を検出するためのサンプル材料としての唾液の使用。

【請求項 9】

唾液が自然に形成されたものであることを特徴とする、請求項8に記載の唾液の使用。

【請求項 10】

唾液サンプルが、ウイルス特異的な富化を行うことなく唾液採取装置で採取されることを特徴とする、請求項8に記載の唾液の使用。

【請求項 11】

インフルエンザAウイルスおよび/またはインフルエンザBウイルスによる感染が免疫学的試験によって検出されることを特徴とする、請求項8~10のいずれか1項に記載の唾液の使用。

【請求項 12】

インフルエンザAウイルスおよび/またはインフルエンザBウイルスによる感染が核酸の検出によって検出されることを特徴とする、請求項8~10のいずれか1項に記載の唾液

10

20

30

40

50

の使用。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、インフルエンザAウイルスおよび／またはインフルエンザBウイルスの検出方法、対応するテストキット、およびインフルエンザAウイルスおよび／またはインフルエンザBウイルス検出のためのサンプル材料としての唾液の使用に関する。

【0002】

インフルエンザは、過小評価されることの多い感染性疾患であるが、特に高齢者とハイリスク患者では高い罹患率と死亡率に至ることがある。インフルエンザAウイルスおよび／またはインフルエンザBウイルス（以下、インフルエンザA／Bウイルスと略記する）は、真性ウイルス性インフルエンザの原因であり、毎年世界中で数億人が罹患する。インフルエンザAウイルスとインフルエンザBウイルスは、主に鼻咽頭空洞部と口腔咽頭空洞部に感染し、初期には、感染者に一般的な呼吸器症状を引き起こす。

【0003】

インフルエンザを患者の臨床症状のみに基づいて高い信頼度で診断することは、経験を積んだ医師ですらできないことである。なぜならば、アデノウイルス、パラインフルエンザウイルスもしくは呼吸合包体ウイルス（RSウイルス）等の鼻腔または咽頭腔に感染する他のウイルスも類似した症状を引き起こすからである。

【0004】

インフルエンザ感染症（インフルエンザ）は医学的に非常に重要であるため、世界中のほとんどすべての国が、現在、国家的に組織化されたインフルエンザ監視システムを設けている。この計画では、一般開業医が鼻および／または喉からスワブ（綿棒で採取したサンプル材料）を採取し、それらを各国の照会センターに送付する。通常は、このスワブを溶出し、その後、MDCK細胞（Madine-Darby Canine Kidney細胞）等の哺乳動物細胞上で患者試料を培養することにより、インフルエンザA／Bウイルスを検出している。

【0005】

これらの特別な実験室での培養は、14日間も要することがあり、したがって、個々の患者の診断にすぐには対応できない。むしろ、上記各国照会センターの目的は、培養したウイルスをタイプ（型）およびサブタイプに分類して、その結果を世界保健機関（WHO）に報告することである。その後、毎年のWHOの推奨を基礎として、最近流行したウイルス株に翌年のインフルエンザワクチンを適合させることがワクチン製造業者の仕事となる。

【0006】

遺伝的な、またそれゆえに、免疫学的な可変性が特にインフルエンザAウイルスで高い理由は、通常の遺伝的浮動（点突然変異）に加えて、まれなケースでは遺伝子転位（ウイルス遺伝子の再編成）も起こりうるためである。このことは、他のウイルスとは対照的に、インフルエンザウイルスのゲノムがセグメント化されており、また、インフルエンザAウイルスが動物だけでなくヒトの病原体でもあるという事実による。

【0007】

ウイルス表面に存在する主要抗原は、ヘマグルチニン（赤血球凝集素）（H）とノイラミニダーゼ（N）である。現在、インフルエンザAウイルスについては、ヘマグルチニンの15のサブタイプ（H1～H15）とノイラミニダーゼの9つのサブタイプ（N1～N9）が知られている。

【0008】

例えば宿主（例：ブタ）がヒトに対して病原性であるA型インフルエンザウイルスと、トリのインフルエンザAウイルスに共感染すると、ウイルスゲノムの再編成が起こって、新しいインフルエンザAウイルスサブタイプが形成される。そしてそれがヒトに逆伝播した時、完全にヒトの免疫系を逃れることになる。そのごく最近の例は、早期の検出と徹底した医療にも関わらず、罹患した患者18人のうち6人が死亡した、1997年5月に香港

10

20

30

40

50

で発生したいわゆるトリウイルスインフルエンザ（A型 / H5N1 / Hong Kong / 156 / 97）であった。

【0009】

しかし、より広範な伝染病もしくは世界的な流行病を引き起こすには、新種のインフルエンザウイルスサブタイプが、直接ヒトからヒトへ伝播されなければならない。最初に1918 / 1919年に起きたサブタイプH1N1のケース（スペインかぜ、世界的に約5000万人が死亡）、1957年のケース（サブタイプH2N2、アジアかぜ、約100万人の犠牲者）、および1968年のケース（サブタイプH3N2、香港かぜ、約100万人の犠牲者）がそうである。

【0010】

新世代のインフルエンザ治療薬が最近入手できるようになり、そのいわゆるノイラミニダーゼ阻害剤は初めてインフルエンザの原因療法を可能にし、ゆえに専門家達からインフルエンザの治療における真の躍進とみなされている。この新しいクラスの物質を登録するために実施された臨床試験により、治療の成功は、主として、最初の臨床徵候が発生した後で早期に治療を開始することに起因することが示された。それゆえに、この新しい治療薬の選択、早い段階での治療開始の必要性、およびそれほど特異的でない臨床症状を考慮すると、迅速な個別診断が治療決定の基礎として有用であるだろう。

【0011】

その結果、いくつかの診断薬製造業者は最近、抗原の検出に基づいた迅速な免疫学的インフルエンザ試験を開発したが、これらの迅速試験は、サンプル材料として鼻および／または喉から綿棒で採取したスワブ、あるいは鼻洗浄によって得られる液体を使用するものである。このような迅速インフルエンザ試験の例には、Roche Diagnostic GmbH社のインフルエンザA / B迅速試験、Quidel社のQuick Vue、およびBiostar社のAB FLU OIAなどがある。

【0012】

サンプルを集めうるうえで特に問題となるのは、鼻や咽頭の空洞の感染部位から、十分な量のインフルエンザAおよび／またはインフルエンザBウイルス（以下インフルエンザA / Bウイルスと略記する）を含むサンプル材料を分離することである。したがって、サンプリングの質が迅速試験の陽性率に直接的な影響を及ぼす。これらの試験は通常約70パーセントの臨床感度を有し、すなわち、免疫学的な迅速試験もまた、対照法（細胞培養）でインフルエンザ陽性と診断された全サンプルの70%において陽性である。したがって、診断薬業者は、彼らのインフルエンザ迅速試験に関し、取得したサンプルに実際に十分な量のインフルエンザA / Bウイルスを確実に含有させるため、サンプルは特別に訓練された医療従事者によってのみ採取されるべきことを、製品説明書中で指摘している。

【0013】

かかる状況は、綿棒でふきとらねばならない咽頭腔（咽頭壁後方、咽頭、扁桃腺）の部位がウイルス感染の存在場所に応じて実際異なっているため、さらに複雑になる。このことは、例えば、インフルエンザA / Bウイルスを検出するためではなく、ストレプトコッカス感染を検出するためには、喉の別の部位からスワブを採取しなければならないことを意味する。

【0014】

鼻／喉からスワブを集めることは、患者にとって不快であり、（小さな）子供の場合には特に問題である。一方、子供は、彼らの社会的接触（幼稚園、学校）によって、また、彼らの免疫系が十分には発達していないという事実によって、インフルエンザ流行の少なくとも初期段階でインフルエンザウイルスの主なキャリアーとなることが多い。

【0015】

鼻および咽頭から得られたスワブは均質なサンプル材料ではないので、インフルエンザ試験の陽性率は、スワブの質に加えて、正確な溶出、すなわち、スワブ材料の液相（次なる試験に実際のサンプル材料として供される）への移行によっても決定される。

【0016】

10

20

30

40

50

特に新しい治療薬の選択（ノイラミニダーゼ阻害剤）は、訓練された（医療）従事者によるサンプリングを必要とする、従来用いられてきたサンプル材料（スワブ、鼻洗浄液）とは相容れない、一般開業医または患者のためのインフルエンザウイルス（インフルエンザA / Bウイルス）試験の必要性を将来的に高めるであろう。

【0017】

本発明の目的は、従来技術の欠点を解決することである。特に本発明の目的は、訓練されていない者もしくは理想的には患者自身が行うことのできる、インフルエンザAおよび/またはインフルエンザBウイルス感染の検出方法を提供することである。とりわけ本発明の目的は、インフルエンザAおよび/またはインフルエンザBウイルスを確実に検出でき、好ましくは均質であり、訓練されていない者もしくは理想的には患者自身が簡便かつ単純な方法で採取できる、そのようなサンプル材料を見出すことである。

10

【0018】

上記目的は、本明細書の独立請求項に特徴付けられる本発明の主題により達成される。本発明の好ましい実施形態は、本明細書の従属請求項に記載する。

【0019】

本発明は、インフルエンザAウイルスおよび/またはインフルエンザBウイルスによる感染を検出する方法であって、以下のステップ：

- i) 唾液サンプルを得るステップ、
- ii 検出のために唾液サンプルを調製するステップ、および
- iii 唾液サンプル中のインフルエンザAウイルスおよび/またはインフルエンザBウイルスを検出するステップ、
を含む、上記方法に関する。

20

【0020】

本発明はさらに、インフルエンザAウイルスおよび/またはインフルエンザBウイルスによる感染を検出するためのテストキットであって、以下のもの：

- i) 唾液サンプルを採取するための装置、および
- ii) インフルエンザAウイルスおよび/またはインフルエンザBウイルスの検出のための試薬および/または補助試薬、
を含んでなる上記キットに関する。

30

【0021】

さらに本発明は、インフルエンザAウイルスおよび/またはインフルエンザBウイルスによる感染を検出するためのサンプル材料としての唾液の使用に関する。

【0022】

驚くべきことに、確立された診断法を用いて、サンプル材料としての唾液からインフルエンザA / Bウイルスを確実に検出できることが見出された。

【0023】

特に、本発明の好ましい実施形態において、サンプル採取の際に唾液サンプル中のウイルスを富化する必要なしに（むしろ、自然に形成された唾液がインフルエンザA / Bウイルス検出用のサンプル材料として十分である）、唾液からインフルエンザA / Bウイルスを検出できるということは予想外のことであった。本発明において、自然に形成された唾液とは、インフルエンザA / Bウイルスを検出することを目的として唾液サンプルを集めると、サンプル中のインフルエンザA / Bウイルスが富化されないということを意味すると理解される。自然に口腔内に存在している唾液だけが採取され、例えば唾液採取容器に（例えば唾を吐くことによって）移される。コットンフリース（綿棒）のような吸収性の材料を利用して口腔内の唾液サンプルを集めたり、または、当業界で周知の唾液採取装置（例えば、Sarstedt社製のSalivette、もしくはEpitope社（Beaverton, OR 97008, USA）製のOrasure試料採取装置など）を使用して唾液サンプルを集めたりすることも可能である。

40

【0024】

当然のことながら、本発明に従って、サンプリング中にもしくはその後の処理段階におい

50

てウイルスの富化（濃縮）を行った唾液を、インフルエンザA／Bウイルス検出用のサンプル材料として使用することも可能である。

【0025】

インフルエンザ診断において従来知られているサンプル材料（すなわち鼻腔／咽喉からのスワップおよび鼻腔刺激により得られる液体）とは対照的に、本発明の唾液サンプル材料および単純なサンプル採取方法は、訓練されていない者または患者自身による標準化されたサンプル採取を可能にし、これにより、インフルエンザA／Bウイルス試験の診断信頼度が向上する。さらに、唾液はこれまで使用してきた材料より均質なサンプル材料であり、このことも診断信頼度の向上に貢献する。

【0026】

本発明の方法では、まず初めに、唾液サンプルを採取する。例えば、サンプル採取は、上記のように、容器へ唾を吐くか、口腔内を綿棒のような吸収性の材料または同様の材料を用いて唾液サンプルを吸収させるか、あるいは、慣用の唾液採取装置を使用することによって行なうことができる。

【0027】

続いて、採用する検出方法（免疫学的検出または核酸による検出）に従う検出反応のために唾液サンプルを調製する。

【0028】

免疫学的検出の場合には、インフルエンザA／Bウイルスのウイルス核タンパク質を、例えば溶解試薬によって唾液サンプルから放出させる。かかる試薬は、当業者には公知であり、溶解のための活性成分として例えば塩類または界面活性剤を含むことができる。インフルエンザウイルス検出用の溶解試薬は、界面活性剤（例えば、好適であることが証明されているTrition（登録商標）X100、Tween（登録商標）20または-Oクチルグリコピラノシド）、弱い還元剤（例えば、N-アセチルL-システインまたはDTT（ジチオトレイトール））、生理食塩水（すなわち、0.9重量%のNaClを含む20～50mMリン酸バッファー）、保存剤（例えば0.09重量%のNaN₃）、および、必要に応じて、非特異的結合を低減させるタンパク質（例えば、BSA（ウシ血清アルブミン）またはBPLA（ウシ血漿アルブミン））を含んでいるのが好ましい。ウイルス核タンパク質に加えて、免疫学的試験で、例えば、ウイルスマトリックスタンパク質またはウイルスポリメラーゼを検出することもできる。さらに、インフルエンザA／Bウイルスのヘマグルチニンまたはノイラミニダーゼを検出することも可能であり、この場合には、これらのウイルス成分がウイルス表面上に存在することから溶解を必要としない。

【0029】

ウイルス検出が核酸に基づく場合は、例えば、ウイルス核酸（RNA）を単離し、精製し、そして検出に必要なプライマーの存在下で適切に増幅する。好ましくは逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）によって増幅する。これらのステップは当業者に公知であり、先に増幅を行わない核酸試験も同様である。

【0030】

インフルエンザA／Bウイルスは、公知の方法により唾液サンプル中で検出される。

【0031】

例えばウイルス核タンパク質の免疫学的検出の場合には、適切な標識抗体を用いてサンドイッチ型複合体を形成させ、それを検出することができる。当然、競合試験フォーマットも可能である。検出は、迅速な試験として目視により評価できる免疫学的クロマトグラフィーテストトリップを用いて行なうのが好ましいが、あらゆる慣例的な免疫学的方法（例えば、ELISA、凝集試験、濁度試験等）により行なうことができる。

【0032】

インフルエンザA／BウイルスをRNAのような核酸により検出する場合は、RT-PCR産物を標識プライマーで標識して、プライマー上の標識（例えば、酵素標識または蛍光標識）を標識の種類に応じて検出することが好ましい。

【0033】

10

20

30

40

50

本発明の方法を実施するためのテストキットも本発明の主題である。テストキットは、重要な構成要素として、第一に、唾を吐き入れるための容器のような唾液サンプル採取装置、1つ以上の吸収性綿棒、または、従来の唾液採取装置（例えば、Sarstedt社製のSalivetteまたはEpitope社製のOrasure試料採取装置）を含む。さらに、テストキットは、唾液サンプル中のインフルエンザA/Bウイルスを検出するために必要な試薬および補助試薬をすべて含む。免疫学的検出の場合には、これらは、例えば、ウイルス核タンパク質を放出させるための溶解バッファー、必要に応じて標識された抗体、および場合により、免疫学的検出を行うための反応媒体（テストストリップ、マイクロタイプレート、試験管）である。対応する試薬および補助試薬は多数の実施形態において当業者に公知である。同じものが核酸試験にも適用される。この場合、キットは、例えば、必要なPCR試薬と反応容器を含む。

10

【0034】

以下の実施例により本発明をさらに説明する。

【0035】

実施例1. サンプル材料としての唾液からのインフルエンザウイルス感染の検出

インフルエンザウイルスを検出するためのサンプル材料としての唾液の適合性を証明するために、インフルエンザ感染の疑いがある10名と感染の疑いがない4名から、咽喉スワブ2つと唾液サンプル1つを採取した。咽喉スワブから得られたサンプル材料は比較目的のために採取し、インフルエンザA/Bウイルス感染について調べた。これらの検査の結果を、サンプル材料として唾液を用いて得られた結果と比較した。表1（実施例の実験部の最後に示す）は、上記比較結果の概要を示す。

20

【0036】

1.1 サンプル採取1.1.1. 咽喉スワブ

咽喉スワブは、Copan Italia社製の滅菌済使い捨て綿棒（I-25125 Brescina；注文番号167CS01）を使用して、当業者によく知られている方法で採取した。各患者から採取した咽喉スワブ2つは、互いに直接隣接して配置した2つの綿パッドを有する綿棒で喉を一回こすって採取した。こうして、2つのスワブが実質的に比較可能となるようにした。

30

【0037】

1.1.2. 唾液サンプル

唾液サンプルは、スクリューキャップ付きの小さな使い捨てプラスチックチューブ（Sarstedt社製、注文番号62.559.001）中に約0.5mlの自然に形成された唾液を採取することによって、患者自身が集めた。当業者には公知である唾液採取方法および唾液採取装置（例えば、Sarstedt社製のSalivetteまたはEpitope社（Beaverton, OR 97008, USA）製のOrasure試料採取装置）は意図的に使用しなかった。それは、予備的な濃縮または唾液の処理をすることなくインフルエンザウイルスを検出することが可能であることを示すためであった。もちろん、本発明に従って、上記唾液採取方法および唾液採取装置を使用することは同様に可能である。

40

【0038】

1.2. 咽喉スワブからのインフルエンザA/Bウイルスの検出（比較目的のため）1.2.1. 細胞培養による咽喉スワブからの検出

各々のケースにおいて、1番目の咽喉スワブは、Virotest社のインフルエンザウイルス輸送培地（Rosenbergstr. 85, D-70193 Stuttgart, カタログ番号0500300）を1.5ml含むチューブ中へサンプル採取後に直ちに移し、そしてMDCK細胞（Madine-Darbyイヌ腎細胞）上で培養した。サンプルは、文献に記載されている方法（“Mikrobiologische Diagnostik”, Georg Thieme編, Stuttgart, New Y

50

ork, 1992, 出版者 Friedrich Burkhardt, 371頁)に従って培養した。上記結果を表1に示すが、ここで「+」は陽性の結果を、「-」は陰性の結果を表す。

【0039】

1.2.2. 免疫学的迅速試験による咽喉スワブからの検出

各々のケースにおいて、2番目のスワブは、患者の喉からサンプルを取り出した後すぐに、インフルエンザウイルスの存在についての免疫学的抗原迅速試験 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany のインフルエンザ A / B 迅速試験、カタログ番号 2158663) によって調べた。本ケースで使用した迅速試験は、本質的に EP-A 0926498 の実施例2に記載された免疫学的迅速試験に相当する。この文献は参考により本明細書に組み入れるものとする。

【0040】

テストストリップの目視による評価に加えて、クロマトグラフィー完了後の検出線の強度を、反射率 (remission) 光度測定装置 (波長 555 nm の 24 の緑色 LED を用いたリング型照明とレンズ付 CCD カメラを装備) によって定量的に測定した。検出線のシグナル強度は、反射率パーセンテージ (% rem; 100% の反射率とされたテストストリップの「白色」面に対して) として調べた： 98.5% を越える反射率値は、ユーザーによって陰性シグナルとして検出され； 96% ~ 98.5% の反射率値は、弱い陽性シグナルとして検出され； 96% より低い反射率値は、明らかな陽性シグナルとして検出される。上記結果を表1に示すが、ここで「+」は陽性シグナルを、「(+)」は弱い陽性シグナルを、そして「-」は陰性シグナルを表す。

【0041】

1.3. 唾液からのインフルエンザ A / B ウィルスの検出

1.3.1. RT-PCR による唾液中のウィルス核酸の検出

唾液サンプルは、インフルエンザウイルス核酸 (この場合リボ核酸、RNA) の存在について RT-PCR (逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応) を用いて調べた。分析方法は、サンプルの調製 (阻害物質を分離するため)、核酸の增幅、核酸の検出からなる、核酸診断における慣例的な3つの部分ステップを含む (以下の 1.3.1.a ~ 1.3.1.c を参考されたい)。手順は以下の通りであった。

【0042】

1.3.1.a サンプルの調製

Roche Molecular Biochemicals社 (Sandhofer Strasse 116, D-68305, Mannheim, Germany) から市販されている High Pure ウィルス RNA キット (注文番号 1858882) を、インフルエンザウイルス RNA を単離するために使用した。手順は、製品説明書に記載されている標準的プロトコールに従うもので、初めに反応容器 (フィルターチューブ) 当たり 200 μl の唾液を、結合バッファーの存在下で、フィルターチューブのガラスフリースに結合させ、存在する可能性のある阻害物質を2回の洗浄ステップで除去し、200 μl の溶出バッファー中へウィルス核酸を溶出させた。この方法では、サンプル量がサンプル調製の前 (唾液) と後 (溶出物) とで同一になるように注意した。その結果、インフルエンザウイルスの濃縮は全く起こらなかった。当然、唾液の量より少ない量の溶出バッファーで溶出ステップを実施し、溶出液中にインフルエンザウイルスを濃縮または富化することも本発明に従って可能である。

【0043】

1.3.1.b RT-PCR

特別に記載しない限り、試薬は、すべて Roche Molecular Biochemicals社 (上記参照) から入手した。

【0044】

PCR 反応容器あたりの反応容量は 50 μl とした。これは、10 μl のサンプル量 (サンプル調製からの溶出物) および 10 μl の Bicine バッファー (5 × RT-

PCR バッファー)を含んでいた。マスター混合物の他の成分は以下の最終濃度で存在した: 2.5 mmol/l の酢酸マンガン、0.2 mmol/l ずつの次の dATP (2' - デオキシアデノシン-5'三リン酸)、dCTP (2' - デオキシシチジン-5'三リン酸)、dTTP (2' - デオキシグアノシン-5'三リン酸) および dUTP (2' - デオキシウリジン-5'三リン酸)、ならびに 0.05 mmol/l のdTTP (2' - デオキシチミジン-5'三リン酸); 0.01U/μl のUNG (ウラシルDNAグリコシラーゼ); 0.2U/μl のThermus thermophilus HB8 由来のTth ポリメラーゼ; 0.8U/μl のRNase 阻害剤; および 1.0 μmol/l のフォワードプライマーとリバースプライマー。

【0045】

10

プライマーの配列は文献から入手した (James C. Donofrio et al., Detection of Influenza A and B in Respiratory Secretions with the PCR, 1992, PCR Methods and Applications 1, 263-268 頁)。プライマーは、インフルエンザ A に対してタイプ特異的であり、長さが 212 塩基対のマトリックス遺伝子の高度に保存された遺伝子セグメント (101~312 位) を有している。リバースプライマーは、次のマイクロタイターブレートでの増幅産物の検出のため、ビオチンで 5' 末端を標識した。インフルエンザ B に対するタイプ特異的プライマーも文献から公知である (James C. Donofrio et al., Detection of Influenza A and B in Respiratory Secretions with the PCR, 1992, PCR Methods and Applications 1, 263-268 頁)。

20

【0046】

マスター混合物を、Perkin Elmer 9600 サーモサイクラーで以下の温度プロフィールを用いて増幅した: UNG の添加後、室温で 20 分 + 60 で 45 分 + 94 で 2 分 + 10 サイクル (94 で 30 秒 + 50 で 60 秒 + 68 で 90 秒) + 35 サイクル (94 で 30 秒 + 60 で 60 秒 + 68 で 90 秒) + 68 で 7 分。

【0047】

30

1.3.1c ハイブリダイゼーションおよび検出

RT-PCR によって増幅された核酸は、Roche Molecular Biochemicals 社カタログ番号 1636111 の PCR ELISA (DIG 検出) を使用して検出した。ピペット容量をのぞいて、すべてのステップを使用説明書にしたがって実施した。

【0048】

40

増幅産物 10 μl を、1.5 ml の反応容器中で変性溶液 20 μl と混合し、室温で 10 分間インキュベートした。その後、250 μl のジゴキシゲニン標識したハイブリダイゼーションプローブを添加した。ハイブリダイゼーションプローブの濃度は 70 ng/ml であった。

【0049】

ハイブリダイゼーションプローブの配列は文献から入手した (James C. Donofrio et al., Detection of Influenza A and B in Respiratory Secretions with the PCR, 1992, PCR Methods and Applications 1, 263-268 頁)。プローブは、インフルエンザ A のマトリックス遺伝子の 177~205 位 (セグメント 7) に対するものである。インフルエンザ B の相当するプローブも、文献から公知である (James C. Donofrio et al., Detection of Influenza A and B in Respiratory Secretions with the PCR, 1992, PCR Methods and Applications 1, 263-268 頁)。

50

【0050】

反応混合物 200 μl を、ストレプトアビシンでコーティングしたマイクロタイタープレートのウェルに移し、37℃で1時間振盪機上にてインキュベートした。ハイブリダイゼーション産物をマイクロタイタープレート壁のストレプトアビシンに結合させた後、ウェルの内容物を吸引し、毎回 300 μl の洗浄溶液で3回洗浄した。その後、抗ジゴキシゲニン - ベルオキシダーゼ基質（抗 DIG - POD コンジュゲート）200 μl を上記ウェルに添加し、この溶液を振盪機上 37℃ で 30 分間インキュベートした。POD コンジュゲートを結合させた後、ウェルの内容物を吸引し、300 μl の洗浄溶液で3回洗浄し、次に、200 μl の 2,2'-アジノ-ジ-[3-エチルベンズチアゾリンスルホネート (6)]ジアンモニウム塩基質 (ABTS 基質) を添加した。37℃ で 30 分間最終的にインキュベートした後、405 nm での発色をマイクロタイタープレートリーダーで測定した。 10

【0051】

唾液サンプルの各 PCR 測定について、汚染による疑陽性結果を排除するために複数の陰性対照 (DEMC 水 (製品番号 16-001Y "Accu Gene Water, 分子生物学グレード, オートクレーブ済", Bio Whittaker Europe S.p.r.l (Parc Industriel de Petit-Rechain, B-4800 Verviers, Belgium) 製) を平行して実施した。また、複数の陽性対照 (インフルエンザウイルスを含有するMDCK 培養上清の連続希釈物) をサンプル調製および RT-PCR によって平行して測定した。さらに、マイクロタイタープレート上で検出試薬を調べるためにキットの内部陽性対照も実施した。 20

【0052】

マイクロタイタープレートで平行して行った陰性対照の吸光度値は、通常 100~150 mA であった。平行して実施されたキットの内部陽性対照の値は、通常 1000~1500 mA であった。 30

【0053】

プランク値またはゼロ値の 2 倍を超えたシグナルに相当する 300 mA 以上の吸光度値を患者サンプルの陽性シグナルとして定義した。上記結果を表 1 に示すが、ここで「+」は陽性結果を、「-」は陰性結果を表す。 30

【0054】

1.3.2. 免疫学的迅速試験による唾液中のウイルス抗原の検出
Roche Diagnostics GmbH のインフルエンザ A / B ウィルス迅速試験、カタログ番号 2158663 を用いて、唾液中のインフルエンザ A / B ウィルスを検出した。使用した迅速試験は、本質的に EP-A 0926498 の実施例 2 に記載された免疫学的迅速試験に相当する。この文献は参考により本明細書に組み入れるものとする。 40

【0055】

通常、この試験を使用して、免疫学的クロマトグラフィーテストストリップにより咽喉スワブ中のウイルス核タンパク質をタイプ特異的に検出した。この試験は、インフルエンザ A ウィルスとインフルエンザ B ウィルスとを識別するものではない。 40

【0056】

サンプル材料として唾液を使用してテストストリップの良好なクロマトグラフィーを確実なものとするために、テストキットの構成要素ではない特定の溶解 / 溶出バッファーを使用した。この特定の溶解 / 溶出バッファーは、以下の組成を有する：

0.9 重量 % の NaCl、2 mM の KH₂PO₄、10 mM の Na₂HPO₄、0.095 重量 % の Na₃N₃、10 mM の EDTA、1.5 重量 % のウシ血清アルブミン (BSA)、1.5 重量 % の Triton (登録商標) X-100。

【0057】

試験は以下の通りに実施した：

製品説明書に記載されているように、最初に、テストキット中に含まれている 3 部 (= 8 50

0 0 μ l) の溶解 / 溶出バッファーで患者サンプルとしての咽喉スワブを溶出するかわりに、 3 0 0 μ l の唾液と 5 0 0 μ l の特定の溶解 / 溶出バッファーを反応容器に添加して混合した。

【 0 0 5 8 】

残りの試験手順は、製品説明書に記載されている方法に従って行った。これは、最初に抗体溶液 1 (核タンパク質 A と核タンパク質 B に対するビオチン化モノクローナル抗体を含有) を 2 滴添加し、抗体溶液 2 (核タンパク質 A と核タンパク質 B に対するジゴキシゲニン化モノクローナル抗体を含有) を 2 滴添加し、次に、テストストリップ上でこの反応混合物のクロマトグラフィーを行うことを含んでなる。

【 0 0 5 9 】

E P - A 0 9 2 6 4 9 8 から公知であるように、テストストリップは、サンプル液中で離脱されうる金コンジュゲートを可逆的に含浸させたコンジュゲートフリースを含んでいる。

【 0 0 6 0 】

検出線としてのポリストレプトアビジンおよび対照線としてのポリクローナル抗体 P A B <マウス F c > S - I g G が非可逆的に含浸されているニトロセルロース膜が、クロマトグラフィー方向下流のテストストリップの別の領域に配置される。

【 0 0 6 1 】

被験体の存在下で反応容器中で形成された、ビオチン化抗体 / 核タンパク質 / ジゴキシゲニン化抗体からなるサンドイッチ型複合体は、テストストリップに沿ってクロマトグラフ展開され、サンドイッチ型複合体のジゴキシゲニン標識抗インフルエンザ抗体に対する抗ジゴキシゲニン抗体によって可溶化された後、金コンジュゲートと結合し、次いで、サンドイッチ型複合体のビオチン標識した抗インフルエンザ抗体によってニトロセルロース膜上のポリストレプトアビジン線に捕捉される。その結果、ニトロセルロース膜上に赤色の線が見えるようになり、これが試験における陽性シグナルを表す。

【 0 0 6 2 】

過剰な金コンジュゲートは、下流にクロマトグラフ展開され、P A B <マウス F c > S - I g G によって別の赤色の線としてニトロセルロース膜の対照線上に捕捉される。

【 0 0 6 3 】

テストストリップの目視による評価に加えて、クロマトグラフィー完了後の検出線の強度を、反射率光度測定装置 (波長 5 5 5 nm の 2 4 の緑色 LED を用いたリング型照明とレンズ付 CCD カメラを装備) によって定量的に測定した。検出線シグナルの強度は、反射率パーセンテージ (% r e m : 1 0 0 % の反射率とされたテストストリップの「白色」面に対して) として調べた： 9 8 . 5 % を越える反射率値は、ユーザーによって陰性シグナルとして検出され； 9 6 % ~ 9 8 . 5 % の反射率値は、弱い陽性シグナルとして検出され； 9 6 % より低い反射率値は、明らかな陽性シグナルとして検出される。上記結果を表 1 に示すが、ここで「+」は陽性シグナルを、「(+)」は弱い陽性シグナルを、そして「-」は陰性シグナルを表す。

【 0 0 6 4 】

1 . 4 . 結果

患者サンプルから得られたいいくつかの結果を、一例として下記に示す (表 1)。

【 0 0 6 5 】

これらの結果はもっぱらインフルエンザ A ウィルスの検出に関係する。というのは、サンプル採取時にインフルエンザ A のみが優勢で、インフルエンザ B に感染した患者は全く存在しなかったからである。専門家であれば、インフルエンザ A とは対照的に、インフルエンザ B は毎冬流行するものではなく、たとえ両方のインフルエンザ A / B ウィルスが冬期に存在したとしても、インフルエンザ B は常に流行がずっと少ないことを理解している。

【 0 0 6 6 】

さらに、人工的に調製したインフルエンザ B 陽性唾液サンプル (インフルエンザ B ウィルスの培養上清を添加した唾液サンプルのプール) が、核酸試験ならびに免疫学的試験にお

10

20

30

40

50

いて唾液中のインフルエンザウイルスを検出するのに好適であったことは特筆すべきである。したがって、示した結果は、唾液からのインフルエンザAウイルスに加えて、インフルエンザBウイルスを別々にもしくは一緒に検出することに関して、本発明の範囲を限定するものではない。むしろ、唾液は、インフルエンザA/Bウイルス検出用のサンプル材料として好適である。

【0067】

【表1】

| 被験者番号 ^A | 咽喉スワブサンプル (比較目的のため) | | | 唾液サンプル | | |
|--------------------|------------------------|-----------------|-------------------|--------------------|-----------------|-------------------|
| | 培養 ^B | 免疫学的迅速試験 | | PCR結果 ^E | 免疫学的迅速試験 | |
| | | 目視 ^C | 光度測定 ^D | | 目視 ^C | 光度測定 ^D |
| 1 | + | + | + | + | + | + |
| 2 | + | (+) | (+) | + | + | + |
| 3 | + | (+) | (+) | + | + | + |
| 4 | + | + | + | + | + | + |
| 5 | + | + | + | + | + | + |
| 6 | + | (+) | (+) | + | + | + |
| 7 | + | - | - | + | (+) | (+) |
| 8 | + | - | - | + | (+) | (+) |
| 9 | - | - | - | - | - | - |
| 10 | - | - | - | - | - | - |
| 11 | - | - | - | - | - | - |
| 12 | - | - | - | - | - | - |
| 13 | - | - | - | - | - | - |
| 14 | - | - | - | - | - | - |

A：被験者番号1～10の被験者はインフルエンザ様症状を示した。被験者番号11～14の被験者は、急性呼吸器症状を示さなかった。

B：M D C K細胞上で培養（上記1.2.1.参照）；「+」陽性、「-」陰性。

C：1.2.2および1.3.2で記載した迅速試験手順（上記参照）；

「+」陽性、「(+)」弱陽性、「-」陰性。

D：反射率光度測定装置による検出線強度の定量的測定（上記1.2.2および1.3.2参照）；本明細書に示したスケールに従う相対的結果（「+」陽性、「(+)」弱陽性、「-」陰性）のみを示す。

E：マイクロタイタープレートの吸光度値を405nmで測定した（上記1.3.1参照）；本明細書に示したスケールに従う相対的結果（「+」陽性、「-」陰性）のみを示す。

【0068】

下記は、表1で示された結果から明らかである：

・ 臨床的症状にしたがってインフルエンザ患者として分類された被験者（番号1～10）のすべてが、実際にインフルエンザ陽性というわけではなかった。被験者9および10は、咽喉スワブの培養、唾液サンプルのPCR、ならびに唾液および咽喉スワブの迅速試験において陰性であった。このことは、臨床的症状のみを基礎としてインフルエンザの決定的診断を下すことは不可能であるという、冒頭部に記載した、また専門家の間でも知られている説を強調するものである。

【0069】

・ 無症候性の被験者（番号11～14）の咽喉スワブサンプルおよび唾液サンプルは先に挙げたすべての試験方法で陰性であり、このことは、これらの方法の臨床的特異性を実証するものである。

【0070】

・ 咽喉スワブの細胞培養によってインフルエンザA陽性であることが判明している8名

10

20

30

40

50

の被験者（番号 1 ~ 8、いわゆる培養陽性被験者）のうち、6名の被験者が咽喉スワブを使用する免疫学的迅速試験によっても陽性と診断された。このことは、サンプル材料としてスワブを使用する従来の迅速試験の臨床的感度が、ゴールドスタンダードとして現在認められている細胞培養法における感度よりも低いことを示すものである（各製造業者の製品説明書に従う種々の免疫学的迅速試験の臨床的感度：Q u i d e l 鼻腔スワブについて 73%、R o c h e 咽喉スワブについて 70%、B i o s t a r 咽喉スワブについて 60%および鼻咽頭スワブについて 83%）。

【0071】

・ 対照的に、8名すべての培養陽性被験者から採取した対応する唾液サンプルは免疫学的迅速試験で陽性であることが判明した。 10

【0072】

・ さらに、唾液サンプルを用いる免疫学的迅速試験のテストトリップ上の検出線の強度は、咽喉スワブを使用した場合の対応する検出線強度よりも幾分強いことが、反射率の値（表には示していない）の比較により示される。

【0073】

・ したがって、唾液による迅速試験の結果は、対応する唾液からのP C R 結果と一致しており、これらの結果は、サンプル採取時に予め富化しなくても、サンプル材料としての唾液中にインフルエンザA / Bウイルスを確実に検出し得ることを示すものである。

【国際公開パンフレット】

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
20. Dezember 2001 (20.12.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/96595 A2

(51) Internationale Patentklassifikation: C12Q 1/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/06735

(22) Internationales Anmeldedatum:
15. Juni 2001 (15.06.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
100 28 837.5 15. Juni 2000 (15.06.2000) DE

(71) Anmelder (nur für DE): ROCHE DIAGNOSTICS GMBH [DE/DE]; Sandhofer Strasse 116, 68305 Mannheim (DE).

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von DE, US): ETOFFMANN-LA ROCHE AG [CH/CH]; Grenzacherstrasse 124, CH 4000 Basel (CH).

(72) Erfinder: und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KLEPP, Juergen [DE/DE]; Ortsweg 5, 76676 Graben Neudorf (DE); SCHLIPPERBACHER, Reiner [DE/DE]; Schenkenbachstrasse 9, 67098 Oedekoven (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BE, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, ER, ES, FI, GB, GD, GR, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(54) Titel: METHOD FOR THE DETECTION OF INFLUENZA A/B VIRUSES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM NACHWEIS VON INFLUENZA A/B-VIRKEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for the detection of an infection with influenza A and/or influenza B virus, comprising the steps: i) obtaining a saliva sample, ii) preparation of the saliva sample for a detection reaction and iii) detection of the influenza A and/or influenza B virus in the saliva sample. The invention further relates to a testkit for the detection of an infection by the influenza A and/or influenza B virus, comprising: i) a device or the collection of a saliva sample and ii) reagents and adjuncts for the detection of influenza A and/or influenza B viruses. Furthermore, the invention relates to the use of saliva as a sample material for the detection of an infection with the influenza A and/or the influenza B virus.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis einer Infektion mit dem Influenza A- und/oder Influenza B-Virus umfassend die Schritte i) Gewinnung einer Speichelprobe, ii) Vorbereitung der Speichelprobe für eine Nachweisreaktion; und iii) Nachweis des Influenza A- und/oder Influenza B-Virus in der Speichelprobe. Die Erfindung betrifft weiterhin einen Testkit zum Nachweis einer Infektion mit dem Influenza A- und/oder Influenza B-Virus enthaltend: i) eine Vorrichtung zum Sammeln einer Speichelprobe; und ii) Reagenzien und Hilfsmittel zum Nachweis von Influenza A und/oder Influenza B-Virus. Schliesslich betrifft die Erfindung die Verwendung von Speichel als Probenmaterial zum Nachweis einer Infektion mit dem Influenza A- und/oder Influenza B-Virus.

WO 01/96595 A2

Erklärungen gemäß Regel 4.17:

— hinsichtlich der Bezeichnung des Anmelders, die Priorisierung einer früheren Anmeldung zu beanspruchen (Regel 4.17 Ziffer ii) für die folgenden Bestimmungsstaaten AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BE, BG, BR, BY, HU, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, ER, ES, FI, GB, GD, GR, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ZR, ARPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), europäische Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TI, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BT, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NF, SN, TD, TG).

Erfindungsdeklaration (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US

Vorliegen:

eine internationale Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Fertigstellung des Berichts;

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verweisen.

Verfahren zum Nachweis von Influenza A/B-Viren

Die Erfindung betrifft ein Verfahren für den Nachweis von Influenza A/B-Viren, einen entsprechenden Testkit sowie die Verwendung von Speichel als Probenmaterial für den Nachweis von Influenza A/B-Viren.

Grippe ist eine häufig unterschätzte Infektionskrankheit, die insbesondere bei älteren Menschen und bei Risikopatienten zu einer hohen Morbiditäts- und Mortalitätsrate führen kann. Influenza A- und/oder Influenza B-Viren (im Folgenden auch kurz: Influenza A/B-Viren) sind verantwortlich für die echte Virusgrippe, an der weltweit jährlich mehrere 100 Millionen Menschen erkranken. Die Influenza A- und B-Viren befallen dabei primär den Nasen-, Mund- und Rachenraum und verursachen beim Betroffenen zunächst allgemein respiratorische Symptome.

Selbst dem erfahrenen Mediziner ist es nicht möglich, ausschließlich aufgrund der klinischen Symptomatik des Patienten die Grippe mit hoher Sicherheit zu diagnostizieren, da auch andere, den Nasen- oder Rachenraum befallende Viren wie etwa Adenoviren, Parainfluenzaviren oder Respiratory Syncytial-Viren (RS-Viren) eine vergleichbare Symptomatik verursachen.

Aufgrund der hohen medizinischen Bedeutung der Influenzainfektion (Grippe) verfügt inzwischen nahezu jedes Land der Erde über ein national organisiertes Grippeüberwachungssystem. Dabei werden von niedergelassenen Ärzten Verdachtspatienten Nasen- und/oder Rachenabstriche entnommen und diese an das jeweilige nationale Referenzzentrum eingeschickt. Der Nachweis der Influenza A/B-Viren erfolgt dann üblicherweise durch Elution des Abstrichtupfers und anschließender Kultivierung der Patientenproben auf Säugetierzellen, beispielsweise MDCK-Zellen (Madin-Darby Canine Kidney-Zellen).

Die Kultivierung in diesen Speziallabora kann bis zu 14 Tage in Anspruch nehmen und ist daher als Diagnose für den einzelnen Patienten nicht von unmittelbarer Relevanz. Vielmehr besteht die Aufgabe der nationalen Referenzzentren darin, die kultivierten Viren zu typisieren.

und zu subtypisieren, und die Ergebnisse an die Weltgesundheitsorganisation (WHO) zu melden. Aufgabe der Impfstoffhersteller ist es dann, aufgrund der jährlichen Empfehlung der WHO die nächstjährigen Grippeimpfstoffe an die zuletzt zirkulierenden Virusstämme anzupassen.

Der Grund der hohen genetischen und damit verbundenen immunologischen Variabilität, insbesondere bei Influenza A-Viren, liegt darin, daß es neben der gewöhnlichen genetischen Drift (Punktmutation) in seltenen Fällen auch zu einem genetischen Shift („Reassortment“, d.h. Neusortierung der Virusgene) kommen kann. Dies wird bedingt durch die Tatsache, daß das Genom der Influenza-Viren im Gegensatz zu anderen Viren segmentiert vorliegt und daß Influenza A sowohl human- als auch tierpathogen ist.

Die an der Oberfläche des Virus sitzenden immundominanten Antigene sind das Hämagglutinin (H) und die Neuraminidase (N). Bei Influenza A sind derzeit 15 Subtypen des Hämagglutinins (H1 – H15) und 9 Subtypen der Neuraminidase (N1 – N9) bekannt.

Beispielsweise kann es bei der Coinfektion eines Wirtes (z. B. eines Schweines) mit einem humanpathogenen Influenzavirus vom A-Typ und einem Influenza A-Vogelvirus zu einer Neusortierung („Reassortment“) des Virusgenoms und damit zu einem neuen Influenza A-Virus-Subtyp kommen, der dann bei Rückübertragung auf den Menschen dessen Immunsystem vollkommen unterläuft. Jüngstes Beispiel dafür war das Auftreten der sogenannten Vogelvirusgrippe im Mai 1997 in Hong Kong (Typ A/H5N1/Hong Kong/156/97), bei der trotz frühzeitigen Erkennens und intensivmedizinischer Behandlung 6 der 18 erkrankten Patienten verstarben.

Um jedoch zu einer größeren Epidemie oder sogar zu einer weltweiten Pandemie zu führen, muß ein neuer Influenza-Virus-Subtyp direkt von Mensch zu Mensch übertragbar sein, wie es etwa 1918/19 bei dem erstmaligen Auftreten des Subtyps H1N1 (Spanische Grippe, weltweit ca. 50 Millionen Tote), 1957 (H2N2, Asiatische Grippe, ca. 1 Million Opfer) und 1968 (H3N2 Hong Kong Grippe, ca. 1 Million Opfer) der Fall war.

Seit kurzem ist eine neue Generation von Grippemitteln verfügbar, die sogenannten Neuraminidaseinhibitoren, die erstmals eine kausale Therapie der Grippe ermöglichen und daher in Expertenkreisen als echter Durchbruch in der Grippetherapie angesehen werden. Klinische Studien bei der Zulassung dieser neuen Substanzklasse haben gezeigt, daß der Therapieerfolg maßgeblich von einem frühen Therapiebeginn nach Auftreten der ersten klinischen Symptome abhängt. Aufgrund dieser neuen therapeutischen Option, der

Notwendigkeit eines fruhen Therapiebeginns einerseits und der relativ unspezifischen klinischen Symptomatik andererseits erscheint eine schnelle Individualdiagnose als Therapieentscheidung hilfreich.

Daher haben vor kurzem einige Diagnostikahersteller immunologische Grippeschneilteste auf Basis eines Antigennachweises entwickelt, wobei diese Schnellteste auf Nasen- und/oder Rachenabstriche bzw. auf durch Nasenspülungen gewonnene Flüssigkeit als Probenmaterial zurückgreifen. Beispiele für solche Grippeschneilteste sind der Influenza A/B Rapid Test der Firma Roche Diagnostics GmbH, Quick Vue von Quidel und AB FLU OIA von Biostar.

Ein besonderes Problem bei der Probengewinnung besteht darin, aus dem befallenen Bereich des Nasen- und Rachenraumes Probenmaterial zu entnehmen, das für einen Nachweis ausreichende Mengen an Influenza A- und/oder Influenza B-Viren (in Folgenden kurz: Influenza A/B-Viren) enthält. Die Qualität der Probennahme hat somit einen unmittelbaren Einfluß auf die Positivitätsrate der Schnellteste, deren klinische Sensitivität üblicherweise bei etwa 70 % liegt, d. h. in 70 % aller durch die Referenzmethode (Zellkultur) als Influenza-positiv beurteilten Proben ist auch der immunologische Schnelltest positiv. Die Diagnostikahersteller weisen daher in den Beipackzetteln ihrer Influenza-Schnellteste darauf hin, daß die Probennahme nur von speziell geschultem medizinischen Personal durchgeführt werden sollte, um zu gewährleisten, dass das gewonnene Probenmaterial tatsächlich ausreichende Mengen an Influenza A/B-Viren enthält.

Desweiteren kommt erschwerend hinzu, daß die im Rachenraum abzustreichenden Bezirke (Rachenhinterwand, Pharynx, Tonsillen) sich je nach vorliegendem Virusinfekt durchaus unterscheiden können. Dies bedeutet zum Beispiel, daß zum Nachweis einer Streptokokkeninfektion andere Rachenbezirke abgestrichen werden müssen als etwa zum Nachweis von Influenza A/B-Viren.

Die Entnahme eines Nasen-/Rachenabstriches ist für den Patienten unangenehm und insbesondere bei (kleinen) Kindern problematisch. Kinder sind andererseits zumindest in der Frühphase einer Influenzaepidemie aufgrund ihrer sozialen Kontakte (Kindergarten, Schule) und des oftmals noch nicht voll ausgeprägten Immunsystems die Hauptüberträger der Virusgrippe.

Da Nasen- und Rachenabstriche kein homogenes Probenmaterial darstellen, wird die Positivitätsrate eines Influenza-Nachweises neben der Qualität des Abstriches auch durch die

korrekte Elution, d.h. Überführung des Abstrichmaterials in die Flüssigphase, die dem nachgeschalteten Test als eigentliches "Probenmaterial" dient, mitbestimmt.

Insbesondere aufgrund der neuen therapeutischen Option (Neuraminidaseinhibitoren) wird zukünftig ein stark zunehmender Bedarf am Nachweis von Grippeviren (Influenza A/B-Viren) beim niedergelassenen Arzt oder vom Patienten selbst vorliegen, der bei dem bisher verwendeten Probenmaterial (Abstrich, Nasenspülung) mit der Notwendigkeit der Probennahme durch geschultes (medizinisches) Personal nicht in Einklang zu bringen ist.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, die Nachteile des Standes der Technik zu beseitigen. Insbesondere besteht die der Erfindung zugrunde liegende Aufgabe darin, ein Verfahren zum Nachweis einer Influenza A- und/oder Influenza B-Virus-Infektion bereitzustellen, das von ungeschultem Personal oder idealerweise dem Patienten selbst einfach durchzuführen ist. Vor allem ist Aufgabe der Erfindung, ein von ungeschultem Personal oder idealerweise dem Patienten selbst einfach und problemlos zu gewinnendes, idealerweise homogenes Probenmaterial zu finden, aus dem zuverlässig Influenza A- und/oder Influenza B-Viren nachgewiesen werden können.

Diese Aufgabe wird durch den Gegenstand der Erfindung, wie er in den unabhängigen Patentansprüchen charakterisiert ist, gelöst. Bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung sind in den abhängigen Ansprüchen angegeben.

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zum Nachweis einer Infektion mit dem Influenza A- und/oder Influenza B-Virus umfassend die Schritte

- i) Gewinnung einer Speichelprobe des zu untersuchenden Individuums
- ii) Vorbereitung der Speichelprobe für den Nachweis bzw. eine Nachweisreaktion; und
- iii) Nachweis des Influenza A- und/oder Influenza B-Virus in der Speichelprobe.

Weiterhin ist Gegenstand der Erfindung ein Testkit zum Nachweis einer Infektion mit dem Influenza A- und/oder Influenza B-Virus enthaltend

- i) eine Vorrichtung zum Sammeln einer Speichelprobe; und
- ii) Reagenzien und Hilfsmittel zum Nachweis von Influenza A und/oder Influenza B-Viren.

Schließlich ist Gegenstand der Erfindung die Verwendung von Speichel als Probenmaterial zum Nachweis einer Infektion mit dem Influenza A- und/oder Influenza B-Virus.

Unerwarteterweise wurde gefunden, daß aus Speichel als Probenmaterial mit etablierten diagnostischen Verfahren ein zuverlässiger Nachweis von Influenza A/B-Viren möglich ist.

Insbesondere erstaunlich ist, dass in einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung der Nachweis von Influenza A/B-Viren aus Speichel möglich ist, ohne dass die Viren bei der Probennahme im Speichel angereichert werden müssen, sondern dass vielmehr spontan gebildeter Speichel als Probenmaterial für den Nachweis von Influenza A/B-Viren genügt. Unter "spontan gebildeter Speichel" soll für die vorliegende Erfindung verstanden werden, dass für den Nachweis von Influenza A/B-Viren bei der Probennahme der Speichelprobe keine Anreicherung der Influenza A/B-Viren in der Probe erfolgt. Es wird lediglich der sich spontan im Mundraum befindliche Speichel gesammelt und beispielsweise in ein Speichelsammlgefäß überführt (z. B. durch Spucken u. ä.). Es ist auch möglich, die Speichelprobe mit Hilfe eines saugfähigen Materials, beispielsweise eines Baumwollvlieses (Tupfer), im Mundraum zu sammeln oder dem Fachmann geläufige Speichelsammelvorrichtungen (wie z. B. die sogenannten Salivetten der Firma Sarstedt oder das OraSure Specimen Collection Device der Firma Epitope Inc. Beaverton, OR 97008, USA) zum Sammeln der Speichelprobe zu verwenden.

Selbstverständlich ist es auch erfundungsgemäß möglich, Speichel als Probenmaterial für den Nachweis von Influenza A/B-Viren einzusetzen, in dem eine Anreicherung (Konzentrierung) der Viren bei der Probennahme oder in nachfolgenden Verarbeitungsschritten stattgefunden hat.

Das erfundungsgemäße Probenmaterial Speichel und die einfache Art der Probengewinnung ermöglicht im Gegensatz zu den bisher in der Influenza-Diagnostik bekannten Probenmaterialien Nasen-/Rachenabstrich und durch Nasenspülung gewonnene Flüssigkeit eine standardisierte Probengewinnung von ungeschulten Personen bzw. dem Patienten selbst und trägt damit zu einer höheren diagnostischen Sicherheit der Influenza A/B-Viren-Teste bei. Zudem ist Speichel als Probenmaterial homogener als die anderen, bislang verwendeten Materialien, was ebenfalls zur diagnostischen Sicherheit beiträgt.

Im erfundungsgemäßen Verfahren wird zunächst eine Speichelprobe gewonnen. Beispielsweise kann dies - wie oben bereits beschrieben - durch Spucken in ein Gefäß, Aufsaugen einer Speichelprobe mittels eines saugfähigen Materials, beispielsweise eines Baumwolltupfers oder ähnlichem, im Mundraum oder unter Benutzung eines herkömmlichen Speichelgewinnungsdevices erfolgen.

Je nach anzuwendender Nachweismethode (immunologischer Nachweis oder Nachweis über entsprechende Nukleinsäuren) wird die Speichelprobe anschließend für die Nachweisreaktion aufbereitet:

Für den immunologischen Nachweis wird aus der Speichelprobe beispielsweise das virale Nukleoprotein von Influenza A/B-Viren durch Lysereagenzien freigesetzt. Solche Reagenzien sind dem Fachmann bekannt und können beispielsweise als wirksame Bestandteile für die Lyse Salze oder Netzmittel enthalten. Lysereagenz zum Nachweis von Influenza-Viren enthält vorzugsweise ein Netzmittel (beispielsweise hat sich Triton® X 100, Tween® 20 oder beta-Octylglycopyranosid bewährt), ein mildes Reduktionsmittel (bsp. N-Acetyl-L-Cystein oder DTT = Dithiothreitol), physiologisches Kochsalz (d.h. 0,9 Gew% NaCl in 20-50mM Phosphatpuffer), ein Konservierungsmittel (bspw. 0,09 Gew% NaNO₃) und gegebenenfalls ein Protein zur Verminderung der unspezifischen Bindung (bsp. RSA = Rinderserumalbumin oder RPLA = Rinderplasmaalbumin). Der immunologische Nachweis kann außer dem viralen Nukleoprotein beispielsweise das virale Matrixprotein oder die viralen Polymerasen nachweisen. Möglich ist auch der Nachweis des Hämagglytinins oder der Neuraminidase der Influenza A/B-Viren, wozu dann - da diese Virusbestandteile auf der Virusoberfläche sitzen - keine Lyse erforderlich ist.

Für den Nachweis über eine Nukleinsäure wird beispielsweise virale Nukleinsäure (RNA) gewonnen, gereinigt und entsprechend in Gegenwart der für den Nachweis erforderlichen Primer amplifiziert, vorzugsweise mittels der Reversen Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR). Diese Schritte sind dem Fachmann bekannt, ebenso wie Nukleinsäurenachweise ohne vorherige Amplifikation.

Der Nachweis der Influenza A/B-Viren in der Speichelprobe erfolgt nach an sich bekannten Verfahren.

Beim immunologischen Nachweis beispielsweise des viralen Nukleoproteins kann ein Sandwichkomplex mit entsprechend markierten Antikörpern gebildet und nachgewiesen werden. Selbstverständlich sind jedoch auch kompetitive Nachweisformate möglich. Obwohl der Nachweis mittels eines visuell auszuwertenden, immunochromatographischen Teststreifens als Schnelltest bevorzugt ist, kann der Nachweis über alle üblichen immunologischen Verfahren, beispielsweise ELISA, Agglutinationstests, turbidimetrische Tests etc. erfolgen.

Beim Nachweis der Influenza A/B-Viren über Nukleinsäuren wie RNA wird bevorzugt das Produkt der RT-PCR mittels eines markierten Primers markiert und die Markierung des Primers (z. B. ein Enzym- oder Fluoreszenzlabel) je nach Natur der Markierung (Label) detektiert.

Ein Testkit für die Durchführung des erfundungsgemäßen Verfahrens ist ebenfalls Gegenstand der Erfindung. Der Testkit enthält als wichtigen Bestandteil zunächst eine Vorrichtung zum Sammeln einer Speichelprobe, beispielsweise ein Gefäß zum Hineinspucken, einen oder mehrere saugfähige Wattebausche, oder eine handelsübliche Speichelgewinnungsvorrichtung, z. B. eine Salivette der Fa. Sarstedt oder ein OraSure Specimen Collection Device der Fa. Epitope. Weiterhin enthält der Testkit sämtliche Reagenzien und Hilfsmittel für den Nachweis der Influenza A/B-Viren in der Speichelprobe. Für einen immunologischen Nachweis sind dies beispielsweise ein Lysepuffer zum Freisetzen der viralen Nukleoproteine, gegebenenfalls markierte Antikörper und gegebenenfalls ein Reaktionsmedium (Teststreifen, Mikrotiterplatte, Reaktionsröhren (Tube)) für die Durchführung des immunologischen Nachweises. Die entsprechenden Reagenzien und Hilfsmittel sind dem Fachmann in einer Vielzahl von Ausführungsformen bekannt. Für den Nukleinsäurenachweis gilt das selbe. Hier enthält der Kit beispielsweise die notwendigen PCR-Reagenzien und -Reaktionsgefäß.

Die Erfindung wird durch das nachfolgende Beispiel näher erläutert:

Beispiel

1. Nachweis einer Influenza-Virus-Infektion aus Speichel als Probenmaterial

Zum Beleg der Eignung von Speichel als Probenmaterial zum Nachweis von Influenza-Viren wurden bei 10 Personen mit Verdacht auf Influenza und bei 4 Personen ohne akuten Influenzaverdacht jeweils zwei Rachenabstriche und eine Speichelprobe entnommen. Das aus den Rachenabstrichen gewonnene Probenmaterial wurde zu Vergleichszwecken gesammelt und auf eine Influenza A/B-Viren-Infektion untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen wurden mit den Ergebnissen verglichen, die mit Speichel als Probenmaterial gewonnen wurden. Tabelle 1, die im Anschluß an den experimentellen Teil des Beispiels wiedergegeben ist, zeigt die Vergleichsergebnisse im Überblick.

1.1. Probengewinnung**1.1.1. Rachenabstriche**

Die Rachenabstriche wurden mittels steriler Einwegbaumwollabstrichtupfer der Firma Copan Italia (I-25125 Brescia; Best.-Nr. 167CS01) in der dem Fachmann geläufigen Art und Weise entnommen. Die jeweils zwei von einem Patienten entnommenen Rachenabstriche wurden durch einmaliges Abstreichen des Rachen mit einem Abstrichtupfer mit zwei unmittelbar nebeneinander angeordneten Baumwollkissen erhalten. Dadurch wurde eine weitgehende Vergleichbarkeit der beiden Abstriche gewährleistet.

1.1.2. Speichelprobe

Die Speichelprobe wurde von den Patienten selbst gewonnen, indem sie jeweils ca. 0,5 ml spontan gebildeten Speichel in einem kleinen Einwegkunststofftröpfchen mit Schraubverschluß (Best.-Nr. 62.559.001 der Firma Sarstedt) auffingen. Auf die Verwendung von dem Fachmann bekannten Speichelgewinnungsverfahren/-devices (wie etwa die Salivelten der Firma Sarstedt oder das OraSure Specimen Collection Device der Firma Epitope Inc. Beaverton, OR 97008, USA) wurde bewußt verzichtet um zu zeigen, daß ohne vorherige Konzentrierung oder Speichelprozessierung ein Nachweis von Influenza-Viren möglich ist. Selbstverständlich ist aber die Benutzung solcher Speichelgewinnungsverfahren/-devices erfundungsgemäß genauso möglich.

1.2. Nachweis von Influenza A/B-Viren aus Rachenabstrichen (nur zum Vergleich)**1.2.1. Nachweis aus Rachenabstrichen mittels Zellkultur**

Jeweils der erste Abstrichtupfer wurde unmittelbar nach der Entnahme in ein Röhrchen mit 1,5 ml Influenza-Virus-Transportmedium der Firma Virotest (Rosenbergstr. 85, D-70193 Stuttgart, Cat.-No. 0500300) überführt und auf MDCK-Zellen (Madine-Darby Canine Kidney-Zellen) kultiviert. Die Kultivierung der Proben erfolgte gemäß dem in der Literatur beschriebenen Verfahren (Mikrobiologische Diagnostik, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1992, Herausgeber Friedrich Burkhardt, Seite 371). Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 wiedergegeben, wobei "+" einen positiven Befund und "-" einen negativen Befund symbolisiert.

1.2.2. Nachweis aus Rachenabstrich mittels eines immunologischen Schnelltests

Der jeweils zweite Abstrichtupfer wurde unmittelbar nach der Entnahme der Probe aus dem Rachenraum des Patienten mittels eines immunologischen Antigenschnelltestes auf

Anwesenheit von Influenza-Viren (Influenza A/B-Rapid Test der Firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Kat.-No. 2 158 663) geprüft. Der dabei verwendete Schnelltest entspricht im Wesentlichen dem als Beispiel 2 in EP-A 0 926 498 beschriebenen immunologischen Schnelltest. Auf dieses Dokument wird hierzu ausdrücklich Bezug genommen.

Neben der visuellen Bewertung der Teststreifen wurde die Intensität der Nachweislinie nach beendeter Chromatographie mittels eines remissionsphotometrischen Meßgerätes (Ringbeleuchtung mittels 24 grüner LEDs der Wellenlänge 555 nm und CCD-Kamera mit Objektiv) quantitativ vermessen. Dabei wurde die Intensität des Nachweisstrichsignals in Prozenten der Remission (% Rem.; bezogen auf einen "weißen" Bezirk des Teststreifens, dem die Remission 100 % zugeordnet wurde) untersucht: Remissionswerte ab 98,5 % werden vom Benutzer als negatives Signal erkannt; Remissionswerte zwischen 96 % und 98,5 % werden als schwach positives Signal erkannt; Remissionswerte von weniger als 96 % werden als eindeutig positives Signal erkannt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 wiedergegeben, wobei "+" ein positives Signal, "(+)" ein schwach positives Signal, und "-" ein negatives Signal bedeutet.

1.3. Nachweis von Influenza A/B-Viren aus Speichel

1.3.1. Nachweis von viraler Nucleinsäure im Speichel mittels RT-PCR

Die Speichelproben wurden mittels RT-PCR (Reversed Transkriptase-Polymerase Chain Reaction) auf Anwesenheit viraler Influenza-Nucleinsäure (hier: Ribonukleinsäure, RNA) geprüft. Der Analysengang setzte sich aus den drei in der Nucleinsäurediagnostik üblichen Teilschritten Probenvorbereitung (zur Abtrennung von Inhibitoren), Amplifikation und Nachweis der Nucleinsäure zusammen (vgl. nachfolgend unter 1.3.1.a bis 1.3.1.c). Dabei wurde wie folgt vorgegangen:

1.3.1.a Probenvorbereitung

Zur Isolierung der viralen Influenza-RNA wurde der unter der Best.-Nr. 1 858 882 von Roche Molecular Biochemicals (Sandhofer Straße 116 in D-68305 Mannheim/Deutschland) kommerziell erhältliche „High Pure Viral RNA Kit“ verwendet. Die Durchführung erfolgte gemäß dem in der Produktbeschreibung aufgeführten Standard-Protokoll, indem zunächst jeweils 200 µl Speichel pro Reaktionsgefäß (Filtertube) in Anwesenheit von Bindepuffer an das Glasvlies des Filtertubes gebunden wurde und nach Entfernen evtl. anwesender Inhibitoren durch zwei Waschschritte die virale Nucleinsäure in 200 µl Elutionspuffer eluiert wurde. Dabei wurde darauf geachtet, dass das Probenvolumen vor (Speichel) und nach

(Eluat) der Probenvorbereitung identisch war, so dass keine Konzentrierung der Influenza-Viren stattgefunden hat. Natürlich ist es erfundungsgemäß auch möglich, den Elutionsschritt mit weniger als der der Speichelmenge entsprechenden Elutionspuffermenge durchzuführen und so die Influenza-Viren im Eluat aufzukonzentrieren bzw. anzureichern.

1.3.1.b RT-PCR

Sämtliche Reagenzien wurden, soweit nicht anders aufgelistet, über Roche Molecular Biochemicals (s. o.) bezogen.

Das Ansatzvolumen pro PCR-Reaktionsgefäß betrug 50 µl. Darin waren 10 µl Probenvolumen (Eluat aus der Probenvorbereitung) sowie 10 µl Bicine-Puffer (5 x RT-PCR-Puffer) enthalten. Die weiteren Komponenten des Mastermixes waren in folgender Endkonzentration enthalten: 2,5 mmolar Mangan-acetat, jeweils 0,2 mmolar dATP (2'-Desoxy-adenosin-5'-triphosphat), dCTP (2'-Desoxy-cytidin-5'-triphosphat), dGTP (2'-Desoxy-guanosin-5'-triphosphat) und dUTP (2'-Desoxy-uridin-5'-triphosphat) sowie 0,05 nmolar dTTP (2'-Desoxy-thymidin-5'-triphosphat); 0,01 U/µl UNG (Uracil-DNA-Glycosylase); 0,2 U/µl Tth-Polymerase aus *Thermus thermophilus* HB8; 0,8 U/µl RNase-Inhibitor sowie jeweils 1,0 µmolar Forward- und Reverse Primer.

Die Sequenz der Primer wurde der Literatur entnommen (James C. Donofrio et al., Detection of Influenza A and B in Respiratory Secretions with the PCR, 1992, PCR Methods and Applications 1, Seite 263-268). Die Primer sind typspezifisch für Influenza A und weisen ein 212 Basenpaar langes hoch konserviertes Gensegment (Position 101 bis 312) des Matrixgens nach. Der Reverse Primer war zum anschließenden Nachweis des Amplifikationsproduktes in der Mikrotiterplatte am 5'-Ende Biotin-markiert. Typspezifische Primer für Influenza B sind ebenfalls in der Literatur bekannt (James C. Donofrio et al., Detection of Influenza A and B in Respiratory Secretions with the PCR, 1992, PCR Methods and Applications 1, Seite 263-268).

Die Amplifikation des Mastermixes erfolgte in einem Perkin Elmer 9600 Thermocycler mit dem nachfolgenden Temperaturprofil: 20 Minuten Raumtemperatur nach UNG-Zugabe + 45 Minuten 60° C + 2 Minuten 94° C + 10 Zyklen (30 Sekunden 94° C + 60 Sekunden 50° C + 90 Sekunden 68° C) + 35 Zyklen (30 Sekunden 94° C + 60 Sekunden 60° C + 90 Sekunden 68° C) + 7 Minuten 68° C.

1.3.1.c Hybridisierung und Detektion

Der Nachweis der aus der mittels RT-PCR amplifizierten Nucleinsäure erfolgte unter Verwendung des PCR ELISA (DIG Detection) der Firma Roche Molecular Biochemicals Cat.-No. 1 636 111. Mit Ausnahme der Pipettervolumina wurden sämtliche Schritte gemäß Beipackzettel ausgeführt.

10 µl des Amplifikationsproduktes wurden mit 20 µl Denaturierungslösung in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß gemischt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 250 µl einer Digoxigenin-markierten Hybridisierungssonde zugegeben. Die Konzentration der Hybridisierungssonde betrug 70 ng/ml.

Die Sequenz der Hybridisierungssonde wurde der Literatur entnommen (James C. Donofrio et al., Detection of Influenza A and B in Respiratory Secretions with the PCR, 1992, PCR Methods and Applications 1, Seite 263-268). Die Sonde ist gegen die Position 177 – 205 des Matrixgenes (Segment 7) von Influenza A gerichtet. Entsprechende Sonden für Influenza B sind ebenfalls in der Literatur bekannt (James C. Donofrio et al., Detection of Influenza A and B in Respiratory Secretions with the PCR, 1992, PCR Methods and Applications 1, Seite 263-268).

200 µl des Reaktionsgemisches wurden in eine Vertiefung ("well") einer mit Streptavidin beschichteten Mikrotiterplatte überführt und auf einem Schüttler für 1 Stunde bei 37° C inkubiert. Nach Bindung des Hybridisierungssproduktes an das Streptavidin der Mikrotiterplattenwand wird der Inhalt des wells abgesaugt und 3 mal mit jeweils 300 µl Waschlösung gewaschen. Danach wurden 200 µl Anti-Digoxigenin-Peroxidase-Substrat (Anti-DIG-POD-Konjugat) in das well gegeben und die Lösung für 30 Minuten bei 37° C auf einem Schüttler inkubiert. Nach Bindung des POD-Konjugates wurde der Inhalt des wells abgesaugt, 3 mal mit 300 µl Waschlösung gewaschen und anschließend 200 µl 2,2'-Azino-di-[3-ethylbenzthiazolin sulfonat (6)] Diammoniumsalz-Substrat (ABTS-Substrat) zugegeben. Nach abschließender Inkubation für 30 Minuten bei 37° C wurde die Farbentwicklung bei 405 nm an einem Mikrotiterplattenterader gemessen.

Bei jeder PCR-Bestimmung von Speichelproben wurden parallel mehrere Negativkontrollen (DEMC-Wasser (Art. Nr. 16-001Y "Accu Gene Water, molecular biology grade, autoclaved" des Herstellers Bio Whitaker Europe S.p.r.l. (Parc Industriel de Petit-Rechain, B-4800 Verviers, Belgium) zum Ausschluß falsch positiver Werte durch Kontamination) sowie mehrere Positivkontrollen (Verdünnungsreihen von influenzahaltigen MDCK-

Kulturüberständen) mittels Probenvorbereitung und RT-PCR mitbestimmt. Zusätzlich wurde zur Kontrolle der Detektionsreagenzien auf der Mikrotiterplatte eine kitinterne Positivkontrolle mitgeführt.

Die Extinktionswerte der mitgeführten Negativkontrollen in der Mikrotiterplatte lagen üblicherweise bei 100 – 150 mE. Die Werte der mitgeführten kitinternen Positivkontrolle lagen üblicherweise bei 1000 – 1500 mE.

Als Positivsignal für Patientenproben wurden Extinktionswerte ≥ 300 mE definiert, was einem Signal größer dem 2fachen Leerwert/Nulwert entspricht. Die Ergebnisse finden sich in Tabelle 1, wobei "+" einen positiven Befund und "-" einen negativen Befund symbolisiert.

1.3.2. Nachweis eines viralen Antigens im Speichel mittels eines immunologischen Schnelltestes

Zum Nachweis der Influenza A/B-Viren aus Speichel wurde der Influenza A/B-Rapid Test der Firma Roche Diagnostics Cat.-No. 2 158 663 verwendet. Der dabei verwendete Schnelltest entspricht im Wesentlichen dem als Beispiel 2 in EP-A 0 926 498 beschriebenen immunologischen Schnelltest. Auf dieses Dokument wird hierzu ausdrücklich Bezug genommen.

Der Test wird normalerweise dazu verwendet, das typspezifische virale Nucleoprotein aus Rachenabstrichen mittels eines immunologischen Chromatographieteststreifens nachzuweisen. Der Test differenziert dabei nicht zwischen Influenza A- und Influenza B-Viren.

Um eine gute Chromatographie des Teststreifens mit Speichel als Probenmaterial zu gewährleisten, wurde ein spezieller Lyse/Elutionspuffer verwendet, der nicht Bestandteil der Testpackung ist. Der spezielle Lyse/Elutionspuffer setzte sich wie folgt zusammen:

0,9 Gew.-% NaCl, 2 mM KH₂PO₄, 10 mM Na₂HPO₄, 0,095 Gew.-% NaN₃, 10 mM EDTA, 1,5 Gew.-% Kinderserumalbumin (RSA), 1,5 Gew.-% Triton[®] X-100.

Der Test wurde wie folgt durchgeführt:

Anstatt wie im Beipackzettel beschrieben zunächst einen Rachenabstrichtupfer als Patientenprobe mit 3 Portionen (= 800 µl) des im Testkit enthaltenen Lyse/Elutionspuffers zu

eluieren, wurden 300 µl Speichel und 500 µl des speziellen Lyse/Elutionspuffers in ein Reaktionsgefäß gegeben und gemischt.

Die weitere Testdurchführung erfolgte gemäß den im Beipackzettel beschriebenen Schritten. Dies beinhaltete zunächst die Zugabe von 2 Tropfen Antikörperlösung 1 (enthält biotinierte monoklonale Antikörper gegen Nucleoprotein A und Nucleoprotein B), die Zugabe von 2 Tropfen Antikörperlösung 2 (enthält digoxigeninierte monoklonale Antikörper gegen Nucleoprotein A und Nucleoprotein B) sowie die abschließende Chromatographie dieses Reaktionsgemisches über einen Teststreifen.

Wie aus EP-A 0 926 498 bekannt ist enthält der Teststreifen ein Konjugatlies, das mit einem in Probenflüssigkeit ablösbarer Goldkonjugat reversibel imprägniert ist. Die Goldpartikel sind dabei adsorptiv mit einem monoklonalen Antikörper gegen Digoxigenin beladen.

In einer weiteren Zone des Teststreifens in Chromatographierichtung flussabwärts befindet sich eine Nitrocellulosemembran, auf der Polystreptavidin als Nachweilinie und ein polyklonaler Antikörper PAK<Maus Fcγ>S-IgG als Kontroll-Linie irreversibel imprägniert sind.

Der in Anwesenheit des Analyten im Reaktionsgefäß gebildete Sandwichkomplex aus biotiniertem Antikörper/Nucleoprotein/digoxigeniniertem Antikörper chromatographiert über den Teststreifen, bindet nach Anlösen des Goldkonjugates dieses über den Anti-Digoxigenin-Antikörper an den digoxigeninmarkierten Anti-Influenza-Antikörper des Sandwich-Komplexes und wird anschließend am Polystreptavidinstrich über den biotinmarkierten Anti-Influenza-Antikörper des Sandwich-Komplexes an der Nitrocellulosemembran abgefangen. Dabei wird ein roter Strich auf der Nitrocellulosemembran sichtbar, der ein positives Testsignal darstellt.

Überschüssiges Goldkonjugat chromatographiert flussabwärts und wird am Kontrollstrich der Nitrocellulosemembran als weitere, sichtbare rote Linie mittels PAK<Maus Fcγ>S-IgG abgefangen.

Neben der visuellen Bewertung der Teststreifen wurde die Intensität der Nachweilinie nach beendeter Chromatographie mittels eines remissionsphotometrischen Meßgerätes (Ringbeleuchtung mittels 24 grüner LED's der Wellenlänge 555 nm und CCD-Kamera mit Objektiv) quantitativ vermessen. Dabei wurde die Intensität des Nachweisstrichsignals in Prozenten der Remission (% Rem.; bezogen auf einen "weißen" Bezirk des Teststreifens, dem

die Remission 100 % zugewandt wurde) untersucht: Remissionswerte ab 98,5 % werden vom Benutzer als negatives Signal erkannt; Remissionswerte zwischen 96 % und 98,5 % werden als schwach positives Signal erkannt; Remissionswerte von weniger als 96 % werden als eindeutig positives Signal erkannt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 wiedergegeben, wobei "+" ein positives Signal, "(+)" ein schwach positives Signal und "-" ein negatives Signal darstellt.

1.4. Ergebnisse

Nachfolgend sind einige mit Patientenproben erhaltene Ergebnisse beispielhaft aufgeführt (Tabelle 1).

Die aufgeführten Ergebnisse beziehen sich ausschließlich auf den Nachweis von Influenza A-Viren, da zum Zeitpunkt der Probennahme ausschließlich Influenza A vorherrschte und keine Patientenproben mit Influenza B gefunden wurden. Den Experten ist bekannt, daß Influenza B im Gegensatz zu Influenza A nicht in jeder Wintersaison zirkuliert und daß selbst bei einem gemeinsamen Auftreten von Influenza A/B-Viren in einer Wintersaison Influenza B immer mit einer deutlich niedrigeren Prävalenz vertreten ist.

Es soll hier nicht unerwähnt bleiben, dass künstlich hergestellte Influenza B-positive Speichelproben (gepoolte Speichelproben, die mit Kulturüberstand aus Influenza B-Viren aufgestockt ("gespiked") waren) sowohl im Nukleinsäuretest als auch im immunologischen Test ebenfalls zum Nachweis von Influenza-Viren aus Speichel geeignet waren. Die aufgeführten Ergebnisse stellen daher keine Limitation im Sinne der Erfindung zum separaten oder gemeinsamen Nachweis von Influenza B-Viren neben Influenza A-Viren aus Speichel dar. Vielmehr ist Speichel als Probenmaterial zum Nachweis von Influenza A/B-Viren geeignet.

Tabelle 1

| Person Nr. ^A | Rachenabstrichproben (nur zum Vergleich) | | | Speichelproben | | | |
|-------------------------|---|--------------------------------|----------------------------|-------------------------------|--------------------------------|----------------------------|-------------------------------|
| | Kultur ^B | immunologischer Schnelltest | | PCR- Ergebnis ^B | immunologischer Schnelltest | | PCR- Ergebnis ^B |
| | | visuell ^C | photometrisch ^D | | visuell ^C | photometrisch ^D | |
| 1 | + | + | + | + | + | + | + |
| 2 | + | (+) | (+) | + | + | + | + |
| 3 | + | (+) | (+) | + | + | + | + |
| 4 | + | + | + | + | + | + | + |
| 5 | + | + | + | + | + | + | + |
| 6 | + | (+) | (+) | + | + | + | + |
| 7 | + | - | - | + | (+) | (+) | - |
| 8 | + | - | - | + | (+) | (+) | - |
| 9 | - | - | - | - | - | - | - |
| 10 | - | - | - | - | - | - | - |
| 11 | - | - | - | - | - | - | - |
| 12 | - | - | - | - | - | - | - |
| 13 | - | - | - | - | - | - | - |
| 14 | - | - | - | - | - | - | - |

A: Bei den Personen Nr. 1 – 10 handelte es sich um Personen mit influenzartiger Symptomatik. Bei den Personen Nr. 11 – 14 handelte es sich um Personen ohne akute respiratorische Symptomatik.

B: Kultivierung auf MDCK-Zellen (vgl. unter 1.2.1. oben); + positiv; - negativ

C: Schnelltestdurchführung wie unter 1.2.2. und 1.3.2. beschrieben (siehe oben); + positiv; (+) schwach positiv; - negativ

D: Quantitative Bestimmung der Intensität des Nachweisstriches mittels eines remissionsphotometrischen Meßgerätes (vgl. unter 1.2.2. und 1.3.2. oben); wiedergegeben sind hier nur die relativen Ergebnisse (+ positiv; (+) schwach positiv; - negativ), die sich gemäß der im Text angegebenen Skala ergeben.

E: Gemessen wurden die Extinktionswerte der Mikrotiterplatte bei 405 nm (vgl. unter 1.3.1. oben); wiedergegeben sind hier nur die relativen Ergebnisse (+ positiv; - negativ), die sich gemäß der im Text angegebenen Skala ergeben.

Aus den Ergebnissen, die in Tabelle 1 wiedergegeben sind, wird folgendes sichtbar:

- Nicht alle aufgrund der klinischen Symptomatik als Influenzapatienten eingestuften Personen (Nr. 1 – 10) waren tatsächlich Influenza-positiv. Person Nr. 9 und 10 waren sowohl in der Kultur aus Rachenabstrich, als auch in der PCR aus Speichel als auch mit dem Schnelltest aus Speichel und Rachenabstrich negativ. Dies verdeutlicht die einleitend gemachte und in Expertenkreisen bekannte Aussage, daß eine definitive Diagnose auf Influenza ausschließlich aufgrund der klinischen Symptomatik nicht möglich ist.
- Die Rachenabstriche und Speichelproben von asymptomatischen Personen (Nr. 11 – 14) waren mit allen aufgelisteten Testmethoden negativ und verdeutlichen damit die klinische Spezifität dieser Methoden.
- Von den 8 über Rachenabstriche mittels Zellkultur Influenza A-positiv gefundenen Personen (Nr. 1 – 8; sog. kulturpositive Patienten) wurden mit dem immunologischen Schnelltest aus Rachenabstrichen 6 Personen ebenfalls als positiv diagnostiziert. Dies verdeutlicht, daß die klinische Sensitivität dieser bisher verfügbaren Schnellteste aus Abstrichen als Probenmaterial unter der zur Zeit als Goldstandard anerkannten Zellkultur liegt (klinische Sensitivitäten verschiedener immunologischer Schnellteste gemäß Beipackzettel der jeweiligen Hersteller: Quidel 73 % für Nasenabstrich, Roche 70 % für Rachenabstrich, Biostar 62 % für Rachenabstrich und 83 % für Nasopharyngealabstrich).
- Hingegen wurden die zugehörigen Speichelproben aller 8 kulturpositiven Patienten mit dem immunologischen Schnelltest positiv gefunden.
- Des Weiteren geht aus dem Vergleich der Remissionswerte (in der Tabelle nicht gezeigt) hervor, daß die Nachweisstrichintensitäten auf dem immunologischen Schnellteststreifen mit Speichelprobe etwas intensiver waren als die zugehörigen Nachweisstrichintensitäten bei Verwendung von Rachenabstrichen.
- Die Schnelltestergebnisse aus Speichel decken sich dabei mit den zugehörigen PCR-Ergebnissen aus Speichel und belegen damit, daß aus Speichel als Probenmaterial auch ohne vorherige Anreicherung bei der Probengewinnung Influenza A/B-Viren zuverlässig nachgewiesen werden können.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis einer Infektion mit dem Influenza A- und/oder Influenza B-Virus umfassend die Schritte
 - i) Gewinnung einer Speichelprobe;
 - ii) Vorbereitung der Speichelprobe für den Nachweis; und
 - iii) Nachweis des Influenza A- und/oder Influenza B-Virus in der Speichelprobe.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Speichelprobe, die in Schritt i) gewonnen wird, spontan gebildeter Speichel ist.
3. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Speichelprobe in Schritt i) mit einem Speichelgewinnungsdevice ohne virusspezifische Anreicherung gewonnen wird.
4. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass in Schritt ii) aus der Speichelprobe virale Influenza A- und/oder Influenza B-RNA gewonnen wird, diese mittels RT-PCR amplifiziert und in Schritt iii) nachgewiesen wird.
5. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Speichelprobe in Schritt iii) immunologisch auf Vorhandensein von Influenza A- und/oder Influenza B-Viren untersucht wird.
6. Verfahren gemäß Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Speichelprobe in Schritt ii) mit einem Lyscpuffer behandelt wird, so dass virales Nukleoprotein des Influenza A- und/oder Influenza B-Virus freigesetzt wird und dieses Nukleoprotein in Schritt iii) immunologisch nachgewiesen wird.
7. Testkit zum Nachweis einer Infektion mit dem Influenza A- und/oder Influenza B-Virus enthaltend
 - i) eine Vorrichtung zum Sammeln einer Speichelprobe; und
 - ii) Reagenzien und Hilfsmittel zum Nachweis von Influenza A- und/oder Influenza B-Viren.
8. Verwendung von Speichel als Probenmaterial zum Nachweis einer Infektion mit dem Influenza A- und/oder Influenza B-Virus.

9. Verwendung von Speichel gemäß Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass der Speichel spontan gebildeter Speichel ist.
10. Verwendung von Speichel gemäß Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Speichelprobe mit einem Speichelgewinnungsdevice ohne viruspezifische Anreicherung gewonnen wird.
11. Verwendung von Speichel gemäß einem der Ansprüche 8 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass der Nachweis einer Infektion mit dem Influenza A- und/oder Influenza B-Virus mittels eines immunologischen Tests erfolgt.
12. Verwendung von Speichel gemäß einem der Ansprüche 8 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass der Nachweis einer Infektion mit dem Influenza A- und/oder Influenza B-Virus mittels eines Nukleinsäurenachweises erfolgt.

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

| | | |
|---|---|---|
| (19) Weltorganisation für geistiges Eigentum Internationales Büro |  |  |
| (43) Internationales Veröffentlichungsdatum 20. Dezember 2001 (20.12.2001) | PCT | (10) Internationale Veröffentlichungsnummer WO 01/96595 A3 |
| (21) Internationale Patentklassifikation ² : C12Q 1/70, G01N 3/3599, C12Q 1/68 | MX, NZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YE, ZA, ZW | |
| (22) Internationales Anmeldedatum: 15. Juni 2001 (15.06.2001) | (84) Bestimmungsstaaten <i>regional</i> : ARIPO-Patent (GH, GM, KL, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), europäisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FL, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BE, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG) | |
| (23) Einreichungssprache: Deutsch | (85) Erklärungen gemäß Regel 4.17: - hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, die Priorität einer früheren Anmeldung zu beanspruchen (Regel 4.17-Ziffer iii) für die folgenden Bestimmungsstaaten: AT, AG, AL, AM, AR, AZ, BA, BE, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CX, CZ, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KP, KG, KP, KP, KZ, LC, LR, LS, LT, MA, PV, RA, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YE, ZA, ZW; ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MR, ME, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), europäisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DK, ES, FL, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BE, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG); - Erfindererklärung (Regel 4.17-Ziffer iv) nur für US | |
| (24) Veröffentlichungssprache: Deutsch | (86) Veröffentlichungsdatum des internationalen Rechercheberichts: 23. Mai 2002 | |
| (25) Angaben zur Priorität: 160 28 837,5 15. Juni 2000 (15.06.2000) DE | (87) Fortsetzung auf der nächsten Seite | |
| (26) Anmelder (nur für DE): ROCHE DIAGNOSTICS GMBH (DE/DE); Sandhofer Straße 116, 68305 Mannheim (DE) | | |
| (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von DE, US; EHOFFMANN-LA ROCHE AG (CH/CH); Grenzacherstrasse 124, CH-4070 Basel (CH)) | | |
| (72) Erfinder: und | | |
| (73) Erfinder/Anmelder (nur für US): KLEPP, Juergen (DE/DE); Offenweg 5, 76676 Graben-Neudorf (DE); SCHLIPFENBACHER, Reiner (DE/DE); Schenkensbachstrasse 9, 67098 Duerkheim (DE) | | |
| (81) Bestimmungsstaaten <i>national</i> : AB, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BY, BZ, CA, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FL, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, | (88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Rechercheberichts: 23. Mai 2002 | |

(64) Title: METHOD FOR THE DETECTION OF INFLUENZA A/B VIRUSES IN SALIVA

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM NACHWEIS VON INFLUENZA A/B-VIRSEN AUS SPITCHEL

(55) **Abstract:** The invention relates to a method for the detection of an infection with influenza A and/or influenza B virus, comprising the steps: i) obtaining a saliva sample, ii) preparation of the saliva sample for a detection reaction and iii) detection of the influenza A and/or influenza B virus in the saliva sample. The invention further relates to a testkit for the detection of an infection by the influenza A and/or influenza B virus, comprising: i) a device or the collection of a saliva sample and ii) reagents and adjuvants for the detection of influenza A and/or influenza B viruses. Furthermore, the invention relates to the use of saliva as a sample material for the detection of an infection with the influenza A and/or the influenza B virus.

(56) **Zusammenfassung:** Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis einer Infektion mit dem Influenza A- und/oder Influenza B-virus umfassend die Schritte i) Gewinnung einer Speichelprobe, ii) Vorbereitung der Speichelprobe für eine Nachweisreaktion; und iii) Nachweis des Influenza A- und/oder Influenza B-virus in der Speichelprobe. Die Erfindung betrifft weiterhin einen Testkit zum Nachweis einer Infektion mit dem Influenza A- und/oder Influenza B-virus enthaltend i) eine Vorrichtung zum Sammeln einer Speichelprobe; und ii) Reagenzien und Hilfsmittel zum Nachweis von Influenza A und/oder Influenza B-Viren. Schließlich betrifft die Erfindung die Verwendung von Speichel als Probenmaterial zum Nachweis einer Infektion mit dem Influenza A- und/oder Influenza B-virus.

WO 01/96595 A3

WO 01/96595 A3

Zur Erklärung der Zwei-Buchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe des PCT-Geistesverwesens verwiesen.

【国際調査報告】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | In International Application No PCT/EP 01/06735 |
|--|--|--|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12Q1/70 G01N33/569 C12Q1/68 | | |
| 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) IPC 7 C12Q G01N | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched | | |
| Electronic data base consulted during the internationalized search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, CHEM ABS Data, BIOTECHNOLOGY ABS, SCISEARCH | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category | Claim or document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | COVALCIUC KA, WEBB KH & CARLSON CA: JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, vol. 37, no. 12, December 1999 (1999-12), pages 3971-3974, XP002186401 abstract page 3971, column 2, paragraph 4 -page 3972, column 2, paragraph 2; table 1 page 3972, column 2, paragraph 7 -page 3973, column 1, paragraph 2; table 2 page 3973, column 2, paragraph 2; figure 1 | 1-12 |
| X | ATMAR RL, BAXTER BD, DOMINGUEZ EA & TABER LH: JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, vol. 34, no. 10, October 1996 (1996-10), pages 2604-2606, XP002186402 abstract page 2604, column 1, paragraph 3 -page 2605, column 2, paragraph 2; table 1 --- | 1-4, 7-10, 12 --- |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex. | | |
| <p>- Special categories of cited documents:</p> <p>*A* document referring the general state of the art which is not concerned in the context of the application</p> <p>*E* earliest document but published no later than the international filing date</p> <p>*I* document which may throw doubts on新颖性 claims or which is cited to establish the publication date of another document (special reasons for citation)</p> <p>*O* document relating 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 but prior date set out in connection with the application but cited to understand the principle of inventiveness of the invention</p> <p>*X* document of particular relevance, the omission of which would impair the understanding of the document or 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>*M* document member of the same patent family</p> | | |
| Date of the actual completion of the international search 7 February 2002 | | Date of mailing of the international search report 19/02/2002 |
| Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 8045 Potsdamerstr. 2 NL - 2285 WI Utrecht Tel. (+31-70) 340 2040, Tx. 31 651 000 NL Fax. (+31-70) 340-3016 | | Authorized office Tilburg, A-C |

Form PCT/ISA/04 (second sheet) (July 1999)

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | In International Application No. PCT/EP 01/06735 |
|---|---|---|
| C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | US 6 015 664 A (FAN JIANG ET AL) 18 January 2000 (2000-01-18) column 4, line 1 - line 38 column 8, line 59 - line 64 column 10, line 36 - line 39 --- | 1-4, 7-10,12 |
| X | FR 2 708 348 A (ALFA BIOTECH SPA;STAGO DIAGNOSTICA) 3 February 1995 (1995-02-03) page 13, line 27 -page 14, line 25 --- | 1-3,5-11 |
| X | WO 92 12256 A (SYMEX CORP) 23 July 1992 (1992-07-23) page 4, line 29 -page 9, line 7 page 17, line 1 - line 31 --- | 1-3 |
| X | US 5 714 341 A (KLIMKOW NANETTE M ET AL) 3 February 1998 (1998-02-03) column 5, line 15 -column 34 column 9, line 22 - line 26 column 9, line 65 -column 10, line 14 --- | 7 |
| P,X | EP 1 010 981 A (DIAGOR GMBH) 21 June 2000 (2000-06-21) column 3, line 34 -column 4, line 13 --- | 1-3,5, 8-11 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/EP 01/06735

| Patent document cited in search report | | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|--|---|------------------|---|--|
| US 6015664 | A | 18-01-2000 | US 5744299 A AU 716222 B2 AU 7483896 A EP 0865503 A1 WO 9716570 A1 | 28-04-1998 24-02-2000 22-05-1997 23-09-1998 09-05-1997 |
| FR 2708348 | A | 03-02-1995 | FR 2708348 A1 AT 177533 T DE 69417039 D1 DE 69417039 T2 EP 0711414 A1 WO 9504279 A1 JP 9504094 T | 03-02-1995 15-03-1999 15-04-1999 15-07-1999 15-05-1996 09-02-1995 22-04-1997 |
| WO 9212256 | A | 23-07-1992 | AT 182925 T AU 656162 B2 AU 9152991 A CA 2104683 A1 DE 69131504 D1 DE 69131504 T2 DK 566633 T3 EP 0566633 A1 ES 2134206 T3 GB 303926 T3 WO 9212256 A1 US 5766841 A US 5252458 A | 15-08-1999 27-01-1995 17-08-1992 01-07-1992 09-09-1999 18-11-1999 06-03-2000 27-10-1993 01-10-1999 30-11-1999 23-07-1992 16-06-1998 12-10-1993 |
| US 5714341 | A | 03-02-1998 | AT 175274 T AU 2197595 A DE 69507019 D1 EP 0753148 A1 WO 9527205 A1 | 15-01-1999 23-10-1995 11-02-1999 15-01-1997 12-10-1995 |
| EP 1010981 | A | 21-06-2000 | EP 1010981 A1 AU 2097900 A WO 0037942 A1 EP 1141721 A1 | 21-06-2000 12-07-2000 29-06-2000 10-10-2001 |

Form PCT/ISA/24 (Patent family annex) (July 1999)

INTERNATION** ER RECHERCHENBERICHT

| | | |
|---|--|---|
| | | In internationales Aktenzeichen PCT/EP 01/06735 |
| A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSBEREICHES IPK 7 C12Q1/70 GOIN33/569 C12Q1/68 | | |
| Nach der internationalem Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK | | |
| B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierte Meldesorten (klassifikationssystem und Klassifikationszirkle): IPK 7 C12Q GOIN | | |
| Recherchierte aber nicht zum Meldesort gehörende Vorlesungsrichtungen, sowie diese unter die recherchierten Gebiete fallen | | |
| Während der Recherche nach Konkurrenz oder Konkurrenz-Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, CHEM ABS Data, BIOTECHNOLOGY ABS, SCISEARCH | | |
| C. ALS WESENTLICH ANGEGEHENE UNTERLAGEN | | |
| Kategorie | Bezeichnung der Veröffentlichung, sowie erforderlich unter Angabe der in Befracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
| X | COVALCIUC KA, WEBB KH & CARLSON CA: JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Bd. 37, Nr. 12, Dezember 1999 (1999-12). Seiten 3971-3974, XP002186401 Zusammenfassung Seite 3971, Spalte 2, Absatz 4 -Seite 3972, Spalte 2, Absatz 2; Tabelle 1 Seite 3972, Spalte 2, Absatz 7 -Seite 3973, Spalte 1, Absatz 2; Tabelle 2 Seite 3973, Spalte 2, Absatz 2; Abbildung 1 — —/— | 1-12 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Vorlesungsvorberichtigungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen | | <input type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie |
| <p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen</p> <p>** Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldezeitraum veröffentlicht wurde, ist und mit der Anmeldung nicht konsistent, sondern nur zum Verständnis des dar Entwickelung zugrundeliegenden Prinzips oder der IV zugrundeliegenden Theorie.</p> <p>** Veröffentlichung, das jedoch erst ein oder nach dem internationalen Anmeldezeitraum veröffentlicht wurde</p> <p>** Veröffentlichung, die gern erachtet wird, um die internationale Patentanmeldung zu unterstützen, jedoch nicht in einer anderen Recherchebericht genannten Veröffentlichung beobachtet werden soll oder die aus einem anderen Grunde angegeben ist (wie z.B. Veröffentlichung, die nicht in einer anderen Recherchebericht genannt wurde)</p> <p>** Veröffentlichung, die sich auf eine einzelne Erfindung, eine Behauptung, die Aussicht oder andere Merkmale bezieht</p> <p>** Veröffentlichung, der vor dem internationalen Anmeldezeitraum, aber nach dem nationalen Patentamt veröffentlicht worden ist</p> <p>** Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldezeitraum veröffentlicht wurde, ist und mit der Anmeldung nicht konsistent, sondern nur zum Verständnis des dar Entwickelung zugrundeliegenden Prinzips oder der IV zugrundeliegenden Theorie.</p> <p>** Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beispielhaft Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erneutem Tafelgut als neu und bedeutend werden.</p> <p>** Veröffentlichung, die beispielhaft Erfindung kann nicht als auf erneuerter Tafel neu bezeichnet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Vorlesungsvorberichtigungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Veröffentlichungen nicht auf erneuerter Tafel neu bezeichnet werden.</p> <p>** Vorlesungsvorberichtigung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p> | | |
| Datum der Abschluss der internationales Recherche | Abschlussdatum des internationales Rechercheberichts | |
| 7. Februar 2002 | 19/02/2002 | |
| Name und Postanschrift des internationales Rechercheberichts Projektschef: T. Tilkorn, P.O. 5810 Patentsamt 2 Tel. (+31-70) 340-2040, Te. 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016 | | Bevollmächtigter Bediensteter Tilkorn, A-C |

INTERNATION** ER RECHERCHENBERICHT

Im Offenes Aktenzeichen
PCT/EP 01/06735

| C(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGEGEHENE UNTERLAGEN | | |
|---|--|--------------------|
| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Uner. Anspruch Nr. |
| X | ATMAR RL, BAXTER BD, DOMINGUEZ EA & TABER LH: JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Bd. 34, Nr. 10, Oktober 1996 (1996-10), Seiten 2604-2606, XP002186402 Zusammenfassung Seite 2604, Spalte 1, Absatz 3 -Seite 2605, Spalte 2, Absatz 2; Tabelle 1 --- | 1-4, 7-10,12 |
| X | US 6 015 664 A (FAN JIANG ET AL) 18. Januar 2000 (2000-01-18) Spalte 4, Zeile 1 - Zeile 38 Spalte 8, Zeile 59 - Zeile 64 Spalte 10, Zeile 36 - Zeile 39 --- | 1-4, 7-10,12 |
| X | FR 2 708 348 A (ALFA BIOTECH SPA;STAGO DIAGNOSTICA) 3. Februar 1995 (1995-02-03) Seite 13, Zeile 27 -Seite 14, Zeile 25 --- | 1-3,5-11 |
| X | WO 92 12256 A (SYMEX CORP) 23. Juli 1992 (1992-07-23) Seite 4, Zeile 29 -Seite 9, Zeile 7 Seite 17, Zeile 1 - Zeile 31 --- | 1-3 |
| X | US 5 714 341 A (KLIMKOW NANETTE M ET AL) 3. Februar 1998 (1998-02-03) Spalte 5, Zeile 15 -Spalte 34 Spalte 9, Zeile 22 - Zeile 26 Spalte 9, Zeile 65 -Spalte 10, Zeile 14 --- | 7 |
| P,X | EP 1 010 981 A (DIAGOR GMBH) 21. Juni 2000 (2000-06-21) Spalte 3, Zeile 34 -Spalte 4, Zeile 13 --- | 1-3,5, 8-11 |

3

Formblatt PCT/EP/210 (Fortsetzung von Blatt 2; 1/2 - 1000)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT
Angaben zu Veröffentlichungen, die zur aktiven Patentfamilie gehören

in: Internationales Patentzeichen
PCT/EP 01/06735

| im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument | | Datum der Veröffentlichung | Mitglieder der Patentfamilie | Datum der Veröffentlichung |
|---|---|----------------------------|--|--|
| US 6015664 | A | 18-01-2000 | US 5744299 A AU 716222 B2 AU 7483896 A EP 0865503 A1 WO 9716570 A1 | 28-04-1998 24-02-2000 22-05-1997 23-09-1998 09-05-1997 |
| FR 2708348 | A | 03-02-1995 | FR 2708348 A1 AT 177533 T DE 69417039 D1 DE 69417039 T2 EP 0711414 A1 WO 9504279 A1 JP 9504094 T | 03-02-1995 15-03-1999 15-04-1999 15-07-1999 15-05-1996 09-02-1995 22-04-1997 |
| WO 9212256 | A | 23-07-1992 | AT 182925 T AU 656162 B2 AU 9152991 A CA 2104683 A1 DE 69131504 D1 DE 69131504 T2 DK 566533 T3 EP 0566633 A1 ES 2134206 T3 GR 3030926 T3 WO 9212256 A1 US 5766841 A US 5252458 A | 15-08-1999 27-01-1995 17-08-1992 01-07-1992 09-09-1999 18-11-1999 06-03-2000 27-10-1993 01-10-1999 30-11-1999 23-07-1992 16-06-1998 12-10-1993 |
| US 5714341 | A | 03-02-1998 | AT 175274 T AU 2197595 A DE 69507019 D1 EP 0753148 A1 WO 9527205 A1 | 15-01-1999 23-10-1995 11-02-1999 15-01-1997 12-10-1995 |
| EP 1010981 | A | 21-06-2000 | EP 1010981 A1 AU 2097900 A WO 0037942 A1 EP 1141721 A1 | 21-06-2000 12-07-2000 29-06-2000 10-10-2001 |

Formular PCT/EP/210 (Anhang Patentanmeldung 1997)

フロントページの続き

| (51) Int.Cl. ⁷ | F I | テーマコード(参考) |
|---------------------------|----------------|------------|
| G 0 1 N 33/566 | G 0 1 N 33/566 | |
| G 0 1 N 33/569 | G 0 1 N 33/569 | L |
| //(C 1 2 Q 1/68 | C 1 2 N 15/00 | A |
| C 1 2 R 1:93) | C 1 2 Q 1/70 | |
| (C 1 2 Q 1/70 | C 1 2 R 1:93 | |
| C 1 2 R 1:93) | C 1 2 Q 1/68 | A |
| | C 1 2 R 1:93 | |

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(72)発明者 クレップ, ユルゲン

ドイツ連邦共和国 7 6 6 7 6 グラベン - ノイドルフ, オルフヴェーク 5

(72)発明者 シュリップフェンバッヒル, ライナー

ドイツ連邦共和国 6 7 0 9 8 ドゥルクハイム, シエンケンビュールシュトラーセ 9

F ターム(参考) 2G045 BB14 BB20 BB50 CB07 CB30 DA13 DA36 FA29 FB02 FB03
FB06 GC10 GC11
4B024 AA14 CA09 CA11 HA14
4B063 QA19 QQ03 QQ10 QQ52 QR56 QR62 QS12 QS25 QS34 QS36
QX01

| | | | |
|-------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 检测甲型流感病毒和/或乙型流感病毒的方法 | | |
| 公开(公告)号 | JP2004503248A | 公开(公告)日 | 2004-02-05 |
| 申请号 | JP2002510708 | 申请日 | 2001-06-15 |
| 申请(专利权)人(译) | F.霍夫曼 - 罗氏公司 | | |
| [标]发明人 | クレップユルゲン シュリップフェンバッヒルライナー | | |
| 发明人 | クレップ,ユルゲン シュリップフェンバッヒル,ライナー | | |
| IPC分类号 | G01N33/50 C12N15/09 C12Q1/68 C12Q1/70 C12R1/93 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/569 | | |
| CPC分类号 | C12Q1/701 G01N33/56983 Y10S435/81 | | |
| FI分类号 | C12Q1/70 C12Q1/68.A G01N33/50.G G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 G01N33/569.L C12N15/00.A C12R1/93 | | |
| F-TERM分类号 | 2G045/BB14 2G045/BB20 2G045/BB50 2G045/CB07 2G045/CB30 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045 /FA29 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB06 2G045/GC10 2G045/GC11 4B024/AA14 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/HA14 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ10 4B063/QQ52 4B063/QR56 4B063 /QR62 4B063/QS12 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX01 | | |
| 优先权 | 10028837 2000-06-15 DE | | |
| 其他公开文献 | JP2004503248A5 | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

本发明涉及检测甲型流感和/或乙型流感病毒感染的方法，包括以下步骤：i) 获得唾液样品，ii) 制备唾液样品用于检测反应和iii) 检测甲型流感病毒和/或乙型流感病毒。本发明还涉及用于检测甲型和/或乙型流感病毒感染的检测试剂盒，其包含：i) 用于收集唾液样品的装置和ii) 用于检测甲型流感病毒的试剂和辅助剂。和/或B型流感病毒。此外，本发明涉及唾液作为样品材料用于检测甲型和/或乙型流感病毒感染的用途。

| 被験者 番号 ^A | 咽喉スワブサンプル (比較目的のため) | | | 唾液サンプル | | |
|------------------------|------------------------|-----------------|-------------------|------------------------|-----------------|-------------------|
| | 培養 ^B | 免疫学的迅速試験 | | PCR 結果 ^E | 免疫学的迅速試験 | |
| | | 目視 ^C | 光度測定 ^D | | 目視 ^C | 光度測定 ^D |
| 1 | + | + | + | + | + | + |
| 2 | + | (+) | (+) | + | + | + |
| 3 | + | (+) | (+) | + | + | + |
| 4 | + | + | + | + | + | + |
| 5 | + | + | + | + | + | + |
| 6 | + | (+) | (+) | + | + | + |
| 7 | + | - | - | + | (+) | (+) |
| 8 | + | - | - | + | (+) | (+) |
| 9 | - | - | - | - | - | - |
| 10 | - | - | - | - | - | - |
| 11 | - | - | - | - | - | - |
| 12 | - | - | - | - | - | - |
| 13 | - | - | - | - | - | - |
| 14 | - | - | - | - | - | - |