

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6544847号
(P6544847)

(45) 発行日 令和1年7月17日(2019.7.17)

(24) 登録日 令和1年6月28日(2019.6.28)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 Q 1/68 (2018.01)	C 1 2 Q 1/68 Z N A
C 1 2 Q 1/686 (2018.01)	C 1 2 Q 1/686 Z
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/09 Z
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 N
	G O 1 N 33/53 M
	請求項の数 11 外国語出願 (全 18 頁)

(21) 出願番号 特願2014-158871 (P2014-158871)
 (22) 出願日 平成26年8月4日(2014.8.4)
 (65) 公開番号 特開2015-57048 (P2015-57048A)
 (43) 公開日 平成27年3月26日(2015.3.26)
 審査請求日 平成29年6月20日(2017.6.20)
 (31) 優先権主張番号 13182864.2
 (32) 優先日 平成25年9月3日(2013.9.3)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 514197784
 ポール ジェネディスク テクノロジーズ
 フランス, 35170 ブリュ, パルク
 ダフェール シセアーパティマン 1
 , ルドゥ クルティル 1
 (74) 代理人 100107456
 弁理士 池田 成人
 (74) 代理人 100162352
 弁理士 酒巻 順一郎
 (74) 代理人 100123995
 弁理士 野田 雅一
 (74) 代理人 100148596
 弁理士 山口 和弘

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 食品試料における志賀毒素産生大腸菌 (S T E C) の存否を決定する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

食品試料における病原性志賀毒素産生大腸菌 (S T E C) の 1 つ又は複数の特定の血清群の存否を決定する方法であって、該方法が、

(1) 大腸菌が成長可能な培養培地中で食品試料をインキュベートして、大腸菌の保存培地を得るステップ、

(2) 保存培地中の大腸菌を溶解させて、大腸菌 D N A 含有試料溶液を得るステップ、

(3) 下記の大腸菌遺伝子又はその断片：

(i) 志賀毒素 1 をコードする s t x 1 及び / 若しくは志賀毒素 2 をコードする s t x 2、

(i i) 決定する各 S T E C の血清群のための、インチミンをコードする血清群の e a e 遺伝子のサブタイプ、及び

(i i i) 決定する各 S T E C の血清群のための、その血清群に特異的なバイオマーカー遺伝子

を増幅させるプライマーを用いて、試料溶液に対して第 1 の一連のポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) を行うステップ、

並びに、

(4) 前記第 1 の一連の P C R において、 s t x 1 及び / 又は s t x 2 並びに少なくとも 1 つの血清群のための e a e 遺伝子及び特異的なバイオマーカー遺伝子が増幅される場合：

大腸菌の保存培地の濃縮物に対して第2の一連のPCRを行うことによって、STECの1つ又は複数の特定の血清群の存在を確認するステップを含み、

前記STECの1つ又は複数の特定の血清群の存在を確認するステップが、

(a) STECの各血清群に対する抗体を用いて、各血清群に対して大腸菌の保存培地の免疫濃縮を行うステップ、

(b) 免疫濃縮物からDNAを分離するステップ、及び、

(c) 下記の大腸菌遺伝子又はその断片：

(i) stx1及び/若しくはstx2、及び

(ii) 各血清群のeae遺伝子のサブタイプ

を増幅させるプライマーを用いて、DNAに対して前記第2の一連のPCRを行うステップ

を含む、方法。

【請求項2】

第2の一連のPCRにて、stx1及び/又はstx2並びにeae遺伝子が増幅される場合、前記STECの1つ又は複数の特定の血清群の存在を確認するステップが、

(d) 免疫濃縮物を色素培地に蒔いて、分離した大腸菌のコロニーを成長させ得るステップ、

(e) 分離したコロニーからDNAを分離するステップ、及び

(f) 下記の大腸菌遺伝子又はその断片：

(i) stx1及び/若しくはstx2、及び

(ii) 各血清群のeae遺伝子のサブタイプ

を増幅させるプライマーを用いて、DNAに対して第3の一連のPCRを行うステップ
をさらに含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

色素培地が、セフィキシム亜テルル酸ソルビットマッコンキー培地(CT-SMAC)；ノボピオシン、セフィキシム三水和物及び亜テルル酸カリウムを含む改変レインボーアガー(mRBA)；トリプトン胆汁酸X-グルクロニド培地(TBX)；並びに、セフィキシム亜テルル酸ラムノースマッコンキー培地(CT-RMAC)から選択される、請求項2に記載の方法。

【請求項4】

一連のPCRが、増幅された遺伝子又は断片の検出を可能とする特異的な標識DNAプローブを用いて行われる、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項5】

決定される特定の血清群(複数可)が、O157、O26、O45、O103、O111、O121及びO145から選択される、請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項6】

O157、O26、O45、O103、O111、O121及びO145の全ての血清群の存否を決定するステップを含む、請求項5に記載の方法。

【請求項7】

一連のPCRにおいて増幅されるeae遺伝子のサブタイプが、O26のeae-、O145及びO157のeae-、O45、O103及びO121のeae-、並びに、O111のeae-から選択される、請求項5又は6に記載の方法。

【請求項8】

特異的なバイオマーカー遺伝子が、各血清群のO抗原トランスポーター遺伝子から選択される、請求項1～7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項9】

食品試料が、生肉、生の乳製品、又は、生の野菜製品から選択される、請求項1～8のいずれか1項に記載の方法。

【請求項10】

10

20

30

40

50

インキュベーションステップでの培養培地が、緩衝ペプトン水；トリプチックソイブロス（T S B）；及び、改変トリプチックソイブロス（m T S B）から選択される、請求項 1～9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

それぞれの一連の P C R が、自動化手法にて同時に行われる、請求項 1～10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、食品試料における志賀毒素産生大腸菌（S T E C）の存否を決定する方法、そのような方法に使用される反応カートリッジ、及び反応カートリッジを収容するための装置に関する。

10

【背景技術】

【0002】

S T E C の菌株の中で、7 つの血清群（即ち、O 1 5 7、O 2 6、O 4 5、O 1 0 3、O 1 1 1、O 1 2 1 及び O 1 4 5）が、ヒトの重度の疾患と関連していることが確認されている。これらの血清群は、以下において、S T E C T o p 7 として称する。アメリカ合衆国農務省（U S D A）は、血清群 O 1 5 7 に加えて上記で特定した 6 つのさらなる血清群を混和物として規定する、ある種の生の牛肉製品の分析に適用できる規制を実行している。

20

【0003】

S T E C のこれらの菌株の存否を決定する場合、一般的には、大腸菌が成長できる培養培地に食品試料を加えて、大腸菌の保存培地を生成する。

【0004】

その後、保存培地中で大腸菌を溶解させることによって、大腸菌 D N A 含有試料溶液を供給する。

【0005】

次いで、試料中の上述した血清群を従来の方法を用いて、信頼のおける手法で検出するには時間がかかる。

【0006】

主な S T E C の病原性遺伝子である s t x 1、s t x 2、e a e 及び血清群特異的遺伝子を検出するためのポリメラーゼ連鎖反応（P C R）の使用は、I S O 1 3 1 3 6 技術仕様書（I S O / T S 1 3 1 3 6 : 2 0 1 2）の通りである。異なる遺伝子が、異なる菌株に属し得、偽陽性の結果に至ることがあるので、P C R の陽性試料は培養法で確認しなければならない。

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明の目的は、より短い期間内で、食品試料における病原性 S T E C の存否に関して信頼のおける結果を導く方法を提供することである。

40

【課題を解決するための手段】

【0008】

この目的は、請求項 1 に記載された方法によって解決される。

【0009】

驚くことに、特定のワークフローのために、本発明による方法は、偽陽性の結果の割合の減少及びコロニーの分離の最適化の両方を可能にする。その結果、食品試料における志賀毒素産生大腸菌（S T E C）の 1 つ又は複数の特定の血清群の存否を決定することは、非常に単純化できる。

【0010】

より詳細には、本発明は、培養培地中で食品試料をインキュベートすることによって、

50

大腸菌の保存培地を得、保存培地に含まれる大腸菌を溶解させた後に、このDNA含有試料溶液に対して、特異的なプライマーを用いる第1の一連のPCRを行う、食品試料において病原性が高いSTECの存否を時間的に大変効率よく同定する方法及び確認する方法を提供する。これを第1のスクリーニングステップと呼ぶことがある。この第1のスクリーニングステップは、志賀毒素をコードするstx1及び/又はstx2病原性遺伝子、1つ又は複数の血清群に特異的に関連するインチミンをコードするeaeサブタイプ、並びに、各血清群のバイオマーカー遺伝子の同時検出を可能にする。

【0011】

続いて、仮定に基づく陽性試料を確認しなければならないであろう。

【0012】

eaeサブタイプの検出により、偽陽性試料の数を大幅に減少することができる。

【0013】

好ましい実施形態では、陽性試料に対して第2のスクリーニングステップを行い、大腸菌の保存培地に由来する免疫濃縮物をPCR分析で再度チェックする。

【0014】

この第2のスクリーニングステップが陽性結果を生じる場合、免疫濃縮物の一部を色素培地に蒔いて、各STEC菌株をコロニーとして分離する。

【0015】

これらの分離されたコロニーに由来するDNAに対してPCR試験を行って、stx及びeae病原性遺伝子の両方、並びに、任意選択で血清群バイオマーカー遺伝子の存在を確認してもよい。

【0016】

陰性試料の場合、食品試料から始めて約12時間以内に最終結果を入手することができる。陽性試料の場合、約2日間で、最終結果を入手することができる。

【0017】

さらに、本発明は、上述した本発明の方法にて用いられるように設計された、請求項13に記載の反応カートリッジに関する。

【0018】

本発明の別の態様は、請求項15にて定義された装置に属する。

【0019】

好ましくは、本発明の方法は、
STECの各血清群に対する抗体を用いて、各血清群に対してインキュベートした食品試料を有する培養培地の免疫濃縮を行うステップ；
免疫濃縮物からDNAを分離するステップ；及び
下記の大腸菌遺伝子又はその断片：

stx1及び/又はstx2、

各血清群のeae遺伝子のサブタイプ、及び

任意選択で、各血清群に特異的なバイオマーカー遺伝子

を増幅させるプライマーを用いて、DNAに対して第2の一連のPCRを行うステップを含む、STECの1つ又は複数の特定の血清群の存在の確認するステップを含む。

【0020】

さらに好ましくは、第2の一連のPCRにて、stx1及び/又はstx2並びにeae遺伝子が増幅される場合、STECの1つ又は複数の特定の血清群の存在を確認するステップが、

免疫濃縮物を色素培地に蒔いて、分離した大腸菌のコロニーを成長させ得るステップ；

分離したコロニーからDNAを分離するステップ；及び

下記の大腸菌遺伝子又はその断片：

stx1及び/又はstx2、

各血清群のeae遺伝子のサブタイプ、及び

任意選択で、各血清群に特異的なバイオマーカー遺伝子

10

20

30

40

50

を増幅させるプライマーを用いて、DNAに対して第3の一連のPCRを行うステップをさらに含む。

【0021】

好ましくは、一連のPCRは、増幅した遺伝子又はその断片の検出を可能にする特異的な特定の標識DNAプローブを用いて行われる。

【0022】

本発明によれば、決定される特定の血清群（複数可）は、O157、O26、O45、O103、O111、O121及びO145から選択されることが好ましい。

【0023】

本発明の方法は、特定の血清群の1つ又は複数を同定し得るが、より好ましくは、この方法は、1つのステップで、O157、O26、O45、O103、O111、O121及びO145の全ての血清群の存否を決定することを含む。

10

【0024】

一連のPCRにて増幅されるeae遺伝子のサブタイプは、O26のeae-、O145及びO157のeae-、O45、O103及びO121のeae-、並びに、O111のeae-から選択されることがさらに好ましい。

【0025】

本発明の方法を実行する場合、特異的なバイオマーカー遺伝子は、各血清群のO抗原トランスポーター遺伝子から選択されることが好ましい。

【0026】

20

本発明の方法は、広範囲の食品試料に適応できるが、食品試料は、生肉、生乳製品、又は、生の野菜製品、特に、スプラウトから選択されることが好ましい。

【0027】

インキュベーションステップに用いられる培養培地は、任意選択でアクリフラビンを含む緩衝ペプトン水；任意選択でノボピオシンを含むトリプチックソイブロス（TSB）；及び、任意選択でノボピオシンを含む改変トリプチックソイブロス（mTSB）から選択されることが好ましい。

【0028】

本発明の方法は、PCRに用いるデバイスが自動的評価及び最終結果の表示をすることができるように、それぞれの一連のPCRを自動化した手法にて同時に行うことが好ましい。

30

【0029】

本発明の方法の好ましい変形形態に従うと、免疫濃縮に用いられる抗体は、モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体から選択される。

【0030】

免疫濃縮物を蒔くために用いられる色素培地は、セフィキシム亜テルル酸ソルビットマッコンキー培地（CT-SMAC）；ノボピオシン、セフィキシム三水和物及び亜テルル酸カリウムを含む改変レインボーアガー（mRBA）；トリプトン胆汁酸X-グルクロニド培地（TBX）；並びに、セフィキシム亜テルル酸ラムノースマッコンキー培地（CT-RMAC）から選択されることが好ましい。

40

【0031】

本発明はまた、本発明の方法にて用いられるように特に構成された反応カートリッジに関する。

【0032】

このような反応カートリッジは、DNA含有試料溶液に対して一連のPCRを行うために設計されており、複数の反応チャンバ及びリザーバを備える。試料溶液は、リザーバに供給し、各反応チャンバをリザーバに接続する導管を通して、反応チャンバへ均一に分配することができる。反応チャンバの少なくとも一部に、下記の大腸菌遺伝子又はその断片：

stx1及び/又はstx2、

50

0157、026、045、0103、0111、0121及び0145から選択される1つ又は複数の血清群のeae遺伝子のサブタイプ、及び

任意選択で、0157、026、045、0103、0111、0121及び0145から選択される1つ又は複数の血清群に特異的なバイオマーカー遺伝子を増幅させるプライマー及びプローブがプレロードされている。

【0033】

さらに、本発明はまた、一連のPCRを自動的に行うための装置に関し、この装置は、上述した反応カートリッジを収容するよう構成されている。装置は、

各プローブを用いて増幅された大腸菌遺伝子を検出するための検出手段；

PCRの実行を制御するための制御手段であって、stx1及び/又はstx2、その血清群のeae遺伝子のサブタイプ、及び、任意選択で、その血清群に特異的なバイオマーカー遺伝子の検出結果に応じて各血清群に対して最終結果が生じるように、アルゴリズムに従って、検出された大腸菌遺伝子を評価することができるソフトウェアが格納されている、制御手段；及び

各血清群の最終結果を、光学的に及び/又は音響的に示す表示手段を備える。

【0034】

本発明の前述した態様及び利点を、図面及び具体例と併せて以下にさらに詳細に開示する。

【図面の簡単な説明】

【0035】

【図1】先行技術の方法（ISO13136技術仕様書）と比較した本発明の方法を示す；

【図2】他の先行技術の方法と比較した本発明の方法を示す；

【図3】本発明によるPCR分析のための装置の概略図を示す；

【図4】本発明のPCR反応カートリッジの断面図を示す；

【図5】本発明のPCR反応カートリッジの上面図を示す；

【図6】PCRの結果の関数として最終結果を生じさせるためのアルゴリズムのフローチャートを示す。

【発明を実施するための形態】

【0036】

STEC Top7と表題を付した図1の左側に、本発明の方法の好ましいワークフローを示す。右側には、ISO/TS13136:2012に相当する従来のワークフローを示す。

どちらの方法も、結果的に富栄養試料（大腸菌の保存培地）となる、大腸菌が成長できる培養培地にてインキュベートされた食品試料を用いるところから始まる。

【0037】

その後、培養培地中で成長した大腸菌の溶解が、例えば、96本のチューブの溶解プレート（図示せず）にて行われ、大腸菌DNA含有試料溶液を得る。

【0038】

ここまで、手順は本発明の方法及び従来のワークフローにおいて同じである。

【0039】

本発明のワークフローによれば、試料溶液を、特定の大腸菌遺伝子又はその断片を増幅させるプライマー及びプローブを用いて、第1の一連のポリメラーゼ連鎖反応（PCR）にかける。図1に示すように、ワークフローは、このステップにて、Top7全て、即ち、stx1、stx2、0157、026、045、0103、0111、0121及び0145のそれぞれのeaeバリエーション（サブタイプ）及びバイオマーカー遺伝子を増幅を含む。これらの血清群のいずれも存在しない場合、本発明のワークフローは、約12時間以下（インキュベーション及び溶解に約11時間及びPCRに約1時間）の期間内に終了する。

10

20

30

40

50

【0040】

陽性結果が報告された場合、1つ又は複数の各血清群のS T E Cに対する抗体を用いて、大腸菌の保存培地の免疫濃縮物を調製し、続いて、

免疫濃縮物からDNAを分離し；

下記の大腸菌遺伝子又はその断片：

s t x 1 及び / 又は s t x 2、

各血清群の e a e 遺伝子のサブタイプ、及び

任意選択で、各血清群に特異的なバイオマーカー遺伝子を増幅させるプライマーを用いて、DNAに対して第2の一連のPCRを行う。

【0041】

陰性結果が得られた場合、ワークフローを終了し得る。

【0042】

陽性結果が得られた場合、免疫濃縮物を、さらに色素培地に蒔き、分離した大腸菌のコロニーを成長させることができる。さらなるステップにて、分離されたコロニーからDNAを分離し、大腸菌遺伝子又はその断片を増幅させるプライマーを用いて、第3の一連のPCRが行われる。それによって、病原性S T E Cの血清群が同定され得る。その場合、最終結果は、約2日以内にて入手することができる。

【0043】

従来のISO/TS 13136:2012によるワークフローは、第1のスクリーニングがs t x 及び一般的なe a e 遺伝子に対して行われる点で、本発明の方法とは異なる。第2のスクリーニングステップにて、S T E CのTop 5のみが対象とされるのに対して、本発明の方法では、Top 7の血清群を全て対象にし得る。

【0044】

従来のワークフローは第1の段階にて陰性結果のみが得られる場合、約24時間必要である。陽性結果を確認しなければならない場合、ワークフローは約4日間かかる。

【0045】

図2は、陰性結果のみが得られる場合に約24時間、陽性結果を確認するために約3日間必要である、Microbiology Laboratory Guidebook of the US - Department of Agriculture、第3版、1998 (MLG5 & MLG5B.01) によって提案された方法と比較して、本発明の方法を示す。

【0046】

図3は、本発明の方法のPCRを実行するのに適している装置10の概略図を示す。

【0047】

装置10は、複数の反応チャンバ又はウェル14をその外周に備えた望ましくは円盤状の形状の反応カートリッジ12、及び中央にリザーバ16を備え、反応チャンバ14は、放射状に広がる溝18を介してリザーバと接続されている。

【0048】

以下では「ジーンディスク (Gene Disc)」ともいうこのような好ましい反応カートリッジ12を図4及び図5によってさらに詳細に示す。

【0049】

反応カートリッジ12のウェル14の典型的な数は36である。ウェル14は、複数のセクター19、例えば6つのセクターにグループ分けされ得る (ジーンディスクセクターともいう)。セクター19のグループのウェル14は、個々の溝18を介して、リザーバ16の共通隔壁22と接続され得る。

【0050】

そのようなカートリッジ12は、本発明のカートリッジを提供するために改良され得、反応チャンバ14の少なくとも一部に、s t x 1 及び / 又は s t x 2、並びに、O157、O26、O45、O103、O111、O121 及び O145 から選択される1つ又は複数の血清群のe a e 遺伝子のサブタイプ、又はそれぞれの遺伝子の断片を増幅させるプ

10

20

30

40

50

ライマー及びプローブがプレロードされている。また、反応チャンバ14は、1つ又は複数のこれら血清群に特異的なバイオマーカー遺伝子を増幅させるためのプライマー及びプローブがプレロードされていることが好ましい。

【0051】

装置10は、望ましくは環状の加熱デバイス24をさらに備え、加熱デバイス24は、4つの異なる温度まで加熱され得る、4つの異なるゾーン（このうち3つのゾーン26、27、28は見ることができ）を備えている。反応カートリッジ12は、加熱デバイス24の上面に設置される。反応カートリッジ12のウェル14は、加熱デバイス24の近く又は接触して配置される。

【0052】

装置10は、反応チャンバ又はウェル14の温度の周期変動を可能にするように、加熱デバイス24に対して反応カートリッジ12を回転させるための手段30を備える。

【0053】

加熱デバイス24の各ゾーンの温度は、均一とすることができ、又は、必要であれば、温度は、勾配に沿って変化させることができる。

【0054】

装置10は各周期について、反応チャンバ14の内容物の蛍光を励起し、測定するために、反応カートリッジ12の上側に配置された蛍光励起検出手段32をさらに備える。

【0055】

このような装置10は、国際公開第2002/009877号パンフレットに詳しく開示されており、ジーンディスクサイクラー（パールジーンディスク技術）として利用することができる。

【0056】

通常、それぞれのPCRサイクルは、ウェルを約95の温度まで加熱して、標的DNAを変性させる第1段階、次いで、プライマーのアニーリングのために約55～約65の温度を有する第2段階、及び、標準的には約72で行われる、DNA鎖の伸長のための第3段階を必要とする。しかし、本発明の方法によれば、各サイクルが2つの異なる温度だけを必要とする、アニーリング及び伸長が同じ温度で行われる簡易化されたサイクルを用いてPCRが行われ得る。装置10の加熱デバイス24の個々のゾーンは、そのような温度を実現するように設定する。

【0057】

好ましくは、増幅させる標的配列に対して特異的なプライマー及びプローブを反応チャンバ又はウェル14に予め分配する。リザーバ16又はその隔壁は、プライマー及びプローブを例外として、分析する核酸の試料及びポリメラーゼ連鎖反応増幅のために必要な試薬からなる液体を受け取ることを意図している。

【0058】

好ましい変形形態では、分析する核酸の試料及びPCRのために必要な試薬を含有する液体を、リザーバから、増幅させる標的核酸配列に対して特異的なプライマー及びプローブを含む複数の反応チャンバへ分配することが可能であり、並びに、反応チャンバ14、及び、異なる温度まで加熱し得る4つの異なるゾーンを具備する加熱デバイス24を備える反応カートリッジ12の周期的な相対運動の手段により、反応チャンバの内容物を、複数回、異なる温度に途切れることなく連続的にさらすこと（即ち、これらは、変性、アニーリング及び伸長に必要である）によって増幅プロセスを引き起こすことが可能である。

【0059】

必要であれば、反応チャンバ14は、上述したプライマー以外にリアルタイムPCRに必要な試薬を収容し得る。装置の好ましい実施形態においては、反応チャンバ14はまた、プライマーに加えて、増幅させる配列に対して特異的な1つ又は複数のプローブを含む。反応チャンバ14におけるプローブの分布は、ある反応チャンバが増幅させる配列に対して特異的なプローブを含み、他の反応チャンバが増幅させる配列を推測的に認識しない制御プローブを含むことも可能である。これらのプローブは標識することができ、複数の

10

20

30

40

50

プローブ（例えば、増幅させる配列に対して特異的なプローブ及び制御プローブ）が1つの同じ反応チャンバに存在する場合、これらのプローブは、異なる蛍光色素分子を用いて標識することが好ましい。

【0060】

好ましくは、PCRは、自動化した方法で、即ち、反応カートリッジ12が装置10に挿入された後、使用者が操作する必要なしに、装置10によって、実行され、評価されることが好ましい。蛍光標識プローブを用いて、増幅した配列は上述した検出手段32によって検出され得、それぞれの増幅した配列の結果は、使用者に表示され得る。

【0061】

好ましい実施形態では、装置10は、本発明に従って変更され、PCRの実行を制御するだけでなく、検出手段32によって検出された増幅した配列を評価し、使用者に最終結果を提供する働きもする制御手段をさらに備える。

10

【0062】

本発明の方法が行われる場合、stx1及び/又はstx2、血清群のeae遺伝子のサブタイプ、及び任意選択で血清群に対して特異的なバイオマーカー遺伝子の検出結果に応じて、各血清群に対して、変更した装置10によって最終結果が生じるように、検出された大腸菌遺伝子に相当する検出手段32からの入力信号がアルゴリズムに従って評価される。

【0063】

変更した装置10により実行される好ましいアルゴリズムの簡易化したフローチャートを図6に示す。この場合、与えられた血清群のstx、eaeパリアント（サブタイプ）、及びバイオマーカー遺伝子に対するPCRの結果が評価される。PCRの結果は、「陽性」、「陰性」又は「使用不可」となり得る。eae遺伝子及びバイオマーカー遺伝子に対するPCRの結果がどのようなものであっても、志賀毒素をコードするstx遺伝子に対するPCRの陰性結果が陰性の最終結果をもたらすために、このアルゴリズムにおいては、志賀毒素をコードするstx遺伝子は優先標的である。最終結果が「陽性」（STECが存在する）、「陰性」（STECが存在しない）又は「無効」（分析が繰り返されるべき場合）となり得る。陽性の最終結果は、3つ全ての標的遺伝子に対するPCRの陽性結果を必要とする。

20

【0064】

アルゴリズムは、本発明に従って、変更された装置10の制御手段に格納されたソフトウェアによって行われる。

30

【0065】

本発明の装置10は、例えば、光学的に及び/又は音響的に示す（例えば、それぞれのSTECの血清群の最終結果を表示する）表示手段（図示せず）である表示器をさらに備える。

【実施例】

【0066】

試料の調製

41.5 ± 1 で予め温めておいた、大腸菌が成長可能な従来の培養培地（例えば、緩衝ペプトン水）で、志賀毒素産生大腸菌の1つ又は複数の特定の血清群の存否を検査する食品試料をインキュベートし、富栄養試料（大腸菌の保存培地）を生じた。水で20重量%に希釈したキレックス（Chellex）100を500 µL 予め充填させた96本のチューブを備えている予め充填された溶解プレートに、富栄養試料の一部である50 µLを移した。アルミニウム板を用いてチューブに封をした後に、102 ± 2 まで予め加熱された熱いブロック（thermal block）の中に、溶解プレートを10分間置いた。溶解ステップが完了したら、アルミニウム板にチップを用いて穴を開け、6セクターディスク反応カートリッジへ移す溶解物の36 µLのポーションを回収する。

40

【0067】

後の検査ステップで使用するために、大腸菌の残りの保存培地を5 ± 3 で保存する。

50

【0068】

ジーンディスク (GeneDisc) PCR分析

溶解物を室温で5分間置き、次いで反応カートリッジに(即ち、1つの試料を1つのセクターに)投入する。このSTEC Top7ジーンディスクの各セクターは、14個の標的遺伝子の検出を可能にする乾燥させたプライマー及びプローブを含む6つの個々のウェルを備える(血清群がそれぞれのバイオマーカー遺伝子を表す、表1及び表2を参照のこと)。

【0069】

それぞれのウェルが2つ又は3つの遺伝子の増幅に用いられ得るように、蛍光色素分子(レポーター)FAM(=カルボキシフルオレセイン)及びROX(=カルボキシローダミン)の2つのうち1つを用いて標識化したプローブを用いることによって、PCRの生成物の蛍光検出を可能にする。

【表1】

表1:STEC Top7ジーンディスクセクターの構成

ウェルID	レポーターFAM	レポーターROX
1	O145	抑制制御
2	<i>eae</i> ε	<i>stx1</i> 及び <i>stx2</i>
3	<i>eae</i> β	<i>eae</i> γ
4	<i>eae</i> θ	O111
5	O157	O26
6		O45 / O103 / O121

10

20

【表 2】

表2:ジーンディスクアッセイに用いられるプライマー及びプローブの配列番号。ヌクレオチド配列は添付の配列表に開示されている。

プライマー及びプローブの名称	配列番号
抑制制御のフォワードプライマー	配列番号1
抑制制御のリバースプライマー	配列番号2
抑制制御のプローブ	配列番号3
O26フォワードプライマー	配列番号4
O26リバースプライマー	配列番号5
O26プローブ	配列番号6
O45フォワードプライマー	配列番号7
O45リバースプライマー	配列番号8
O45プローブ	配列番号9
O103フォワードプライマー	配列番号10
O103リバースプライマー	配列番号11
O103プローブ	配列番号12
O111フォワードプライマー	配列番号13
O111リバースプライマー	配列番号14
O111プローブ	配列番号15
O121フォワードプライマー	配列番号16
O121リバースプライマー	配列番号17
O121プローブ	配列番号18
O145フォワードプライマー	配列番号19
O145リバースプライマー	配列番号20
O145プローブ	配列番号21
O157フォワードプライマー	配列番号22
O157リバースプライマー	配列番号23
O157プローブ	配列番号24
eae β フォワードプライマー	配列番号25
eae β リバースプライマー	配列番号26
eae β プローブ	配列番号27
eae γ フォワードプライマー	配列番号28
eae γ リバースプライマー	配列番号29
eae γ プローブ	配列番号30
eae θ フォワードプライマー	配列番号31
eae θ リバースプライマー	配列番号32
eae θ プローブ	配列番号33
eae ε フォワードプライマー	配列番号34
eae ε リバースプライマー 1	配列番号35
eae ε リバースプライマー 2	配列番号36
eae ε プローブ	配列番号37
stx1フォワードプライマー	配列番号38
stx2フォワードプライマー	配列番号39
stx1リバースプライマー	配列番号40
stx2リバースプライマー 1	配列番号41
stx2リバースプライマー 2	配列番号42
stx2プローブ	配列番号43
stx1プローブ	配列番号44

10

20

30

40

【0070】

各試料について、ジーンディスクサイクラーに対して作動するソフトウェアによるアルゴリズムに従って、蛍光検出によって得られる、異なる標的遺伝子のPCRの結果を評価する。表3は、得られた血清群のPCRの結果の関数としてアルゴリズムの結果を示す。eae遺伝子及びバイオマーカー遺伝子に対するPCRの結果がどのようなものであって

50

も、これら遺伝子のPCRの陰性結果が陰性の最終結果をもたらすように、このアルゴリズムにおいては、*stx1*及び*stx2*が優先標的である。

【表3】

表3:PCR結果を評価するためのアルゴリズム

標的遺伝子に対するPCRの結果 (1=陽性、2=陰性、3=使用不可)			所与の血清群に対する 最終結果	
<i>stx1</i> 及び/ 又は <i>stx2</i>	変異 <i>eae</i>	血清群バイオマ ーカー	アルゴリズム の結果	色コード
2	1又は2又は3	1又は2又は3	2	緑
1又は3	2	1又は2又は3	2	緑
1又は3	1又は2又は3	2	2	緑
1	1	1	1	赤
1	1	3	3	灰色
1	3	1	3	灰色
1	3	3	3	灰色
3	1又は3	1又は3	3	灰色

10

【0071】

使用者が自ら、単一遺伝子のPCRの結果を評価する必要がないように、完全に自動化されたPCRの評価は、検出されたSTEC Top7の血清群のそれぞれの最終結果を示すことができ、特に表示することができる。最終結果は、色コードとして、即ち、STECの血清群が存在しないと緑、STECの血清群が存在すると赤、及び、無効の結果（分析が繰り返されるべき場合）に対して灰色として、表示されることが好ましい。

20

【0072】

抑制制御のさらなる評価は、1:10の希釈の後に分析が繰り返されるべき場合、PCRの抑制剤が試料溶液中に存在することを示し得る。

【0073】

免疫濃縮 - PCR (IMC - PCR)

ジーンディスク分析にてPCRが陽性結果の場合、推定される陽性のSTEC Top7の1つに対して特異的な抗体と共に、100µL~1mLの富栄養試料をインキュベートし、免疫濃縮物を調製した。1~4回の洗浄ステップの後、0.05重量%のトゥーン(Tween)20を含むPBSを用いて、濃縮された細胞(免疫濃縮物)を溶離した。細胞の半分をSTEC Top7のジーンディスクプレートを用いたPCR分析に使用する。標的遺伝子に対して陽性結果の場合、特定の色を生じるアガー培地に、細胞の残りの部分を蒔く。最終確認のために、STEC Top7のジーンディスクを用いて、6つまで分離されたコロニーを検査する。

30

【0074】

生牛肉(25g及び375g)及び生乳製品(25g)に対して、本発明の方法(以下、「STEC Top7のジーンディスクの方法」ともいう)で検査した。

【0075】

実施例1:生牛肉(25g)

フランスの92地方行政区画のスーパーマーケットにて収集した2,476の新鮮な牛ひき肉の試料に対して、STEC Top7のジーンディスクの方法を評価した。各試料25gを225mLの緩衝ペプトン水と混合し、次いで、37°Cで18時間~24時間インキュベートした。PCRスクリーニングの後に、ISO13136技術仕様書の提言に従って、直接焼き付けによって、PCRの陽性試料から細菌分離を行った。この研究の目的は、一般的な*eae*遺伝子の代わりに、*eae*バリエーション(サブタイプ)を含むSTEC Top7のスクリーニング法と、ISO13136技術仕様書(*stx*、*eae*及び血清群)に記載されたスクリーニング法を比較することである。結果を表4にて報告する。

40

【表4】

表4:自然に汚染された2,476個の生牛ひき肉試料を用いたジーンディスクSTEC Top7法全体の評価

スクリーニングステップ	生牛ひき肉	
	数	有病率%
試料の合計数	2,476	100
<i>stx</i> ⁺ , <i>eae</i> ⁺ , Top7 ⁺	84	3.4
<i>stx</i> ⁺ , 変異 <i>eae</i> ⁺ , Top7 ⁺	29	1.2
コロニーの分離	7	0.3

10

【0076】

この実施例は、血清群をコードする遺伝子に関連する *eae* バリエーション遺伝子及び *stx* 遺伝子に対する第1のスクリーニングによって、PCRの陽性試料の数を84から29へ著しく減少することができることを証明する。実際、ISO 13136の方法及びジーンディスクSTEC Top7のジーンディスクの方法のPCRの陽性試料の割合は、それぞれ3.4%及び1.2%であった。

【0077】

実施例2：生乳製品(25g)

1,072の生乳試料及び376の生乳チーズを含む1,448個の生乳製品に対して、STEC Top7のジーンディスクの方法を評価した。各試料25gを、ノボピオシン(10mg/L)を補った225mLの緩衝ペプトン水で希釈した。試料を37℃で18時間±2時間インキュベートした。この実施例の目的は、一般的な*eae*遺伝子の代わりに、*eae*バリエーションを含むSTEC Top7のスクリーニング法と、ISO 13136技術仕様書(*stx*、*eae*及び血清群)に記載されたスクリーニング法を比較することであった。結果を表5にて報告する。

20

【表5】

表5:自然に汚染された1,448個の生乳製品試料を用いたジーンディスクSTEC Top7法全体の評価

スクリーニングステップ	生乳		生乳チーズ		全世界の有病率
	数	有病率%	数	有病率%	
試料の合計数	1,072	100	376	100	100
<i>stx</i> ⁺ , <i>eae</i> ⁺ , Top7 ⁺	245	22.9	160	42.6	28.0
<i>stx</i> ⁺ , 変異 <i>eae</i> ⁺ , Top7 ⁺	163	15.2	104	27.7	18.4
IMC-PCRと同等	40	3.7	36	9.6	5.2
コロニーの分離	7	0.7	6	1.6	0.9

30

【0078】

この結果は、第1のスクリーニングにて*eae*バリエーション遺伝子を検出することによって、生乳試料及び生乳チーズでそれぞれ33.6%及び35.0%までPCRの陽性試料の割合を減少することができることを再び示した。IMC-PCRに基づく、STEC Top7の方法の第2のスクリーニングのステップは、生乳試料及び生乳チーズ試料でそれぞれ75.7%及び65.3%まで仮定に基づく陽性試料の著しい減少を引き起こし、多くの試料において、異なる標的遺伝子が、異なる大腸菌の菌株によって実施されるべきことを示している。

40

【0079】

実施例3：生牛肉(375g)

方法全体の評価も、USの全域の4つの施設にて加工された400の牛ひき肉の試料及び150のひき肉用牛肉の試料を含む、375gの生牛肉の試料であると理解した。本発明のジーンディスクの方法をUSDA-FSIS MLG 5B.01の方法と比較した。各試料の375gを1.5LのmTSB又は975mLのノボピオシンを含むmTSB

50

(mTSBn)にて希釈した。試料を42℃でインキュベートした。インキュベートする時間は、富栄養培養液に依存した：mTSBでは12時間、mTSBnでは15時間であった。仮定に基づく陽性試料を参照方法(USDA-FSIS MLG5 & 5B.01)に従って確認した。結果を表6にて報告する。

【表6】

表6:自然に汚染された550個の生牛肉試料を用いたジーンディスクSTEC Top7法全体の評価

試料の種類	富栄養培養液	ジーンディスクSTEC Top7法		USDA-FSIS法 MLG 5 & 5B.01	
		PCRの陽性試料	確認	PCRの陽性試料	確認
牛ひき肉	mTSB (12 h)	0/400	NA	0/400	NA
	mTSBn (15 h)	1/400	1/1 (O157)	9/400	1/8 (O157)
ひき肉用牛肉	mTSB (12 h)	1/150	1/1 (O26)	0/150	NA
	mTSBn (15 h)	1/150	1/1 (O26)	1/150	0/1
有病率		0.36%	0.36%	1.82%	0.18%

【0080】

400の牛ひき肉の試料の中で、STEC Top7のジーンディスクの方法を、富栄養mTSBnからの仮定に基づく陽性試料1つだけに行った。この仮定に基づく結果を培養方法によって確認した。USDA-FSIS方法は、9つの陽性の可能性のある試料を検出した。1つのみが培養方法によって確認された。STECのO157を用いて自然に汚染させた試料は、どちらの方法によっても検出され、培養によって確認された。

【0081】

150のひき肉用牛肉の試料の中で、ジーンディスクの方法は、培養方法によって確認された、mTSB又はmTSBnのいずれかで富栄養化させた陽性の可能性がある1つの試料を検出した。USDA-FSIS MLG5B.01の方法により確認されなかった、mTSBnで富栄養化された陽性の可能性がある他の1つの試料を検出した。さらに興味深いことに、培養によって確認されたジーンディスクの方法による仮定に基づく陽性試料は、USDA-FSIS MLG5B.01の方法のPCRのスクリーニングによって検出されなかった。

【0082】

STEC Top7のジーンディスクの方法及び参照方法は、それぞれ2及び10の仮定に基づく陽性試料が結果として得られた。試料全てを培養による確認をすることによって、STEC Top7の分離物3つが得られ、このうち2つは、ジーンディスクの方法による仮定に基づく陽性試料として得られた(O157及びO26)。参照方法によって得られた仮定に基づく陽性試料のうち、1つだけが確認された(O157)。

ジーンディスクの方法及びUSDA-FSISの方法の有病率は、それぞれ0.36%及び1.82%であった。

【0083】

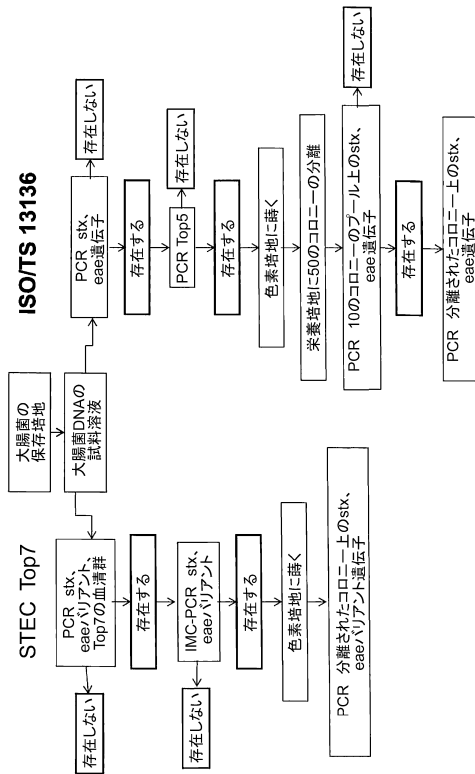
表7は、本発明の方法とISO/TS13136:2012の方法との大きな違いの概要を説明する。

【表 7】
表7

試料の種類	生牛ひき肉 (25 g)	生乳 (25 g)	生乳チーズ (25 g)
検査試料数	2,476	1,072	376
変異 eae スクリーニングによる陽性試料の減少	65.5%	33.5%	35.0%
IMC-PCR による陽性試料の減少	ND	75.5%	65.4%

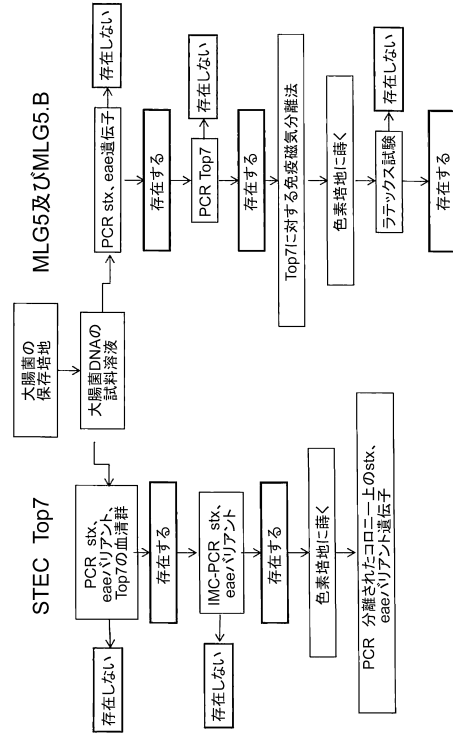
【 図 1 】

Fig. 1

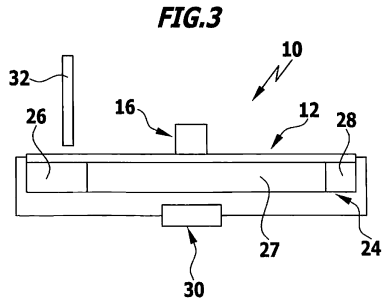


【 図 2 】

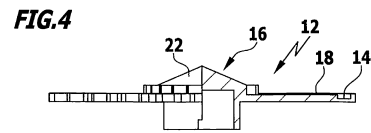
Fig. 2



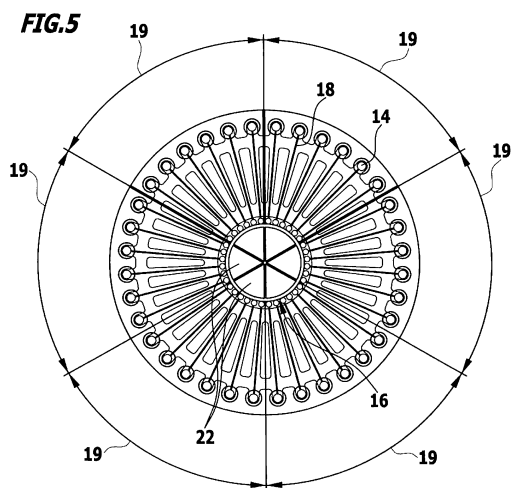
【 図 3 】



【 図 4 】

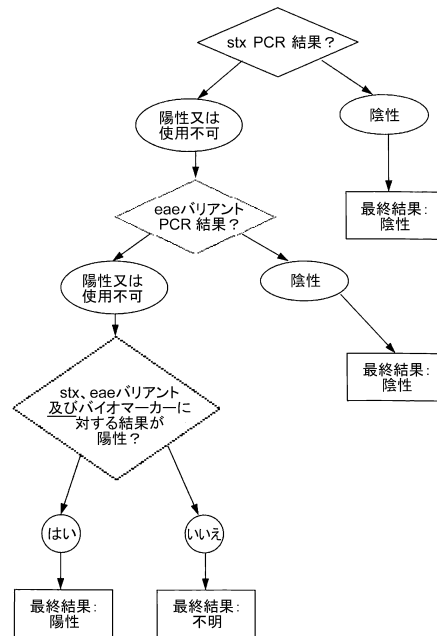


【 図 5 】



【 図 6 】

Fig. 6



【配列表】

0006544847000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 シルヴィー ハリエ - スーリエ
フランス, 35170 ブリュ, リュ ド シャティオン 14
- (72)発明者 ユ ワン
アメリカ合衆国, マサチューセッツ州, ノース グラフトン, ブライドル リッジ ドライ
ヴ 8
- (72)発明者 クリステル ノイエ
フランス, 35230 ノワイヤル - シャティオン - シュル - セッシュ, アリー デウ ロン
ジュリ, 3
- (72)発明者 マリリン ルメルハルト
フランス, 35890 プール - デ - コント, リュ - ディット ル マフェイ
- (72)発明者 サラ ジェマル
フランス, 35170 ブリュ, アンパッス レオ フェレ, 14
- (72)発明者 セバステリアン ブトン
フランス, 35380 プレラン - ル - グラン, ル パ トレロ
- (72)発明者 ヴァレリー ヴァン ワイルダー
フランス, 35000 レヌヌ, リュ フランソワ タンギー プリジャン, 49

審査官 市島 洋介

- (56)参考文献 特表2013-501516(JP, A)
Appl. Environ. Microbiol., 2011年, Vol.77, No.6, pp.2035-2041
Front. Cell. Infect. Microbiol., 2012年, Vol.2, Article 152, pp.1-6
- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12Q 1/00 - 3/00
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS(STN)

专利名称(译)	确定食物样品中产生志贺毒素的大肠杆菌 (STEC) 的存在或不存在的方法		
公开(公告)号	JP6544847B2	公开(公告)日	2019-07-17
申请号	JP2014158871	申请日	2014-08-04
[标]申请(专利权)人(译)	保罗基因磁盘技术		
申请(专利权)人(译)	保罗基因磁盘技术		
当前申请(专利权)人(译)	保罗基因磁盘技术		
[标]发明人	シルヴィーハリエスーリエ ユワン クリステルノイエ マリリンルメルハルト サラジェマル セバステアンプトン ヴァレリーヴァンワイルダー		
发明人	シルヴィーハリエスーリエ ユワン クリステルノイエ マリリンルメルハルト サラジェマル セバステアンブトン ヴァレリーヴァンワイルダー		
IPC分类号	C12Q1/68 C12Q1/686 C12N15/09 G01N33/53		
CPC分类号	C12Q1/689 C12Q2600/158		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA C12Q1/686.Z C12N15/09.Z G01N33/53.N G01N33/53.M C12M1/00.A C12N15/00.A C12Q1/68.AZN.A C12Q1/689.C C12Q1/689.Z		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA20 4B024/HA12 4B029/AA07 4B029/AA08 4B029/BB20 4B029/FA12 4B029/FA15 4B029/GA08 4B029/GB10 4B063/QA01 4B063/QQ16 4B063/QQ42 4B063/QR32 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QR69 4B063/QS25 4B063/QX02		
代理人(译)	池田 成人 小泉纯酒卷 山口和弘		
优先权	2013182864 2013-09-03 EP		
其他公开文献	JP2015057048A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及一种方法，该方法将在较短的时间内导致关于食品样品中存在或不存在致病STEC（产志贺毒素的大肠杆菌）的可靠结果。该方法包括 - 将培养基中的食物样品温育，使大肠杆菌生长，得到大肠杆菌原种培养基； - 在储备培养基中进行大肠杆菌的裂解，以获得包含大肠杆菌DNA的样品溶液； - 使用引物扩增下列大肠杆菌基因或其片段，对样品溶液进行第一系列聚合酶链式反应（PCR）：分别编码志贺毒素1和志贺毒素2的stx1和/或stx2，每个待测定的STEC血清群，该血清群的eae基因的亚型编码一个intimin，每个STEC血清群确定一个，这是一个特异于该血清群的生物标记基因；并且，如果在第一系列PCR中扩增stx1和/或stx2以及eae基因和至少一个血清群的特定生物标记基因： - 通过执行来验证STEC的一个或多个特定血清群的存在对大肠杆菌原种培养基浓缩物进行第二系列PCR，并任选地对来自浓缩物的单个大肠杆菌菌落进行第三系列PCR。

(45) 発行日 令和1年7月17日 (2019. 7. 17)

(24) 登録日 令和1年6月28日 (2019. 6. 28)

(5) Int. Cl.			F I		
C 1 2 Q	1/68	(2018. 01)	C 1 2 Q	1/68	Z N A
C 1 2 Q	1/686	(2018. 01)	C 1 2 Q	1/686	Z
C 1 2 N	15/09	(2006. 01)	C 1 2 N	15/09	Z
G O 1 N	33/53	(2006. 01)	G O 1 N	33/53	N
			G O 1 N	33/53	M

請求項の数 11 外国語出願 (全 18 頁)

(21) 出願番号	特願2014-158871 (P2014-158871)	(73) 特許権者	514197784
(22) 出願日	平成26年8月4日 (2014. 8. 4)		
(65) 公開番号	特開2015-57048 (P2015-57048A)		
(43) 公開日	平成27年3月26日 (2015. 3. 26)		
審査請求日	平成29年6月20日 (2017. 6. 20)		
(31) 優先権主張番号	13182864. 2	(74) 代理人	100107456
(32) 優先日	平成25年9月3日 (2013. 9. 3)		弁理士 池田 成人
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100162352
			弁理士 濱巻 順一郎
		(74) 代理人	100123995
			弁理士 野田 雅一
		(74) 代理人	100148596
			弁理士 山口 和弘

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 食品試料における志賀毒素産生大腸菌 (S T E C) の存否を決定する方法