



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102112625 A

(43) 申请公布日 2011.06.29

(21) 申请号 200980107903.7

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2009.03.03

C12Q 1/68 (2006.01)

(30) 优先权数据

C12N 15/09 (2006.01)

2008-052399 2008.03.03 JP

G01N 33/569 (2006.01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010.09.03

(86) PCT申请的申请数据

PCT/JP2009/053976 2009.03.03

(87) PCT申请的公布数据

W02009/110473 JA 2009.09.11

(71) 申请人 学校法人埼玉医科大学

地址 日本埼玉县

(72) 发明人 平间崇 萩原弘一

(74) 专利代理机构 北京尚诚知识产权代理有限公司

公司 11322

代理人 龙淳

权利要求书 3 页 说明书 21 页

序列表 14 页 附图 11 页

(54) 发明名称

造成急性呼吸道感染的炎性病原体的鉴别方法

(57) 摘要

本发明提供一种造成急性呼吸道感染的炎性病原体的鉴别方法。作为鉴别对象的病原体是位于呼吸道的病原体,并且,该方法具备:a)测定由含有对象呼吸道分泌物的样本制备而成的DNA中来源于对象细胞的基因拷贝数的工序;b)测定DNA中来源于病原体的基因拷贝数的工序;c)计算来源于病原体的基因拷贝数相对于来源于对象细胞的基因拷贝数的相对数的工序;d)基于鉴别基准值和相对数,鉴别病原体是否是炎性病原体的工序。

1. 一种方法,其中,
所述方法为造成急性呼吸道感染的炎性病原体的鉴别方法,
作为鉴别对象的病原体是呼吸道定植病原体;
并且,该方法具备:相对于含有对象呼吸道分泌物的样本中的对象细胞量,测定所述样本中病原体量的相对值的工序;和基于所述相对值,鉴别所述病原体是否是炎性病原体的工序。
2. 一种方法,其中,
所述方法是确定用于鉴别造成急性呼吸道感染的炎性病原体的鉴别基准值的方法,
作为鉴别对象的病原体是呼吸道定植病原体;
并且,该方法具备:
 - a) 测定由含有对象呼吸道分泌物的样本调制而成的 DNA 中来源于对象细胞的基因拷贝数的工序;
 - b) 测定所述 DNA 中来源于病原体的基因拷贝数的工序;
 - c) 计算来源于所述病原体的基因拷贝数相对于来源于所述对象细胞的基因拷贝数的相对数的工序;
 - d) 对多个对象进行所述工序 a) ~ c),得到各个对象的相对数的工序;
 - e) 通过比较各个对象的相对数和各个对象的临床诊断结果,将 i) 在临床诊断中成为炎性病原体阳性的相对数的下限值、和 / 或 ii) 在临床诊断中成为炎性病原体阴性的相对数的上限值确定为鉴别基准值的工序。
3. 一种方法,其中,
所述方法为鉴别造成急性呼吸道感染的炎性病原体的方法,
作为鉴别对象的病原体是呼吸道定植病原体;
并且,该方法具备:
 - a) 测定由含有对象呼吸道分泌物的样本调制而成的 DNA 中来源于对象细胞的基因拷贝数的工序;
 - b) 测定所述 DNA 中来源于病原体的基因拷贝数的工序;
 - c) 计算来源于所述病原体的基因拷贝数相对于来源于所述对象细胞的基因拷贝数的相对数的工序;
 - d) 基于权利要求 2 所述的鉴别基准值和所述相对值,鉴别所述病原体是否是炎性病原体的工序。
4. 如权利要求 2 或 3 所述的方法,其中,
呼吸道定植病原体为选自链球菌属菌、嗜血杆菌属菌、莫拉菌属菌、假单胞菌属菌、克雷伯菌属菌、寡养单胞菌属菌、不动杆菌属菌和葡萄球菌属菌中的 1 种以上的病原体。
5. 如权利要求 3 或 4 所述的方法,其中,
作为进一步的鉴别对象的病原体是呼吸道中通常不存在的病原体;
并且该方法进一步具备:
 - a) 测定由含有对象呼吸道分泌物的样本调制而成的 DNA 中来源于所述病原体的基因拷贝数的工序;
 - b) i) 在没有检测出来源于所述病原体的基因的情况下,鉴别所述病原体与感染无关;

和 ii) 在检测出来源于所述病原体的基因的情况下, 鉴别所述病原体为炎性病原体的工序。

6. 如权利要求 5 所述的方法, 其中,

所述在呼吸道中通常不存在的病原体为选自支原体属菌、军团菌属菌、嗜衣原体属菌、分支杆菌属菌、立克次体属菌、诺卡氏菌属菌、肺孢子菌属菌和曲霉菌属菌中的 1 种以上病原体。

7. 如权利要求 2 ~ 6 中任意一项所述的方法, 其中,

来源于所述病原体的基因为选自肺炎球菌的肺炎球菌溶血素基因、肺炎球菌的 *lytA* 基因、流感嗜血杆菌的 16S rRNA 基因、卡他莫拉菌的 *copB* 基因、假单胞菌属菌的 16S rRNA 基因、肺炎杆菌的 *gapA* 基因、嗜麦芽寡养单胞菌的 23S rRNA 基因、金黄色葡萄球菌的 *femB* 基因的 1 种以上的来源于呼吸道定植病原体的基因。

8. 如权利要求 5 ~ 7 中任意一项所述的方法, 其中,

来源于所述病原体的基因为选自肺炎支原体的 16S rRNA 基因、嗜肺军团菌的 *mip* 基因、军团菌属菌的 16S rRNA 基因、肺炎衣原体的 53kD- 抗原基因、鹦鹉热衣原体的 *ompA* 基因、结核分枝杆菌的 MPB64 基因、胞内分枝杆菌的 ITS 16-23S rRNA 基因、鸟型分枝杆菌的 16SrRNA 基因、鸟型分枝杆菌的 ITS 16-23S rRNA 基因、堪萨斯分枝杆菌的 *dnaJ* 基因、诺卡氏菌属菌的 16S rRNA 基因和耶氏肺孢子菌的 5SrRNA 基因中的 1 种以上的来源于呼吸道中通常不存在的病原体的基因。

9. 如权利要求 2 ~ 8 中任意一项所述的方法, 其中,

来源于所述病原体的基因进一步包含耐药性基因。

10. 如权利要求 9 所述的方法, 其中,

所述耐药性基因为选自 *mecA* 基因和金属- β -内酰胺酶基因中的 1 种以上的基因。

11. 如权利要求 1 ~ 10 中任意一项所述的方法, 其中,

所述对象为人。

12. 一种用于鉴别造成急性呼吸道感染的炎性病原体的试剂盒, 其中,

所述试剂盒包括: 针对来源于呼吸道定植病原体的基因的引物对和使用说明书,

其中, 所述呼吸道定植病原体是选自链球菌属菌、嗜血杆菌属菌、莫拉菌属菌、假单胞菌属菌、克雷伯菌属菌、寡养单胞菌属菌、不动杆菌属菌和葡萄球菌属菌中的 1 种以上的病原体。

13. 如权利要求 12 所述的试剂盒, 其中,

所述试剂盒进一步包含: 针对来源于呼吸道中通常不存在的病原体的基因的引物对和使用说明书,

其中, 所述呼吸道中通常不存在的病原体是选自支原体属菌、军团菌属菌、嗜衣原体属菌、分支杆菌属菌、立克次体属菌、诺卡氏菌属菌、肺孢子菌属菌、和曲霉菌属菌中的 1 种以上的病原体。

14. 如权利要求 12 或 13 中任意一项所述的试剂盒, 其中,

所述试剂盒进一步包括: 针对选自 *mecA* 基因和金属- β -内酰胺酶基因中的 1 种以上的耐药性基因的引物对和使用说明书。

15. 一种装置, 其中,

所述装置是用于鉴别造成急性呼吸道感染的炎性病原体的装置，
作为鉴别对象的病原体是呼吸道定植病原体；
并且，所述装置具备以下机构：

a) DNA 调制机构，用于从含有对象呼吸道分泌物的样本来调制 DNA；

b) DNA 扩增机构，用于将所述 DNA 中来源于对象细胞的 DNA 和来源于病原体的 DNA 进行特异性扩增；

c) DNA 检测机构，用于将通过所述 DNA 扩增机构而被扩增的来源于对象细胞的 DNA 和来源于病原体 DNA 进行检测；

d) 计算机构，用于基于通过所述 DNA 检测机构而被检测出的信号，计算来源于所述病原体的 DNA 拷贝数相对于来源于所述对象细胞的 DNA 拷贝数的相对数；和

e) 鉴别机构，用于基于权利要求 2 所述的鉴别基准值和所述相对数，鉴别所述病原体是否是炎性病原体。

16. 如权利要求 15 所述的装置，其中，

作为进一步的鉴别对象的病原体是呼吸道中通常不存在的病原体；

并且，所述装置进一步具备以下机构：

a) DNA 调制机构，用于从含有对象呼吸道分泌物的样本来调制 DNA；

b) DNA 扩增机构，用于将所述 DNA 中来源于病原体的 DNA 进行特异性扩增；

c) DNA 检测机构，用于将通过所述 DNA 扩增机构而被扩增的来源于病原体的 DNA 进行检测；

d) 鉴别机构，用于：

i) 在没有检测出来源于所述病原体的 DNA 的情况下，鉴别所述病原体与感染无关；以及

ii) 在检测出来源于所述病原体的 DNA 的情况下，鉴别所述病原体为炎性病原体。

17. 如权利要求 15 或 16 中所述的装置，其中，

来源于病原体的 DNA 进一步含有耐药性基因。

造成急性呼吸道感染的炎性病原体的鉴别方法

技术领域

[0001] 本发明涉及造成急性呼吸道感染的炎性病原体的鉴别方法。

背景技术

[0002] 肺炎等急性呼吸道感染根据炎性病原体的种类而分类为细菌性（也包含结核分枝杆菌等抗酸菌）、真菌性、病毒性等。此外，在日常临床中，肺炎根据发病地点分类为社区获得性肺炎、护理院获得性肺炎（主要指吸入性肺炎）、医院获得性肺炎（包含呼吸机相关性肺炎和机遇性肺炎等特殊状态下的肺炎）。根据发病地点的不同来确认炎性病原体的种类和频率等流行病学特征的不同。另外，在急性呼吸道感染中，确定其炎性病原体对于确定诊断、决定治疗方案是非常重要的，因此希望有更高信赖性的肺炎病原体的检查法。

[0003] 作为造成急性呼吸道感染的炎性病原体的检查法，已知有涂抹革兰氏染色、培养检查、血清诊断。另外，开发了将军团菌和肺炎球菌作为对象的尿中抗原检测法（非专利文献 1），以及基因诊断法（专利文献 1 和非专利文献 2）。

[0004] 专利文献 1：日本特开 2005-110545 号公报

[0005] 非专利文献 1：Clin. Infect. Dis. 44：S27-72(2007)

[0006] 非专利文献 2：Nippon Rinsho 65Suppl2：199-207(2007)

[0007] 非专利文献 3：N. Engl. J. Med. 348：1256-1266(2003)

[0008] 非专利文献 4：Thorax 58：960-965(2004)

[0009] 非专利文献 5：Am. J. Respir. Crit Care Med. 165：867-903(2002)

[0010] 非专利文献 6：Intensive Care Med. 22：387-394(1996)

[0011] 非专利文献 7：Lancet 362：1991-2001(2003)

[0012] 非专利文献 8：N. Engl. J. Med. 352：380-391(2005)

发明内容

[0013] 急性呼吸道感染大致分为由于呼吸道中通常不存在的病原体（非定植病原体）导致的急性感染，和由于呼吸道定植病原体或慢性呼吸道感染的炎性病原体导致的急性感染。确认呼吸道定植病原体和慢性呼吸道感染的炎性病原体在健康者呼吸道中也有其存在，维持着定植和持续性感染的状态。但是，在以携带者健康状况不良等主要原因为契机时转移为急性感染，引起强烈的症状（发热、肺炎、败血症等）。然而，即使通过例如 PCR 等检测出作为急性呼吸道感染的病因的病原体，也无法鉴别该病原体是造成急性感染的炎性病原体，或是与急性感染无关的定植病原体或慢性呼吸道感染的炎性病原体（非专利文献 3）。实际上，如果使用 PCR 进行检查，从健康者的痰和呼吸道分泌物以及肺炎患者的痰和呼吸道分泌物均能检测出同一病原体。

[0014] 本发明是鉴于上述现有技术所具有的课题而完成的，目的在于提供一种造成急性呼吸道感染的炎性病原体的鉴别方法。

[0015] 本发明提供一种方法，该方法为造成急性呼吸道感染的炎性病原体的鉴别方法。

作为鉴别对象的病原体是呼吸道定植病原体,该方法具备:相对于含有对象呼吸道分泌物的样本中的对象细胞量,测定所述样本中病原体量的相对值的工序;和基于所述相对值,鉴别所述病原体是否是炎性病原体的工序。

[0016] 在 Thorax 58:960-965(2004)(非专利文献4)中实施的具有前瞻性的群组研究中,表明:对于需要入院治疗的社区获得性肺炎,在初期治疗中使用不恰当的抗生素的情况与使用恰当的抗生素的情况相比,死亡率为11倍。

[0017] 在 Am. J. Respir. Crit Care Med. 165:867-903(2002)(非专利文献5)中,报道了:在医院获得性肺炎中的呼吸机相关性肺炎的初期治疗中,在使用恰当抗生素的情况下和使用不恰当抗生素的情况下,死亡率在统计学上有显著差异。

[0018] 在 Intensive Care Med. 22:387-394(1996)(非专利文献6)中,报道了:在ICU中需要治疗的肺炎中,初期治疗中使用的抗生素不一定恰当;作为误认率高的病原体,可以列举出假单胞菌属菌、葡萄球菌属菌、不动杆菌属菌等的呼吸道定植病原体。即,如果在初期治疗阶段中错误地确定炎性菌,则无法完成确切的治疗,危险性变高,死亡率也增高。

[0019] 根据本发明的造成急性呼吸道感染的炎性病原体的鉴别方法,对于以往发炎状态、定植状态的鉴别困难的呼吸道定植病原体,通过基于与样本中的对象细胞数的比较来鉴别,从而可以更高灵敏度、高特异性地鉴别检测的病原体是炎性病原体还是定植病原体。

[0020] 本发明提供一种方法。该方法是确定用于鉴别造成急性呼吸道感染的炎性病原体的鉴别基准值的方法。作为鉴别对象的病原体是呼吸道定植病原体;并且,该方法具备:

[0021] a) 测定由含有对象呼吸道分泌物的样本制备而成的DNA中来源于对象细胞的基因拷贝数的工序;

[0022] b) 测定所述DNA中来源于病原体的基因拷贝数的工序;

[0023] c) 计算来源于所述病原体的基因拷贝数相对于来源于所述对象细胞的基因拷贝数的相对数的工序;

[0024] d) 对多个对象进行所述工序a)~c),得到各个对象的相对数的工序;

[0025] e) 通过比较各个对象的相对数和各个对象的临床诊断结果,将i)在临床诊断中成为炎性病原体阳性的相对数的下限值、和/或ii)在临床诊断中成为炎性病原体阴性的相对数的上限值确定为鉴别基准值的工序。

[0026] 呼吸道定植病原体优选为选自链球菌属菌、嗜血杆菌属菌、莫拉菌属菌、假单胞菌属菌、克雷伯菌属菌、寡养单胞菌属菌、不动杆菌属菌和葡萄球菌属菌中的1种以上的病原体。另外,来源于呼吸道定植病原体的基因优选为病原体特异性基因,优选为肺炎球菌的肺炎球菌溶血素基因、肺炎球菌的lytA基因、流感嗜血杆菌的16S rRNA基因、卡他莫拉菌的copB基因、假单胞菌属菌的16S rRNA基因、肺炎杆菌的gapA基因、嗜麦芽寡养单胞菌的23S rRNA基因、金黄色葡萄球菌的femB基因。

[0027] 根据本发明的方法,可以确定鉴别基准值,该鉴别基准值用于鉴别在呼吸道定植病原体中由于急性呼吸道感染而被检测出的病原体是炎性病原体还是定植病原体。

[0028] 本发明提供一种方法。该方法为鉴别造成急性呼吸道感染的炎性病原体的方法。作为鉴别对象的病原体是呼吸道定植病原体,并且,该方法具备:

[0029] a) 测定由含有对象呼吸道分泌物的样本制备而成的DNA中来源于对象细胞的基因拷贝数的工序;

[0030] b) 测定所述 DNA 中来源于病原体的基因拷贝数的工序；

[0031] c) 计算来源于所述病原体的基因拷贝数相对于来源于所述对象细胞的基因拷贝数的相对数的工序；

[0032] d) 基于所述鉴别基准值和所述相对值，鉴别所述病原体是否是炎性病原体的工序。

[0033] 根据本发明的鉴别造成急性呼吸道感染的炎性病原体的方法，对于以往发炎状态、定植状态的鉴别困难的呼吸道定植病原体，通过基于作为客观指标的鉴别基准值来鉴别，可以更高灵敏度、高特异性地鉴别被检测的病原体是炎性病原体还是定植病原体。

[0034] 另外，在鉴别上述造成急性呼吸道感染的炎性病原体的方法中，优选通过 PCR 等基因扩增法测定基因拷贝数。由此可以迅速地鉴别炎性病原体。例如，一边检查多个基因，一边可以从样本中提取出 4 小时内得到炎性病原体的鉴别结果。因此，在初期治疗的初期阶段中，可以进行适当的炎性病原体的鉴别，可以进行适当的初期治疗。

[0035] 进一步，为了同时测定在呼吸道分泌物的样本中所包含的来源于对象的细胞数，可以通过适当地进行样本采集、DNA 制备、PCR 反应等来确认。因此，由于 DNA 纯化不良（例如，纯化试剂盒的误操作）和操作者的测定错误（例如，忘记将样本放入测定机器中）等，可以降低本来应该呈阳性的结果而判断为阴性（伪阴性）。在鉴别结果是阴性的情况下，可以否定其病原体参与感染。

[0036] 进一步，本发明的鉴别造成急性呼吸道感染的炎性病原体的方法，其特征在于：

[0037] 作为进一步的鉴别对象的病原体是呼吸道中通常不存在的病原体，并且该方法进一步具备：

[0038] a) 测定由含有对象呼吸道分泌物的样本制备而成的 DNA 中来源于病原体的基因拷贝数的工序；

[0039] b) i) 在没有检测出来源于所述病原体的基因的情况下，鉴别所述病原体与感染无关；和 ii) 在检测出来源于所述病原体的基因的情况下，鉴别所述病原体为炎性病原体的工序。

[0040] 作为在呼吸道中通常不存在的病原体，可以列举出支原体属菌、军团菌属菌、嗜衣原体属菌、分支杆菌属菌、立克次体属菌、诺卡氏菌属菌、肺孢子菌属菌和曲霉菌属菌等。作为来源于呼吸道中通常不存在的病原体的基因，优选肺炎支原体的 16S rRNA 基因、嗜肺军团菌的 mip 基因、军团菌属菌的 16S rRNA 基因、肺炎衣原体的 53kD- 抗原基因、鹦鹉热病原体的 ompA 基因、结核分枝杆菌的 MPB64 基因、胞内分枝杆菌的 ITS 16-23S rRNA 基因、鸟型分枝杆菌的 16S rRNA 基因、鸟型分枝杆菌的 ITS 16-23S rRNA 基因、堪萨斯分枝杆菌的 dnaJ 基因、诺卡氏菌属菌的 16S rRNA 基因和耶氏肺孢子菌的 5S rRNA 基因等。

[0041] 在现有的造成急性呼吸道感染的炎性病原体诊断中存在各种问题。首先，最常用的快速诊断法是革兰氏染色，对菌量多的部分细菌感染有用；但在菌量少的情况下和细菌以外的感染的情况下，没有临床上的有用性。另外，即使是检测出细菌的情况，也可以是定植病原体或慢性呼吸道感染的炎性病原体的情况，常常不能断定为造成急性呼吸道感染的炎性病原体。尿中抗原诊断在肺炎球菌和军团菌中是可以利用的，但不能检测出这 2 种以外的菌。另外，由于在任意的尿中抗原检查中感染后都长期呈阳性，因此难以判断检查时间的感染。PCR 诊断有结核分枝杆菌作为可能的病原体。该 PCR 诊断作为通过图像诊断在怀

疑为结核时的确认检查是有用的,但由于不能检查其它细菌,一般在造成急性呼吸道感染的炎性病原体诊断中是不合适的。在现有进行的培养检查中,存在着直到诊断为止耗费时间;无法鉴别被分离、确定的病原体是炎性病原体还是定植病原体;另外,如果预先给予抗生素则无法培养等许多问题。此外,存在着如果不是适合病原体的培养基则无法培养;如果不组合多个培养基则无法明确炎性病原体等的问题。

[0042] 根据本发明的鉴别造成急性呼吸道感染的炎性病原体的方法,除了对呼吸道定植病原体之外,还对呼吸道中通常不存在的病原体同时进行检查。即,可以综合性地检测急性呼吸道感染的病原体。因此,可以容易地比较不同病原体间的解析结果。由于社区获得性肺炎、医院获得性肺炎中全部包含有高频率地被检测出的病原体,因此从可以综合性地鉴别主要的炎性病原体的观点来看,临床价值非常高。

[0043] 此外,本发明的鉴别造成急性呼吸道感染的炎性病原体的方法,其特征在于:来源于病原体的基因进一步包含与取得病原体耐药性有关的基因(耐药性基因)。作为耐药性基因,优选 *mecA* 基因和金属- β -内酰胺酶基因等。

[0044] 因此,耐药性基因还可以与病原体同时进行综合性检索,从而可以迅速得到综合性的检查结果。因而,可以鉴别耐药性病原体是定植病原体还是炎性病原体。因而,可以提供用于抗生素的选择的有用信息。进一步,可以检测出具有耐药性基因的耐药性病原体的存在,例如,由于还可以调查入院患者有无携带耐药性菌,从院内感染对策等的预防观点来看,这也是优选的。

[0045] 另外,上述对象优选为哺乳类,特别优选为人类。在上述对象为人的情况下,来源于对象细胞的基因优选为来源于人细胞的人特异性基因,例如,优选人的 SFTPC(肺表面活性物质相关蛋白 C) 基因、 β -珠蛋白基因和 β -肌动蛋白基因。

[0046] 本发明通过上述鉴别造成急性呼吸道感染的炎性病原体的方法,而提供一种用于鉴别造成急性呼吸道感染的炎性病原体的试剂盒。本发明的试剂盒,其特征在于:包括针对来源于呼吸道定植病原体的基因的引物对和使用说明书,其中,所述呼吸道定植病原体是选自链球菌属菌、嗜血杆菌属菌、莫拉菌属菌、假单胞菌属菌、克雷伯菌属菌、寡养单胞菌属菌、不动杆菌属菌和葡萄球菌属菌中的 1 种以上的病原体。

[0047] 另外,本发明的试剂盒优选进一步包含针对来源于呼吸道中通常不存在的病原体的基因的引物对和使用说明书,其中,所述呼吸道中通常不存在的病原体是选自支原体属菌、军团菌属菌、嗜衣原体属菌、分支杆菌属菌、立克次体属菌、诺卡氏菌属菌、肺孢子菌属菌、诺卡氏菌属菌、肺孢子菌属菌和曲霉属菌中的 1 种以上的病原体。本发明的试剂盒优选进一步包含针对选自 *mecA* 基因和金属- β -内酰胺酶基因中的 1 种以上的耐药性基因的引物对和使用说明书。

[0048] 根据本发明用于鉴别造成急性呼吸道感染的炎性病原体的试剂盒,与现有检查比较,可以更高灵敏度、高特异性地鉴别造成急性呼吸道感染的炎性病原体和定植病原体。

[0049] 本发明通过上述鉴别造成急性呼吸道感染的炎性病原体的方法,而提供了一种用于鉴别造成急性呼吸道感染的炎性病原体的装置。本发明的装置,其作为鉴别对象的病原体是呼吸道定植病原体,其特征在于:具备以下机构:

[0050] a) DNA 制备机构,用于从含有对象呼吸道分泌物的样本来制备 DNA;

[0051] b) DNA 扩增机构,用于将上述 DNA 中来源于对象细胞的 DNA 和来源于病原体的 DNA

进行特异性扩增；

[0052] c) DNA 检测机构,用于将通过上述 DNA 扩增机构而被扩增的来源于对象细胞的 DNA 和来源于病原体 DNA 进行检测；

[0053] d) 计算机构,用于基于通过上述 DNA 检测机构而被检测出的信号,计算来源于上述病原体的 DNA 拷贝数相对于来源于上述对象细胞的 DNA 拷贝数的相对数；和

[0054] e) 鉴别机构,用于基于上述鉴别基准值和上述相对数,鉴别上述病原体是否是炎性病原体。

[0055] 另外,本发明的装置,作为进一步的鉴别对象的病原体是呼吸道中通常不存在的病原体,其特征在于:进一步具备以下的机构:

[0056] a) DNA 制备机构,用于从含有对象呼吸道分泌物的样本来制备 DNA；

[0057] b) DNA 扩增机构,用于将上述 DNA 中来源于病原体的 DNA 进行特异性扩增；

[0058] c) DNA 检测机构,用于将通过上述 DNA 扩增机构而被扩增的来源于病原体的 DNA 进行检测；

[0059] d) 计算机构,用于基于通过上述 DNA 检测机构而被检测出的信号,计算来源于上述病原体的 DNA 拷贝数；

[0060] e) 鉴别机构,用于:

[0061] i) 在没有检测出来源于所述病原体的 DNA 的情况下,鉴别上述病原体与感染无关；以及

[0062] ii) 在检测出来源于所述病原体的 DNA 的情况下,鉴别上述病原体为炎性病原体。

[0063] 本发明的装置优选为来源于病原体的 DNA 进一步包含耐药性基因。

[0064] 根据本发明的装置,可以短时间检查多个样本,以及每个样本的多个病原体和耐药性基因,从而可以鉴别造成急性呼吸道感染的炎性病原体。

[0065] 进一步,根据本发明的鉴别造成急性呼吸道感染的炎性病原体的方法,以及用于鉴别造成急性呼吸道感染的炎性病原体的试剂盒和装置,由于也可以追加参与呼吸道感染的病毒和至今难以迅速诊断的真菌作为检查对象,因此适应性优异,由此可以进一步提高便利性。

[0066] 在现有检查中,即使只检查上述病原体也需要高成本(26,000 日元以上)。本发明中,即使实施每个样本 21 种目标基因的综合检索,可以以低成本(4,600 日元)实施。可以实现远超检查成本的医疗费用的削减,从市场的观点来看,也大为期待。

[0067] 在现有的检查中,即使是主要检测方法的培养检查,直到诊断确定需要最少 3 ~ 14 天,如果使用配对血清,则需要最少 14 天。与之相对,本发明从样本处理到多个目标基因的综合检索、检查结果的返还,用 4 小时就可以实施。因此,从快速性的观点来看,也是优异的。

[0068] 现有的快速诊断中使用的革兰氏染色由于对其影像需要熟练的技术和能力,因此根据检查实施者不同而有不同的结果。但是,PCR 不需要熟练的技术,也可以规范化。另外,即使检查实施者不同,也可以得到高精度的结果。因此,从具有高客观性的观点来看,也是优异的。

附图说明

- [0069] 图 1 :模式化呼吸道感染原理的模式图。
- [0070] 图 2 :表示用于鉴别本发明的一个实施例所涉及的造成急性呼吸道感染的炎性病原体的装置结构的框图。
- [0071] 图 3 :使用实际的 2 例肺炎病例的目标基因的检测中,表示 PCR 循环和荧光强度关系的图,以及痰的革兰氏染色的照片。
- [0072] 图 4 :检测出的肺炎球菌的 44 例 (A) 和 100 例 (B) 中,标出 Δ Cycle 和临床诊断结果的图。
- [0073] 图 5 :检测出的流感嗜血杆菌的 26 例 (A) 和 29 例 (B) 中,标出 Δ Cycle 和临床诊断结果的图。
- [0074] 图 6 :检测出的绿脓杆菌的 37 例 (A) 和 48 例 (B) 中,标出 Δ Cycle 和临床诊断结果的图。
- [0075] 图 7 :检测出的卡他莫拉菌的 17 例 (A) 和 20 例 (B) 中,标出 Δ Cycle 和临床诊断结果的图。
- [0076] 图 8 :检测出的耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的 34 例中,标出 Δ Cycle 和临床诊断结果的图。
- [0077] 图 9 :表示 300 例中被确定为炎性病原体的 158 例详细内容的图。表示病原体名称、病例数、病例的比例 (%)。
- [0078] 图 10 :表示 223 例鉴别结果的详细内容的图。表示病原体名称、病例的比例 (%)。
- [0079] 图 11 :表示多阶段前瞻性试验中登记的 174 例鉴别结果的详细内容的图。表示病原体名称、病例的比例 (%)。

具体实施方式

- [0080] 以下,对于本发明适合的实施方式进行详细说明。
- [0081] 鉴别本实施方式的造成急性呼吸道感染的炎性病原体的方法,作为鉴别对象的病原体包含呼吸道定植病原体,具备:相对于含有对象呼吸道分泌物的样本中的对象细胞量,测定所述样本中病原体的量的相对值的工序;基于所述相对值,鉴别所述病原体是否是炎性病原体的工序。
- [0082] 首先,用图 1 对于本发明造成急性呼吸道感染的炎性病原体的鉴别方法的原理进行说明。图 1 左的图和照片表示在正常对象(健康人)的痰或呼吸道分泌物中存在的病原体(例如,病原体 1 和病原体 2)和来源于对象的细胞(人类细胞)的存在。病原体 1 和病原体 2 是呼吸道定植病原体,上述病原体不引起炎症,作为带菌者的对象也不出现呼吸道症状。这里,假定由病原体 2 引起急性呼吸道感染。在急性呼吸道感染发病的对象的痰或呼吸道分泌物中的细菌与来源于对象的细胞的比例如图 1 右那样变化。由于在呼吸道中产生强烈的炎症,对象出现呼吸道症状(呼吸困难、咳嗽、脓痰)。作为炎性病原体的病原体 2 也增加。不引起肺炎的病原体 1 则不能看到显著变化。由此,确定病原体 1 是定植病原体。
- [0083] 这里,如果用 PCR 等公知的方法检测病原体 1 和病原体 2,则双方均检测出。由于病原体的 DNA 纯化效率、目标基因的扩增·检测效率等的不同,难以估计作为目标病原体的存在量(存在比)。进一步,在使用公知的 PCR 法的来源于对象的痰、呼吸道分泌物检查中,

可以计量病原体存在或不存在以及每单位体积的病原体量。痰或呼吸道分泌物中大多大量混入唾液和定植于上呼吸道的定植病原体,难以从病原体存在或不存在以及每单位体积的病原体量的信息中来确定造成急性呼吸道感染的炎性病原体。换言之,痰·呼吸道分泌物的多样性大到无法作为同一种样本进行一并处理。因此,即使固定在检测中使用的样本量和 DNA 量并用公知的方法进行检查,也难以将检测结果标准化,并在许多情况下难以解释其结果。

[0084] 在本发明中,着眼于呼吸道分泌物内共存的来源于对象的细胞(呼吸道上皮细胞和白血球等炎症细胞)。如图 1 右所示,急性呼吸道感染发病时,为了平定病原体活动,来源于对象的细胞增加。另一方面,推测与炎症无关的定植病原体的量基本没有变化。因此,建立了如下假设,即:将来源于对象的细胞作为内部参照,通过估计病原体存在量的相对数,可以鉴别炎性病原体、定植病原体。在以下说明的实施例中证实该假设,从而完成本申请发明。

[0085] 以下对于根据发病地点分类的急性呼吸道感染的主要炎性病原体进行说明。社区获得性肺炎(Community-acquired pneumonia, CAP)指一般人等在社会中罹患的肺炎。表 1 中列举了社区获得性肺炎的主要炎性病原体(参照非专利文献 3 和 7)。社区获得性肺炎的病因在于包含呼吸道定植病原体、以及呼吸道中通常不存在的病原体在内的多种炎性病原体。为此,有必要检查对多种病原体进行综合性检查,以确定急性呼吸道感染的主要病原体。为此,有必要分成 2 个阶段的过程。第 1 阶段是通过高灵敏度的手法综合性地检测有可能性的病原体的过程。第 2 阶段是在检测出的病原体中,鉴别哪个是炎性病原体,哪个是定植病原体的过程。通过本发明的鉴别方法,可以综合性地检测和鉴别病原体。

[0086] 表 1:

[0087] 社区获得性肺炎

病原体	分类
肺炎链球菌	CO
肺炎支原体	NCO
肺炎衣原体	NCO
流感嗜血杆菌	CO
金黄色葡萄球菌	CO
卡他莫拉菌	CO
军团菌属	NCO
肠杆菌	CO
假单胞菌属	CO
厌氧菌	CO
病毒	
肺孢子菌属	
结核分枝杆菌	NCO
鹦鹉热衣原体	NCO
贝氏柯克斯体	NCO

[0088] CO:呼吸道定植病原体

[0090] NCO:呼吸道中通常不存在的病原体

[0091] 呼吸机相关性肺炎 (Ventilator-Associated Pneumonia, VAP) 是医院获得性肺炎的一个分类,指人工呼吸机使用中患者的肺炎。表 2 中,列举了呼吸机相关性肺炎的主要炎性病原体 (参照非专利文献 5)。从表 2 可知,主要的病原体几乎都是呼吸道定植病原体或慢性呼吸道感染的炎性病原体。因此,很有必要鉴别出被检测的病原体到底是炎性病原体和定植病原体中的哪一种。根据本发明,可以对至今不能鉴别的呼吸道定植病原体进行鉴别。

[0092] 表 2:

[0093] 呼吸机相关性肺炎

病原体		频率	分类
绿脓杆菌		24.4%	CO
不动杆菌属		7.9%	CO
嗜麦芽寡养单胞菌		1.7%	CO
肠杆菌	克雷伯菌属	2.2%	14.1% CO
	大肠杆菌	3.4%	
	成团肠杆菌属	2.7%	
	其它	5.8%	
嗜血杆菌属		9.8%	CO
金黄色葡萄球菌	MSSA	10.0%	20.4% CO
	MRSA	11.4%	
链球菌属		8.0%	CO
肺炎链球菌		4.1%	CO
凝固酶阴性葡萄球菌		1.4%	CO
奈瑟菌属		2.6%	CO
厌氧菌		0.9%	CO
真菌		0.9%	
其它		3.8%	

[0095] CO:呼吸道定植病原体

[0096] 接着,对本发明实施方式确定用于鉴别造成急性呼吸道感染的炎性病原体的鉴别基准值的方法、以及基于鉴别基准值来鉴别造成急性呼吸道感染的炎性病原体的方法进行说明。

[0097] (确定用于鉴别造成急性呼吸道感染的炎性病原体的鉴别基准值的方法)

[0098] 确定用于鉴别造成急性呼吸道感染的炎性病原体的鉴别基准值的方法是确定用于鉴别呼吸道定植病原体的鉴别基准值的方法,具备以下的工序。

[0099] 从含有对象呼吸道分泌物的样本来制备 DNA 的工序;

[0100] a) 测定 DNA 中来源于对象细胞的基因拷贝数的工序;

[0101] b) 测定 DNA 中来源于病原体的基因拷贝数的工序;

[0102] c) 计算来源于病原体的基因拷贝数相对于来源于对象细胞的基因拷贝数的相对数的工序;

[0103] d) 对多个对象进行工序 a) ~ c), 得到各个对象的相对数的工序; 以及

[0104] e) 通过比较各个对象的相对数和各个对象的临床诊断结果,将 i) 在临床诊断中成为炎性病原体阳性的相对数的下限值、和 / 或 ii) 在临床诊断中成为炎性病原体阴性的相对数的上限值确定为鉴别基准值的工序。

[0105] 接着,说明各工序。

[0106] 本实施方式中的病原体是呼吸道定植病原体。所谓“呼吸道定植病原体”是可以定植在呼吸道的病原体(也称为定植病原体、本土病原体、共生病原体、共生有机体),在不发生感染的健康者中也存在。正常时,这些定植病原体不引发炎症,带菌者(对象)也不出现呼吸道症状。但是,以对象身体状况不良等主要原因为契机,会转成感染,变为慢性 / 急性呼吸道感染的病因病原体(炎性病原体)。在本发明中,所谓“呼吸道定植病原体”是指可以定植在呼吸道的病原体的种类。另外,单单说到“定植病原体”的情况是指呼吸道定植病原体中与呼吸道感染无关状态的病原体。

[0107] 作为呼吸道定植病原体,可以列举出肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)等的链球菌属菌,流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)等的嗜血杆菌属菌,卡他莫拉菌(*Moraxella catarrhalis*)等的莫拉菌属菌,绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)等的假单胞菌属菌,肺炎杆菌(*Klebsiella pneumoniae*)等的克雷伯菌属菌,嗜麦芽寡养单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*)等的寡养单胞菌属菌,鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)等的不动杆菌属菌,金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)等的葡萄球菌属菌等。

[0108] 对象优选为哺乳类,特别优选为人类。另外,对象是具有急性肺炎等急性呼吸道感染的对象或有该嫌疑的对象。样本只要含有呼吸道分泌物就可以利用,具体而言,优选咳出痰、吸引痰、诱发咳出痰、气管内采集的痰等痰。另外,优选立刻被咳出的痰或在 -20°C 冷冻保存的痰。

[0109] DNA 是指来源于对象的 DNA 和 / 或来源于病原体的 DNA,即指基因组 DNA、线粒体 DNA、或从基因组 RNA 用逆转录酶变换为 DNA 的互补 DNA。只要将用于检测的 DNA 调整为可检测出在 DNA 中存在的基因 DNA 即可。DNA 提取纯化方法是该领域中公知的,例如,可以使用在 Sambrook et al. ((2001) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 第 3 版, Cold Spring Harbour Laboratory Press) 中记载的本领域技术人员公知的方法和市售的 DNA 纯化试剂盒来制备。

[0110] “测定基因拷贝数”是指测定来源于对象的 DNA 和 / 或来源于病原体的 DNA 中作为目标基因序列的拷贝数。另外,指测定在样本中比较可能的目标 DNA 的相对拷贝数。DNA 的相对拷贝数的测定只要使用本领域技术人员公知的测定体系即可,具体而言,可以列举出 PCR 法(实时 PCR(Real-time PCR)法)等基因扩增检测法。作为 PCR 定量方法,可以列举出琼脂糖凝胶电泳法、嵌入(intercalate)法(SYBRGreen 法)、荧光探针法等。其中,优选利用荧光探针法的实时 PCR 法。DNA 的相对拷贝数在利用嵌入法或荧光探针法的实时 PCR 法中,用循环阈值(Ct 值)表示。

[0111] PCR 法中使用的引物对是可以识别基因的特异区域的物质,从而可以特异性地识别对象基因或病原体基因,并且,引物的具体的核苷酸序列可以适当决定。

[0112] 作为荧光探针法中使用的荧光探针,可以选择 TaqMan 探针、循环探针、分子信标(molecular beacon)等。荧光探针是可以识别基因的特异区域的物质,从而可以与上述引

物对同时特异性地识别对象基因或病原体基因,并且,探针的具体的核苷酸序列可以适当决定。荧光探针 5'和 3'末端侧分别用荧光物质和猝灭剂物质来修饰,伴随着 PCR 反应的进行,通过解除由于猝灭剂物质造成的抑制从而检测发出的荧光。由此,可以测定 DNA 中目标基因序列的相对拷贝数。荧光物质和猝灭剂物质的组合只要是可以相互识别的组合即可,这样的荧光标识物质的组合可以分别使用本领域技术人员公知的组合,优选 FAM(注册商标)和 TAMRA(注册商标)、TET(注册商标)和 BHQ-1(注册商标)等的组合。另外,可以使用同时激发和检测不同波长的荧光的系统(例如,Smart Cycler II System, Takara Bio. Inc.),从而可以同时检测在 1 个多重 PCR 反应中扩增的多个目标序列。用一对 PCR 引物对来扩增 1 个目标碱基序列的 PCR 反应称为单一 PCR(Single PCR),用多对 PCR 引物对来同时扩增多个目标碱基序列的 PCR 反应称为多重 PCR(Multiplex PCR)。

[0113] “计算相对数”是计算出相对拷贝数,具体而言,计算来源于病原体的基因序列的相对拷贝数相对于来源于对象细胞的基因序列的相对拷贝数的相对数。由此,估计将来源于对象的细胞数作为内部参照的病原体细胞的相对数,从而可以在不同样本间比较。换言之,工序 a) ~ c) 是病原体的检测工序,由此可以将病原体标准化而进行检测。例如,从来源于对象细胞的基因中得到的 Ct 值减去来源于病原体的基因中得到的 Ct 值,通过所得到的差值(Δ Cycle)来表示病原体细胞的相对数。

[0114] 所谓“临床诊断结果”是在该领域中可以采用的急性呼吸道感染的临床诊断结果,是指通过痰涂抹革兰氏染色、痰培养法、尿中抗原检查、配对血清法等公知的检查方法,在确定炎性病原体、确认炎性病原体的嫌疑、判断某种病原体并非炎性病原体等的临床诊断中得到的观察结果。

[0115] 另外,所谓“临床诊断中炎性病原体阳性”是指在上述诊断中,确定炎性病原体的情况,或确认炎性病原体的嫌疑的情况。所谓“临床诊断中炎性病原体阴性”是指在上述诊断中,判断某种病原体并非炎性病原体的情况。

[0116] 在确定鉴别基准值的工序中,首先,一并标出各个对象中得到的相对数(例如, Δ Cycle)和表明各个对象中得到的炎性病原体阳性/阴性的临床诊断结果,并解析两者在统计学上的相关性。接着,确定作为目标病原体的炎性病原体/定植病原体(非炎性病原体)的边界的相对数,即确定在临床诊断中显著地成为炎性病原体阳性的相对数的下限值和/或在临床诊断中显著地成为炎性病原体阴性的相对数的上限值,将其作为鉴别基准值。这样的统计学上的解析方法是本领域技术人员公知的。对此,对于某个病原体的特异目标基因,可以分别确定固有的鉴别基准值。另外,进一步追加样本数,并通过在上述图中追加其样本的相对数和临床诊断结果,评价鉴别基准值的信赖性,可以确定信赖性更高的鉴别基准值。

[0117] (造成急性呼吸道感染的炎性病原体的鉴别方法)

[0118] 本实施方式的鉴别造成急性呼吸道感染的炎性病原体的方法大致分为以下 3 个方法。

[0119] (1) 将呼吸道定植病原体作为鉴别对象的鉴别方法

[0120] (2) 将呼吸道中通常不存在的病原体作为进一步的鉴别对象的鉴别方法

[0121] (3) 测定耐药性基因的拷贝数,评价病原体耐药性的鉴别方法

[0122] 以下,分别对上述方法进行说明。

[0123] (1) 将呼吸道定植病原体作为鉴别对象的鉴别方法

[0124] 将呼吸道定植病原体作为鉴别对象的造成急性呼吸道感染的炎性病原体的鉴别方法具备以下工序。

[0125] 从含有对象呼吸道分泌物的样本来制备 DNA 的工序；以及

[0126] a) 测定 DNA 中来源于对象细胞的基因拷贝数的工序；

[0127] b) 测定 DNA 中来源于病原体的基因拷贝数的工序；

[0128] c) 计算来源于病原体的基因拷贝数相对于来源于对象细胞的基因拷贝数的相对数的工序；

[0129] d) 基于上述鉴别基准值和上述相对值，鉴别所述病原体是否是炎性病原体的工序。

[0130] 从制备 DNA 的工序起到工序 c) 采用与确定上述鉴别基准值同样的方法即可，省略重复说明。

[0131] 呼吸道定植病原体经过在呼吸道附着、增殖、定植、感染这样的过程，以带菌者身体状况不良等主要因素为契机而转化为急性感染，即转化为发炎状态。因此，呼吸道定植病原体的情况存在阴性、定植病原体和炎性病原体这 3 种状态（鉴别结果）。由于对于机会性病原体 (opportunistic pathogen) 也经过同样的过程而参与感染，因此存在着有阴性、定植病原体（不显性感染的状态）和炎性病原体这 3 种状态（鉴别结果）。

[0132] 鉴别工序：在 (1) 的工序 d) 中，通过比较所得到的相对数和鉴别基准值，可以鉴别属于上述 3 种状态中的哪一种。具体而言，i) 在没有检测出来源于呼吸道定植病原体的基因的情况下，鉴别出病原体并不定植在呼吸道内（阴性）；ii) 在检测出来源于呼吸道定植病原体的基因，但相对数小于鉴别基准值的情况下，鉴别出病原体是定植病原体，但不是炎性病原体；以及 iii) 在相对数在鉴别基准值以上的情况下，鉴别出病原体是炎性病原体。这里，“不能检测出”或在检测限以下是指，例如，在将基因相对拷贝数用 Ct 值表示的情况下，表示来源于基因的扩增产物的信号强度（荧光强度）没有达到规定 Ct 值的信号强度的情况。另外，在没有检测出来源于作为内部参照的对象细胞的基因的情况下，不能得到相对数，因而，该案例不能作为鉴别对象。在该情况下，怀疑无法恰当进行样本采集、DNA 制备、PCR 反应等。因此，在现有检查中可以降低判断为阴性的伪阴性。

[0133] (2) 将呼吸道中通常不存在的病原体作为进一步的鉴别对象的鉴别方法

[0134] 接着，除了呼吸道定植病原体，还对将呼吸道中通常不存在的病原体作为进一步的鉴别对象的造成急性呼吸道感染的炎性病原体的鉴别方法进行说明。本实施方式的鉴别方法不仅具备 (1) 的鉴别方法的工序，还进一步具备以下的工序。

[0135] 从含有对象呼吸道分泌物的样本来制备 DNA 的工序；以及

[0136] a) 测定由含有对象呼吸道分泌物的样本制备而成的 DNA 中来源于病原体的基因拷贝数的工序；

[0137] b) i) 在没有检测出来源于病原体的基因的情况下，鉴别病原体与感染无关；和 ii) 在检测出来源于病原体的基因的情况下，鉴别病原体为炎性病原体的工序。

[0138] 作为呼吸道中通常不存在的病原体 (Noncommensal organism)，可以列举出不仅有肺炎支原体 (*Mycoplasma pneumoniae*) 等的支原体属菌；嗜肺军团菌 (*Legionella pneumophila*) 等的军团菌属菌；肺炎衣原体 (*Chlamydia pneumoniae*) 等的衣原体属菌。

pneumoniae)、鹦鹉热衣原体 (*Chlamydia psittaci*) 等的嗜衣原体属菌;结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)、胞内分枝杆菌 (*Mycobacterium intracellulare*)、鸟型分枝杆菌 (*Mycobacterium avium*)、堪萨斯分枝杆菌 (*Mycobacterium kansasii*) 等的分枝杆菌属菌;贝氏柯克斯体 (*Coxiella burnetii*) 等的立克次体属菌;还有机会性病原体、即星型诺卡菌 (*Nocardia asteroides*) 等的诺卡氏菌属菌;耶氏肺孢子菌 (*Pneumocystis jirovecii*) 等的肺孢子菌属菌;烟曲霉 (*Aspergillus fumigatus*) 等的曲霉菌属菌(真菌)等。

[0139] 机会性感染是由于在健康对象中不引起感染症的病原体(称为弱毒微生物、非病原微生物、平常无害菌等)为原因而发病的感染症。在具有由于获得性免疫缺陷综合症(AIDS)、类固醇、免疫抑制剂等造成免疫力低下状态的对象中,在通常情况下由于其免疫力而增殖被抑制的病原性低的病原体发生增殖,其结果引起疾病。作为通常与机会性感染相关的病原体,大致分为在环境中存在时侵入对象的外因性病原体和人体中潜伏存在的内因性病原体;在本发明中,将前者作为机会性病原体处理,将后者作为呼吸道定植病原体处理。

[0140] 呼吸道中通常不存在的病原体由于通常在呼吸道中不存在,因此存在阴性、炎性病原体这2种鉴别结果。鉴别工序:在(2)的工序b)中,通过检测呼吸道中通常不存在的病原体的有无,可以鉴别属于这2种状态中的哪一种。具体而言,i)在没有检测出来源于病原体的基因的情况下,鉴别病原体与感染无关(阴性);和ii)在检测出来源于病原体的基因的情况下,鉴别病原体为炎性病原体。

[0141] 除了上述列举的病原体之外,也可以进一步追加检测出与呼吸道感染相关的病毒、细菌、真菌和/或寄生虫等。作为病毒,例如可以列举出流感病毒、副流感病毒、腺病毒、鼻病毒、呼吸道合胞病毒(*Respiratory syncytial virus*)、偏肺病毒(*metapneumovirus*)、巨细胞病毒(CMV)。作为细菌,可以列举出鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)等的不动杆菌属菌,贝氏柯克斯体(*Coxiella burnetii*)等的立克次体属菌等。作为真菌,例如可以列举出烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)等的曲霉菌属菌、新型隐球菌(*Cryptococcus neoformans*)等的隐球菌属菌。作为寄生虫,例如可以列举出卫氏并殖吸虫(*Paragonimus westermani*)等的肺吸虫。

[0142] (3) 测定耐药性基因的拷贝数,评价病原体耐药性的鉴别方法

[0143] 第三个鉴别方法是在上述(1)或(2)鉴别方法的基础上,测定耐药性基因的拷贝数,评价病原体耐药性的鉴别方法。在该鉴别方法中,可以进一步追加检测·鉴别作为来源于病原体基因的与获得病原体耐药性相关的基因(耐药性基因)。

[0144] 作为耐抗生素等药剂的基因(耐药性基因),可以列举出作为耐甲氧西林基因的 *mecA* 基因;对水解青霉素、头孢类、碳氢霉烯类等的具有 β -内酰胺环的大部分抗生素的酶进行编码的金属- β -内酰胺酶基因(*IMP*基因、*VIM*基因、*GIM-1*基因、*SPM-1*基因等,参照非专利文献8:“The New β -lactamases”);作为耐异烟肼(INH)基因的 *katG* 基因、*inhA* 基因、*ahp0* 基因等;作为耐利福平(RFP)基因的 *rpoB* 基因;作为耐乙胺丁醇(EB)基因的 *embC* 基因、*embB* 基因、*embA* 基因等;作为耐链霉素(SM)基因的 *rpsL* 基因、*rrs* 基因等;作为耐吡嗪酰胺(PZA)基因的 *PncA* 基因等;作为耐氟喹诺酮等喹诺酮类药剂的基因的 *gyrA* 基因、*gyrB* 基因等。其中,优选作为临床上重要的耐药性基因的 *mecA* 基因、金属- β -内酰

胺酶基因等。

[0145] 作为耐药性病原体,已知有耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)和多重耐药绿脓杆菌。另外,报道了具有对INH、RFP、EB、SM、PZA、喹诺酮类等药剂具有抗性的结核分枝杆菌。作为评价病原体耐药性的方法,可以列举出比较从病原体特异基因得到的相对数和从来源于病原体的耐药性基因得到的相对数,从而从耐药性基因的相对拷贝数相对于病原体特异基因的相对拷贝数的比率来推测耐药性病原体的存在的方法。具体而言,在检测出相等量金黄色葡萄球菌的femB基因和耐甲氧西林基因mecA的情况下,提示了耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的存在。另外,在检测出相等量的金属- β -内酰胺酶基因和假单胞菌属菌的16S rRNA基因情况下,提示了多重耐药绿脓杆菌的存在。

[0146] 另外,即使耐药性基因的相对拷贝数少,但提示了将来具有其耐药性基因的病原体作为主要炎性病原体的危险性。另外,其它病原体获得其耐药性基因,提示了将来例如出现耐甲氧西林金黄色葡萄球菌或多重耐药绿脓杆菌的危险性。为此,上述病原体的耐药性评价从治疗中抗生素的选择方面以及院内感染对策方面来看,是有用的信息。

[0147] (用于鉴别造成急性呼吸道感染的炎性病原体的试剂盒)

[0148] 本实施方式的试剂盒是根据鉴别上述造成急性呼吸道感染的炎性病原体的方法,用于鉴别造成急性呼吸道感染的炎性病原体的试剂盒,包含:针对来源于1个以上的上述呼吸道定植病原体的基因的引物对以及使用说明书。另外,本实施方式的试剂盒优选进一步包含:针对来源于1个以上的上述呼吸道中通常不存在的病原体的基因的引物对以及使用说明书,和/或针对1个以上的上述耐药性基因的引物对和使用说明书。

[0149] 各引物对优选在作为目标病原体中针对特异基因区域设计的引物对,或优选为针对耐药性基因中特异基因区域设计的引物对。各引物对中也含有对扩增的基因区域的特异探针,优选通过荧光探针法扩增来源于病原体的基因并进行检测。具体而言,可以使用表3中列举的引物对。使用说明书包含不仅有鉴别造成急性呼吸道感染的炎性病原体的方法,还有对于各个病原体和/或耐药性基因的鉴别基准值或对于鉴别基准值的确定方法的使用说明。

[0150] (用于鉴别造成急性呼吸道感染的炎性病原体的装置)

[0151] 对于用于鉴别本实施方式的造成急性呼吸道感染的炎性病原体的装置(以下称为“鉴别装置”)进行说明。本实施方式的鉴别装置大致分为以下3种方法。

[0152] (1) 将呼吸道定植病原体作为鉴别对象的鉴别装置

[0153] (2) 将呼吸道中通常不存在的病原体作为进一步的鉴别对象的鉴别装置

[0154] (3) 测定耐药性基因的拷贝数,评价病原体耐药性的鉴别装置

[0155] 图2是本实施方式的装置框图。以下,一边参照图2,一边详细说明本实施方式的装置。在同一图中,本实施方式的鉴别装置10包括DNA制备部11、DNA扩增部12、DNA检测部13、计算部14和鉴别部15而构成。鉴别装置10可以全自动地进行DNA制备·扩增·检测·计算·鉴别工序,各工序按照分别配置在鉴别装置10的内部DNA制备部11、DNA扩增部12、DNA检测部13、计算部14和鉴别部15的顺序来实施。因此,通过鉴别装置10,检查者将添加有含对象呼吸道分泌物的样本的样品管放置在DNA制备部11的样品架上后,只要启动鉴别装置10,就可以进行炎性病原体的鉴别。

[0156] 接着,对于具有该结构的本实施例的鉴别装置的动作进行说明。使鉴别装置10启

动,将含有对象呼吸道分泌物的样本导入 DNA 制备部 11,通过 DNA 制备部 11 从样本来制备 DNA。DNA 制备部 10 在含有细胞的样本中添加表面活性剂和蛋白酶 K 并处理,接着利用包括将硅胶薄膜等多孔膜作为基板的 DNA 纯化法(例如,QIA amp DNA BloodKit(注册商标),QIAGEN Co.)在内的任意 DNA 提取手段进行 DNA 制备。DNA 扩增部 12 将由 DNA 制备部 10 制备的 DNA 作为模板,扩增来源于作为鉴别对象的病原体的 DNA(相当于病原体基因中特异区域中的 DNA)。这里,扩增来源于作为内部标准的对象细胞的 DNA。来源于作为鉴别对象的病原体的 DNA 包含:(1) 来源于呼吸道定植病原体的 DNA,或(2) 来源于呼吸道中通常不存在的病原体的 DNA。在其它形态中进一步包含(3) 来源于作为鉴别对象的病原体的 DNA 相当于耐药剂基因中特异区域的 DNA。作为 DNA 扩增方法,优选 PCR、实时 PCR 等。DNA 检测部 13 检测由 DNA 扩增机构扩增的来源于对象细胞的 DNA、以及来源于病原体的 DNA。DNA 检测可以和 DNA 扩增同时进行,或在扩增结束后进行。作为 DNA 检测方法,可以列举出嵌入法(SYBR Green 法)、荧光探针法等。作为 DNA 扩增和检测的组合,优选利用实时 PCR 法和荧光探针法。

[0157] 计算部 14 在(1) 在将呼吸道定植病原体作为鉴别对象的情况下,基于由 DNA 检测机构检测出的信号,计算出来源于病原体的 DNA 拷贝数相对于来源于对象细胞的 DNA 拷贝数的相对数。另外,(2) 在将呼吸道中通常不存在的病原体作为鉴别对象的情况下,计算出来源于病原体的 DNA 的拷贝数。从而,(1) 基于上述鉴别基准值和上述相对数,鉴别部 15 鉴别呼吸道定植病原体是否是炎性病原体。具体而言,i) 在没有检测出来源于呼吸道定植病原体的 DNA 的情况下,鉴别出病原体不在呼吸道定植(阴性);ii) 在检测出来源于呼吸道定植病原体的 DNA,但相对数小于鉴别基准值的情况下,鉴别出病原体是定植病原体而非炎性病原体;以及 iii) 在相对数在鉴别基准值以上的情况下,鉴别出病原体是炎性病原体。另外,(2) 在将呼吸道中通常不存在的病原体作为鉴别对象的情况下,鉴别部 15 在 i) 没有检测出来源于呼吸道中通常不存在的病原体的 DNA 的情况下,鉴别出病原体与感染无关;和 ii) 检测出来源于呼吸道中通常不存在的病原体的 DNA 的情况下,鉴别出病原体为炎性病原体。

[0158] 实施例

[0159] (实施例 1 :DNA 纯化)

[0160] 作为样本,可以使用外来接受诊断或入院中呼吸道感染患者的咳出痰、吸引痰、诱发痰、气管内采集的痰中的任意一种。另外,使用立刻被咳出的痰或在 -20°C 冷冻保存的痰。在样本中加入等量的磷酸盐缓冲液(PBS),通过涡流得到粘性低下的均匀试料。200 μL 的试料中加入 200 μL 样品裂解液(Buffer AL,QIAGEN Co.)和 20 μL 蛋白酶 K(Takara Bio. Inc.), 57°C 下培养 2 小时。接着,使用 QIAamp 血样 DNA 小提试剂盒(QIAamp DNA Blood Mini Kit(QIAGEN Co.))纯化样本的 DNA。

[0161] (实施例 2 :PCR 反应)

[0162] 将纯化的来源于各样本的 DNA 作为模板,对于 21 种目标基因进行 PCR 反应(实时 PCR)。另外,在 PCR 反应中使用 Smart Cycler II System(Takara Bio. Inc.),在 1 个反应中检测 1 种或 2 种目标基因。PCR 反应液和 PCR 反应用以下条件。用于检测 22 种目标基因而使用的引物对和探针的组合在表 3 中表示。另外,在利用 1 个反应同时扩增 2 种目标碱基序列的情况下,使用不同的探针的荧光标识组合。

[0163]

表 3:

种属/菌株 (目标基因)	正向引物和反向引物	序列号	探针	序列号	探针浓度	扩增大小
1) 智人 (<i>Homo sapiens</i>) (SFTPC)	5' -GCAGTGCCTACGCTAAGCTG-3' 3' -TAGATGTAGTAGGGCCACCTC-3'	1 2	FAM-CGAGATGACGGCTCAGCACCCTC-TAMRA	42	0.3 μM	130 bp
2) 肺炎链球菌 (肺炎球菌肺炎)	5' -CTAAGGCTTGGACAGAAATGGGC-3' 3' -CCGCTTACCACTAGTGGCAATC-3'	3 4	TET-AGGAATGTTGGCAATCTCTCTGTCA-BHQ-1	43	0.3 μM	172 bp
3) 流感嗜血杆菌 (16S rRNA)	5' -TTGACATCCTAAGAAGAGCTCAGAGA-3' 3' -CTTCCCTGTGTAGGCAATGTAGC-3'	5 6	TET-ATGGCTGTGTCAGCTCGTGT-BHQ-1	44	0.3 μM	267 bp
4) 卡他莫拉菌 (copB)	5' -CGTGGCTGTGACCGTTTGGACTTTA-3' 3' -CAGCGCTGCCAAAATAACTGCCAAAAG-3'	7 8	TET-CAGCGGTAACTTAATCTATCCACTC-BHQ-1	45	0.3 μM	298 bp
5) 假单胞菌属 (16S rRNA)	5' -GAGGGGTGAGTAAAGCTAGGA-3' 3' -CCACTGGTGTCTCTCTATATCT-3'	9 10	TET-AGTGGGGGATCTTCGGACCTCA-BHQ-1	46	0.3 μM	618 bp
6) 肺炎克雷伯菌 (gppA)	5' -TGAAGTATGACTCCACTCAGCGT-3' 3' -CTTCAGAACCGGTTTGTGGT-3'	11 12	FAM-CCGGTATCTTCCTGACCGAOGA-TAMRA	47	0.3 μM	670 bp
7) 嗜麦芽芽孢杆菌 (23S rRNA)	5' -GGAAAGGAACTGGTGAACCTGAAAT-3' 3' -CGCACAGGTTTCAGTTCTATTCA-3'	13 14	FAM-ACCGGATAGTGAACCACTACC-TAMRA	48	0.3 μM	341 bp
8) 金黄色葡萄球菌 (femB)	5' -TGCCCACTATGATTAAGCTTGC-3' 3' -TGATAATCACTACCTGGACCGGA-3'	15 16	TET-OGAGGTCATTCGAGCTTCTACTTA-BHQ-1	49	0.1 μM	162 bp
9) 金黄色葡萄球菌, MRSA (mecA)	5' -AAGTAGGTAATGATGCAAC-3' 3' -CTTGGTCTTCTGCAATTCCTGGA-3'	17 18	FAM-AGATGGTATGTTGGAAGTTAGATTGGGA-TAMRA	50	0.3 μM	112 bp
10) 金属-β-内酰胺酶 (IMP)	5' -GGGAGYATTCCTCTCATTTTCATAGC-3' 3' -AATTTGTRCTTGAACCTTACCCTT-3'	19 20	TET-ATTTCTCGATCTATCCACCAGTATGCA-BHQ-1	51	0.1 μM	136 bp
11) 肺炎支原体 (16S rRNA)	5' -AGTAATCTTGTAGGGCAACGGTGA-3' 3' -TCTACTTCTCAGCATAGTACAGTCA-3'	21 22	FAM-ACCACTAGTGTATGTTGGCA-TAMRA	52	0.3 μM	227 bp
12) 嗜肺炎军团菌 (mip)	5' -TAACCGAAGCAAAATGAAAGAGC-3' 3' -AAAACGGTACCATCAATCAGAGGA-3'	23 24	TET-TGATGGCAAAAGGCTACTGCTGAA-BHQ-1	53	0.1 μM	264 bp
13) 军团菌属 (16S rRNA)	5' -AGGCTAATCTTAAAGCGCCAGGCC-3' 3' -GCATGCTTAAACATGCAAGTGGAAAC-3'	25 26	FAM-CATATTCCTACCGGTTACTCACCCGT-TAMRA	54	0.1 μM	198 bp
14) 肺炎衣原体 (53KD-抗原)	5' -GCAACCGGTAGCAACAAATTA-3' 3' -AATTGAGCGCGTTTGTGCACT-3'	27 28	FAM-AGCGGCTGCAAACTGGGAATAAAG-TAMRA	55	0.3 μM	364 bp
15) 肺炎衣原体 (ompA)	5' -GTAATGTCATGCTTAAAGCTGTTTCAC-3' 3' -TCCACATAGTCCCATCGATTAATAAAC-3'	29 30	TET-CCAAGAGAGCAAAATTAGAATAGGAGCA-BHQ-1	56	0.1 μM	291 bp
16) 诺卡菌属 (16S rRNA)	5' -CCTTGGGTTGTAACCTTTCGAC-3' 3' -TTGGGTTGAGCCCAAGTTTCA-3'	31 32	FAM-AAAAGAGCAGCCGCAACTACGTCC-TAMRA	57	0.1 μM	191 bp
17) 耶氏肺炎菌 (5S rRNA)	5' -GTGATGTTGCAAGTACTCAGAAAG-3' 3' -GATGGTGTTCAGGCCA-3'	33 34	TET-CTAGGATATAGCTGGTTTTCTGGGAA-BHQ-1	58	0.3 μM	346 bp
18) 结核分枝杆菌 (MPB64)	5' -ATCCCTGCCCAGTGTCTCC-3' 3' -CTGGGAGTCTAGCCAGCAT-3'	35 36	TET-CCGGACAACAGGATCGATAGGCC-BHQ-1	59	0.1 μM	238 bp
19) 胞内分枝杆菌 (ITS 16-23S rRNA)	5' -AGCACCAAGAAAGCTCAAT-3' 3' -CGAACCATACCGCTAAGGACTA-3'	37 38	FAM-CCTGAGACAACACTCGTCCGATCC-TAMRA	60	0.1 μM	243 bp
20) 鸟型分枝杆菌 (ITS 16-23S rRNA)	5' -AGCACCAAGAAAGCTCAAT-3' 3' -AATTACACATTCGATGAAACCGCGG-3'	39 40	FAM-CCTGAGACAACACTCGTCCGATCC-TAMRA	60	0.3 μM	257 bp
21) 堪萨斯分枝杆菌 (dnaJ)	5' -ACCGTGTGATGATGCAAGGC-3' 3' -GTAAGCTGACCGCAACTGTGAGC-3'	41	TET-AGGACCGACAGCGGATCAGACT-BHQ-1	61	0.1 μM	231 bp
22) 鸟型分枝杆菌 (16S rRNA)	5' -CAAGTCAAGGAAAGGCTCT-3' 3' -GCCGTATCTAGTCCCAAGTGTG-3'	62 63	FAM-TACCGGATAGGACCTCAAGACGC-TAMRA	64	0.3 μM	269 bp

[0164] [PCR 反应液 (单一 PCR)]

[0165] TAKARA Premix Ex Taq

12.5 μL

[0166]	目标基因 A 正向引物 (10 μ M)	0.75 μ L
[0167]	目标基因 A 反向引物 (10 μ M)	0.75 μ L
[0168]	目标基因 A 探针 (10 μ M)	0.75 μ L
[0169]	模板 DNA	1.0 μ L
[0170]	无菌水	总计 25.0 μ L
[0171]	[PCR 反应液 (多重 PCR)]	
[0172]	TAKARA Premix Ex Taq	12.5 μ L
[0173]	目标基因 A 正向引物 (10 μ M)	0.75 μ L
[0174]	目标基因 A 反向引物 (10 μ M)	0.75 μ L
[0175]	目标基因 A 探针 (10 μ M)	0.25 μ L 或 0.75 μ L
[0176]	目标基因 B 正向引物 (10 μ M)	0.75 μ L
[0177]	目标基因 B 反向引物 (10 μ M)	0.75 μ L
[0178]	目标基因 B 探针 (10 μ M)	0.25 μ L 或 0.75 μ L
[0179]	模板 DNA	1.0 μ L
[0180]	无菌水	总计 25.0 μ L
[0181]	[PCR 反应条件 (扩增大小 : 小于 500bp)]	
[0182]	第 1 改性阶段	95°C 30 秒
[0183]	3 阶段 PCR(40 个循环)	
[0184]	改性阶段	95°C 8 秒
[0185]	退火阶段	61°C 25 秒
[0186]	伸长阶段 (检测荧光)	72°C 20 秒
[0187]	[PCR 反应条件 (扩增大小 : 500bp 以上)]	
[0188]	第 1 改性阶段	95°C 30 秒
[0189]	3 阶段 PCR(40 个循环)	
[0190]	改性阶段	95°C 10 秒
[0191]	退火阶段	61°C 35 秒
[0192]	伸长阶段 (检测荧光)	72°C 25 秒

[0193] (实施例 3 : 在实际肺炎病例中病原菌的检测)

[0194] 在实际肺炎病例 (病例 1 和病例 2) 中 PCR 解析结果在图 3 中表示。图 3 是表示目标基因的检测中 PCR 循环数和荧光强度关系的图以及痰革兰氏染色的照片。首先, 对于痰革兰氏染色进行说明。病例 1 的痰革兰氏染色照片是病例 1 的实际情况。确认了人体细胞 (白血球) 占多数, 并确认了在其上被染成藏青色的链球菌 (肺炎球菌)。认为在革兰氏染色中涂抹观察结果是肺炎球菌感染的痰。为此, 认为病例 1 是起因于肺炎球菌的肺炎。病例 2 的痰革兰氏染色照片是病例 2 的实际情况。确认了人体细胞 (白血球), 并确认了在其上被染成红色的小杆菌 (流感嗜血杆菌)。认为革兰氏染色中涂抹观察结果是流感嗜血杆菌感染的痰。另外, 确认病例 2 的照片中有少数被染色成藏青色的链球菌 (肺炎球菌), 与流感嗜血杆菌相比是极少数, 不能看到是怀疑由该病原体导致的感染的观察结果。为此, 认为病例 2 中肺炎球菌是定植病原体。

[0195] 对于上述样本, 将检测病原体特异基因的结果分别在图 3 中的图表表示。在图表

中,在 PCR 循环数较少的时点而荧光强度增加的基因意味着痰中 DNA 序列拷贝数较多。即,达到一定荧光强度的时点的循环数(循环阈值, Ct 值)表示样本中目标基因(病原体)的相对拷贝数。另外,从作为参照的人体细胞的 Ct 值中减去某病原体 Ct 值而得到的差值(Δ Cycle)表示将人体细胞作为内部参照的病原体细胞的相对量。

[0196] 病例 1(起因于肺炎球菌的肺炎)的图表中,虚线表示肺炎球菌特异序列的扩增曲线,Ct 值是 17.89 个循环。实线表示人体细胞特异序列的扩增曲线,Ct 值是 22.67 个循环。因此,可知肺炎球菌的 Δ Cycle 是 +4.78 个循环。

[0197] 在病例 2 中,肺炎球菌特异序列的扩增曲线(虚线)的 Ct 值是 29.31 个循环,人体细胞特异序列的扩增曲线(实线)的 Ct 值是 22.67 个循环。因此,肺炎球菌的 Δ Cycle 是 -6.64 个循环。另一方面,流感嗜血杆菌特异序列的扩增曲线的 Ct 值和 Δ Cycle 分别是 14.07 个循环和 +6.60 个循环。从而,可以判断出在病例 2 中流感嗜血杆菌特异序列的相对拷贝数比肺炎球菌的显著高。该结果与痰涂抹革兰氏染色的观察结果相关。另外,对于肺炎球菌的观察可知:与病例 2 相比,病例 1 中肺炎球菌的 Δ Cycle 显著高。该结果与起因于 / 不起因于肺炎球菌的诊断结果相关。

[0198] 从以上可知:可以将人体细胞作为内部参照的病原体细胞的相对数(Δ Cycle)进行数值化。

[0199] (实施例 4~9:实际肺炎病例中鉴别基准值(临界值)的设定)

[0200] 使用实际肺炎病例的临床样本,以实施例 1 和 2 所示顺序进行 PCR 解析,评价炎性病原体鉴别方法的实用性。另外,使用重复临床样本(第 1 次:207 例或 300 例,第 2 次:223 例),进行 2 次解析。在第 1 次解析中,临床样本仅利用从外来或入院患者得到的且从接受诊断 3 天以内的咳出痰。在第 2 次解析中,更严密地设定作为解析对象的临床样本的基准来进行解析。具体而言,临床样本利用从外来或入院患者得到的且从接受诊断 2 天以内的咳出痰、气管内采集的痰、诱发痰。另外,检测出鸟型分枝杆菌 16-23ITS rRNA 基因。

[0201] (实施例 4:肺炎球菌的鉴别基准值的设定)

[0202] (4-1)

[0203] 在 207 例中,用 PCR 检测出肺炎球菌的 44 例在图 4A 中表示。将该 44 例作为基础,设定鉴别基准值。图 4A 是基于各个病例中得到的 Δ Cycle,标出临床诊断为肺炎球菌性肺炎的 15 例病例(菱形)、以及不能临床诊断为肺炎球菌性肺炎的肺炎病例或别的炎性病原体的肺炎病例 29 例(三角)的图。从该结果,求得成为炎性病原体阳性的 Δ Cycle 的下限,将肺炎球菌中炎性 / 定植的鉴别基准值设定为“-4”。

[0204] (4-2)

[0205] 在 223 例中,用 PCR 检测出肺炎球菌的 100 例在图 4B 中表示。将其中通过现有的方法诊断肺炎球菌是炎性病原体的 27 例作为基础,设定鉴别基准值。图 4B 是基于各个病例中得到的 Δ Cycle,标出临床诊断为肺炎球菌性肺炎的 27 例病例(灰色三角)、以及用 PCR 检测出肺炎球菌但不能临床诊断为肺炎球菌性肺炎的肺炎病例或别的炎性病原体的肺炎病例 73 例(白色三角)的图。从该结果,求得成为炎性病原体阳性的 Δ Cycle 的下限,将肺炎球菌中炎性 / 定植的鉴别基准值设定为“-4”。

[0206] (实施例 5:流感嗜血杆菌的鉴别基准值的设定)

[0207] (5-1)

[0208] 在 207 例中,用 PCR 检测出流感嗜血杆菌的 26 例在图 5A 中表示。将该 26 例作为基础,设定鉴别基准值。图 5A 是基于各个病例中得到的 Δ Cycle,标出在急性呼吸道感染中将流感嗜血杆菌临床诊断为炎性病原体的 9 例病例(菱形)、将在急性呼吸道感染中将流感嗜血杆菌认为是定植病原体的 6 例(三角)、以及将在慢性呼吸道感染中将流感嗜血杆菌临床诊断为炎性病原体的 11 例病例(方形)的图。从该结果,求得成为炎性病原体阳性的 Δ Cycle 的下限,将流感嗜血杆菌的炎性 / 定植的鉴别基准值设定为“-1”。

[0209] (5-2)

[0210] 在 223 例中,用 PCR 检测出流感嗜血杆菌的 29 例在图 5B 中表示。将其中通过现有的方法诊断流感嗜血杆菌是炎性病原体的 12 例作为基础,设定鉴别基准值。图 5B 是基于各个病例中得到的 Δ Cycle,标出 223 例肺炎中临床诊断流感嗜血杆菌为炎性病原体的 12 例病例(灰色三角)、尽管用 PCR 检测出流感嗜血杆菌但不能诊断为流感嗜血杆菌肺炎(将流感嗜血杆菌看作定植病原体)的 17 例(白色三角)的图。从该结果,求得炎性病原体阳性的 Δ Cycle 的下限,将流感嗜血杆菌的炎性 / 定植的鉴别基准值设定为“1”。由此增加现有的诊断结果与通过本发明得到的 Δ Cycle 可以进行比较的病例来进行解析,可以设定信赖度更好的鉴别基准值。

[0211] (实施例 6:绿脓杆菌的鉴别基准值的设定)

[0212] (6-1)

[0213] 在 207 例中,用 PCR 检测出绿脓杆菌的 37 例在图 6A 中表示。将该 37 例作为基础,设定鉴别基准值。图 6A 是基于各个病例中得到的 Δ Cycle,标出在急性呼吸道感染中将绿脓杆菌临床诊断为炎性病原体的 8 例(菱形)、急性呼吸道感染中将绿脓杆菌看作定植病原体的 7 例(三角)、在慢性呼吸道感染中将绿脓杆菌临床诊断为炎性病原体的 15 例病例(方形)、慢性呼吸道感染中将绿脓杆菌看作定植病原体的 7 例(圆)的图。从该结果,求得成为炎性病原体 / 定植病原体的边界的 Δ Cycle,将假单胞菌属菌中炎性 / 定植的鉴别基准值设定为“-2”。

[0214] (6-2)

[0215] 在 223 例中,用 PCR 检测出绿脓杆菌的 48 例在图 6B 中表示。将其中通过现有的方法诊断绿脓杆菌是炎性病原体的 27 例作为基础,设定鉴别基准值。图 6B 是基于各个病例中得到的 Δ Cycle,标出 223 例肺炎中临床诊断绿脓杆菌作为炎性病原体的 27 例病例(灰色三角)、尽管用 PCR 检测出绿脓杆菌但不能诊断为绿脓杆菌肺炎(将绿脓杆菌看作定植病原体)的 21 例(白色三角)的图。从该结果,求得成为炎性病原体阳性的 Δ Cycle 的下限,将绿脓杆菌中炎性 / 定植的鉴别基准值设定为“-2”。

[0216] (实施例 7:卡他莫拉菌的鉴别基准值的设定)

[0217] (7-1)

[0218] 在 300 例中,用 PCR 检测出卡他莫拉菌的 17 例在图 7A 中表示。将该 17 例作为基础,设定鉴别基准值。图 7A 是基于各个病例中得到的 Δ Cycle,标出临床诊断在急性呼吸道感染中将卡他莫拉菌作为炎性病原体的 9 例(菱形)、急性呼吸道感染中将卡他莫拉菌看作定植病原体的 8 例(三角)的图。从该结果,求得成为炎性病原体 / 定植病原体的边界的 Δ Cycle,将卡他莫拉菌中炎性 / 定植的鉴别基准值设定为“-4”。

[0219] (7-2)

[0220] 在 223 例中,用 PCR 检测出卡他莫拉菌的 20 例在图 7B 中表示。将其中通过现有的方法诊断卡他莫拉菌是炎性病原体的 9 例作为基础,设定鉴别基准值。图 7B 是基于各个病例中得到的 Δ Cycle,标出 223 例肺炎中临床诊断卡他莫拉菌作为炎性病原体的 9 例病例(灰色三角)、尽管用 PCR 检测出卡他莫拉菌但无法诊断为卡他莫拉菌肺炎(将卡他莫拉菌看作定植病原体)的 11 例(白色三角)的图。从该结果,求得成为炎性病原体阳性的 Δ Cycle 的下限,将绿脓杆菌中炎性/定植的鉴别基准值设定为“0”。

[0221] (实施例 8:耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的鉴别基准值的设定)

[0222] (8-1)

[0223] 在 300 例中,用 PCR 检测出耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(以下记为 MRS Δ)的 34 例在图 8A 中表示。将该 34 例作为基础,设定鉴别基准值。图 8 是基于各个病例中得到的 Δ Cycle,标出临床诊断在急性呼吸道感染中将 MRSA 作为炎性病原体的 8 例(菱形)、急性呼吸道感染中将 MRSA 看作定植病原体的 26 例(三角)的图。从该结果,求得成为炎性病原体阳性的 Δ Cycle 的下限,将 MRSA 中炎性/定植的鉴别基准值设定为“-4”。

[0224] (8-2)

[0225] 在 223 例中,将用现有方法诊断 MRSA 是炎性病原体的病例作为基础,用与实施例 4~8 同样的方法设定鉴别基准值。基于各个病例得到的 Δ Cycle,求得成为炎性病原体阳性的 Δ Cycle 的下限,将 MRSA 中炎性/定植的鉴别基准值设定为“-4”。

[0226] (实施例 9:肺炎杆菌的鉴别基准值的设定)

[0227] 在 2 次评价中,将 223 例中用现有方法诊断肺炎杆菌是炎性病原体的病例作为基础,用与实施例 4~8 同样的方法设定鉴别基准值。基于各个病例得到的 Δ Cycle,求得成为炎性病原体阳性的 Δ Cycle 的下限,将肺炎杆菌中炎性/定植的鉴别基准值设定为“-4”(没有图示)。

[0228] 对于所有的呼吸道定植病原体,也与实施例 4~9 同样地设定鉴别基准值。另外,通过追加病例数,可以提高设定的鉴别基准值的信赖度,同时可以进一步设定信赖度高的鉴别基准值。

[0229] (实施例 10:在实际肺炎病例中的实用例)

[0230] 对于使用 1 次解析的实际肺炎病例(300 例,与实施例 4~8 的肺炎病例有重复)的临床样本,进行上述 PCR 解析,基于实施例 4~8 中设定的鉴别基准值,确定炎性病原体。其结果在图 9 中表示。病原体的检出率为 300 例中检出 236 例(78.7%)。另外,300 例中,确定 158 例为炎性病原体。由于检测出除去作为参照的人体基因的 20 种病原体·耐药性基因,炎性病原体的确定率是 52.7%。

[0231] 对于使用 2 次解析的实际肺炎病例(223 例)的临床样本,进行上述 PCR 解析,基于实施例 4~9 中设定的鉴别基准值,确定炎性病原体。其结果在图 10 中表示。223 例肺炎炎性病原体的检出率为 223 例中检出 119 例(53.36%)。因此,作为从 1 份痰样本和 1 个系列的检查所得到的快速检查结果,可以确认得到非常高的确定率。

[0232] 以上表明:通过将人体细胞作为内部参照的 PCR 解析,利用基于 Δ Cycle 而设定的鉴别基准值,可以有效地发挥鉴别炎性病原体的作用。该检测方法特别对呼吸道定植病原体的检测,即炎性病原体和定植病原体的鉴别是有效的。另外,通过检测如表 3 所示的人体细胞、各种病原体·耐药性基因(计 21 种或 22 种)的多重 PCR,利用 1 次检查可以综合性

地检查呼吸道定植病原体、通常不定植在呼吸道内的病原体等。由此,可以确定成为感染的主要原因的炎性病原体,从而可以进行适合各个病原体的有效的药剂治疗等治疗。

[0233] (实施例 11:前瞻性试验)

[0234] 为了研究讨论在实施例 4~9 中设定的鉴别基准值的妥当性,实施临床试验(UMIN 试验编号:UMIN000001118)。以多中心连续登记肺炎病例的前瞻性试验,比较研究使用现有技术来确定炎性病原体的方法和通过使用上述 2 次解析中设定的鉴别基准值的 PCR 解析来确定炎性病原体的方法。主要成果的评价项目是对肺炎球菌肺炎中鉴别基准值的妥当性的研究讨论。另外,作为鸟型分枝杆菌的特异基因,检测出鸟型分枝杆菌 16S rRNA 基因。

[0235] 采用满足以下病例选择基准的病例作为试验对象。

[0236] 18 岁以上的对象,在接受诊断后或肺炎发病后 2 天以内得到痰的病例。

[0237] 痰为 Miller-Jones 分类的 M2、P1、P2、P3,并且人体细胞特异序列的 Ct 值小于 27 的病例。

[0238] 实施痰检查(涂抹、培养)以及肺炎球菌尿中抗原检查的病例。

[0239] 另外,这里处理的肺炎是急性呼吸道感染(急性肺炎),限定在伴随着新出现的呼吸道症状(发热、咳痰、咳嗽、胸膜痛、呼吸困难),用胸部图像诊断检查确认有新出现的阴影的肺炎。

[0240] 关于呼吸道定植病原体,根据现有的临床诊断的炎性病原体的诊断定义如下。

[0241] 在用 PCR 检出的呼吸道定植病原体中,探索作为炎性病原体不矛盾的治疗过程,并且满足以下(1)~(4)的任意一个。

[0242] (1) 从无菌样本中检测出该病原体。(例如:血液培养、胸腔积液培养)

[0243] (2) 用革兰氏染色确认与该病原体不矛盾的病原体,进一步在痰培养中检测并确定该病原体。

[0244] (3) 用革兰氏染色确认多个白血球($> 25\text{cell/field at}\times 100$),进一步吞噬与该病原体形态上不矛盾的病原体。

[0245] (4) 肺炎球菌尿中抗原阳性。(只对应肺炎球菌)

[0246] 多中心前瞻性试验的结果为肺炎病例登记了 174 例。其中,用现有方法确定肺炎球菌为炎性病原体的病例是 43 例。另一方面,通过使用上述鉴别基准值的 PCR 解析,确定肺炎球菌是炎性病原体的病例是 40 例。在肺炎球菌肺炎中炎性菌的确定率(灵敏度)是 93.02% (40/43;95%置信区间: $0.83 <$) (使用临界值的确定法/用现有方法的确定法)。另外,即使用 PCR 检测出肺炎球菌,但也可以否定作为炎性菌的能力(阴性的中立)是 93.48%。在其它病原体中,也可以得到相等或以上的结果的预备数据。

[0247] 从以上结果,特别对于肺炎球菌,可以确认以下的(1)~(4)。

[0248] (1) 本发明的鉴别方法可以高灵敏度地鉴别现有诊断方法可以诊断的病例(本发明的鉴别方法的阳性集合包含现有检查的阳性集合)。

[0249] (2) 本发明的鉴别方法的阳性集合具有与现有诊断方法的阳性集合同等的肺炎球菌/来源于对象的细胞比(即, ΔCycle 值)。

[0250] (3) 从而明确将本发明的鉴别方法的阳性集合考虑作为治疗对象组(即,将肺炎球菌估计为炎性病原体的组)。

[0251] (4) 前瞻性临床试验中的病例的治疗经过以及基于本发明的鉴别结果将肺炎球菌

作为治疗对象的情况均支持鉴别结果是妥当的。

[0252] 对于临床试验中登记的 174 例肺炎病例的临床样本,通过使用鉴别基准值的 PCR 解析来确定炎性病原体。其结果在图 11 中表示。174 例肺炎病例中炎性病原体的确定率在 174 例中是 121 例 (70%) (图 11)。使用现有方法的炎性病原体的确定率在 174 例中是 97 例 (55%)。因此,证明 :可以比现有方法更快速地确定炎性病原体,而且检出率也高。

[0001]

SEQUENCE LISTING

- <110> Saitama Medical University
- <120> Method of Discriminating Inflammatory Pathogen of Acute Respiratory Infection
- <130> FP09-0094-00
- <160> 64
- <170> PatentIn version 3.1
- <210> 1
- <211> 21
- <212> DNA
- <213> Homo sapiens
- <400> 1
- gcagtgcccta cgtctaagct g 21
- <210> 2
- <211> 23
- <212> DNA
- <213> Homo sapiens
- <400> 2
- tagatgtagt agagcggcac ctc 23
- <210> 3
- <211> 24
- <212> DNA
- <213> Streptococcus pneumoniae
- <400> 3
- ctaaggcttg ggacagaaat gggc 24
- <210> 4
- <211> 24
- <212> DNA
- <213> Streptococcus pneumoniae

[0002]

<400> 4	
ccgcttacgc actagtgcca aatc	24
<210> 5	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Haemophilus influenzae	
<400> 5	
ttgacatcct aagaagagct cagaga	26
<210> 6	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Haemophilus influenzae	
<400> 6	
ctccctctg tatacgccat tgtagc	26
<210> 7	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Moraxella catarrhalis	
<400> 7	
cgtgcgtgtg gaccgtttg acttta	26
<210> 8	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Moraxella catarrhalis	
<400> 8	
cacgctgccca aaaataactg ccaaag	26
<210> 9	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Pseudomonas sp.	

[0003]

<400> 9	
gacgggtgag taatgcctag ga	22
<210> 10	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Pseudomonas sp.	
<400> 10	
ccaactggtgt tccttctat atct	24
<210> 11	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Klebsiella pneumoniae	
<400> 11	
tgaagtatga ctccaactcac ggt	23
<210> 12	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Klebsiella pneumoniae	
<400> 12	
cttcagaagc ggctttgatg gctt	24
<210> 13	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Stenotrophomonas maltophilia	
<400> 13	
ggaagcgaac ctggtgaact gaaata	26
<210> 14	
<211> 26	
<212> DNA	

[0004]

<213> Stenotrophomonas maltophilia	
<400> 14	
cgcacacggt ttcaggttct attca	26
<210> 15	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Staphylococcus aureus	
<400> 15	
tggccactat gagttaaagc ttgc	24
<210> 16	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Staphylococcus aureus	
<400> 16	
tcataatcaa tcaactggacc gcga	24
<210> 17	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Staphylococcus aureus	
<400> 17	
aactacggta acattgatcg caac	24
<210> 18	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Staphylococcus aureus	
<400> 18	
cttgggtctt tctgcattcc tgga	24
<210> 19	
<211> 27	

[0005]

<212> DNA	
<213> Metallo-beta-lactamase	
<400> 19	
ggcagyattt cctctcattt tcatagc	27
<210> 20	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Metallo-beta-lactamase	
<400> 20	
aatttgrgc tgaacctta ccgtctt	27
<210> 21	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Mycoplasma pneumoniae	
<400> 21	
agtaatactt tagaggcgaa cgggtga	27
<210> 22	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Mycoplasma pneumoniae	
<400> 22	
tctactctc agcatagcta cacgtca	27
<210> 23	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Legionella pneumophila	
<400> 23	
taaccgaaca gcaaatgaaa gacg	24
<210> 24	

[0006]

<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	<i>Legionella pneumophila</i>	
<400>	24	
	aaaacggtag catcaatcag acga	24
<210>	25	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	<i>Legionella sp.</i>	
<400>	25	
	aggctaattct taaagcgcca ggcc	24
<210>	26	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	<i>Legionella sp.</i>	
<400>	26	
	gcatgcttaa cacatgcaag tcgaac	26
<210>	27	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	
<400>	27	
	gcaaccacgg tagcaacaca aatta	25
<210>	28	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	
<400>	28	
	aattgagcga cgttttgtg catct	25

[0007]

<210> 29	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> <i>Chlamydophila psittaci</i>	
<400> 29	
gtatgttcat gcttaaggct gtttcac	28
<210> 30	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> <i>Chlamydophila psittaci</i>	
<400> 30	
tcccacatag tgccatgat taataaac	28
<210> 31	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> <i>Nocardia sp.</i>	
<400> 31	
ccctcgggtt gtaaacctct ttcgac	26
<210> 32	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> <i>Nocardia sp.</i>	
<400> 32	
ttggggttga gccccaagtt ttca	24
<210> 33	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> <i>Pneumocystis jiroveci</i>	
<400> 33	
gtgtacgttg caaagtactc agaaga	26

[0008]

<210>	34	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	<i>Pneumocystis jiroveci</i>	
<400>	34	
	gatggctgtt tccaagccca	20
<210>	35	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	
<400>	35	
	atccgctgcc agtcgtcttc c	21
<210>	36	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	
<400>	36	
	ctcgcgagtc taggccagca t	21
<210>	37	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	<i>Mycobacterium intracellulare, Mycobacterium avium</i>	
<400>	37	
	agcaccacga aaagcactcc aatt	24
<210>	38	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	<i>Mycobacterium intracellulare</i>	
<400>	38	
	cgaacgcacg agccctaagg acta	24

[0009]

<210>	39	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	<i>Mycobacterium avium</i>	
<400>	39	
	aattacacat ttcgatgaac gccgg	25
<210>	40	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	<i>Mycobacterium kansasii</i>	
<400>	40	
	accctgtga tgagtcaaa ggc	23
<210>	41	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	<i>Mycobacterium kansasii</i>	
<400>	41	
	gtaaagctga ccggaactgt gacg	24
<210>	42	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	<i>Homo sapiens</i>	
<400>	42	
	cgagatgcag gctcagcacc ctc	23
<210>	43	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	
<400>	43	

[0010]

agggaatggt cgcaatctct ctgtca	26
<210> 44	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Haemophilus influenzae	
<400> 44	
atggctgtcg tcagctcgtg tt	22
<210> 45	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Moraxella catarrhalis	
<400> 45	
cagcggtaac ctaatctatg ccaact	26
<210> 46	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Pseudomonas sp.	
<400> 46	
agtgggggat cttcggacct ca	22
<210> 47	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Klebsiella pneumoniae	
<400> 47	
ccggtatctt cctgaccgac ga	22
<210> 48	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Stenotrophomonas maltophilia	

[0011]

<400> 48	
accgaccgat agtgaaccag tacc	24
<210> 49	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Staphylococcus aureus	
<400> 49	
cgaggtcatt gcagcttgct tactta	26
<210> 50	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Staphylococcus aureus	
<400> 50	
agatggtatg tggaagttag attggga	27
<210> 51	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Metallo-beta-lactamase	
<400> 51	
attctcgatc tatccccacg tatgca	26
<210> 52	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Mycoplasma pneumoniae	
<400> 52	
accaactagc tgatatggcg ca	22
<210> 53	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Legionella pneumophila	

[0012]

<400> 53	
tgatggcaaa gcgtactgct gaa	23
<210> 54	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Legionella sp.	
<400> 54	
catattccta cgcgttactc acccgt	26
<210> 55	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Chlamydophila pneumoniae	
<400> 55	
agcggctgtc aaatctggaa taaaag	26
<210> 56	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Chlamydophila psittaci	
<400> 56	
ccagaagagc aaattagaat agcgagca	28
<210> 57	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Nocardia sp.	
<400> 57	
aagaagcacc ggccaactac gtgc	24
<210> 58	
<211> 26	
<212> DNA	

[0013]

<213> Pneumocystis jiroveci	
<400> 58	
ctaggatata gctggtttc tgcgaa	26
<210> 59	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Mycobacterium tuberculosis	
<400> 59	
ccggacaaca ggtatcgata gcgcc	25
<210> 60	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Mycobacterium intracellulare, Mycobacterium avium	
<400> 60	
cctgagacaa cactcggteg atcc	24
<210> 61	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Mycobacterium kansasii	
<400> 61	
aggacggaca gcggatcaga ct	22
<210> 62	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Mycobacterium avium	
<400> 62	
caagtgaac ggaaaggcct ct	22
<210> 63	
<211> 22	

[0014]

<212> DNA	
<213> Mycobacterium avium	
<400> 63	
gccgtatctc agtcccagtg tg	22
<210> 64	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Mycobacterium avium	
<400> 64	
taccgatag gacctcaaga cgc	23

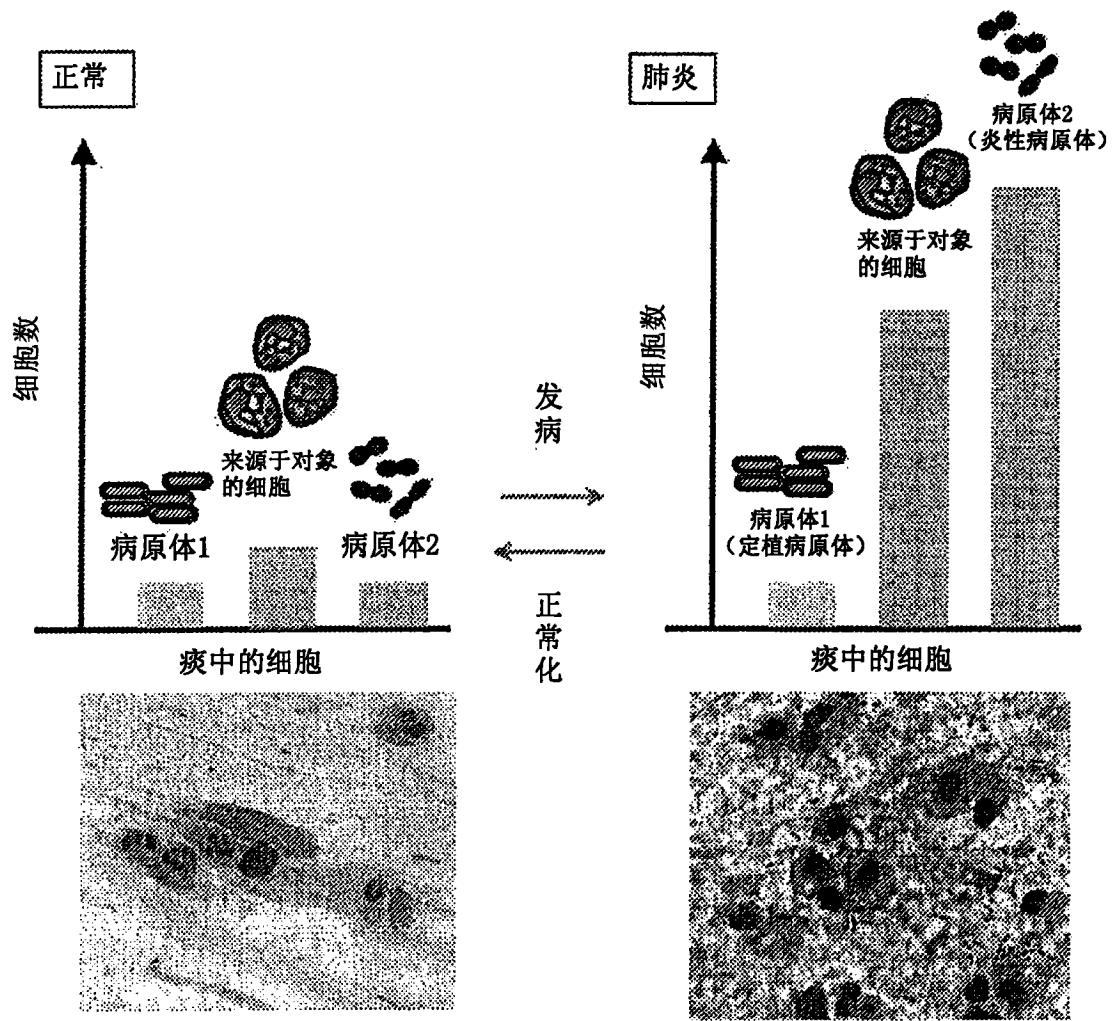


图 1

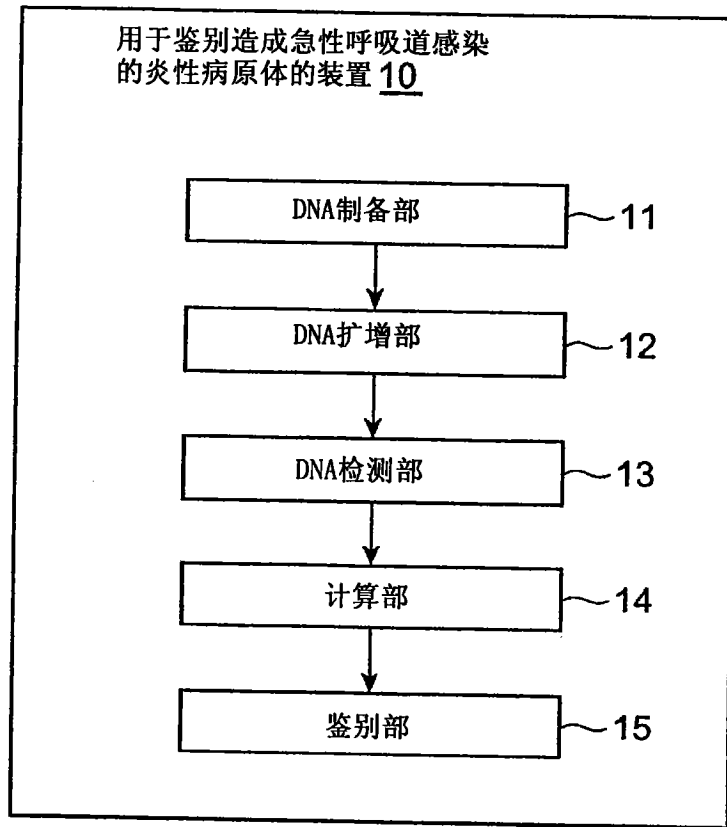


图 2

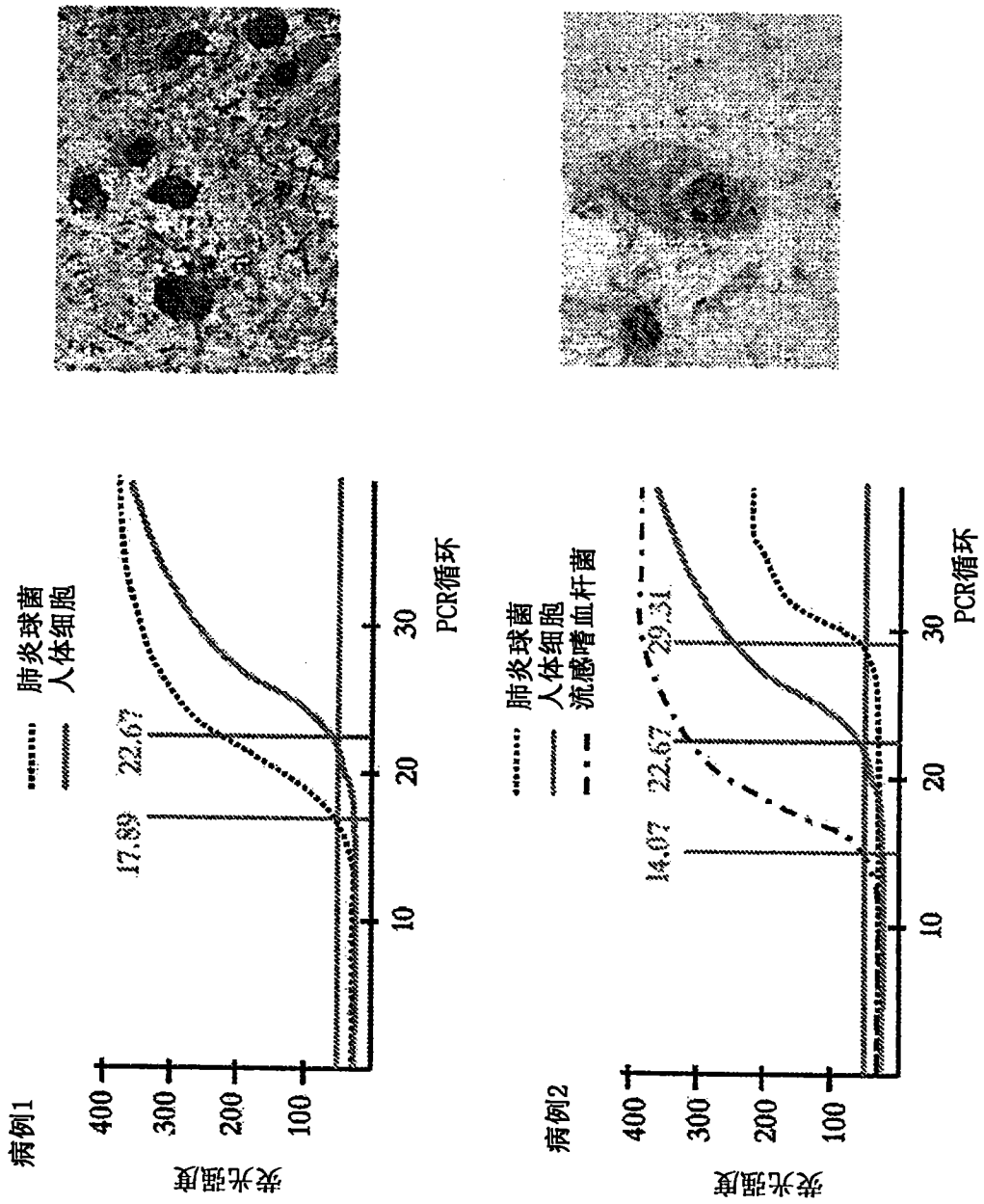


图 3

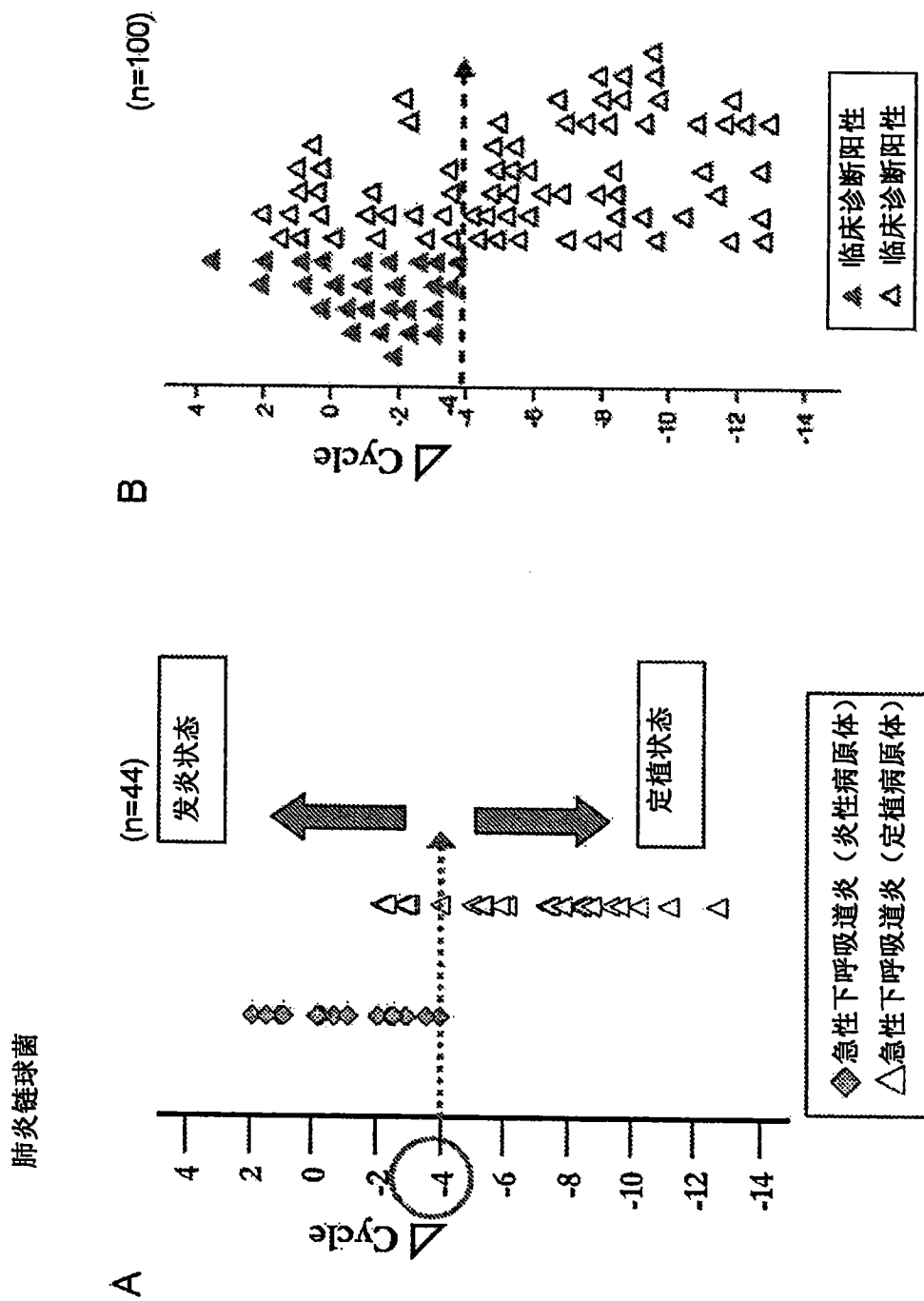


图 4

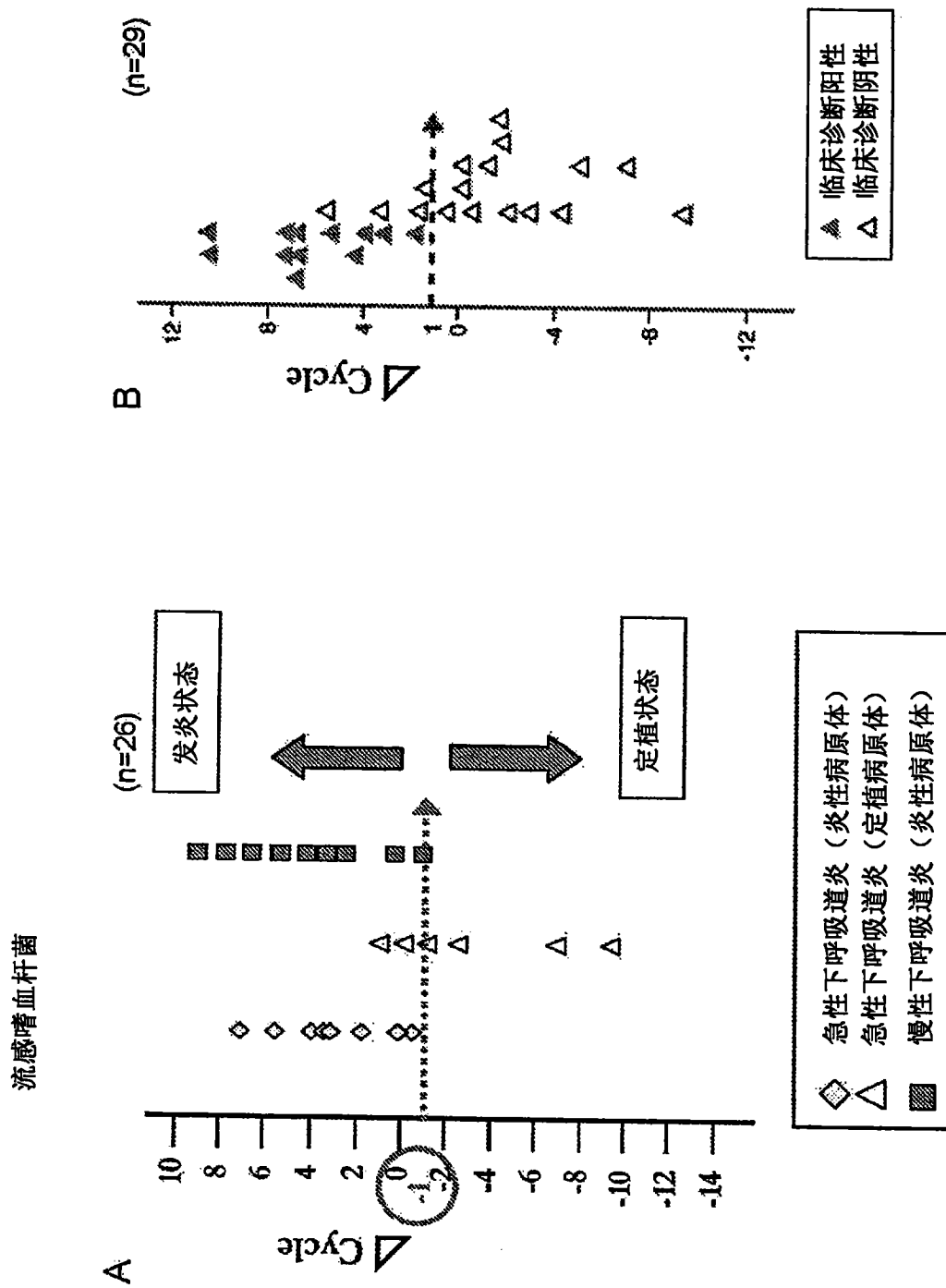


图 5

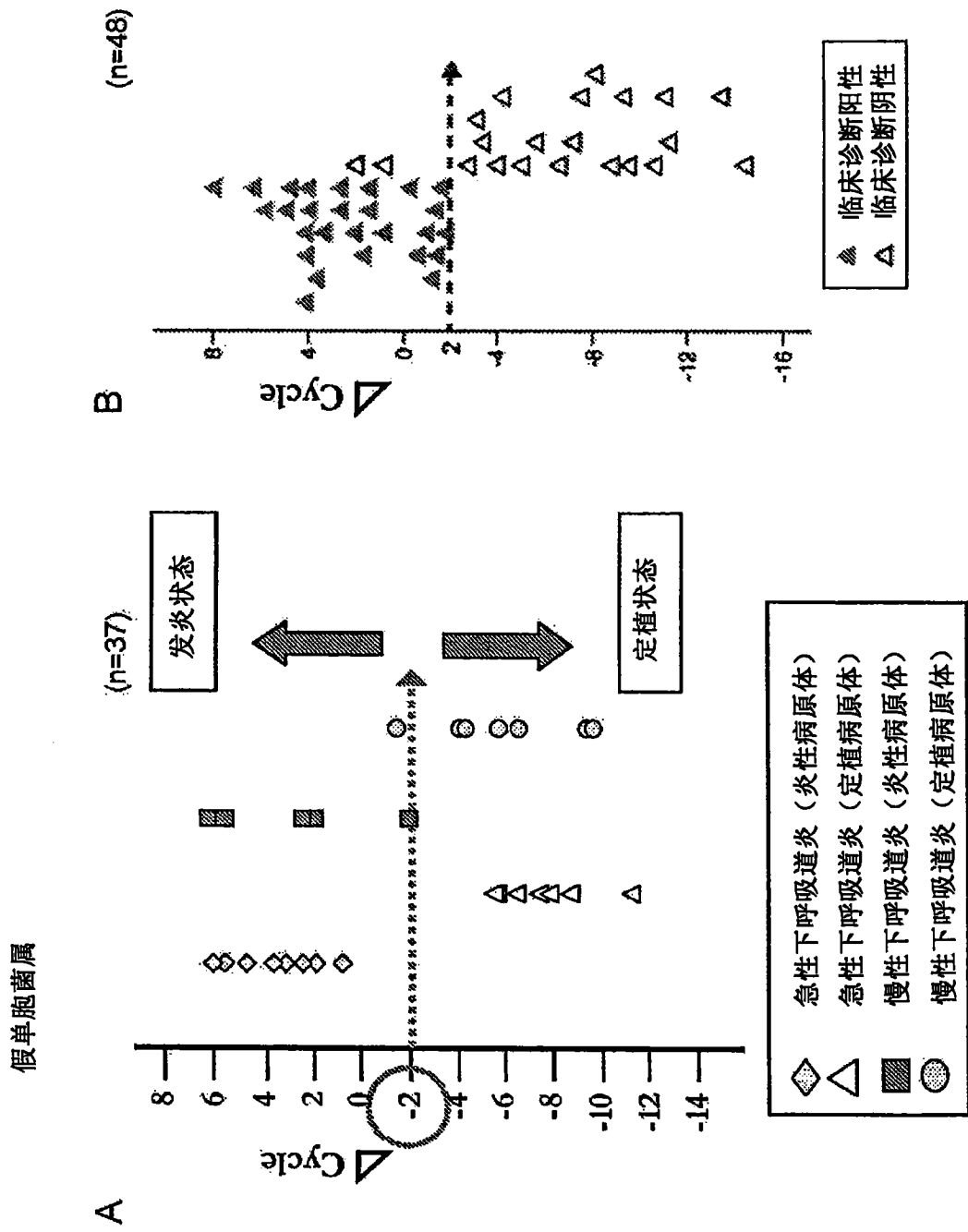


图 6

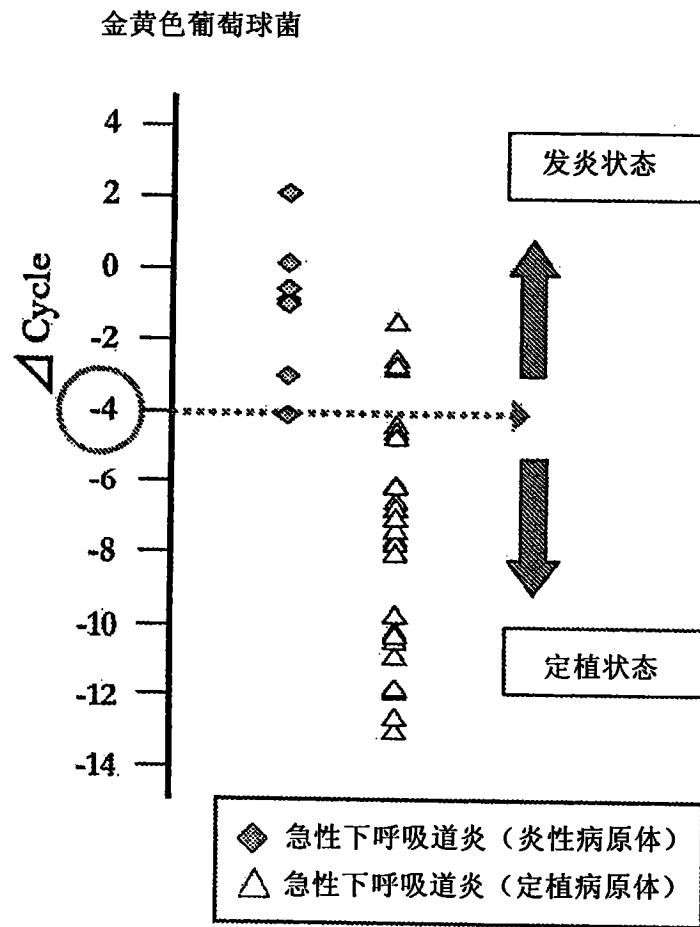


图 8

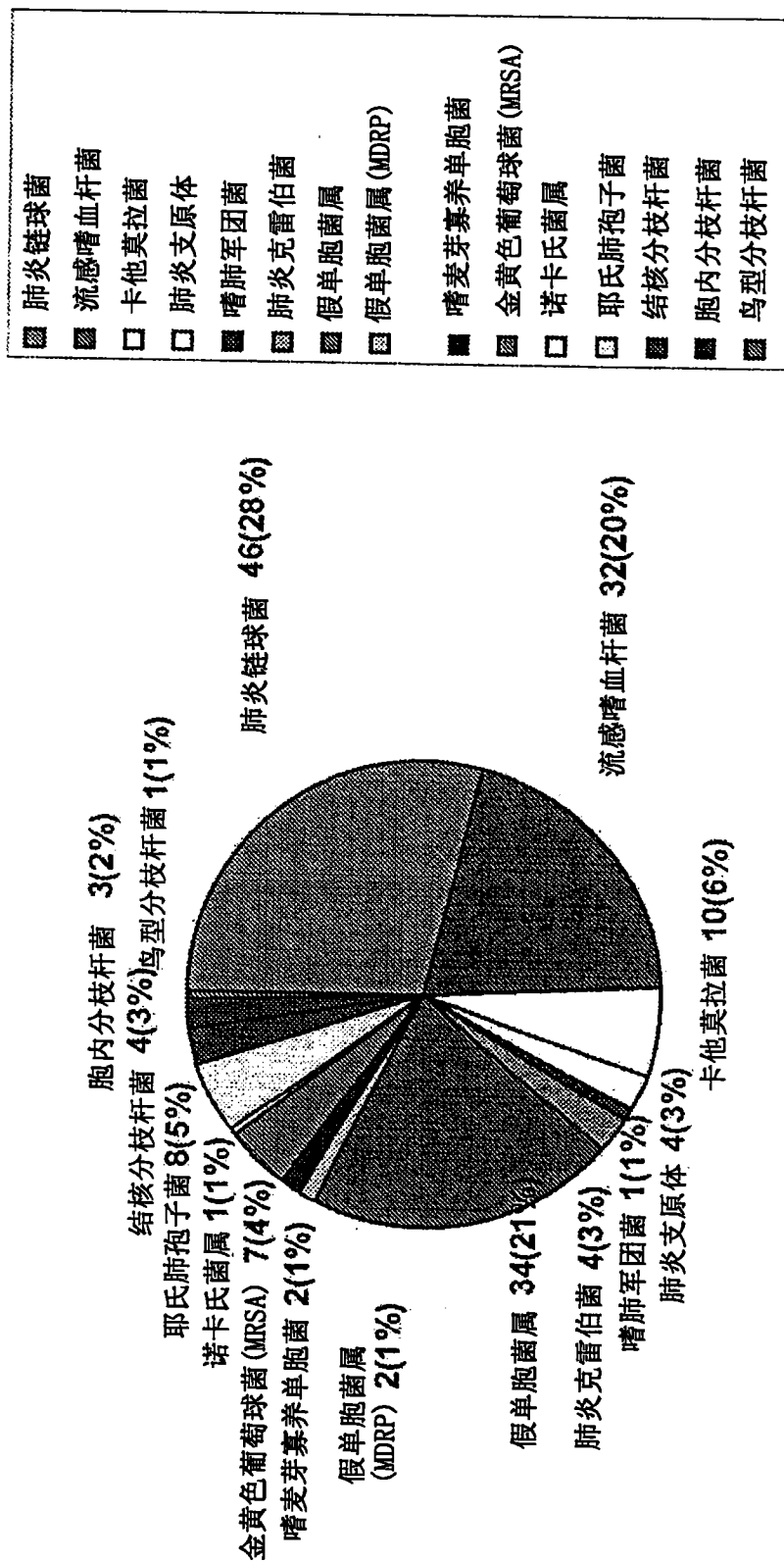


图 9

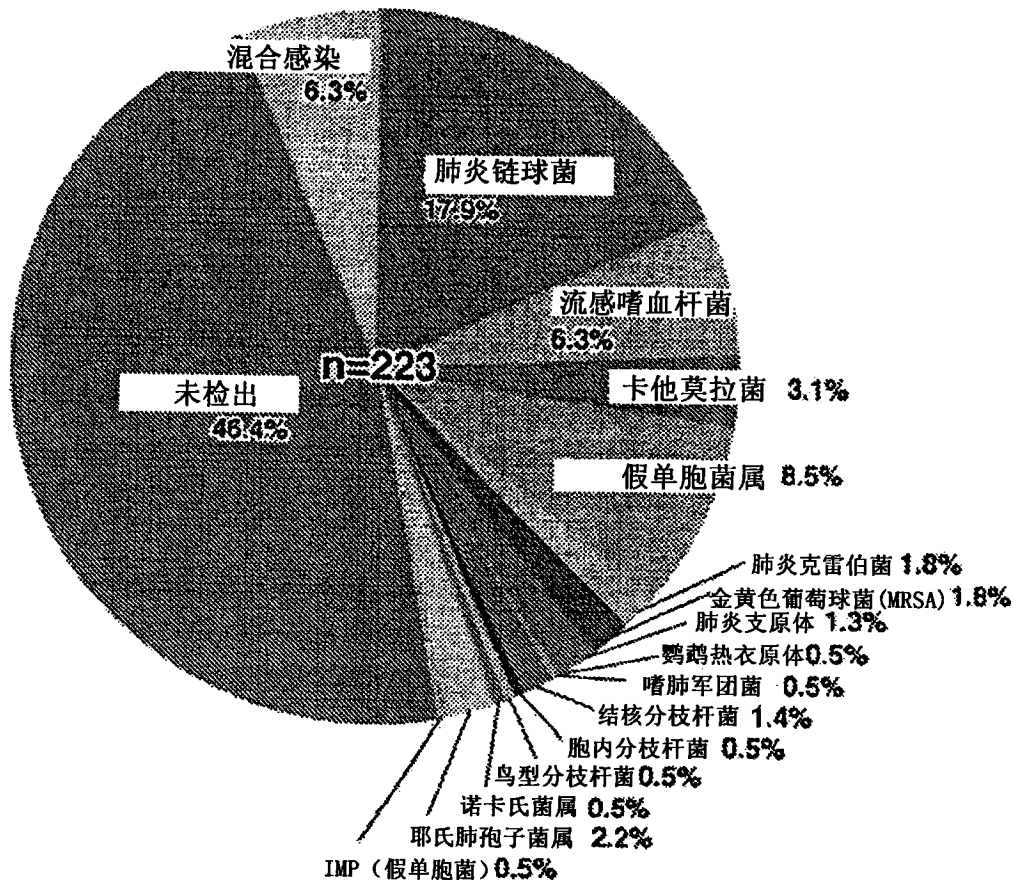


图 10

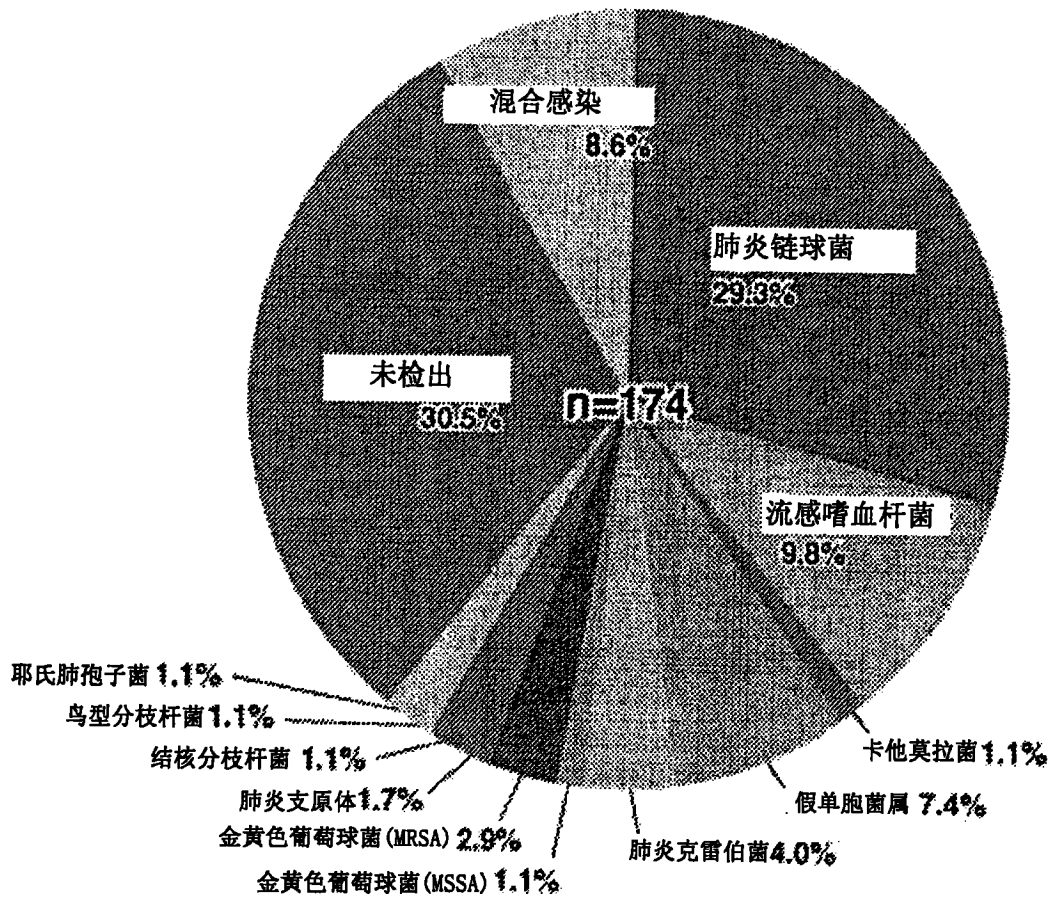


图 11