

明 細 書

発明の名称：敗血症の原因細菌を同定する方法及びキット

技術分野

[0001] 本発明は、敗血症の原因細菌を同定する方法及びキットに関する。

背景技術

[0002] 敗血症は、感染症に起因する、二次的な症状であり、様々な細菌等への感染が原因となり得る。敗血症が重症化することで呼吸不全、腎不全、肺不全及び敗血性ショック等を招き、命を落とす危険が高まる。このため、感染症の原因となっている病原体を早急に特定して、治療を開始することが重要である。

[0003] 敗血症の病原因子に関して、例えば、特許文献1には、敗血症の複数種類の病原因子を吸着する吸着材料のリガンドの製造方法について記載されている。しかしながら、複数種類の病原体から感染症の原因となっている病原体、すなわち、敗血症の原因細菌を同定するための方法については報告がない。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：米国特許出願公開第2019054227号明細書

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 本発明は、敗血症の原因細菌を効率的に同定することが可能な方法及びそのためのキットを提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明は、例えば、以下の発明を提供する。

[1]

敗血症の原因細菌を同定する方法であって、
対象から採取した試料と、大腸菌（*Escherichia coli*）

の *gyrB* 遺伝子、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) の *nuc* 遺伝子、表皮ブドウ球菌 (*Staphylococcus epidermidis*) の *atlE* 遺伝子、クレブシエラ・ニューモニエ (*Klebsiella pneumoniae*) の *gyrB* 遺伝子、及びエンテロコッカス属菌 (*Enterococcus* spp.) (例えば、エンテロコッカス・ファエカリス (*Enterococcus faecalis*)) の *rpoB* 遺伝子の全長又は一部の領域にそれぞれ特異的なプライマーのセットの組み合わせとを用いて、PCR法を実施する工程、並びに

各遺伝子の上記全長又は一部の領域のDNAにそれぞれ特異的なプローブの組み合わせを用いて、上記全長又は一部の領域の増幅の有無を検出する工程、を含む、方法。

[2]

上記大腸菌の *gyrB* 遺伝子の上記全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットが、配列番号10の塩基配列又は配列番号10の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプライマーと、配列番号11の塩基配列又は配列番号11の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプライマーを含み、

上記黄色ブドウ球菌の *nuc* 遺伝子の上記全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットが、配列番号32の塩基配列若しくは配列番号32の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプライマー、配列番号34の塩基配列若しくは配列番号34の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプライマー、及びこれらの組み合わせから選択される1又は複数のプライマーと、配列番号33の塩基配列若しくは配列番号33の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプライマーとを含み、

上記表皮ブドウ球菌の *atlE* 遺伝子の上記全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットが、配列番号37の塩基配列又は配列番号37の塩基

配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプライマーと、配列番号38又は配列番号38の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列の塩基配列を含むプライマーとを含み、

上記クレブシエラ・ニューモニエのgyrB遺伝子の上記全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットが、配列番号14の塩基配列又は配列番号14の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプライマーと、配列番号15又は配列番号15の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列の塩基配列を含むプライマーとを含み、

上記エンテロコッカス属菌のrpoB遺伝子の上記全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットが、配列番号26の塩基配列若しくは配列番号26の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプライマー、配列番号27の塩基配列若しくは配列番号27の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプライマー、配列番号28の塩基配列若しくは配列番号28の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプライマー、及びこれらの組み合わせから選択される1又は複数のプライマーと、配列番号29の塩基配列若しくは配列番号29の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプライマーとを含む、[1]に記載の方法。

[3]

上記大腸菌のgyrB遺伝子の上記全長又は一部の領域のDNAが、配列番号51の塩基配列又は配列番号51の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含み、

上記黄色ブドウ球菌のnuc遺伝子の上記全長又は一部の領域のDNAが、配列番号61の塩基配列又は配列番号61の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含み、

上記表皮ブドウ球菌のatlE遺伝子の上記全長又は一部の領域のDNAが、配列番号63の塩基配列又は配列番号63の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含み、

上記クレブシエラ・ニューモニエのgyrB遺伝子の上記全長又は一部の

領域のDNAが、配列番号53の塩基配列又は配列番号53の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含み、

上記エンテロコッカス属菌のrpoB遺伝子の上記全長又は一部の領域のDNAが、配列番号59の塩基配列又は配列番号59の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含む、[1]又は[2]に記載の方法。

[4]

上記プローブが、上記全長又は一部の領域のDNAとストリンジェントな条件下でそれぞれハイブリダイズするプローブである、[3]に記載の方法。

[5]

上記大腸菌のgyrB遺伝子の上記全長又は一部の領域のDNAに特異的なプローブが、配列番号121の塩基配列又は配列番号121の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含み、

上記黄色ブドウ球菌のnuc遺伝子の上記全長又は一部の領域のDNAに特異的なプローブが、配列番号134の塩基配列又は配列番号134の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含み、

上記表皮ブドウ球菌のatlE遺伝子の上記全長又は一部の領域のDNAに特異的なプローブが、配列番号136の塩基配列又は配列番号136の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含み、

上記クレブシエラ・ニューモニエのgyrB遺伝子の上記全長又は一部の領域のDNAに特異的なプローブが、配列番号124の塩基配列又は配列番号124の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含み、

上記エンテロコッカス属菌のrpoB遺伝子の上記全長又は一部の領域のDNAに特異的なプローブが、配列番号129の塩基配列若しくは配列番号129の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプローブ、配列番号130の塩基配列若しくは配列番号130の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプローブ、配列番号131の塩基配列若しくは配列番号131の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプロ

ープ及びこれらの組み合わせから選択される、[1]～[4]のいずれかに記載の方法。

[6]

上記プローブが、それぞれ異なる識別子を含むか、又は固体支持体上の異なる識別子にそれぞれ結合している、[1]～[5]のいずれかに記載の方法。

[7]

PCR法により増幅したDNAが標識を含む、[1]～[6]のいずれかに記載の方法。

[8]

上記対象から採取した試料が血液である、[1]～[7]のいずれかに記載の方法。

[9]

上記血液を培養する工程をさらに含む、[8]に記載の方法。

[10]

敗血症の原因細菌を同定するためのキットであって、

大腸菌 (*Escherichia coli*) の *gyrB* 遺伝子、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) の *nuc* 遺伝子、表皮ブドウ球菌 (*Staphylococcus epidermidis*) の *atlE* 遺伝子、クレブシエラ・ニューモニエ (*Klebsiella pneumoniae*) の *gyrB* 遺伝子、及びエンテロコッカス属菌 (*Enterococcus spp.*) の *rpoB* 遺伝子の全長又は一部の領域にそれぞれ特異的なPCR用のプライマーのセットを含む第1の試薬と、

各遺伝子の上記全長又は一部の領域のDNAにそれぞれ特異的なプローブの組み合わせを含む第2の試薬とを含む、キット。

[11]

上記大腸菌の *gyrB* 遺伝子の上記全長又は一部の領域に特異的なプライ

マーのセットが、配列番号 10 の塩基配列又は配列番号 10 の塩基配列と配列同一性が 90%以上の塩基配列を含むプライマーと、配列番号 11 の塩基配列又は配列番号 11 の塩基配列と配列同一性が 90%以上の塩基配列を含むプライマーとを含み、

上記黄色ブドウ球菌の *nuc* 遺伝子の上記全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットが、配列番号 32 の塩基配列若しくは配列番号 32 の塩基配列と配列同一性が 90%以上の塩基配列を含むプライマー、配列番号 34 の塩基配列若しくは配列番号 34 の塩基配列と配列同一性が 90%以上の塩基配列を含むプライマー、及びこれらの組み合わせから選択される 1 又は複数のプライマーと、配列番号 33 の塩基配列若しくは配列番号 33 の塩基配列と配列同一性が 90%以上の塩基配列を含むプライマーとを含み、

上記表皮ブドウ球菌の *atlE* 遺伝子の上記全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットが、配列番号 37 の塩基配列又は配列番号 37 の塩基配列と配列同一性が 90%以上の塩基配列を含むプライマーと、配列番号 38 又は配列番号 38 の塩基配列と配列同一性が 90%以上の塩基配列の塩基配列を含むプライマーとを含み、

上記クレブシエラ・ニューモニエの *gyrB* 遺伝子の上記全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットが、配列番号 14 の塩基配列又は配列番号 14 の塩基配列と配列同一性が 90%以上の塩基配列を含むプライマーと、配列番号 15 又は配列番号 15 の塩基配列と配列同一性が 90%以上の塩基配列の塩基配列を含むプライマーとを含み、

上記エンテロコッカス属菌の *rpoB* 遺伝子の上記全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットが、配列番号 26 の塩基配列若しくは配列番号 26 の塩基配列と配列同一性が 90%以上の塩基配列を含むプライマー、配列番号 27 の塩基配列若しくは配列番号 27 の塩基配列と配列同一性が 90%以上の塩基配列を含むプライマー、配列番号 28 の塩基配列若しくは配列番号 28 の塩基配列と配列同一性が 90%以上の塩基配列を含むプライマー、及びこれらの組み合わせから選択される 1 又は複数のプライマーと、配列

番号 29 の塩基配列若しくは配列番号 29 の塩基配列と配列同一性が 90 % 以上の塩基配列を含むプライマーとを含む、[10] に記載のキット。

[12]

上記大腸菌の *gyrB* 遺伝子の上記全長又は一部の領域の DNA が、配列番号 51 の塩基配列又は配列番号 51 の塩基配列と配列同一性が 90 % 以上の塩基配列を含み、

上記黄色ブドウ球菌の *nuc* 遺伝子の上記全長又は一部の領域の DNA が、配列番号 61 の塩基配列又は配列番号 61 の塩基配列と配列同一性が 90 % 以上の塩基配列を含み、

上記表皮ブドウ球菌の *atlE* 遺伝子の上記全長又は一部の領域の DNA が、配列番号 63 の塩基配列又は配列番号 63 の塩基配列と配列同一性が 90 % 以上の塩基配列を含み、

上記クレブシエラ・ニューモニエの *gyrB* 遺伝子の上記全長又は一部の領域の DNA が、配列番号 53 の塩基配列又は配列番号 53 の塩基配列と配列同一性が 90 % 以上の塩基配列を含み、

上記エンテロコッカス属菌の *rpoB* 遺伝子の上記全長又は一部の領域の DNA が、配列番号 59 の塩基配列又は配列番号 59 の塩基配列と配列同一性が 90 % 以上の塩基配列を含む、[10] 又は [11] に記載のキット。

[13]

上記プローブが、上記全長又は一部の領域の DNA とストリンジェントな条件下でそれぞれハイブリダイズするプローブである、[12] に記載のキット。

[14]

上記大腸菌の *gyrB* 遺伝子の上記全長又は一部の領域の DNA に特異的なプローブが、配列番号 121 の塩基配列又は配列番号 121 の塩基配列と配列同一性が 90 % 以上の塩基配列を含み、

上記黄色ブドウ球菌の *nuc* 遺伝子の上記全長又は一部の領域の DNA に特異的なプローブが、配列番号 134 の塩基配列又は配列番号 134 の塩基

配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含み、

上記表皮ブドウ球菌の *atlE* 遺伝子の上記全長又は一部の領域のDNAに特異的なプローブが、配列番号136の塩基配列又は配列番号136の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含み、

上記クレブシエラ・ニューモニエの *gyrB* 遺伝子の上記全長又は一部の領域のDNAに特異的なプローブが、配列番号124の塩基配列又は配列番号124の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含み、

上記エンテロкокカス属菌の *rpoB* 遺伝子の上記全長又は一部の領域のDNAに特異的なプローブが、配列番号129の塩基配列若しくは配列番号129の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプローブ、配列番号130の塩基配列若しくは配列番号130の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプローブ、配列番号131の塩基配列若しくは配列番号131の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプローブ、及びこれらの組み合わせから選択される、[10]～[13]のいずれかに記載のキット。

[15]

上記第2の試薬に含まれるプローブが、それぞれ異なる識別子を含むか、又は固体支持体上の異なる識別子にそれぞれ結合している、[10]～[14]のいずれかに記載のキット。

[16]

上記プライマーのセットを用いてPCR法により増幅したDNAが標識を含むようにプライマーのセットが設計されているか、又は上記増幅したDNAを標識化するための第3の試薬をさらに含む、[10]～[15]のいずれかに記載のキット。

発明の効果

[0007] 本発明によれば、複数の敗血症の原因細菌について同時に調べることができ、敗血症の原因細菌を効率的に同定することが可能となる。敗血症の原因細菌を効率的に同定できることから、早急に治療の選択が可能となる。

図面の簡単な説明

- [0008] [図1]実施例1におけるプライマーセット1及びプライマーセット2を用いてリアルタイムPCRを実施した結果（増幅曲線）を示すグラフである。
- [図2]実施例1におけるプライマーセット1を用いて得られたPCR産物を、2種のプローブ（E. coli__531P16及びE. coli__526P15）を用いて検出した結果（検出蛍光値）を示すグラフである。
- [図3]実施例2におけるプライマーセット1を用いてリアルタイムPCRを実施した結果（増幅曲線）を示すグラフである。
- [図4]実施例2におけるプライマーセット2を用いてリアルタイムPCRを実施した結果（増幅曲線）を示すグラフである。
- [図5]実施例2におけるプライマーセット3を用いてリアルタイムPCRを実施した結果（増幅曲線）を示すグラフである。
- [図6]実施例2におけるシトロバクター・フロインディーを鋳型としてプライマーセット1を用いて得られたPCR産物を、3種のプローブ（C. spp__24P17、C. spp__55P15Y及びC. spp__65P19）を用いて検出した結果（検出蛍光値）を示すグラフである。
- [図7]実施例2におけるシトロバクター・コセリを鋳型としてプライマーセット1を用いて得られたPCR産物を、3種のプローブ（C. spp__24P17、C. spp__55P15Y及びC. spp__65P19）を用いて検出した結果（検出蛍光値）を示すグラフである。
- [図8]実施例3における各菌種のPCR産物に対するプローブの反応性及び特異性について評価した結果（検出蛍光値）を示すグラフである。
- [図9]実施例3における各菌種のPCR産物に対するプローブの反応性及び特異性について評価した結果（検出蛍光値）を示すグラフである。
- [図10]実施例3における各菌種のPCR産物に対するプローブの反応性及び特異性について評価した結果（検出蛍光値）を示すグラフである。
- [図11]実施例3における各薬剤耐性遺伝子のPCR産物に対するプローブの反応性及び特異性について評価した結果（検出蛍光値）を示すグラフである。

。

[図12]実施例3における各薬剤耐性遺伝子のPCR産物に対するプローブの反応性及び特異性について評価した結果（検出蛍光値）を示すグラフである

。

発明を実施するための形態

[0009] 以下、本発明を実施するための形態について詳細に説明する。なお、本発明は、以下の実施形態に限定されるものではない。

[0010] <同定方法>

本発明は、一実施形態として、

対象から採取した試料と、

大腸菌 (*Escherichia coli*) の *gyrB* 遺伝子、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) の *nuc* 遺伝子、表皮ブドウ球菌 (*Staphylococcus epidermidis*) の *atlE* 遺伝子、クレブシエラ・ニューモニエ (*Klebsiella pneumoniae*) の *gyrB* 遺伝子、及びエンテロコッカス属菌 (*Enterococcus spp.*) の *rpoB* 遺伝子の全長又は一部の領域にそれぞれ特異的なプライマーのセットの組み合わせとを用いて、PCR法を実施する工程、並びに

各遺伝子の上記全長又は一部の領域のDNAにそれぞれ特異的なプローブの組み合わせを用いて、上記全長又は一部の領域の増幅の有無を検出する工程、

を含む、敗血症の原因細菌を同定する方法を提供する。

[0011] [PCR法を実施する工程]

一実施形態において、PCR法を実施する工程は、対象から採取した試料と、大腸菌 (*Escherichia coli*) の *gyrB* 遺伝子、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) の *nuc* 遺伝子、表皮ブドウ球菌 (*Staphylococcus epidermidis*) の *atlE* 遺伝子、クレブシエラ・ニューモニエ (*Klebsiella*

la pneumoniae) の gyrB 遺伝子、及びエンテロコッカス属菌 (Enterococcus spp.) の rpoB 遺伝子全長又は一部の領域にそれぞれ特異的なプライマーのセットの組み合わせとを用いて、PCR法を実施する工程である。

- [0012] 試料を採取する対象は、例えば、敗血症を有する対象又は敗血症が疑われる対象であってよく、細菌への感染が認められる対象又は細菌への感染が疑われる対象であってもよい。試料は、例えば、敗血症の原因細菌のDNAを含む試料又は敗血症の原因細菌のDNAを含む疑いがある試料であってよい。対象は、例えば、哺乳類動物であってよく、ヒトであってよく、非ヒト哺乳類動物であってもよい。
- [0013] 対象から採取した試料は、例えば、血液、唾液、尿、及びリンパ液等の体液であってよい。試料は、血液であることが好ましい。
- [0014] 対象から採取した試料は、必要に応じて、培養して用いてもよい。例えば、本実施形態に係る方法は、血液を培養する工程をさらに含んでもよい。血液を培養する方法は、当該技術分野で公知の方法により行うことができる。
- [0015] PCR法を実施する工程は、対象から採取した試料から鋳型を調製する工程をさらに含んでもよい。
- [0016] 鋳型としては、例えば、DNA抽出物が挙げられる。対象から採取した試料からDNAを抽出する方法は、当該技術分野で公知の方法により行うことができる。
- [0017] 本明細書において、各遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットとは、各遺伝子の全長又は一部の領域を標的として特異的に結合し、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) により標的とした領域のDNAを増幅させるためのプライマーのセットを意味する。プライマーのセットは、少なくとも1種のフォワードプライマーと少なくとも1種のリバースプライマーを含む。プライマーのセットは、例えば、複数のフォワードプライマーとリバースプライマー1種との組み合わせであってもよく、フォワードプライマー1種と複数のリバースプライマーとの組み合わせであってもよく、複数の

フォワードプライマー及び複数のリバースプライマーの組み合わせであってもよい。例えば、以下、上記標的とした領域を「標的領域」と呼ぶこともある。

[0018] 標的配列となる各遺伝子の配列は、例えば、米国の国立生物工学情報センター（NCBI）が提供するGenBank等、配列情報が登録された公共のデータベースから入手することができる。本明細書に記載された遺伝子のGenBank ID等の情報は、以下の表1及び表2に記載されている。本明細書において、原則として各遺伝子名は、特定の配列を有する遺伝子のみを指すものではなく、例えば、天然に存在する一塩基多型を有する遺伝子も指す。

[0019] 本明細書に記載される細菌に関する株名及びGenBank IDの例示を以下に示す。遺伝子名は本明細書に記載される標的遺伝子及び薬剤耐性遺伝子を例示的に示したものである。

[0020]

[表1]

菌種	株名	GenBank ID	標的遺伝子名
アシネトバクター・バウマンニ	strainAb30	NZ_CP009257.1	rpoB
アシネトバクター・バウマンニ	strainNF43	KR922891.1	16S-23S ITS
シトロバクター・コセリ	strain_AR_0025	CP026697.1	ompA
エンテロバクター・クロアカ	strain NCTC13405	NZ_UGIT00000000.1	rpoS
大腸菌	strain113	CP028680.1	gyrB
クレブシエラ・アエロゲネス	strain Ea11791	QKNB01000001.1	gyrB
クレブシエラ・ニューモニエ	strain KPNIH39	CP014762.1	gyrB
クレブシエラ・オキシトカ	strain NCTC11691	NZ_UGJS01000001.1	pehX
クレブシエラ・バリイコーラ	strain MGH-76aedYL	NZ_KK737663.1	gyrB
シュードモナス・エルギノーザ	strainNCTC13621	CAADJP010000013.1	oprL
プロテウス・ミラビリス	strain ATCC7002	KN150749.1	rpoB
セラチア・マルセッセンス	strain 2880STDY5682934	NZ_FCJR00000000.1	hasA
エンテロкокカス・ファエカリス	strain B15321	PZZF01000001.1	rpoB
リステリア・モノサイトゲネス	strain ATCC19118	AF532293.1	iap p60
黄色ブドウ球菌	strainGD1539	CP019594.2	nuc
スタフィロкокカス・アルゲンテウス	strain 3688STDY6125066	FQMM01000001.1	nuc
表皮ブドウ球菌	strain AU23	LNUS01000001.1	atIE

黄色ブドウ球菌	KG-18	AP019543.1	tuf
肺炎レンサ球菌	strain GPSC19 substr. ST1955	NZ_LR216069.1	rnpB
肺炎レンサ球菌	strain GPSC108 substr. ST9487	NZ_LR216028.1	xisco
化膿レンサ球菌	strain MGAS7888	CP031640.1	gyrB

[0021] [表2]

菌種	株名	GenBank ID	薬剤耐性遺伝子名
クレブシエラ・ニューモニエ	VAKPC278_plasmid_ pVAKPC278-138	NZ_JMSW01000002.1	ベータラクタマーゼ__KP C
クレブシエラ・ニューモニエ	strain_JNM10C3	NZ_CP030876.1	ベータラクタマーゼ__N DM
シュドモナス・エルギノーザ	strain197018	MN510335.1	ベータラクタマーゼ__IM P85
シトロバクター・フロインディー	str._E2614	NZ_LS992177.1	ベータラクタマーゼ__VI M
サルモネラ・エンテリカ	LC0541/17	NZ_CP030839.1	ベータラクタマーゼ__CT X-M1
サルモネラ・エンテリカ	CAS-5	NG_048968.1	ベータラクタマーゼ__CT X-M2
大腸菌	785-D	NG_049043.1	ベータラクタマーゼ__CT X-M9
大腸菌		AF518567.2	ベータラクタマーゼ__CT X-M25
シトロバクター・アマロナティクス	Rio-2	NG_049032.1	ベータラクタマーゼ__CT X-M8
アシネトバクター・パウマンニ	strainTG60155	NZ_CP036284.1	ベータラクタマーゼ__OX A-23
アシネトバクター・パウマンニ	BAL_204	KT946773.1	ベータラクタマーゼ__OX A-40
クレブシエラ・ニューモニエ	plasmidpKPoxa- 48N2	NC_021502.1	ベータラクタマーゼ__OX A-48
アシネトバクター・ヘモリティカス	strainTJR01plasmid pAHTJR1	NZ_CP038010.1	ベータラクタマーゼ__OX A-58
黄色ブドウ球菌	isolateTMHS-SA- 3125	KU194302.1	mecA
エンテロコッカス・ファエカリス	plasmidpWZ7140	NC_019284.1	vanA
エンテロコッカス・フェシウム	strain10_1922	KT003978.1	vanB

[0022] 各遺伝子の全長又は一部の領域を標的配列として増幅するための特異的な

プライマーのセット（フォワードプライマー及びリバースプライマー）は、標的配列の配列に基づき設計することができる。プライマーは、当業者に公知の方法により合成することができる。プライマーは、例えば、10～50塩基長のオリゴヌクレオチドであってもよく、15～30塩基長のオリゴヌクレオチドであってもよく、17～25塩基長のオリゴヌクレオチドであってもよい。プライマーは標的配列の正確な配列を反映する必要はないが、鋳型とハイブリダイズし、DNA合成を開始するのに十分相補的である必要がある。

[0023] 本明細書において、プライマーは、特定の配列である塩基配列又はそれと配列同一性が85%以上、90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、若しくは99%以上の塩基配列を含むものであってよい。また、プライマーは、特定の配列である塩基配列又はそれと配列同一性が85%以上、90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、若しくは99%以上の塩基配列からなるものであってよい。また、プライマーは、特定の配列である塩基配列、又はその3'末端若しくは5'末端に0～5個、1～4個、1～3個、1～2個、若しくは1個のヌクレオチド付加若しくは欠失を含む塩基配列を含むものであってもよい。

[0024] 本明細書において、ヌクレオチド塩基の一文字コードは、下記の表に示す国際純正・応用化学連合（IUPAC）の定める塩基表記に従い使用している。

[0025]

[表3]

塩基	コード
アデニン	A
シトシン	C
グアニン	G
チミン	T
ウリジン	U
アデニン又はシトシン	M
アデニン又はグアニン	R
アデニン又はチミン	W
シトシン又はグアニン	S
シトシン又はチミン	Y
グアニン又はチミン	K

[0026] プライマーは、塩基 A、G、C、T 若しくは類似体、又は縮重塩基（M、R、W、S、Y、K）からなっていてよい。細菌株によって塩基配列が異なる特定の位置に縮重塩基を含むことで、より適切に細菌の遺伝子を増幅することができる。

[0027] また、プライマーは、分光学的手段、光化学的手段、生化学的手段、免疫化学的手段、又は化学的手段により検出可能な標識を有するものであってもよい。検出可能な標識としては、例えば、標識アビジン（例えば、蛍光標識ストレプトアビジン）で検出するビオチン、ハプテン、蛍光色素（例えば、フルオレセイン、テキサスレッド及びローダミン）、電子密度試薬、酵素（例えば、ホースラディッシュペルオキシダーゼ及びアルカリホスファターゼ）、及び放射性同位元素（例えば、 ^{32}P 、 ^3H 、 ^{14}C 及び ^{125}I ）が挙げられる。標識は、例えば、プライマーの 5' 末端、3' 末端又はインターナルが標識を有していてもよく、リンカーを介して標識されていてもよい。例えば、プライマーの 5' 末端がビオチン修飾されることで標識されていてもよく、その際、リンカーを介してプライマーの 5' 末端がビオチン修飾されていてもよい。

- [0028] PCR法を実施する工程において、標識を有するプライマーを使用することで、標識を含む増幅したDNAを得ることができる。標識は、また、プライマー又は増幅したDNAを固体支持体上へ固定化するために、プライマーを捕捉するために用いることもできる。
- [0029] 本実施形態において、複数の遺伝子の全長又は一部の領域にそれぞれ特異的なプライマーのセットの組み合わせを用いて同時にPCR法を実施するため、プライマーのセットは、それぞれの遺伝子に関して類似又は均一な増幅条件下で増幅段階を実施することができるように設計される。試料中にプライマーが標的とする遺伝子の全長又は一部の領域のDNAが含まれる場合には、当該領域が増幅される。
- [0030] 複数の遺伝子の全長又は一部の領域にそれぞれ特異的なプライマーのセットの組み合わせを用いてPCR法を実施する方法は、当業者に公知の方法により行うことができる。PCRでは、通常最初の変性工程があり、続いてPCR増幅サイクルが行われる。PCR増幅の各サイクルにおいて、二本鎖標的の配列を変性し（変性工程）、変性した標的の各鎖にプライマーをアニーリングさせ（アニーリング工程）、DNAポリメラーゼの作用によりプライマーを伸長させる（伸長工程）。
- [0031] 異なる配列を持つ様々なゲノム領域を一つのPCR反応系で増幅する方法としては、例えば、マルチプレックスポリメラーゼ連鎖反応（マルチプレックスPCR）が挙げられる。マルチプレックスPCRは、マルチプレックスの形式で異なる標的核酸を増幅する複数のプライマーを組み合わせ、1つの試料に対して同時に試験を実施する方法である。
- [0032] 本実施形態において、異なる遺伝子の領域を一つのPCR反応系で同時に増幅するため、上記各遺伝子の全長又は一部の領域にそれぞれ特異的なプライマーのセットは集合的に用いられる。例えば、核酸増幅に適した条件下で、対象から採取した試料をプライマーのセットの混合物に接触させることで、プライマーのセットが細菌遺伝子若しくは細菌遺伝子及び薬剤耐性遺伝子の全長又は一部の領域にそれぞれ特異的に結合し、DNAポリメラーゼによ

り当該領域を増幅させることができる。

- [0033] 対象から採取した試料に含まれる又は含まれる疑いのある細菌遺伝子若しくは細菌遺伝子及び薬剤耐性遺伝子を標的とするプライマーのセットの組み合わせを使用してPCR法を実施することで、増幅反応混合物を形成することができる。標的とする遺伝子が試料に含まれている場合、増幅反応混合物には、細菌遺伝子若しくは細菌遺伝子及び薬剤耐性遺伝子の全長又は一部が増幅されたDNAが含まれる。
- [0034] PCR法を実施する工程において、例えば、試料から得られた鋳型及び上記プライマーのセットの組み合わせを含む混合物を反応混合物と呼ぶことができる。
- [0035] 反応混合物はPCR標準試薬を含んでいてもよい。PCR標準試薬としては、例えば、Multiplex PCR Assay Kit Ver. 2（タカラバイオ社）が挙げられる。反応混合物は、DNAポリメラーゼ、デオキシヌクレオシド三リン酸（dNTP）、マグネシウムイオン、1以上の塩類、トリスバッファ（Tris-HCl）、EDTA、グリセロール及びpHバッファからなる群から選択される1以上をさらに含んでもよい。
- [0036] DNAポリメラーゼとしては、例えば、taq（サーマス・アクアチカス）ポリメラーゼ及びpfu（ピロコッカス・フリオサス）ポリメラーゼが挙げられる。
- [0037] 1以上の塩類としては、例えば、塩化カリウム及び塩化マグネシウムが挙げられる。PCRに用いるバッファの塩濃度は、例えば、1mM～200mMであってよく、塩化カリウムの場合は125mM～175mM、塩化マグネシウムの場合は1～4mMであってよい。
- [0038] pHバッファとしては、例えば、Tris-pHバッファが挙げられる。pHバッファのpHは、例えば、7.5～9.0であってよく、8.0～9.0であってよい。
- [0039] PCRに用いる各プライマーの濃度（PCR反応液における最終濃度）は、例えば、0.01μM～3μMであってよく、0.1μM～0.3μMで

あってよく、 $0.05\mu\text{M}\sim 2.5\mu\text{M}$ であってよく、 $0.1\mu\text{M}\sim 0.4\mu\text{M}$ であってよい。

[0040] PCRにおける変性工程は、例えば、 $90^{\circ}\text{C}\sim 95^{\circ}\text{C}$ で30秒～60秒であってよく、 94°C で30秒であってもよい。

[0041] アニール工程は、例えば、 $58\sim 64^{\circ}\text{C}$ で30秒～65秒及び $90^{\circ}\text{C}\sim 95^{\circ}\text{C}$ で20秒～40秒であってもよく、 $60\sim 62^{\circ}\text{C}$ で50秒～60秒及び $92^{\circ}\text{C}\sim 95^{\circ}\text{C}$ で25秒～35秒であってもよく、 60°C で60秒及び 94°C で30秒であってもよい。アニールのサイクル数は、例えば、25回～50回であってもよく、30回～40回であってもよく、30回であってよい。

[0042] 伸長工程は、例えば、 $70^{\circ}\text{C}\sim 75^{\circ}\text{C}$ で100秒～700秒であってよく、 $70^{\circ}\text{C}\sim 75^{\circ}\text{C}$ で400秒～700秒であってよく、 72°C で600秒であってよい。

[0043] 本実施形態において用いられるプライマーのセットの組み合わせは、PCR法における変性工程、アニール工程、及び伸長工程について、一定の温度サイクル条件を用いて行うことが可能であるように設計されていることが好ましい。

[0044] PCR法を実施する工程においては、大腸菌 (*Escherichia coli*) の *gyrB* 遺伝子、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) の *nuc* 遺伝子、表皮ブドウ球菌 (*Staphylococcus epidermidis*) の *atlE* 遺伝子、クレブシエラ・ニューモニエ (*Klebsiella pneumoniae*) の *gyrB* 遺伝子、及びエンテロコッカス属菌 (*Enterococcus* spp.) (例えば、エンテロコッカス・ファエカリス (*Enterococcus faecalis*)) の *rpoB* 遺伝子の全長又は一部の領域にそれぞれ特異的なプライマーのセットの組み合わせが用いられる。

[0045] PCR法を実施する工程において、大腸菌 (*Escherichia coli*) の *gyrB* 遺伝子、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus*

s aureus) のnuc遺伝子、表皮ブドウ球菌 (Staphylococcus epidermidis) のatlE遺伝子、クレブシエラ・ニューモニエ (Klebsiella pneumoniae) のgyrB遺伝子、及びエンテロコッカス属菌 (Enterococcus spp.) のrpoB遺伝子以外の遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットをさらに用いてもよい。

[0046] 例えば、PCR法を実施する工程において、アシネトバクター属菌 (Acinetobacter spp.) (例えば、アシネトバクター・バウマンニ (Acinetobacter baumannii)) のrpoB遺伝子、アシネトバクター・バウマンニ (Acinetobacter baumannii) の16S-23S ITS遺伝子、シトロバクター属菌 (Citrobacter spp.) (例えば、シトロバクター・コセリ (Citrobacter koseri)、シトロバクター・フロインディー (Citrobacter freundii)) のompA遺伝子、エンテロバクター属菌 (Enterobacter spp.) (例えば、エンテロバクター・クロアカ (Enterobacter cloacae)) のrpoS遺伝子、クレブシエラ・アエロゲネス (Klebsiella aerogenes) のgyrB遺伝子、クレブシエラ・オキシトカ (Klebsiella oxytoca) のpehX遺伝子、クレブシエラ・バリイコーラ (Klebsiella variicola) のgyrB遺伝子、シュードモナス・エルギノーザ (Pseudomonas aeruginosa) のoprL遺伝子、プロテウス属菌 (Proteus spp.) (例えば、プロテウス・ミラビリス (Proteus mirabilis)) のrpoB遺伝子、セラチア・マルセッセンス (Serratia marcescens) のhasA遺伝子、リステリア属菌 (Listeria spp.) (例えば、リステリア・モノサイトゲネス (Listeria monocytogenes)) のiap p60遺伝子、スタフィロコッカス・アルゲンテウス (Staphylococcus argente

us) のnuc遺伝子、ブドウ球菌属 (*Staphylococcus* spp.) (例えば、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*)) のtuf遺伝子、レンサ球菌属 (*Streptococcus* spp.) (例えば、肺炎レンサ球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)) のrnpB遺伝子、肺炎レンサ球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) のxisco遺伝子、及び化膿レンサ球菌 (*Streptococcus pyogenes*) のgyrB遺伝子からなる群から選択される1以上の遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットをさらに用いてもよい。

[0047] また、例えば、PCR法を実施する工程において、薬剤耐性遺伝子である、クレブシエラ・ニューモニエ (*Klebsiella pneumoniae*) のベータラクタマーゼ__KPC (beta-lactamase__KPC) 遺伝子、クレブシエラ・ニューモニエ (*Klebsiella pneumoniae*) のベータラクタマーゼ__NDM (beta-lactamase__NDM) 遺伝子、シュードモナス・エルギノーザ (*Pseudomonas aeruginosa*) のベータラクタマーゼ__IMP85 (beta-lactamase__IMP85) 遺伝子、シトロバクター・フロインディー (*Citrobacter freundii*) のベータラクタマーゼ__VIM (beta-lactamase__VIM) 遺伝子、サルモネラ・エンテリカ (*Salmonella enterica*) のベータラクタマーゼ__CTX-M1 (beta-lactamase__CTX-M1) 遺伝子、サルモネラ・エンテリカ (*Salmonella enterica*) のベータラクタマーゼ__CTX-M2 (beta-lactamase__CTX-M2) 遺伝子、シトロバクター・アマロナティクス (*Citrobacter amalonaticus*) のベータラクタマーゼ__CTX-M8 (beta-lactamase__CTX-M8) 遺伝子、大腸菌 (*Escherichia coli*) のベータラクタマーゼ__CTX-M25 (beta-lactamase__CTX-M25) 遺伝子、大腸菌 (

Escherichia coli) のベータラクタマーゼ__CTX-M9 (beta-lactamase__CTX-M9) 遺伝子、アシネトバクター・バウマンニ (*Acinetobacter baumannii*) のベータラクタマーゼ__OXA-23 (beta-lactamase__OXA-23) 遺伝子、アシネトバクター・バウマンニ (*Acinetobacter baumannii*) のベータラクタマーゼ__OXA-40 (beta-lactamase__OXA-40) 遺伝子、クレブシエラ・ニューモニエ (*Klebsiella pneumoniae*) のベータラクタマーゼ__OXA-48 (beta-lactamase__OXA-48) 遺伝子、アシネトバクター・ヘモリティカスのベータラクタマーゼ__OXA-58 (beta-lactamase__OXA-58) 遺伝子、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) の *mecA* 遺伝子、エンテロコッカス・ファエカリス (*Enterococcus faecalis*) の *vanA* 遺伝子、及びエンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*) の *vanB* 遺伝子からなる群から選択される1以上遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットをさらに用いてもよい。

[0048] また、例えば、PCR法を実施する工程において、アシネトバクター属菌の *rpoB* 遺伝子、アシネトバクター・バウマンニの 16S-23S ITS 遺伝子、シトロバクター属菌（例えば、シトロバクター・コセリ、シトロバクター・フロインディー）の *ompA* 遺伝子、エンテロバクター属菌（例えば、エンテロバクター・クロアカ）の *rpoS* 遺伝子、クレブシエラ・アエロゲネスの *gyrB* 遺伝子、クレブシエラ・オキシトカの *pehX* 遺伝子、クレブシエラ・バリイコーラの *gyrB* 遺伝子、シュードモナス・エルギノーザの *oprL* 遺伝子、プロテウス属菌（例えば、プロテウス・ミラビリス）の *rpoB* 遺伝子、セラチア・マルセッセンスの *hasA* 遺伝子、リステリア属菌の *iap* p60 遺伝子、スタフィロコッカス・アルゲンテウスの *nuc* 遺伝子、ブドウ球菌属の *tuf* 遺伝子、レンサ球菌属の *rnpB* 遺

伝子、肺炎レンサ球菌の *x i s c o* 遺伝子、化膿レンサ球菌の *g y r B* 遺伝子、クレブシエラ・ニューモニエのベータラクタマーゼ__K P C 遺伝子、クレブシエラ・ニューモニエのベータラクタマーゼ__N D M 遺伝子、シュドモナス・エルギノーザのベータラクタマーゼ__I M P 8 5 遺伝子、シトロバクター・フロインディーのベータラクタマーゼ__V I M 遺伝子、サルモネラ・エンテリカのベータラクタマーゼ__C T X - M 1 遺伝子、サルモネラ・エンテリカのベータラクタマーゼ__C T X - M 2 遺伝子、シトロバクター・アモナティクスのベータラクタマーゼ__C T X - M 8 遺伝子、大腸菌のベータラクタマーゼ__C T X - M 2 5 遺伝子、大腸菌のベータラクタマーゼ__C T X - M 9 遺伝子、アシネトバクター・バウマンニのベータラクタマーゼ__O X A - 2 3 遺伝子、アシネトバクター・バウマンニのベータラクタマーゼ__O X A - 4 0 遺伝子、クレブシエラ・ニューモニエのベータラクタマーゼ__O X A - 4 8 遺伝子、アシネトバクター・ヘモリティカスのベータラクタマーゼ__O X A - 5 8 遺伝子、黄色ブドウ球菌の *m e c A* 遺伝子、エンテロコッカス・ファエカリスの *v a n A* 遺伝子、及びエンテロコッカス・フェシウムの *v a n B* 遺伝子からなる群から選択される 1 以上の遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットを用いてもよい。

[0049] 上記複数の遺伝子の群から選択される細菌又は遺伝子は、例えば、2 種以上、3 種以上、5 種以上、7 種以上、1 0 種以上、1 5 種以上、2 0 種以上、2 5 種以上、2 8 種以上、3 0 種以上、又は 3 2 種以上であってよい。また、上記複数の遺伝子の群から選択される細菌又は遺伝子は、例えば、3 7 種以下、3 4 種以下、2 1 種以下、1 6 種以下、又は 1 1 種以下であってもよい。また、上記複数の遺伝子の群から選択される細菌又は遺伝子は、例えば、2 種～4 0 種、5 種～3 7 種、1 0 種～3 7 種、又は 1 5 種～2 5 種であってよい。

[0050] 上記のプライマーのセットをさらに用いることで、より多くの敗血症の原因細菌について調べたり、薬剤耐性遺伝子についてもあわせて調べたりすることができる。薬剤耐性遺伝子のプライマーのセットをさらに用いることで

、敗血症の原因細菌の同定及び細菌の薬剤耐性遺伝子の有無の同定を同時にできるため、早急に治療の選択をすることができる。また、原因細菌の治療薬に対する耐性の有無も考慮し、適切な治療の選択及び治療方針の決定をすることができる。

[0051] PCR法を実施する工程において、大腸菌の *gyrB* 遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットは、配列番号10の塩基配列又は配列番号10の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプライマーと、配列番号11の塩基配列又は配列番号11の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプライマーとを含むものであってよく、

黄色ブドウ球菌の *nuc* 遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットは、配列番号32の塩基配列若しくは配列番号32の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプライマー、配列番号34の塩基配列若しくは配列番号34の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプライマー、及びこれらの組み合わせから選択される1又は複数のプライマーと、配列番号33の塩基配列若しくは配列番号33の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプライマーとを含むものであってよく、

表皮ブドウ球菌の *atlE* 遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットは、配列番号37の塩基配列又は配列番号37の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプライマーと、配列番号38又は配列番号38の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列の塩基配列を含むプライマーとを含むものであってよく、

クレブシエラ・ニューモニエの *gyrB* 遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットは、配列番号14の塩基配列又は配列番号14の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプライマーと、配列番号15又は配列番号15の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列の塩基配列を含むプライマーとを含むものであってよく、

エンテロコッカス属菌の *rpoB* 遺伝子の全長又は一部の領域に特異的な

プライマーのセットは、配列番号 26 の塩基配列若しくは配列番号 26 の塩基配列と配列同一性が 90%以上の塩基配列を含むプライマー、配列番号 27 の塩基配列若しくは配列番号 27 の塩基配列と配列同一性が 90%以上の塩基配列を含むプライマー、配列番号 28 の塩基配列若しくは配列番号 28 の塩基配列と配列同一性が 90%以上の塩基配列を含むプライマー、及びこれらの組み合わせから選択される 1 又は複数のプライマーと、配列番号 29 の塩基配列若しくは配列番号 29 の塩基配列と配列同一性が 90%以上の塩基配列を含むプライマーとを含むものであってよい。

[0052] 上記のプライマーセットを用いることで、プライマー間の相互作用が減少し、各領域を増幅する際の特異性及び反応性が向上する。また、PCR法を実施する際の、温度及び試薬等の均一な条件下での増幅効率も向上する。

[0053] また、大腸菌の *gyrB* 遺伝子、黄色ブドウ球菌の *nuc* 遺伝子、表皮ブドウ球菌の *atlE* 遺伝子、クレブシエラ・ニューモニエの *gyrB* 遺伝子、及びエンテロコッカス属菌の *rpoB* 遺伝子以外の遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットをさらに用いる場合において、

アシネトバクター属菌の *rpoB* 遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットは、配列番号 1 の塩基配列又は配列番号 1 の塩基配列と配列同一性が 90%以上の塩基配列を含むプライマーと、配列番号 2 の塩基配列又は配列番号 2 の塩基配列と配列同一性が 90%以上の塩基配列を含むプライマーとを含むものであってよく、

アシネトバクター・バウマンニの *16S-23S ITS* 遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットは、配列番号 3 の塩基配列又は配列番号 3 の塩基配列と配列同一性が 90%以上の塩基配列を含むプライマーと、配列番号 4 の塩基配列又は配列番号 4 の塩基配列と配列同一性が 90%以上の塩基配列を含むプライマーとを含むものであってよく、

シトロバクター属菌（例えば、シトロバクター・コセリ、シトロバクター・フロインディー）の *ompA* 遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットは、配列番号 5 の塩基配列若しくは配列番号 5 の塩基配列と

配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプライマー、配列番号6若しくは配列番号6の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列の塩基配列を含むプライマー、及びこれらの組み合わせから選択される1又は複数のプライマーと、配列番号7若しくは配列番号7の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列の塩基配列を含むプライマーとを含むものであってよく、

エンテロバクター属菌の *rpoS* 遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットは、配列番号8の塩基配列又は配列番号8の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプライマーと、配列番号9又は配列番号9の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列の塩基配列を含むプライマーとを含むものであってよく、

クレブシエラ・アエロゲネスの *gyrB* 遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットは、配列番号12の塩基配列又は配列番号12の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプライマーと、配列番号13の塩基配列又は配列番号13の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプライマーとを含むものであってよく、

クレブシエラ・オキシトカの *pehX* 遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットは、配列番号16の塩基配列又は配列番号16の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプライマーと、配列番号17の塩基配列又は配列番号17の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプライマーとを含むものであってよく、

クレブシエラ・バリイコーラの *gyrB* 遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットは、配列番号18の塩基配列又は配列番号18の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプライマーと、配列番号19の塩基配列又は配列番号19の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプライマーとを含むものであってよく、

シュードモナス・エルギノーザの *oprL* 遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットは、配列番号20の塩基配列又は配列番号20の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプライマーと、配列

番号 21 の塩基配列又は配列番号 21 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列を含むプライマーとを含むものであってよく、

プロテウス属菌の *rpoB* 遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットは、配列番号 22 の塩基配列又は配列番号 22 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列を含むプライマーと、配列番号 23 の塩基配列又は配列番号 23 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列を含むプライマーとを含むものであってよく、

セラチア・マルセッセンスの *hasA* 遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットは、配列番号 24 の塩基配列又は配列番号 24 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列を含むプライマーと、配列番号 25 の塩基配列又は配列番号 25 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列を含むプライマーとを含むものであってよく、

リステリア属菌の *iap* p60 遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットは、配列番号 30 の塩基配列又は配列番号 30 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列を含むプライマーと、配列番号 31 の塩基配列又は配列番号 31 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列を含むプライマーとを含むものであってよく、

スタフィロコッカス・アルゲンテウスの *nuc* 遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットは、配列番号 35 の塩基配列又は配列番号 35 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列を含むプライマーと、配列番号 36 の塩基配列又は配列番号 36 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列を含むプライマーとを含むものであってよく、

ブドウ球菌属の *tuf* 遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットは、配列番号 39 の塩基配列又は配列番号 39 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列を含むプライマーと、配列番号 40 の塩基配列又は配列番号 40 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列を含むプライマーとを含むものであってよく、

レンサ球菌属の *rnpB* 遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマ

一のセットは、配列番号41の塩基配列又は配列番号41の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプライマーと、配列番号42の塩基配列又は配列番号42の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプライマーとを含むものであってよく、

肺炎レンサ球菌の*xiscO*遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットは、配列番号43の塩基配列又は配列番号43の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプライマーと、配列番号44の塩基配列又は配列番号44の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプライマーとを含むものであってよく、

化膿レンサ球菌の*gyrB*遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットは、配列番号45の塩基配列又は配列番号45の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプライマーと、配列番号46の塩基配列又は配列番号46の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプライマーとを含むものであってよく、

クレブシエラ・ニューモニエのベータラクタマーゼ__KPC遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットは、配列番号68の塩基配列又は配列番号68の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプライマーと、配列番号69の塩基配列又は配列番号69の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプライマーとを含むものであってよく、

クレブシエラ・ニューモニエのベータラクタマーゼ__NDM遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットは、配列番号70の塩基配列又は配列番号70の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプライマーと、配列番号71の塩基配列又は配列番号71の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプライマーとを含むものであってよく、

シュードモナス・エルギノーザのベータラクタマーゼ__IMP85遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットは、配列番号72の塩基配列又は配列番号72の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプライマーと、配列番号73の塩基配列又は配列番号73の塩基配列と

配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプライマーとを含むものであってよく、

シトロバクター・フロインディーのベータラクタマーゼ__VIM遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットは、配列番号74の塩基配列又は配列番号74の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプライマーと、配列番号75の塩基配列又は配列番号75の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプライマーとを含むものであってよく、

サルモネラ・エンテリカのベータラクタマーゼ__CTX-M1遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットは、配列番号76の塩基配列又は配列番号76の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプライマーと、配列番号77の塩基配列又は配列番号77の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプライマーとを含むものであってよく、

サルモネラ・エンテリカのベータラクタマーゼ__CTX-M2遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットは、配列番号78の塩基配列又は配列番号78の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプライマーと、配列番号79の塩基配列又は配列番号79の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプライマーとを含むものであってよく、

シトロバクター・アマロナティクスのベータラクタマーゼ__CTX-M8遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットは、配列番号80の塩基配列又は配列番号80の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプライマーと、配列番号81の塩基配列又は配列番号81の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプライマーとを含むものであってよく、

大腸菌のベータラクタマーゼ__CTX-M25遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットは、配列番号82の塩基配列又は配列番号

８２の塩基配列と配列同一性が９０％以上の塩基配列を含むプライマーと、配列番号８３の塩基配列又は配列番号８３の塩基配列と配列同一性が９０％以上の塩基配列を含むプライマーとを含むものであってよく、

大腸菌のベータラクタマーゼ__CTX-M9遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットは、配列番号８４の塩基配列又は配列番号８４の塩基配列と配列同一性が９０％以上の塩基配列を含むプライマーと、配列番号８５の塩基配列又は配列番号８５の塩基配列と配列同一性が９０％以上の塩基配列を含むプライマーとを含むものであってよく、

アシネトバクター・バウマンニのベータラクタマーゼ__OXA-23遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットは、配列番号８６の塩基配列又は配列番号８６の塩基配列と配列同一性が９０％以上の塩基配列を含むプライマーと、配列番号８７の塩基配列又は配列番号８７の塩基配列と配列同一性が９０％以上の塩基配列を含むプライマーとを含むものであってよく、

アシネトバクター・バウマンニのベータラクタマーゼ__OXA-40遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットは、配列番号８８の塩基配列又は配列番号８８の塩基配列と配列同一性が９０％以上の塩基配列を含むプライマーと、配列番号８９の塩基配列又は配列番号８９の塩基配列と配列同一性が９０％以上の塩基配列を含むプライマーとを含むものであってよく、

クレブシエラ・ニューモニエのベータラクタマーゼ__OXA-48遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットは、配列番号９０の塩基配列又は配列番号９０の塩基配列と配列同一性が９０％以上の塩基配列を含むプライマーと、配列番号９１の塩基配列又は配列番号９１の塩基配列と配列同一性が９０％以上の塩基配列を含むプライマーとを含むものであってよく、

アシネトバクター・ヘモリティカスのベータラクタマーゼ__OXA-58遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットは、配列番号９

2の塩基配列又は配列番号92の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプライマーと、配列番号93の塩基配列又は配列番号93の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプライマーとを含むものであってよく、

黄色ブドウ球菌の*mecA*遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットは、配列番号94の塩基配列又は配列番号94の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプライマーと、配列番号95の塩基配列又は配列番号95の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプライマーとを含むものであってよく、

エンテロコッカス・ファエカリスの*vanA*遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットは、配列番号96の塩基配列又は配列番号96の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプライマーと、配列番号97の塩基配列又は配列番号97の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプライマーとを含むものであってよく、

エンテロコッカス・フェシウムの*vanB*遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットは、配列番号98の塩基配列又は配列番号98の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプライマーと、配列番号99の塩基配列又は配列番号99の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプライマーとを含むものであってよい。

[0054] 上記のプライマーセットをさらに用いることで、より多くの敗血症の原因細菌若しくは原因細菌遺伝子及び薬剤耐性遺伝子について調べることができる。上記のプライマーセットを用いることで、プライマー間の相互作用が減少し、PCR法を実施する際の特異性及び反応性が向上する。また、PCR法を実施する際の、温度及び試薬等の均一な条件下での増幅効率も向上する。

[0055] 本実施形態において、各遺伝子の全長又は一部の領域のDNA（標的領域）、及び／又は増幅したDNAの長さは、例えば、50～300塩基長であってもよく、100～200塩基長であってもよい。

- [0056] 本明細書において、各遺伝子の標的領域のDNA、及び／又は増幅したDNAは、特定の配列である塩基配列又はそれと配列同一性が85%以上、90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、若しくは99%以上の塩基配列を含むものであってよい。また、増幅した遺伝子のDNAは、特定の配列である塩基配列又はそれと配列同一性が85%以上、90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、若しくは99%以上の塩基配列からなるものであってよい。また、増幅した遺伝子のDNAは、特定の配列である塩基配列、又はその3'末端若しくは5'末端に0～5個、1～4個、1～3個、1～2個、若しくは1個のヌクレオチド付加若しくは欠失を含む塩基配列を含むものであってもよい。
- [0057] また、各遺伝子の標的領域のDNA、及び／又は増幅したDNAは、分光学的手段、光化学的手段、生化学的手段、免疫化学的手段、又は化学的手段により検出可能な標識を有するものであってもよい。検出可能な標識としては、例えば、標識ストレプトアビジンで検出するビオチン、ハプテン、蛍光色素（例えば、フルオレセイン、テキサスレッド及びローダミン）、電子密度試薬、酵素（例えば、ホースラディッシュペルオキシダーゼ及びアルカリホスファターゼ）、及び放射性同位元素（例えば、 ^{32}P 、 ^3H 、 ^{14}C 及び ^{125}I ）が挙げられる。標識は、例えば、増幅した遺伝子のDNAの5'末端、3'末端又はインターナルが標識を有していてもよく、リンカーを介して標識されていてもよい。例えば、増幅した遺伝子のDNAの5'末端がビオチン修飾されることで標識されていてもよく、その際、リンカーを介してプライマーの5'末端がビオチン修飾されていてもよい。上述したような標識を有するプライマーを使用してDNAを増幅することで、標識を含む増幅したDNAを得ることができる。
- [0058] 大腸菌のgyrB遺伝子の全長又は一部の領域のDNAは、配列番号51の塩基配列又は配列番号51の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配

列を含むものであってよく、

黄色ブドウ球菌の *nuc* 遺伝子の全長又は一部の領域の DNA は、配列番号 61 の塩基配列又は配列番号 61 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列を含むものであってよく、

表皮ブドウ球菌の *atlE* 遺伝子の全長又は一部の領域の DNA は、配列番号 63 の塩基配列又は配列番号 63 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列を含むものであってよく、

クレブシエラ・ニューモニエの *gyrB* 遺伝子の全長又は一部の領域の DNA は、配列番号 53 の塩基配列又は配列番号 53 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列を含むものであってよく、

エンテロコッカス属菌の *rpoB* 遺伝子の全長又は一部の領域の DNA は、配列番号 59 の塩基配列又は配列番号 59 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列を含むものであってよい。

[0059] 上記の全長又は一部の領域の DNA を用いることで、複数の DNA 間の相互作用が減少し、各領域の増幅の有無を検出する際の特異性及び反応性が向上する。

[0060] また、大腸菌の *gyrB* 遺伝子、黄色ブドウ球菌の *nuc* 遺伝子、表皮ブドウ球菌の *atlE* 遺伝子、クレブシエラ・ニューモニエの *gyrB* 遺伝子、及びエンテロコッカス属菌の *rpoB* 遺伝子以外の遺伝子の全長又は一部の領域にそれぞれ特異的なプライマーのセットをさらに用いる場合において、

アシネトバクター属菌の *rpoB* 遺伝子の全長又は一部の領域の DNA は、配列番号 47 の塩基配列又は配列番号 47 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列を含むものであってよく、

アシネトバクター・バウマンニの 16S-23S ITS 遺伝子の全長又は一部の領域の DNA は、配列番号 48 の塩基配列又は配列番号 48 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列を含むものであってよく、

シトロバクター属菌の *ompA* 遺伝子の全長又は一部の領域の DNA は、

配列番号 49 の塩基配列又は配列番号 49 の塩基配列と配列同一性が 90 % 以上の塩基配列を含むものであってよく、

エンテロバクター属菌の *rpoS* 遺伝子の全長又は一部の領域の DNA は、配列番号 50 の塩基配列又は配列番号 50 の塩基配列と配列同一性が 90 % 以上の塩基配列を含むものであってよく、

クレブシエラ・アエロゲネスの *gyrB* 遺伝子の全長又は一部の領域の DNA は、配列番号 52 の塩基配列又は配列番号 52 の塩基配列と配列同一性が 90 % 以上の塩基配列を含むものであってよく、

クレブシエラ・オキシトカの *pehX* 遺伝子の全長又は一部の領域の DNA は、配列番号 54 の塩基配列又は配列番号 54 の塩基配列と配列同一性が 90 % 以上の塩基配列を含むものであってよく、

クレブシエラ・バリイコーラの *gyrB* 遺伝子の全長又は一部の領域の DNA は、配列番号 55 の塩基配列又は配列番号 55 の塩基配列と配列同一性が 90 % 以上の塩基配列を含むものであってよく、

シュードモナス・エルギノーザの *oprL* 遺伝子の全長又は一部の領域の DNA は、配列番号 56 の塩基配列又は配列番号 56 の塩基配列と配列同一性が 90 % 以上の塩基配列を含むものであってよく、

プロテウス属菌の *rpoB* 遺伝子の全長又は一部の領域の DNA は、配列番号 57 の塩基配列又は配列番号 57 の塩基配列と配列同一性が 90 % 以上の塩基配列を含むものであってよく、

セラチア・マルセッセンスの *hasA* 遺伝子の全長又は一部の領域の DNA は、配列番号 58 の塩基配列又は配列番号 58 の塩基配列と配列同一性が 90 % 以上の塩基配列を含むものであってよく、

リステリア属菌の *iap* p60 遺伝子の全長又は一部の領域の DNA は、配列番号 60 の塩基配列又は配列番号 60 の塩基配列と配列同一性が 90 % 以上の塩基配列を含むものであってよく、

スタフィロコッカス・アルゲンテウスの *nuc* 遺伝子の全長又は一部の領域の DNA は、配列番号 62 の塩基配列又は配列番号 62 の塩基配列と配列

同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよく、

ブドウ球菌属の *tuf* 遺伝子の全長又は一部の領域のDNAは、配列番号64の塩基配列又は配列番号64の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよく、

レンサ球菌属の *rnpB* 遺伝子の全長又は一部の領域のDNAは、配列番号65の塩基配列又は配列番号65の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよく、

肺炎レンサ球菌の *xiscO* 遺伝子の全長又は一部の領域のDNAは、配列番号66の塩基配列又は配列番号66の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよく、

化膿レンサ球菌の *gyrB* 遺伝子の全長又は一部の領域のDNAは、配列番号67の塩基配列又は配列番号67の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよく、

クレブシエラ・ニューモニエのベータラクタマーゼ__KPC遺伝子の全長又は一部の領域のDNAは、配列番号100の塩基配列又は配列番号100の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよく、

クレブシエラ・ニューモニエのベータラクタマーゼ__NDM遺伝子の全長又は一部の領域のDNAは、配列番号101の塩基配列又は配列番号101の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよく、

シュドモナス・エルギノーザのベータラクタマーゼ__IMP85遺伝子の全長又は一部の領域のDNAは、配列番号102の塩基配列又は配列番号102の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよく、

シトロバクター・フロインディーのベータラクタマーゼ__VIM遺伝子の全長又は一部の領域のDNAは、配列番号103の塩基配列又は配列番号103の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよく、

サルモネラ・エンテリカのベータラクタマーゼ__CTX-M1遺伝子の全

長又は一部の領域のDNAは、配列番号104の塩基配列又は配列番号104の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよく、

サルモネラ・エンテリカのベータラクタマーゼ__CTX-M2遺伝子の全長又は一部の領域のDNAは、配列番号105の塩基配列又は配列番号105の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよく、

シトロバクター・アマロナティクスのベータラクタマーゼ__CTX-M8遺伝子の全長又は一部の領域のDNAは、配列番号106の塩基配列又は配列番号106の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよく、

大腸菌のベータラクタマーゼ__CTX-M25遺伝子の全長又は一部の領域のDNAは、配列番号107の塩基配列又は配列番号107の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよく、

大腸菌のベータラクタマーゼ__CTX-M9遺伝子の全長又は一部の領域のDNAは、配列番号108の塩基配列又は配列番号108の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよく、

アシネトバクター・バウマンニのベータラクタマーゼ__OXA-23遺伝子の全長又は一部の領域のDNAは、配列番号109の塩基配列又は配列番号109の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよく、

アシネトバクター・バウマンニのベータラクタマーゼ__OXA-40遺伝子の全長又は一部の領域のDNAは、配列番号110の塩基配列又は配列番号110の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよく、

クレブシエラ・ニューモニエのベータラクタマーゼ__OXA-48遺伝子の全長又は一部の領域のDNAは、配列番号111の塩基配列又は配列番号111の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよく、

よく、

アシネトバクター・ヘモリティカスのベータラクタマーゼ__OXA-58 遺伝子の全長又は一部の領域のDNAは、配列番号112の塩基配列又は配列番号112の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよく、

黄色ブドウ球菌のmecA遺伝子の全長又は一部の領域のDNAは、配列番号113の塩基配列又は配列番号113の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよく、

エンテロコッカス・ファエカリスのvanA遺伝子の全長又は一部の領域のDNAは、配列番号114の塩基配列又は配列番号114の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよく、

エンテロコッカス・フェシウムのvanB遺伝子の全長又は一部の領域のDNAは、配列番号115の塩基配列又は配列番号115の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよい。

[0061] 上記の全長又は一部の領域のDNAを用いることで、複数のDNA間の相互作用が減少し、各領域の増幅の有無を検出する際の特異性及び反応性が向上する。

[0062] [検出工程]

一実施形態において、検出工程は、各遺伝子の全長又は一部の領域のDNAにそれぞれ特異的なプローブを用いて、上記全長又は一部の領域の増幅の有無を検出する工程である。

[0063] 各遺伝子の全長又は一部の領域（標的領域）のDNAに特異的なプローブは、上記標的領域のDNAの配列に基づき設計することができる。プローブは、当業者に公知の方法により合成することができる。プローブは、例えば、10～30塩基長のオリゴヌクレオチドであってもよく、15～20塩基長のオリゴヌクレオチドであってもよい。プライマーは標的領域の正確な配列を反映する必要はないが、標的領域のDNAの少なくとも一部（例えば、内部領域の配列）とハイブリダイズし、検出するのに十分相補的である必要

がある。

- [0064] 本明細書において、プローブは、特定の配列である塩基配列又はそれと配列同一性が85%以上、90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、若しくは99%以上の塩基配列を含むものであってよい。また、プローブは、特定の配列である塩基配列又はそれと配列同一性が85%以上、90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、若しくは99%以上の塩基配列からなるものであってよい。また、プローブは、特定の配列である塩基配列、又はその3'末端若しくは5'末端に0～5個、1～4個、1～3個、1～2個、若しくは1個のヌクレオチド付加若しくは欠失を含む塩基配列を含むものであってよい。
- [0065] プローブは、塩基A、G、C、T若しくは類似体、又は縮重塩基（M、R、W、S、Y、K）からなっていてよい。細菌株によって塩基配列が異なる特定の位置に縮重塩基を含むことで、より適切に標的領域のDNAとハイブリダイズすることができる。
- [0066] また、プローブは、分光学的手段、光化学的手段、生化学的手段、免疫化学的手段、又は化学的手段により検出可能な標識を有するものであってもよい。検出可能な標識としては、例えば、標識アビジンで検出するビオチン、ハプテン、蛍光色素（例えば、フルオレセイン、テキサスレッド及びローダミン）、電子密度試薬、酵素（例えば、ホースラディッシュペルオキシダーゼ及びアルカリホスファターゼ）、及び放射性同位元素（例えば、 ^{32}P 、 ^3H 、 ^{14}C 及び ^{125}I ）が挙げられる。標識は、例えば、プローブの5'末端、3'末端又はインターナルが標識を有していてもよく、リンカーを介して標識されていてもよい。例えば、プローブの5'末端がビオチン修飾されることで標識されていてもよく、その際、リンカーを介してプローブの5'末端がビオチン修飾されていてもよい。
- [0067] 標識を有するプローブを使用して増幅したDNAとハイブリダイズさせる

ことで、標識を利用して増幅したDNAを検出することができる。標識は、また、プローブを固体支持体上へ固定化するために、プローブを捕捉するために用いることもできる。

[0068] 本実施形態において、各遺伝子の標的領域のDNAの増幅の有無を同時に検出するため、プローブは、それぞれの遺伝子のDNAに関して類似又は均一な条件下で検出を実施することができるように設計される。

[0069] プローブを、例えば、増幅したDNAと混合することで増幅したDNAとハイブリダイズさせてもよく、固体支持体上に固定化して増幅したDNAとハイブリダイズさせてもよい。固体支持体としては、例えば、基板、アレイ、磁性ビーズ、カラム、及び着色ビーズ等が挙げられる。固体支持体上に固定化させる方式は、マルチプレックスフォーマットであってもよい。固体支持体上に固定化したプローブにより、増幅したDNAを捕捉してもよい。

[0070] 固体支持体上にプローブを固定化する場合、例えば、それぞれが識別可能な異なる識別子（例えば、ID）を含むプローブが固定化されていてもよいし、識別可能な識別子を含む固体支持体の各識別子上に各プローブが固定化されていてもよい。言い換えると、プローブが、それぞれ異なる識別子を含むか、又は固体支持体上の異なる識別子にそれぞれ結合しているものであってもよい。プローブが固体支持体上に固定化されている場合には、増幅したDNAが対応する各プローブに特異的に結合することで増幅したDNAを捕捉することができる。捕捉された増幅したDNAは標識化され、その標識に基づき増幅したDNAを検出することができる。例えば、標識化が蛍光標識である場合には、蛍光値の測定により増幅したDNAを検出することができる。識別子による識別により、各プローブと増幅したDNAの結合による蛍光値を測定することができる装置としては、例えば、蛍光測定装置である 100 Fluorescent Analyzer (PlexBio社) が挙げられる。

[0071] プローブを用いて、各遺伝子の標的領域のDNAの増幅の有無を検出する方法は、当業者に公知の方法により実施することができるが、例えば、以下

のように実施することができる。

[0072] PCR法を実施する工程にて得られたPCR産物（試料が標的領域のDNAを含む場合には、増幅したDNAが含まれる）を熱変性（例えば、95℃で5分の後4℃へ急冷）し、プローブとハイブリダイズさせる。熱変性は、例えば、90℃～95℃で3分～10分の後、0～5℃へ急冷してもよく、95℃で5分の後、4℃へ急冷してもよい。ハイブリダイゼーションは、例えば、35℃～39℃で10分～30分のインキュベーションにより行ってよく、37℃で20分のインキュベーションで行ってもよい。プローブは、標的領域のDNAとストリンジントな条件下でそれぞれハイブリダイズするプローブであってよい。本明細書における「ストリンジントな条件」とは、標的領域の配列に対して相同性を有するヌクレオチド鎖の相補鎖が標的領域の配列に優先的にハイブリダイズし、そして相同性を有さないヌクレオチド鎖の相補鎖が実質的にハイブリダイズしない条件を意味する。ストリンジントな条件は配列依存的であり、そして種々の状況で異なる。より長い配列は、より高い温度で特異的にハイブリダイズする。ストリンジントな条件としては、例えば、50%ホルムアミド、5×SSC（150mM塩化ナトリウム、15mMクエン酸三ナトリウム、10mMリン酸ナトリウム、1mMエチレンジアミン四酢酸、pH7.2）、5×デンハート溶液、0.1%SDS、10%デキストラン硫酸及び100μg/mLの変性サケ精子DNAで42℃インキュベーションした後、フィルターを0.2×SSC中42℃で洗浄するという条件が挙げられる。

[0073] ハイブリダイゼーションを行った後、例えば、増幅したDNA及び／又はプローブの標識を利用して検出することができる。検出は、標識の種類に応じて適宜実施できる。また、ハイブリダイゼーションを行った後、ビオチン修飾された増幅したDNAを、標識アビジン（例えば、Streptavidin-Phycoerythrin（PlexBio社））により標識化することにより検出することもできる。標識化は、標識の種類に応じて適宜実施できるが、例えば、35℃～39℃で10分～30分のインキュベ

ートにより行ってよく、37℃で10分のインキュベートで行ってもよい。

[0074] 本実施形態の検出工程において、標的領域のDNAの増幅の有無は、それぞれに対して特異的なプローブを用いて同時に検出される。標的領域のDNAの増幅の有無をそれぞれに対して特異的なプローブを用いて同時に検出する方法は、当業者に公知の方法により行うことができる。

[0075] 異なる標的領域のDNAの増幅の有無を同時に検出する方法としては、例えば、マルチプレックスPCRアッセイが挙げられる。したがって、本実施形態に係る方法は、マルチプレックスPCRアッセイにより実施することもできる。検出工程は、マルチプレックスフォーマットで固相基板上に固定化された、標的領域のDNAにそれぞれ特異的なプローブと、PCR法を実施する工程において増幅した標的領域のDNAを（例えば、増幅反応混合物を用いて）ハイブリダイズさせること、ハイブリダイズされた上記増幅した標的領域のDNAを同時に検出することを含んでいてもよい。

[0076] 本実施形態において、異なる標的領域のDNAの増幅の有無を一つの反応系（例えば、ハイブリダイゼーション反応系）で同時に検出するため、上記各遺伝子の標的領域のDNAにそれぞれ特異的なプローブは集合的に用いられる。例えば、ハイブリダイゼーション反応に適した条件下で、増幅したDNAの組み合わせ（例えば、混合物）をプローブの組み合わせ（例えば、混合物）に接触させることで、プローブが各遺伝子の増幅したDNAの少なくとも一部にそれぞれ特異的に結合し、増幅したDNAの標識、プローブの標識、又は増幅したDNAが捕捉された後の標識化により、リアルタイムPCR検出（例えば、TaqManプローブ、分子指標）、又は固形支持体ハイブリダイゼーション（例えば、核酸のマイクロアレイハイブリダイゼーション、ビーズベースの捕捉）等により検出することができる。

[0077] 細菌の標的遺伝子、又は細菌の標的遺伝子及び薬剤耐性遺伝子の標的領域のDNAの増幅の有無の検出は、検出方法に応じて適宜判断することができるが、例えば、細菌のDNAを含まない対照試料との比較により標的領域のDNAが増幅されたか否か判断してもよく、基準値との比較により増幅され

たか否かと判断してもよい。予め定められた基準値との比較により増幅の有無を判断する場合には、例えば、基準値を超えた場合には、細菌の標的遺伝子、又は細菌の標的遺伝子及び薬剤耐性遺伝子の標的領域のDNAが検出されたと判断してもよい。基準値は、それぞれの遺伝子について設定されてもよく、すべての遺伝子に対して一律に設定されていてもよい。基準値は、例えば、細菌のDNAを含まない対照試料における値から設定した値でもよく、細菌のDNAを含む試料における値から設定した値でもよく、対照試料における値と細菌のDNAを含む試料における値とを比較することにより設定した値であってもよい。また、それぞれの遺伝子の標的領域のDNAの増幅の有無を適切に判断するため、カットオフ値を利用してもよい。カットオフ値もまた、それぞれの遺伝子について設定されてもよく、すべての遺伝子に対して一律に設定されていてもよい。カットオフ値は、例えば、ROC曲線を利用して、目標の感度と特異度が担保できるカットオフ値とを選択することにより設定することができる。例えば、若干の交叉反応がみられるプローブに関して、カットオフ値を少し高く設定することで、判定精度を向上させることができる。

[0078] 増幅が確認された標的領域のDNAに基づき、対象の試料に存在する原因細菌、又は原因細菌及び細菌の薬剤耐性遺伝子を同定することができる。例えば、特定の細菌の遺伝子の標的領域のDNAの増幅が検出された場合に、その細菌が原因細菌であると同定してもよい。

[0079] 検出工程において、大腸菌のgyrB遺伝子の全長又は一部の領域のDNAに特異的なプローブは、配列番号121の塩基配列又は配列番号121の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよく、

黄色ブドウ球菌のnuc遺伝子の全長又は一部の領域のDNAに特異的なプローブは、配列番号134の塩基配列又は配列番号134の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよく、

表皮ブドウ球菌のatlE遺伝子の全長又は一部の領域のDNAに特異的なプローブは、配列番号136の塩基配列又は配列番号136の塩基配列と

配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよく、

クレブシエラ・ニューモニエのgyrB遺伝子の全長又は一部の領域のDNAに特異的なプローブは、配列番号124の塩基配列又は配列番号124の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよく、

エンテロコッカス属菌のrpoB遺伝子の全長又は一部の領域のDNAに特異的なプローブは、配列番号129の塩基配列若しくは配列番号129の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプローブ、配列番号130の塩基配列若しくは配列番号130の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプローブ、配列番号131の塩基配列若しくは配列番号131の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプローブ、及びこれらの組み合わせから選択されるものであってよい。

[0080] 上記のプローブを用いることで、複数のプローブ間の相互作用が減少し、各領域の増幅の有無を検出する際の特異性及び反応性が向上する。また、同時にハイブリダイゼーション反応する際の、温度及び試薬等の均一な条件下でのハイブリダイゼーション効率も向上する。

[0081] また、大腸菌のgyrB遺伝子、黄色ブドウ球菌のnuc遺伝子、表皮ブドウ球菌のatlE遺伝子、クレブシエラ・ニューモニエのgyrB遺伝子、及びエンテロコッカス属菌のrpoB遺伝子以外の遺伝子の全長又は一部の領域のDNAに特異的なプローブをさらに用いる場合において、

アシネトバクター属菌のrpoB遺伝子の全長又は一部の領域のDNAに特異的なプローブは、配列番号116の塩基配列若しくは配列番号116の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプローブ、配列番号117の塩基配列若しくは配列番号117の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプローブ、及びこれらの組み合わせから選択されるものであってよく、

アシネトバクター・バウマンニの16S-23S ITS遺伝子の全長又は一部の領域のDNAに特異的なプローブは、配列番号118の塩基配列又は配列番号118の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むも

のであってよく、

シトロバクター属菌の *omp A* 遺伝子の全長又は一部の領域の DNA に特異的なプローブは、配列番号 119 の塩基配列又は配列番号 119 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列を含むものであってよく、

エンテロバクター属菌の *rpo S* 遺伝子の全長又は一部の領域の DNA に特異的なプローブは、配列番号 120 の塩基配列又は配列番号 120 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列を含むものであってよく、

クレブシエラ・アエロゲネスの *gyr B* 遺伝子の全長又は一部の領域の DNA に特異的なプローブは、配列番号 122 の塩基配列又は配列番号 122 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列を含むものであってよく、

クレブシエラ・オキシトカの *peh X* 遺伝子の全長又は一部の領域の DNA に特異的なプローブは、配列番号 123 の塩基配列又は配列番号 123 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列を含むものであってよく、

クレブシエラ・バリイコーラの *gyr B* 遺伝子の全長又は一部の領域の DNA に特異的なプローブは、配列番号 125 の塩基配列又は配列番号 125 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列を含むものであってよく、

シュドモナス・エルギノーザの *opr L* 遺伝子の全長又は一部の領域の DNA に特異的なプローブは、配列番号 126 の塩基配列又は配列番号 126 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列を含むものであってよく、

プロテウス属菌の *rpo B* 遺伝子の全長又は一部の領域の DNA に特異的なプローブは、配列番号 127 の塩基配列又は配列番号 127 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列を含むものであってよく、

セラチア・マルセッセンスの *has A* 遺伝子の全長又は一部の領域の DNA に特異的なプローブは、配列番号 128 の塩基配列又は配列番号 128 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列を含むものであってよく、

リステリア属菌の *iap* p60 遺伝子の全長又は一部の領域の DNA に特異的なプローブは、配列番号 132 の塩基配列若しくは配列番号 132 の

塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプローブ、配列番号133の塩基配列若しくは配列番号133の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプローブ、及びこれらの組み合わせから選択されるものであってよく、

スタフィロкокカス・アルゲンテウスのnuc遺伝子の全長又は一部の領域のDNAに特異的なプローブは、配列番号135の塩基配列又は配列番号135の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよく、

ブドウ球菌属のtuf遺伝子の全長又は一部の領域のDNAに特異的なプローブは、配列番号137の塩基配列又は配列番号137の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよく、

レンサ球菌属のrnpB遺伝子の全長又は一部の領域のDNAに特異的なプローブは、配列番号140の塩基配列又は配列番号140の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよく、

肺炎レンサ球菌のxisC遺伝子の全長又は一部の領域のDNAに特異的なプローブは、配列番号138の塩基配列又は配列番号138の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよく、

化膿レンサ球菌のgyrB遺伝子の全長又は一部の領域のDNAに特異的なプローブは、配列番号139の塩基配列又は配列番号139の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよく、

クレブシエラ・ニューモニエのベータラクタマーゼ_KPC遺伝子の全長又は一部の領域のDNAに特異的なプローブは、配列番号142の塩基配列又は配列番号142の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよく、

クレブシエラ・ニューモニエのベータラクタマーゼ_NDM遺伝子の全長又は一部の領域のDNAに特異的なプローブは、配列番号141の塩基配列又は配列番号141の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよく、

シュードモナス・エルギノーザのベータラクタマーゼ__IMP85 遺伝子の全長又は一部の領域のDNAに特異的なプローブは、配列番号144の塩基配列又は配列番号144の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよく、

シトロバクター・フロインディーのベータラクタマーゼ__VIM 遺伝子の全長又は一部の領域のDNAに特異的なプローブは、配列番号143の塩基配列又は配列番号143の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよく、

サルモネラ・エンテリカのベータラクタマーゼ__CTX-M1 遺伝子の全長又は一部の領域のDNAに特異的なプローブは、配列番号149の塩基配列又は配列番号149の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよく、

サルモネラ・エンテリカのベータラクタマーゼ__CTX-M2 遺伝子の全長又は一部の領域のDNAに特異的なプローブは、配列番号150の塩基配列又は配列番号150の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよく、

シトロバクター・アマロナティクスのベータラクタマーゼ__CTX-M8 遺伝子の全長又は一部の領域のDNAに特異的なプローブは、配列番号151の塩基配列又は配列番号151の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよく、

大腸菌のベータラクタマーゼ__CTX-M25 遺伝子の全長又は一部の領域のDNAに特異的なプローブは、配列番号153の塩基配列又は配列番号153の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよく、

大腸菌のベータラクタマーゼ__CTX-M9 遺伝子の全長又は一部の領域のDNAに特異的なプローブは、配列番号152の塩基配列又は配列番号152の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよく、

アシネトバクター・バウマンニのベータラクタマーゼ__OXA-23 遺伝子の全長又は一部の領域のDNAに特異的なプローブは、配列番号145の塩基配列又は配列番号145の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよく、

アシネトバクター・バウマンニのベータラクタマーゼ__OXA-40 遺伝子の全長又は一部の領域のDNAに特異的なプローブは、配列番号146の塩基配列又は配列番号146の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよく、

クレブシエラ・ニューモニエのベータラクタマーゼ__OXA-48 遺伝子の全長又は一部の領域のDNAに特異的なプローブは、配列番号147の塩基配列又は配列番号147の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよく、

アシネトバクター・ヘモリティカスのベータラクタマーゼ__OXA-58 遺伝子の全長又は一部の領域のDNAに特異的なプローブは、配列番号148の塩基配列又は配列番号148の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよく、

黄色ブドウ球菌のmecA 遺伝子の全長又は一部の領域のDNAに特異的なプローブは、配列番号154の塩基配列又は配列番号154の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよく、

エンテロコッカス・ファエカリスのvanA 遺伝子の全長又は一部の領域のDNAに特異的なプローブは、配列番号155の塩基配列又は配列番号155の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよく、

エンテロコッカス・フェシウムのvanB 遺伝子の全長又は一部の領域のDNAに特異的なプローブは、配列番号156の塩基配列又は配列番号156の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよい。

[0082] 上記のプローブをさらに用いることで、より多くの敗血症の原因細菌につ

いて調べたり、薬剤耐性遺伝子についてもあわせて調べたりすることができる。

[0083] 上記のプロブを用いることで、複数のプロブ間の相互作用が減少し、各領域の増幅の有無を検出する際の特異性及び反応性が向上する。また、ハイブリダイゼーション反応する際の、温度及び試薬等の均一な条件下でのハイブリダイゼーション効率も向上する。

[0084] 本発明は、また、一実施形態として、対象から採取した試料と、大腸菌 (*Escherichia coli*) の *gyrB* 遺伝子、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) の *nuc* 遺伝子、表皮ブドウ球菌 (*Staphylococcus epidermidis*) の *at* *IE* 遺伝子、クレブシエラ・ニューモニエ (*Klebsiella pneumoniae*) の *gyrB* 遺伝子、エンテロコッカス属菌 (*Enterococcus spp.*) (例えば、エンテロコッカス・ファエカリス (*Enterococcus faecalis*)) の *rpoB* 遺伝子、アシネトバクター属菌 (*Acinetobacter spp.*) (例えば、アシネトバクター・バウマンニ (*Acinetobacter baumannii*)) の *rpoB* 遺伝子、アシネトバクター・バウマンニ (*Acinetobacter baumannii*) の 16S-23S ITS 遺伝子、シトロバクター属菌 (例えば、シトロバクター・コセリ、シトロバクター・フロインディー) の *ompA* 遺伝子、エンテロバクター・クロアカ (*Enterobacter cloacae*) の *rpoS* 遺伝子、クレブシエラ・アエロゲネス (*Klebsiella aerogenes*) の *gyrB* 遺伝子、クレブシエラ・オキシトカ (*Klebsiella oxytoca*) の *pehX* 遺伝子、クレブシエラ・バリイコーラ (*Klebsiella variicola*) の *gyrB* 遺伝子、シュードモナス・エルギノーザ (*Pseudomonas aeruginosa*) の *oprL* 遺伝子、プロテウス属菌 (*Proteus spp.*) (例えば、プロテウス・ミラビリス (*Proteus mirabilis*)) の *rpoB* 遺伝子、セラチア・マ

ルセッセンス (*Serratia marcescens*) の *hasA* 遺伝子、リステリア属菌 (*Listeria spp.*) (例えば、リステリア・モノサイトゲネス (*Listeria monocytogenes*)) の *iap p60* 遺伝子、スタフィロコッカス・アルゲンテウス (*Staphylococcus argenteus*) の *nuc* 遺伝子、ブドウ球菌属 (*Staphylococcus spp.*) (例えば、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*)) の *tuf* 遺伝子、レンサ球菌属 (*Streptococcus spp.*) (例えば、肺炎レンサ球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)) の *rnpB* 遺伝子、肺炎レンサ球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) の *xisco* 遺伝子、化膿レンサ球菌 (*Streptococcus pyogenes*) の *gyrB* 遺伝子、クレブシエラ・ニューモニエ (*Klebsiella pneumoniae*) のベータラクタマーゼ__KPC (*beta-lactamase__KPC*) 遺伝子、クレブシエラ・ニューモニエ (*Klebsiella pneumoniae*) のベータラクタマーゼ__NDM (*beta-lactamase__NDM*) 遺伝子、シュードモナス・エルギノーザ (*Pseudomonas aeruginosa*) のベータラクタマーゼ__IMP85 (*beta-lactamase__IMP85*) 遺伝子、シトロバクター・フロインディー (*Citrobacter freundii*) のベータラクタマーゼ__VIM (*beta-lactamase__VIM*) 遺伝子、サルモネラ・エンテリカ (*Salmonella enterica*) のベータラクタマーゼ__CTX-M1 (*beta-lactamase__CTX-M1*) 遺伝子、サルモネラ・エンテリカ (*Salmonella enterica*) のベータラクタマーゼ__CTX-M2 (*beta-lactamase__CTX-M2*) 遺伝子、シトロバクター・アマロナティクス (*Citrobacter amalonaticus*) のベータラクタマーゼ__CTX-M8 (*beta-lactamase__CTX-M8*) 遺伝子、大腸菌 (*Escherichia coli*

i) のベータラクタマーゼ__CTX-M25 (beta-lactamase__CTX-M25) 遺伝子、大腸菌 (*Escherichia coli*) のベータラクタマーゼ__CTX-M9 (beta-lactamase__CTX-M9) 遺伝子、アシネトバクター・バウマンニ (*Acinetobacter baumannii*) のベータラクタマーゼ__OXA-23 (beta-lactamase__OXA-23) 遺伝子、アシネトバクター・バウマンニ (*Acinetobacter baumannii*) のベータラクタマーゼ__OXA-40 (beta-lactamase__OXA-40) 遺伝子、クレブシエラ・ニューモニエ (*Klebsiella pneumoniae*) のベータラクタマーゼ__OXA-48 (beta-lactamase__OXA-48) 遺伝子、アシネトバクター・ヘモリティカスのベータラクタマーゼ__OXA-58 (beta-lactamase__OXA-58) 遺伝子、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) の *mecA* 遺伝子、エンテロコッカス・ファエカリス (*Enterococcus faecalis*) の *vanA* 遺伝子、及びエンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*) の *vanB* 遺伝子からなる群から選択される2種以上の細菌の遺伝子及び／又は薬剤耐性遺伝子の全長又は一部の領域にそれぞれ特異的なプライマーのセットの組み合わせとを用いて、PCR法を実施する工程、並びに

各遺伝子の全長又は一部の領域のDNAにそれぞれ特異的なプローブの組み合わせを用いて、上記全長又は一部の領域のDNAの増幅の有無を検出する工程、

を含む、敗血症の原因細菌及び／又は薬剤耐性遺伝子を同定する方法も提供する。

[0085] 上記複数の遺伝子の群から選択される細菌又は遺伝子は、例えば、5種以上、10種以上、15種以上、20種以上、25種以上、28種以上、30種以上、32種以上、35種以上又は37種であってよい。上記複数の遺伝子の群から選択される細菌の遺伝子は、例えば、3種以上、5種以上、7種

以上、１０種以上、１２種以上、１５種以上、１７種以上、１９種以上又は２１種以上であってよい。また上記複数の遺伝子の群から選択される薬剤耐性遺伝子は、例えば、３種以上、５種以上、７種以上、１０種以上、１２種以上、１４種以上、１６種以上であってよい。また、上記複数の遺伝子の群から選択される細菌又は遺伝子は、例えば、３７種以下、３４種以下、２１種以下、１６種以下、又は１１種以下であってもよい。また、上記複数の遺伝子の群から選択される細菌又は遺伝子は、例えば、２種～４０種、５種～３７種、１０種～３７種、又は１５種～２５種であってもよい。

[0086] PCR法を実施する工程において、大腸菌のgyrB遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットは、配列番号１０の塩基配列又は配列番号１０の塩基配列と配列同一性が９０％以上の塩基配列を含むプライマーと、配列番号１１の塩基配列又は配列番号１１の塩基配列と配列同一性が９０％以上の塩基配列を含むプライマーとを含むものであってよく、

黄色ブドウ球菌のnuc遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットは、配列番号３２の塩基配列若しくは配列番号３２の塩基配列と配列同一性が９０％以上の塩基配列を含むプライマー、配列番号３４の塩基配列若しくは配列番号３４の塩基配列と配列同一性が９０％以上の塩基配列を含むプライマー、及びこれらの組み合わせから選択される１又は複数のプライマーと、配列番号３３の塩基配列若しくは配列番号３３の塩基配列と配列同一性が９０％以上の塩基配列を含むプライマーとを含むものであってよく、

表皮ブドウ球菌のatlE遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットは、配列番号３７の塩基配列又は配列番号３７の塩基配列と配列同一性が９０％以上の塩基配列を含むプライマーと、配列番号３８又は配列番号３８の塩基配列と配列同一性が９０％以上の塩基配列の塩基配列を含むプライマーとを含むものであってよく、

クレブシエラ・ニューモニエのgyrB遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットは、配列番号１４の塩基配列又は配列番号１４の

塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプライマーと、配列番号15又は配列番号15の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列の塩基配列を含むプライマーとを含むものであってよく、

エンテロコッカス属菌の *rpoB* 遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットは、配列番号26の塩基配列若しくは配列番号26の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプライマー、配列番号27の塩基配列若しくは配列番号27の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプライマー、配列番号28の塩基配列若しくは配列番号28の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプライマー、及びこれらの組み合わせから選択される1又は複数のプライマーと、配列番号29の塩基配列若しくは配列番号29の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプライマーとを含むものであってよく、

アシネトバクター属菌の *rpoB* 遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットは、配列番号1の塩基配列又は配列番号1の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプライマーと、配列番号2の塩基配列又は配列番号2の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプライマーとを含むものであってよく、

アシネトバクター・バウマンニの *16S-23S ITS* 遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットは、配列番号3の塩基配列又は配列番号3の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプライマーと、配列番号4の塩基配列又は配列番号4の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプライマーとを含むものであってよく、

シトロバクター属菌の *ompA* 遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットは、配列番号5の塩基配列若しくは配列番号5の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプライマー、配列番号6若しくは配列番号6の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列の塩基配列を含むプライマー、及びこれらの組み合わせから選択される1又は複数のプライマーと、配列番号7若しくは配列番号7の塩基配列と配列同一性が90%

以上の塩基配列の塩基配列を含むプライマーとを含むものであってよく、

エンテロバクター属菌の *r p o S* 遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットは、配列番号 8 の塩基配列又は配列番号 8 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列を含むプライマーと、配列番号 9 又は配列番号 9 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列の塩基配列を含むプライマーとを含むものであってよく、

クレブシエラ・アエロゲネスの *g y r B* 遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットは、配列番号 12 の塩基配列又は配列番号 12 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列を含むプライマーと、配列番号 13 の塩基配列又は配列番号 13 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列を含むプライマーとを含むものであってよく、

クレブシエラ・オキシトカの *p e h X* 遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットは、配列番号 16 の塩基配列又は配列番号 16 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列を含むプライマーと、配列番号 17 の塩基配列又は配列番号 17 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列を含むプライマーとを含むものであってよく、

クレブシエラ・バリイコーラの *g y r B* 遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットは、配列番号 18 の塩基配列又は配列番号 18 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列を含むプライマーと、配列番号 19 の塩基配列又は配列番号 19 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列を含むプライマーを含むものであってよく、

シュードモナス・エルギノーザの *o p r L* 遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットは、配列番号 20 の塩基配列又は配列番号 20 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列を含むプライマーと、配列番号 21 の塩基配列又は配列番号 21 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列を含むプライマーとを含むものであってよく、

プロテウス属菌の *r p o B* 遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットは、配列番号 22 の塩基配列又は配列番号 22 の塩基配列と配

列同一性が90%以上の塩基配列を含むプライマーと、配列番号23の塩基配列又は配列番号23の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプライマーとを含むものであってよく、

セラチア・マルセッセンスのh a s A遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットは、配列番号24の塩基配列又は配列番号24の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプライマーと、配列番号25の塩基配列又は配列番号25の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプライマーとを含むものであってよく、

リステリア属菌のi a p p 6 0遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットは、配列番号30の塩基配列又は配列番号30の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプライマーと、配列番号31の塩基配列又は配列番号31の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプライマーとを含むものであってよく、

スタフィロкокカス・アルゲンテウスのn u c遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットは、配列番号35の塩基配列又は配列番号35の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプライマーと、配列番号36の塩基配列又は配列番号36の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプライマーとを含むものであってよく、

ブドウ球菌属のt u f遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットは、配列番号39の塩基配列又は配列番号39の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプライマーと、配列番号40の塩基配列又は配列番号40の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプライマーとを含むものであってよく、

レンサ球菌属のr n p B遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットは、配列番号41の塩基配列又は配列番号41の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプライマーと、配列番号42の塩基配列又は配列番号42の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプライマーとを含むものであってよく、

肺炎レンサ球菌の x i s c o 遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットは、配列番号 4 3 の塩基配列又は配列番号 4 3 の塩基配列と配列同一性が 9 0 % 以上の塩基配列を含むプライマーと、配列番号 4 4 の塩基配列又は配列番号 4 4 の塩基配列と配列同一性が 9 0 % 以上の塩基配列を含むプライマーとを含むものであってよく、

化膿レンサ球菌の g y r B 遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットは、配列番号 4 5 の塩基配列又は配列番号 4 5 の塩基配列と配列同一性が 9 0 % 以上の塩基配列を含むプライマーと、配列番号 4 6 の塩基配列又は配列番号 4 6 の塩基配列と配列同一性が 9 0 % 以上の塩基配列を含むプライマーとを含むものであってよく、

クレブシエラ・ニューモニエのベータラクタマーゼ__K P C 遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットは、配列番号 6 8 の塩基配列又は配列番号 6 8 の塩基配列と配列同一性が 9 0 % 以上の塩基配列を含むプライマーと、配列番号 6 9 の塩基配列又は配列番号 6 9 の塩基配列と配列同一性が 9 0 % 以上の塩基配列を含むプライマーとを含むものであってよく、

クレブシエラ・ニューモニエのベータラクタマーゼ__N D M 遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットは、配列番号 7 0 の塩基配列又は配列番号 7 0 の塩基配列と配列同一性が 9 0 % 以上の塩基配列を含むプライマーと、配列番号 7 1 の塩基配列又は配列番号 7 1 の塩基配列と配列同一性が 9 0 % 以上の塩基配列を含むプライマーとを含むものであってよく、

シュドモナス・エルギノーザのベータラクタマーゼ__I M P 8 5 遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットは、配列番号 7 2 の塩基配列又は配列番号 7 2 の塩基配列と配列同一性が 9 0 % 以上の塩基配列を含むプライマーと、配列番号 7 3 の塩基配列又は配列番号 7 3 の塩基配列と配列同一性が 9 0 % 以上の塩基配列を含むプライマーとを含むものであってよく、

シトロバクター・フロインディーのベータラクタマーゼ__V I M 遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットは、配列番号 7 4 の塩基

配列又は配列番号 74 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列を含むプライマーと、配列番号 75 の塩基配列又は配列番号 75 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列を含むプライマーとを含むものであってよく、

サルモネラ・エンテリカのベータラクタマーゼ__CTX-M1 遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットは、配列番号 76 の塩基配列又は配列番号 76 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列を含むプライマーと、配列番号 77 の塩基配列又は配列番号 77 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列を含むプライマーとを含むものであってよく、

サルモネラ・エンテリカのベータラクタマーゼ__CTX-M2 遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットは、配列番号 78 の塩基配列又は配列番号 78 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列を含むプライマーと、配列番号 79 の塩基配列又は配列番号 79 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列を含むプライマーとを含むものであってよく、

シトロバクター・アマロナティクスのベータラクタマーゼ__CTX-M8 遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットは、配列番号 80 の塩基配列又は配列番号 80 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列を含むプライマーと、配列番号 81 の塩基配列又は配列番号 81 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列を含むプライマーとを含むものであってよく、

大腸菌のベータラクタマーゼ__CTX-M25 遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットは、配列番号 82 の塩基配列又は配列番号 82 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列を含むプライマーと、配列番号 83 の塩基配列又は配列番号 83 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列を含むプライマーとを含むものであってよく、

大腸菌のベータラクタマーゼ__CTX-M9 遺伝子の全長又は一部の領域

に特異的なプライマーのセットは、配列番号 84 の塩基配列又は配列番号 84 の塩基配列と配列同一性が 90%以上の塩基配列を含むプライマーと、配列番号 85 の塩基配列又は配列番号 85 の塩基配列と配列同一性が 90%以上の塩基配列を含むプライマーとを含むものであってよく、

アシネトバクター・バウマンニのベータラクタマーゼ__OXA-23 遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットは、配列番号 86 の塩基配列又は配列番号 86 の塩基配列と配列同一性が 90%以上の塩基配列を含むプライマーと、配列番号 87 の塩基配列又は配列番号 87 の塩基配列と配列同一性が 90%以上の塩基配列を含むプライマーとを含むものであってよく、

アシネトバクター・バウマンニのベータラクタマーゼ__OXA-40 遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットは、配列番号 88 の塩基配列又は配列番号 88 の塩基配列と配列同一性が 90%以上の塩基配列を含むプライマーと、配列番号 89 の塩基配列又は配列番号 89 の塩基配列と配列同一性が 90%以上の塩基配列を含むプライマーとを含むものであってよく、

クレブシエラ・ニューモニエのベータラクタマーゼ__OXA-48 遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットは、配列番号 90 の塩基配列又は配列番号 90 の塩基配列と配列同一性が 90%以上の塩基配列を含むプライマーと、配列番号 91 の塩基配列又は配列番号 91 の塩基配列と配列同一性が 90%以上の塩基配列を含むプライマーとを含むものであってよく、

アシネトバクター・ヘモリティカスのベータラクタマーゼ__OXA-58 遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットは、配列番号 92 の塩基配列又は配列番号 92 の塩基配列と配列同一性が 90%以上の塩基配列を含むプライマーと、配列番号 93 の塩基配列又は配列番号 93 の塩基配列と配列同一性が 90%以上の塩基配列を含むプライマーとを含むものであってよく、

黄色ブドウ球菌の *mecA* 遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットは、配列番号 94 の塩基配列又は配列番号 94 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列を含むプライマーと、配列番号 95 の塩基配列又は配列番号 95 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列を含むプライマーとを含むものであってよく、

エンテロコッカス・ファエカリスの *vanA* 遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットは、配列番号 96 の塩基配列又は配列番号 96 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列を含むプライマーと、配列番号 97 の塩基配列又は配列番号 97 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列を含むプライマーとを含むものであってよく、

エンテロコッカス・フェシウムの *vanB* 遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットは、配列番号 98 の塩基配列又は配列番号 98 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列を含むプライマーと、配列番号 99 の塩基配列又は配列番号 99 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列を含むプライマーとを含むものであってよい。

[0087] 上記のプライマーセットの組み合わせを用いることで、PCR法を実施する際の特異性及び反応性が向上する。また、PCR法を実施する際の、温度及び試薬等の均一な条件下での増幅効率も向上する。

PCR法を実施する工程において、大腸菌の *gyrB* 遺伝子の全長又は一部の領域のDNAは、配列番号 51 の塩基配列又は配列番号 51 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列を含むものであってよく、

黄色ブドウ球菌の *nuc* 遺伝子の全長又は一部の領域のDNAは、配列番号 61 の塩基配列又は配列番号 61 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列を含むものであってよく、

表皮ブドウ球菌の *atlE* 遺伝子の全長又は一部の領域のDNAは、配列番号 63 の塩基配列又は配列番号 63 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列を含むものであってよく、

クレブシエラ・ニューモニエの *gyrB* 遺伝子の全長又は一部の領域のD

N A は、配列番号 5 3 の塩基配列又は配列番号 5 3 の塩基配列と配列同一性が 9 0 % 以上の塩基配列を含むものであってよく、

エンテロコッカス属菌の *r p o B* 遺伝子の全長又は一部の領域の D N A は、配列番号 5 9 の塩基配列又は配列番号 5 9 の塩基配列と配列同一性が 9 0 % 以上の塩基配列を含むものであってよく、

アシネトバクター属菌の *r p o B* 遺伝子の全長又は一部の領域の D N A は、配列番号 4 7 の塩基配列又は配列番号 4 7 の塩基配列と配列同一性が 9 0 % 以上の塩基配列を含むものであってよく、

アシネトバクター・バウマンニの 1 6 S - 2 3 S I T S 遺伝子の全長又は一部の領域の D N A は、配列番号 4 8 の塩基配列又は配列番号 4 8 の塩基配列と配列同一性が 9 0 % 以上の塩基配列を含むものであってよく、

シトロバクター属菌の *o m p A* 遺伝子の全長又は一部の領域の D N A は、配列番号 4 9 の塩基配列又は配列番号 4 9 の塩基配列と配列同一性が 9 0 % 以上の塩基配列を含むものであってよく、

エンテロバクター属菌の *r p o S* 遺伝子の全長又は一部の領域の D N A は、配列番号 5 0 の塩基配列又は配列番号 5 0 の塩基配列と配列同一性が 9 0 % 以上の塩基配列を含むものであってよく、

クレブシエラ・アエロゲネスの *g y r B* 遺伝子の全長又は一部の領域の D N A は、配列番号 5 2 の塩基配列又は配列番号 5 2 の塩基配列と配列同一性が 9 0 % 以上の塩基配列を含むものであってよく、

クレブシエラ・オキシトカの *p e h X* 遺伝子の全長又は一部の領域の D N A は、配列番号 5 4 の塩基配列又は配列番号 5 4 の塩基配列と配列同一性が 9 0 % 以上の塩基配列を含むものであってよく、

クレブシエラ・バリイコーラの *g y r B* 遺伝子の全長又は一部の領域の D N A は、配列番号 5 5 の塩基配列又は配列番号 5 5 の塩基配列と配列同一性が 9 0 % 以上の塩基配列を含むものであってよく、

シュードモナス・エルギノーザの *o p r L* 遺伝子の全長又は一部の領域の D N A は、配列番号 5 6 の塩基配列又は配列番号 5 6 の塩基配列と配列同一

性が90%以上の塩基配列を含むものであってよく、

プロテウス属菌の *rpoB* 遺伝子の全長又は一部の領域のDNAは、配列番号57の塩基配列又は配列番号57の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよく、

セラチア・マルセッセンスの *hasA* 遺伝子の全長又は一部の領域のDNAは、配列番号58の塩基配列又は配列番号58の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよく、

リステリア属菌の *iap* p60 遺伝子の全長又は一部の領域のDNAは、配列番号60の塩基配列又は配列番号60の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよく、

スタフィロкокカス・アルゲンテウスの *nuc* 遺伝子の全長又は一部の領域のDNAは、配列番号62の塩基配列又は配列番号62の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよく、

ブドウ球菌属の *tuf* 遺伝子の全長又は一部の領域のDNAは、配列番号64の塩基配列又は配列番号64の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよく、

レンサ球菌属の *rnpB* 遺伝子の全長又は一部の領域のDNAは、配列番号65の塩基配列又は配列番号65の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよく、

肺炎レンサ球菌の *xisc* o 遺伝子の全長又は一部の領域のDNAは、配列番号66の塩基配列又は配列番号66の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよく、

化膿レンサ球菌の *gyrB* 遺伝子の全長又は一部の領域のDNAは、配列番号67の塩基配列又は配列番号67の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよく、

クレブシエラ・ニューモニエのベータラクタマーゼ__KPC 遺伝子の全長又は一部の領域のDNAは、配列番号100の塩基配列又は配列番号100の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよく、

クレブシエラ・ニューモニエのベータラクタマーゼ__NDM遺伝子の全長又は一部の領域のDNAは、配列番号101の塩基配列又は配列番号101の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよく、

シュドモナス・エルギノーザのベータラクタマーゼ__IMP85遺伝子の全長又は一部の領域のDNAは、配列番号102の塩基配列又は配列番号102の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよく、

シトロバクター・フロインディーのベータラクタマーゼ__VIM遺伝子の全長又は一部の領域のDNAは、配列番号103の塩基配列又は配列番号103の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよく、

サルモネラ・エンテリカのベータラクタマーゼ__CTX-M1遺伝子の全長又は一部の領域のDNAは、配列番号104の塩基配列又は配列番号104の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよく、

サルモネラ・エンテリカのベータラクタマーゼ__CTX-M2遺伝子の全長又は一部の領域のDNAは、配列番号105の塩基配列又は配列番号105の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよく、

シトロバクター・アマロナティクスのベータラクタマーゼ__CTX-M8遺伝子の全長又は一部の領域のDNAは、配列番号106の塩基配列又は配列番号106の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよく、

大腸菌のベータラクタマーゼ__CTX-M25遺伝子の全長又は一部の領域のDNAは、配列番号107の塩基配列又は配列番号107の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよく、

大腸菌のベータラクタマーゼ__CTX-M9遺伝子の全長又は一部の領域のDNAは、配列番号108の塩基配列又は配列番号108の塩基配列と配

列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよく、

アシネトバクター・バウマンニのベータラクタマーゼ__OXA-23 遺伝子の全長又は一部の領域のDNAは、配列番号109の塩基配列又は配列番号109の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよく、

増幅したアシネトバクター・バウマンニのベータラクタマーゼ__OXA-40 遺伝子の全長又は一部の領域のDNAは、配列番号110の塩基配列又は配列番号110の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよく、

増幅したクレブシエラ・ニューモニエのベータラクタマーゼ__OXA-48 遺伝子の全長又は一部の領域のDNAは、配列番号111の塩基配列又は配列番号111の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよく、

アシネトバクター・ヘモリティカスのベータラクタマーゼ__OXA-58 遺伝子の全長又は一部の領域のDNAは、配列番号112の塩基配列又は配列番号112の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよく、

黄色ブドウ球菌のmecA遺伝子の全長又は一部の領域のDNAは、配列番号113の塩基配列又は配列番号113の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよく、

エンテロコッカス・ファエカリスのvanA遺伝子の全長又は一部の領域のDNAは、配列番号114の塩基配列又は配列番号114の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよく、

エンテロコッカス・フェシウムのvanB遺伝子の全長又は一部の領域のDNAは、配列番号115の塩基配列又は配列番号115の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよい。

[0088] 上記の全長又は一部の領域のDNAを用いることで、複数のDNA間の相互作用が減少し、各領域の増幅の有無を検出する際の特異性及び反応性が向

上する。

同定工程において、増幅した大腸菌の *gyrB* 遺伝子の全長又は一部の領域の DNA に特異的なプローブは、配列番号 121 の塩基配列又は配列番号 121 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列を含むものであってよく、

黄色ブドウ球菌の *nuc* 遺伝子の全長又は一部の領域の DNA に特異的なプローブは、配列番号 134 の塩基配列又は配列番号 134 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列を含む塩基配列を含むものであってよく、

表皮ブドウ球菌の *atlE* 遺伝子の全長又は一部の領域の DNA に特異的なプローブは、配列番号 136 の塩基配列又は配列番号 136 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列を含むものであってよく、

クレブシエラ・ニューモニエの *gyrB* 遺伝子の全長又は一部の領域の DNA に特異的なプローブは、配列番号 124 の塩基配列又は配列番号 124 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列を含むものであってよく、

エンテロコッカス属菌の *rpoB* 遺伝子の上記全長又は一部の領域の DNA に特異的なプローブは、配列番号 129 の塩基配列若しくは配列番号 129 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列を含むプローブ、配列番号 130 の塩基配列若しくは配列番号 130 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列を含むプローブ、配列番号 131 の塩基配列若しくは配列番号 131 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列を含むプローブ、及びこれらの組み合わせから選択されるものであってよく、

アシネトバクター属菌の *rpoB* 遺伝子の全長又は一部の領域の DNA に特異的なプローブは、配列番号 116 の塩基配列若しくは配列番号 116 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列を含むプローブ、配列番号 117 の塩基配列若しくは配列番号 117 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列を含むプローブ、及びこれらの組み合わせから選択されるものであってよく、

アシネトバクター・バウマンニの 16S-23S ITS 遺伝子の全長又

は一部の領域のDNAに特異的なプローブは、配列番号118の塩基配列又は配列番号118の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよく、

シトロバクター属菌のompA遺伝子の全長又は一部の領域のDNAに特異的なプローブは、配列番号119の塩基配列又は配列番号119の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよく、

エンテロバクター属菌のrpoS遺伝子の全長又は一部の領域のDNAに特異的なプローブは、配列番号120の塩基配列又は配列番号120の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよく、

クレブシエラ・アエロゲネスのgyrB遺伝子の全長又は一部の領域のDNAに特異的なプローブは、配列番号122の塩基配列又は配列番号122の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよく、

クレブシエラ・オキシトカのpehX遺伝子の全長又は一部の領域のDNAに特異的なプローブは、配列番号123の塩基配列又は配列番号123の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよく、

クレブシエラ・バリイコーラのgyrB遺伝子の全長又は一部の領域のDNAに特異的なプローブは、配列番号125の塩基配列又は配列番号125の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよく、

シュードモナス・エルギノーザのoprL遺伝子の全長又は一部の領域のDNAに特異的なプローブは、配列番号126の塩基配列又は配列番号126の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよく、

プロテウス属菌のrpoB遺伝子の全長又は一部の領域のDNAに特異的なプローブは、配列番号127の塩基配列又は配列番号127の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよく、

セラチア・マルセッセンスのhasA遺伝子の全長又は一部の領域のDNAに特異的なプローブは、配列番号128の塩基配列又は配列番号128の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよく、

リステリア属菌の *i a p p 6 0* 遺伝子の全長又は一部の領域の DNA に特異的なプローブは、配列番号 1 3 2 の塩基配列若しくは配列番号 1 3 2 の塩基配列と配列同一性が 9 0 % 以上の塩基配列を含むプローブ、配列番号 1 3 3 の塩基配列若しくは配列番号 1 3 3 の塩基配列と配列同一性が 9 0 % 以上の塩基配列を含むプローブ、及びこれらの組み合わせから選択されるものであってよく、

スタフィロコッカス・アルゲンテウス *n u c* 遺伝子の全長又は一部の領域の DNA に特異的なプローブは、配列番号 1 3 5 の塩基配列又は配列番号 1 3 5 の塩基配列と配列同一性が 9 0 % 以上の塩基配列を含むものであってよく、

ブドウ球菌属の *t u f* 遺伝子の全長又は一部の領域の DNA に特異的なプローブは、配列番号 1 3 7 の塩基配列又は配列番号 1 3 7 の塩基配列と配列同一性が 9 0 % 以上の塩基配列を含むものであってよく、

レンサ球菌属の *r n p B* 遺伝子の全長又は一部の領域の DNA に特異的なプローブは、配列番号 1 4 0 の塩基配列又は配列番号 1 4 0 の塩基配列と配列同一性が 9 0 % 以上の塩基配列を含むものであってよく、

肺炎レンサ球菌の *x i s c o* 遺伝子の全長又は一部の領域の DNA に特異的なプローブは、配列番号 1 3 8 の塩基配列又は配列番号 1 3 8 の塩基配列と配列同一性が 9 0 % 以上の塩基配列を含むものであってよく、

化膿レンサ球菌の *g y r B* 遺伝子の全長又は一部の領域の DNA に特異的なプローブは、配列番号 1 3 9 の塩基配列又は配列番号 1 3 9 の塩基配列と配列同一性が 9 0 % 以上の塩基配列を含むものであってよく、

クレブシエラ・ニューモニエのベータラクタマーゼ *K P C* 遺伝子の全長又は一部の領域の DNA に特異的なプローブは、配列番号 1 4 2 の塩基配列又は配列番号 1 4 2 の塩基配列と配列同一性が 9 0 % 以上の塩基配列を含むものであってよく、

クレブシエラ・ニューモニエのベータラクタマーゼ *N D M* 遺伝子の全長又は一部の領域の DNA に特異的なプローブは、配列番号 1 4 1 の塩基配列

又は配列番号 1 4 1 の塩基配列と配列同一性が 9 0 % 以上の塩基配列を含むものであってよく、

シュードモナス・エルギノーザのベータラクタマーゼ__IMP 8 5 遺伝子の全長又は一部の領域の DNA に特異的なプローブは、配列番号 1 4 4 の塩基配列又は配列番号 1 4 4 の塩基配列と配列同一性が 9 0 % 以上の塩基配列を含むものであってよく、

シトロバクター・フロインディーのベータラクタマーゼ__VIM 遺伝子の全長又は一部の領域の DNA に特異的なプローブは、配列番号 1 4 3 の塩基配列又は配列番号 1 4 3 の塩基配列と配列同一性が 9 0 % 以上の塩基配列を含むものであってよく、

サルモネラ・エンテリカのベータラクタマーゼ__CTX-M 1 遺伝子の全長又は一部の領域の DNA に特異的なプローブは、配列番号 1 4 9 の塩基配列又は配列番号 1 4 9 の塩基配列と配列同一性が 9 0 % 以上の塩基配列を含むものであってよく、

サルモネラ・エンテリカのベータラクタマーゼ__CTX-M 2 遺伝子の全長又は一部の領域の DNA に特異的なプローブは、配列番号 1 5 0 の塩基配列又は配列番号 1 5 0 の塩基配列と配列同一性が 9 0 % 以上の塩基配列を含むものであってよく、

シトロバクター・アマロナティクスのベータラクタマーゼ__CTX-M 8 遺伝子の全長又は一部の領域の DNA に特異的なプローブは、配列番号 1 5 1 の塩基配列又は配列番号 1 5 1 の塩基配列と配列同一性が 9 0 % 以上の塩基配列を含むものであってよく、

大腸菌のベータラクタマーゼ__CTX-M 2 5 遺伝子の全長又は一部の領域の DNA に特異的なプローブは、配列番号 1 5 3 の塩基配列又は配列番号 1 5 3 の塩基配列と配列同一性が 9 0 % 以上の塩基配列を含むものであってよく、

大腸菌のベータラクタマーゼ__CTX-M 9 遺伝子の全長又は一部の領域の DNA に特異的なプローブは、配列番号 1 5 2 の塩基配列又は配列番号 1

52の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよく、

アシネトバクター・バウマンニのベータラクタマーゼ__OXA-23遺伝子の全長又は一部の領域のDNAに特異的なプローブは、配列番号145の塩基配列又は配列番号145の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよく、

アシネトバクター・バウマンニのベータラクタマーゼ__OXA-40遺伝子の全長又は一部の領域のDNAに特異的なプローブは、配列番号146の塩基配列又は配列番号146の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよく、

クレブシエラ・ニューモニエのベータラクタマーゼ__OXA-48遺伝子の全長又は一部の領域のDNAに特異的なプローブは、配列番号147の塩基配列又は配列番号147の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよく、

アシネトバクター・ヘモリティカスのベータラクタマーゼ__OXA-58遺伝子の全長又は一部の領域のDNAに特異的なプローブは、配列番号148の塩基配列又は配列番号148の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよく、

黄色ブドウ球菌のmecA遺伝子の全長又は一部の領域のDNAに特異的なプローブは、配列番号154の塩基配列又は配列番号154の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよく、

エンテロコッカス・ファエカリスのvanA遺伝子の全長又は一部の領域のDNAに特異的なプローブは、配列番号155の塩基配列又は配列番号155の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよく、

エンテロコッカス・フェシウム vanB 遺伝子の全長又は一部の領域のDNAに特異的なプローブは、配列番号156の塩基配列又は配列番号156の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよい

。

[0089] 上記のプロブを用いることで、複数のプロブ間の相互作用が減少し、各領域の増幅の有無を検出する際の特異性及び反応性が向上する。また、同時にハイブリダイゼーション反応する際の、温度及び試薬等の均一な条件下でのハイブリダイゼーション効率も向上する。

[0090] 本実施形態に係る方法における具体的な態様等は、上述した具体的な態様等を制限なく適用できる。

[0091] <キット>

本発明は、一実施形態として、

大腸菌 (*Escherichia coli*) の *gyrB* 遺伝子、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) の *nuc* 遺伝子、表皮ブドウ球菌 (*Staphylococcus epidermidis*) の *atlE* 遺伝子、クレブシエラ・ニューモニエ (*Klebsiella pneumoniae*) の *gyrB* 遺伝子、及びエンテロコッカス属菌 (*Enterococcus spp.*) の *rpoB* 遺伝子の全長又は一部の領域にそれぞれ特異的なPCR用のプライマーのセットを含む第1の試薬と、

各遺伝子の前記全長又は一部の領域のDNAにそれぞれ特異的なプロブの組み合わせを含む第2の試薬とを含む、敗血症の原因細菌を同定するためのキットを提供する。

[0092] 第1の試薬を用いて、上述した<同定方法>におけるPCR法を実施する工程を実施することができる。第1の試薬は、大腸菌の *gyrB* 遺伝子、黄色ブドウ球菌の *nuc* 遺伝子、表皮ブドウ球菌の *atlE* 遺伝子、クレブシエラ・ニューモニエの *gyrB* 遺伝子、及びエンテロコッカス属菌の *rpoB* 遺伝子以外の遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットをさらに含んでもよい。

[0093] 例えば、第1の試薬は、アシネトバクター属菌の *rpoB* 遺伝子、アシネトバクター・バウマンニの *16S-23S ITS* 遺伝子、シトロバクター

属菌のompA遺伝子、エンテロバクター属菌のrpoS遺伝子、クレブシエラ・アエロゲネスのgyrB遺伝子、クレブシエラ・オキシトカのpehX遺伝子、クレブシエラ・バリイコーラのgyrB遺伝子、シュードモナス・エルギノーザのoprL遺伝子、プロテウス属菌のrpoB遺伝子、セラチア・マルセッセンスのhasA遺伝子、リステリア属菌のiap p60遺伝子、スタフィロコッカス・アルゲンテウスのnuc遺伝子、ブドウ球菌属のtuf遺伝子、レンサ球菌属のrnpB遺伝子、肺炎レンサ球菌のxisco遺伝子、及び化膿レンサ球菌のgyrB遺伝子からなる群から選択される1以上の遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットをさらに含んでもよい。

[0094] 例えば、第1の試薬は、薬剤耐性遺伝子である、クレブシエラ・ニューモニエのベータラクタマーゼ__KPC遺伝子、クレブシエラ・ニューモニエのベータラクタマーゼ__NDM遺伝子、シュードモナス・エルギノーザのベータラクタマーゼ__IMP85遺伝子、シトロバクター・フロインディーのベータラクタマーゼ__VIM遺伝子、サルモネラ・エンテリカのベータラクタマーゼ__CTX-M1遺伝子、サルモネラ・エンテリカのベータラクタマーゼ__CTX-M2遺伝子、シトロバクター・アマロナティクスのベータラクタマーゼ__CTX-M8遺伝子、大腸菌のベータラクタマーゼ__CTX-M25遺伝子、大腸菌のベータラクタマーゼ__CTX-M9遺伝子、アシネトバクター・バウマンニのベータラクタマーゼ__OXA-23遺伝子、アシネトバクター・バウマンニのベータラクタマーゼ__OXA-40遺伝子、クレブシエラ・ニューモニエのベータラクタマーゼ__OXA-48遺伝子、アシネトバクター・ヘモリティカスのベータラクタマーゼ__OXA-58遺伝子、黄色ブドウ球菌のmecA遺伝子、エンテロコッカス・ファエカリスのvanA遺伝子、及びエンテロコッカス・フェシウム vanB遺伝子からなる群から選択される1以上の遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットをさらに含んでもよい。

[0095] また、例えば、第1の試薬は、アシネトバクター属菌のrpoB遺伝子、

アシネトバクター・バウマンニの16S-23S ITS遺伝子、シトロバクター属菌のompA遺伝子、エンテロバクター属菌のrpoS遺伝子、クレブシエラ・アエロゲネスのgyrB遺伝子、クレブシエラ・オキシトカのpehX遺伝子、クレブシエラ・バリイコーラのgyrB遺伝子、シュードモナス・エルギノーザのoprL遺伝子、プロテウス属菌のrpoB遺伝子、セラチア・マルセッセンスのhasA遺伝子、リステリア属菌のiap60遺伝子、スタフィロコッカス・アルゲンテウスのnuc遺伝子、ブドウ球菌属のtuf遺伝子、レンサ球菌属のrnpB遺伝子、肺炎レンサ球菌のxisco遺伝子、化膿レンサ球菌のgyrB遺伝子、クレブシエラ・ニューモニエのベータラクタマーゼ__KPC遺伝子、クレブシエラ・ニューモニエのベータラクタマーゼ__NDM遺伝子、シュードモナス・エルギノーザのベータラクタマーゼ__IMP85遺伝子、シトロバクター・フロインディーのベータラクタマーゼ__VIM遺伝子、サルモネラ・エンテリカのベータラクタマーゼ__CTX-M1遺伝子、サルモネラ・エンテリカのベータラクタマーゼ__CTX-M2遺伝子、シトロバクター・アマロナティクスのベータラクタマーゼ__CTX-M8遺伝子、大腸菌のベータラクタマーゼ__CTX-M25遺伝子、大腸菌のベータラクタマーゼ__CTX-M9遺伝子、アシネトバクター・バウマンニのベータラクタマーゼ__OXA-23遺伝子、アシネトバクター・バウマンニのベータラクタマーゼ__OXA-40遺伝子、クレブシエラ・ニューモニエのベータラクタマーゼ__OXA-48遺伝子、アシネトバクター・ヘモリティカスのベータラクタマーゼ__OXA-58遺伝子、黄色ブドウ球菌のmecA遺伝子、エンテロコッカス・ファエカリスのvanA遺伝子、及びエンテロコッカス・フェシウム vanB遺伝子からなる群から選択される1以上の遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットを含んでもよい。

[0096] 上記複数の遺伝子の群から選択される細菌又は遺伝子は、例えば、2種以上、3種以上、5種以上、7種以上、10種以上、15種以上、20種以上、25種以上、28種以上、30種以上、又は32種以上であってよい。ま

た、上記複数の遺伝子の群から選択される細菌又は遺伝子は、例えば、３７種以下、３４種以下、２１種以下、１６種以下、又は１１種以下であってもよい。また、上記複数の遺伝子の群から選択される細菌又は遺伝子は、例えば、２種～４０種、５種～３７種、１０種～３７種、又は１５種～２５種であってもよい。

[0097] 例えば、第１の試薬において、大腸菌の *gyrB* 遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットは、配列番号１０の塩基配列又は配列番号１０の塩基配列と配列同一性が９０％以上の塩基配列を含むプライマーと、配列番号１１の塩基配列又は配列番号１１の塩基配列と配列同一性が９０％以上の塩基配列を含むプライマーとを含むものであってよく、

黄色ブドウ球菌の *nuc* 遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットは、配列番号３２の塩基配列若しくは配列番号３２の塩基配列と配列同一性が９０％以上の塩基配列を含むプライマー、配列番号３４の塩基配列若しくは配列番号３４の塩基配列と配列同一性が９０％以上の塩基配列を含むプライマー、及びこれらの組み合わせから選択される１又は複数のプライマーと、配列番号３３の塩基配列若しくは配列番号３３の塩基配列と配列同一性が９０％以上の塩基配列を含むプライマーとを含むものであってよく、

表皮ブドウ球菌の *atlE* 遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットは、配列番号３７の塩基配列又は配列番号３７の塩基配列と配列同一性が９０％以上の塩基配列を含むプライマーと、配列番号３８又は配列番号３８の塩基配列と配列同一性が９０％以上の塩基配列の塩基配列を含むプライマーとを含むものであってよく、

クレブシエラ・ニューモニエの *gyrB* 遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットは、配列番号１４の塩基配列又は配列番号１４の塩基配列と配列同一性が９０％以上の塩基配列を含むプライマーと、配列番号１５又は配列番号１５の塩基配列と配列同一性が９０％以上の塩基配列の塩基配列を含むプライマーとを含むものであってよく、

エンテロコッカス属菌の *r p o B* 遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットは、配列番号 26 の塩基配列若しくは配列番号 26 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列を含むプライマー、配列番号 27 の塩基配列若しくは配列番号 27 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列を含むプライマー、配列番号 28 の塩基配列若しくは配列番号 28 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列を含むプライマー、及びこれらの組み合わせから選択される 1 又は複数のプライマーと、配列番号 29 の塩基配列若しくは配列番号 29 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列を含むプライマーとを含むものであってよい。

[0098] 上記のプライマーセットを用いることで、プライマー間の相互作用が減少し、各領域を増幅する際の特異性及び反応性が向上する。また、同時に増幅する際の、温度及び試薬等の均一な条件下での増幅効率も向上する。

[0099] また、第 1 の試薬は、大腸菌の *g y r B* 遺伝子、黄色ブドウ球菌の *n u c* 遺伝子、表皮ブドウ球菌の *a t l E* 遺伝子、クレブシエラ・ニューモニエの *g y r B* 遺伝子、及びエンテロコッカス属菌の *r p o B* 遺伝子以外の遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットをさらに含んでもよい。各プライマーについては、＜同定方法＞において上述したとおりである。

[0100] 大腸菌の *g y r B* 遺伝子の全長又は一部の領域の DNA は、配列番号 51 の塩基配列又は配列番号 51 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列を含むものであってよく、

黄色ブドウ球菌の *n u c* 遺伝子の全長又は一部の領域の DNA は、配列番号 61 の塩基配列又は配列番号 61 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列を含むものであってよく、

表皮ブドウ球菌の *a t l E* 遺伝子の全長又は一部の領域の DNA は、配列番号 63 の塩基配列又は配列番号 63 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列を含むものであってよく、

クレブシエラ・ニューモニエの *g y r B* 遺伝子の全長又は一部の領域の DNA は、配列番号 53 の塩基配列又は配列番号 53 の塩基配列と配列同一性

が90%以上の塩基配列を含むものであってよく、

エンテロコッカス属菌の *rpoB* 遺伝子の全長又は一部の領域のDNAは、配列番号59の塩基配列又は配列番号59の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよい。

[0101] 上記の全長又は一部の領域のDNAを用いることで、複数のDNA間の相互作用が減少し、各領域の増幅の有無を検出する際の特異性及び反応性が向上する。

[0102] また、第1の試薬を使用して、大腸菌の *gyrB* 遺伝子、黄色ブドウ球菌の *nuc* 遺伝子、表皮ブドウ球菌の *atlE* 遺伝子、クレブシエラ・ニューモニアの *gyrB* 遺伝子、及びエンテロコッカス属菌の *rpoB* 遺伝子以外の遺伝子の全長又は一部についてPCR法を実施する場合、各遺伝子の全長又は一部の領域のDNAについては、＜同定方法＞において上述したとおりである。

[0103] 第2の試薬は、各遺伝子の上記全長又は一部の領域のDNAにそれぞれ特異的なプローブを含む。第2の試薬を用いて、上述した＜同定方法＞における検出工程を実施することができる。複数の遺伝子の全長又は一部の領域の増幅の有無を検出するため、プローブは、それぞれの遺伝子のDNAに関して類似又は均一な条件下で検出を実施することができるよう設計される。プローブは、増幅したDNAとストリンジェントな条件下でそれぞれハイブリダイズするプローブであってよい。ストリンジェントな条件については＜同定方法＞において上述したとおりである。第2の試薬は、プローブの組み合わせを、例えば混合物として含んでもよく、固体支持体上に固定化された形態で含んでもよい。固体支持体としては、例えば、基板、アレイ、磁性ビーズ、カラム、及び着色ビーズ等が挙げられる。プローブの組み合わせは、マルチプレックスフォーマットで固体支持体上に固定化されていてもよい。

[0104] 第2の試薬に含まれるプローブが、固体支持体上に固定化されている場合、固体支持体は、例えば、それぞれが識別可能な異なる識別子（例えば、ID）を含むプローブが固定化された固体支持体であってもよいし、識別可能

な識別子を含み、各識別子上に各プローブが固定化された固体支持体であってもよい。言い換えると、プローブが、それぞれ異なる識別子を含むか、又は固体支持体上の異なる識別子にそれぞれ結合しているものであってもよい。

[0105] 第2の試薬において、大腸菌の *gyrB* 遺伝子の全長又は一部の領域のDNAに特異的なプローブは、配列番号121の塩基配列又は配列番号121の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよく、黄色ブドウ球菌の *nuc* 遺伝子の全長又は一部の領域のDNAに特異的なプローブは、配列番号134の塩基配列又は配列番号134の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよく、

表皮ブドウ球菌の *atlE* 遺伝子の全長又は一部の領域のDNAに特異的なプローブは、配列番号136の塩基配列又は配列番号136の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよく、

クレブシエラ・ニューモニエの *gyrB* 遺伝子の全長又は一部の領域のDNAに特異的なプローブは、配列番号124の塩基配列又は配列番号124の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むものであってよく、

エンテロコッカス属菌の *rpoB* 遺伝子の全長又は一部の領域のDNAに特異的なプローブは、配列番号129の塩基配列若しくは配列番号129の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプローブ、配列番号130の塩基配列若しくは配列番号130の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプローブ、配列番号131の塩基配列若しくは配列番号131の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプローブ、及びこれらの組み合わせから選択されるものであってよい。

[0106] 上記のプローブを用いることで、複数のプローブ間の相互作用が減少し、各領域を検出する際の特異性及び反応性が向上する。また、同時にハイブリダイゼーション反応する際の、温度及び試薬等の均一な条件下でのハイブリダイゼーション効率も向上する。

[0107] また、第2の試薬は、大腸菌の *gyrB* 遺伝子、黄色ブドウ球菌の *nuc*

遺伝子、表皮ブドウ球菌の *at l E* 遺伝子、クレブシエラ・ニューモニエの *g y r B* 遺伝子、及びエンテロコッカス属菌の *r p o B* 遺伝子以外の遺伝子の全長又は一部の領域の DNA に特異的なプローブをさらに含んでもよい。各プローブについては、＜同定方法＞において上述したとおりである。

[0108] 本実施形態に係るキットは、上記プライマーのセットを用いて PCR 法を実施した際に増幅した DNA が標識を含むようにプライマーのセットが設計されていてもよく、増幅した DNA を標識化するための第 3 の試薬をさらに含んでいてもよい。増幅した DNA が標識を含むように設計されたプライマーは、＜同定方法＞にて具体的に説明したとおりだが、例えば、標識を有するプライマーを使用して PCR 法を実施することで、標識を含む増幅した DNA を得ることができるため、5' 末端、3' 末端又はインターナルに標識を有するようにプライマーが設計されていてよい。例えば、プライマーの 5' 末端がビオチン修飾されていてもよい。増幅 DNA の標識化についても、＜同定方法＞にて具体的に説明したとおりだが、例えば、ビオチン修飾された増幅した DNA を標識化するために、標識アビジンを第 3 の試薬として含んでよい。

[0109] 本実施形態に係るキットは、対象から試料を採取する手段をさらに含んでもよい。試料を採取する手段は、試料の種類等によって異なるが、例えば、試料が血液である場合には採血手段（例えば、採血キット）、試料が尿である場合には採尿容器等が挙げられる。

[0110] 本実施形態に係るキットは、対照から採取した試料を調製するための調製材料をさらに含んでもよい。調製材料としては、例えば、細胞溶解剤、及び DNA 抽出材料等が挙げられる。

[0111] 本実施形態に係るキットは、PCR 標準試薬をさらに含んでもよい。また、キットは、DNA ポリメラーゼ、デオキシヌクレオシド三リン酸 (d N T P)、マグネシウムイオン、1 以上の塩類及び pH バッファからなる群から選択される 1 以上をさらに含んでもよい。これらの試薬は、プライマーとともに第 1 の試薬に含まれていてもよい。

- [0112] 本実施形態に係るキットは、増幅したDNA及び／又はプローブを標識化するための標的化試薬をさらに含んでもよい。標識化試薬としては、例えば、標識アビジンが挙げられる。
- [0113] 本実施形態に係るキットは、検出結果を比較するための対照（例えば、対照試料）をさらに含んでもよい。
- [0114] 本実施形態に係るキットは、敗血症の原因細菌を同定するために用いられ、敗血症の原因細菌を同定する方法を記載した説明書、又はキットに含まれている試薬を使用するための説明書をさらに含んでもよい。
- [0115] プライマー、各遺伝子の標的領域、プローブ等その他の本実施形態に係るキットにおける具体的な態様等は、＜同定方法＞等で上述した具体的な態様等を制限なく適用できる。
- [0116] 本発明は、一実施形態として、
大腸菌のgyrB遺伝子、黄色ブドウ球菌のnuc遺伝子、表皮ブドウ球菌のatlE遺伝子、クレブシエラ・ニューモニエのgyrB遺伝子、エンテロコッカス属菌のrpoB遺伝子、アシネトバクター属菌のrpoB遺伝子、アシネトバクター・バウマンニの16S-23S ITS遺伝子、シトロバクター属菌のompA遺伝子、エンテロバクター属菌のrpoS遺伝子、クレブシエラ・アエロゲネスのgyrB遺伝子、クレブシエラ・オキシトカカのpehX遺伝子、クレブシエラ・バリイコーラのgyrB遺伝子、シュードモナス・エルギノーザのoprL遺伝子、プロテウス属菌のrpoB遺伝子、セラチア・マルセッセンスのhasA遺伝子、リステリア属菌のiap p60遺伝子、スタフィロコッカス・アルゲンテウスのnuc遺伝子、ブドウ球菌属のtuf遺伝子、レンサ球菌属のrnpB遺伝子、肺炎レンサ球菌のxisco遺伝子、化膿レンサ球菌のgyrB遺伝子、クレブシエラ・ニューモニエのベータラクタマーゼ_KPC遺伝子、クレブシエラ・ニューモニエのベータラクタマーゼ_NDM遺伝子、シュードモナス・エルギノーザのベータラクタマーゼ_IMP85遺伝子、シトロバクター・フロインディーのベータラクタマーゼ_VIM遺伝子、サルモネラ・エンテリカのベ

ータラクタマーゼ__CTX-M1 遺伝子、サルモネラ・エンテリカのベータラクタマーゼ__CTX-M2 遺伝子、シトロバクター・アマロナティクスのベータラクタマーゼ__CTX-M8 遺伝子、大腸菌のベータラクタマーゼ__CTX-M25 遺伝子、大腸菌のベータラクタマーゼ__CTX-M9 遺伝子、アシネトバクター・バウマンニのベータラクタマーゼ__OXA-23 遺伝子、アシネトバクター・バウマンニのベータラクタマーゼ__OXA-40 遺伝子、クレブシエラ・ニューモニエのベータラクタマーゼ__OXA-48 遺伝子、アシネトバクター・ヘモリティカスのベータラクタマーゼ__OXA-58 遺伝子、黄色ブドウ球菌の *mecA* 遺伝子、エンテロコッカス・ファエカリスの *vanA* 遺伝子、及びエンテロコッカス・フェシウム *vanB* 遺伝子からなる群から選択される2種以上の細菌の遺伝子及び／又は薬剤耐性遺伝子の全長又は一部の領域にそれぞれ特異的なプライマーのセットを含む第1の試薬と、

上記全長又は一部の領域のDNAにそれぞれ特異的なプローブの組み合わせを含む第2の試薬とを含む、敗血症の原因細菌及び／又は薬剤耐性遺伝子を同定するためのキットも提供する。

[0117] 上記複数の遺伝子の群から選択される細菌又は遺伝子は、例えば、5種以上、10種以上、15種以上、20種以上、25種以上、28種以上、30種以上、32種以上、35種以上又は37種であってよい。上記複数の遺伝子の群から選択される細菌の遺伝子は、例えば、3種以上、5種以上、7種以上、10種以上、12種以上、15種以上、17種以上、19種以上又は21種以上であってよい。また上記複数の遺伝子の群から選択される薬剤耐性遺伝子は、例えば、3種以上、5種以上、7種以上、10種以上、12種以上、14種以上、16種以上であってよい。また、上記複数の遺伝子の群から選択される細菌又は遺伝子は、例えば、37種以下、34種以下、21種以下、16種以下、又は11種以下であってもよい。また、上記複数の遺伝子の群から選択される細菌又は遺伝子は、例えば、2種～40種、5種～37種、10種～37種、又は15種～25種であってもよい。

[0118] 本実施形態に係るキットにおける具体的な態様等は、上述した具体的な態様等を制限なく適用できる。

[0119] <敗血症の診断方法及び診断補助方法並びに治療方法>

本発明は一実施形態として、敗血症の原因細菌を同定することを含む、敗血症の診断又は診断補助方法も提供する。敗血症の原因細菌を同定する方法については、<同定方法>において上述したとおりである。

[0120] 一例として、本実施形態の敗血症の診断方法は、対象から採取した試料と、

大腸菌の *gyrB* 遺伝子、黄色ブドウ球菌の *nuc* 遺伝子、表皮ブドウ球菌の *atlE* 遺伝子、クレブシエラ・ニューモニエの *gyrB* 遺伝子、及びエンテロコッカス属菌の *rpoB* 遺伝子の全長又は一部の領域にそれぞれ特異的なプライマーのセットの組み合わせとを用いて、PCR法を実施する増幅工程、

上記全長又は一部の領域のDNAにそれぞれ特異的なプローブの組み合わせを用いて、上記全長又は一部の領域の増幅の有無を検出する工程、並びに原因細菌が同定された場合には、敗血症であるか、又は敗血症の疑いがあると診断する工程を含んでよい。

[0121] また、一例として、本実施形態の敗血症の診断補助方法は、対象から採取した試料と、

大腸菌の *gyrB* 遺伝子、黄色ブドウ球菌の *nuc* 遺伝子、表皮ブドウ球菌の *atlE* 遺伝子、クレブシエラ・ニューモニエの *gyrB* 遺伝子、及びエンテロコッカス属菌の *rpoB* 遺伝子の全長又は一部の領域にそれぞれ特異的なプライマーのセットの組み合わせとを用いて、PCR法を実施する増幅工程、

上記全長又は一部の領域のDNAにそれぞれ特異的なプローブの組み合わせを用いて、上記全長又は一部の領域の増幅の有無を検出する工程、並びに原因細菌が同定された場合には、敗血症であるか、若しくは敗血症の疑いがあるとの指標を提供する工程を含んでよい。

- [0122] 敗血症の原因細菌を同定した場合には、その同定した細菌を原因とする敗血症であるか、若しくは敗血症の疑いがあると診断するか、又は、同定した細菌を原因とする敗血症であるか、若しくは敗血症の疑いがあるとの指標を提供することで診断補助することもできる。
- [0123] 本実施形態に係る診断又は診断補助方法は *In vitro* で実施することができる。
- [0124] 本発明は一実施形態として、敗血症の原因細菌を同定することを含む、敗血症の治療方法も提供する。敗血症の原因細菌を同定する方法については、＜同定方法＞において上述したとおりである。
- [0125] 本実施形態の治療方法は、上述した診断又は診断補助方法により、敗血症であるか、若しくは敗血症の疑いがあると診断又はその指標を提供された対象に対して、敗血症の治療をする工程を含んでもよい。また、治療方法は、同定された原因細菌に基づき、適切な治療を選択する工程を含んでもよい。さらに、薬剤耐性遺伝子も同定された場合には、同定された原因細菌及び薬剤耐性遺伝子に基づき、適切な治療を選択する工程を含んでもよい。
- [0126] 本実施形態に係る診断方法及び診断補助方法並びに治療方法における具体的な態様等は、上述した具体的な態様等を制限なく適用できる。

実施例

- [0127] [実施例 1 大腸菌検出のためのプライマー及びプローブの開発]

敗血症パネルに含まれる菌種を検出するためのプライマー及びプローブを菌種項目ごとに開発した。代表例として、大腸菌 (*Escherichia coli*) のゲノム DNA を検出するためのプライマー及びプローブの具体的な開発の方法について説明する。なお、本実施例の検出方法は、細菌のゲノム DNA の標的遺伝子を PCR 増幅する工程と増幅した PCR 産物を基板上のプローブによって検出する工程とを含む。

- [0128] 1. プライマーの開発と選定

大腸菌ゲノム DNA の遺伝子 (*gyrB*) の特定の領域を増幅するために

、2種類のプライマーセットを候補として設計した。以下の表に示すプライマーセット1及び2のそれぞれと、大腸菌由来ゲノムDNAを用いてPCR反応液を調製し、Light Cycler（登録商標）480 II（Roche社）を用いて、リアルタイムPCRによる増幅を行った。増幅に用いた試薬はTakara multiplex assay kit Ver 2（タカラバイオ社）、インターカレーター色素に20xEvaGreen（biotium社）を使用した。各プライマーは終濃度0.2μMとなるように添加し、Takara multiplex assay kit Ver 2内の2xMultiplex PCR Bufferは1x、Multiplex PCR Enzyme Mixは1Uを使用し、鋳型として大腸菌のゲノムDNAを混合してPCR反応液を調製した。

[0129] [表4]

プライマーセット	プライマー名称	配列 (5'→3')	配列番号
1	E.coli_468F19	GGTTACCGGCGAGACTGAA	10
	E.coli_567R18	GACAACTCACGCAGACGT	11
2	E.coli_1969F17	CAAAACCTGTTCGAGCC	157
	E.coli_2093R18	CTTCTTCCAGCAAGCCAC	158

[0130] 以下の条件で増幅反応を行った。

変性工程：94℃ 30秒

アニーリング工程：60℃ 60秒→94℃ 30秒（サイクル数40回）

伸長工程：72℃ 600秒

[0131] PCR反応液の組成は以下の表のとおりである。

[表5]

PCR反応液組成		
PCR mix	使用量/μL	終濃度
Multiplex PCR Enzyme Mix	0.1	1 U
2xMultiplex PCR Buffer	10	1x
20μM フォワードプライマー	0.2	0.2 μM
20μM リバースプライマー	0.2	0.2 μM
鋳型	2	–
20xEvaGreen	1	1x
dH ₂ O	6.5	
total	20	

[0132] 2. 結果

プライマーセット1及び2それぞれの増幅曲線の結果を図1に示す。リアルタイムPCRを用いた検討の結果、プライマーセット1は、大腸菌の鋳型に対して増幅曲線の早い立ち上がりが見られた。プライマーセット1は、大腸菌の標的遺伝子を増幅できることが示された。プライマーセット2では、大腸菌の鋳型に対する増幅曲線の立ち上がりは遅くプラトーに達していないことから、十分なPCR産物の増幅は見られなかった。これより、プライマーセット2では、大腸菌の標的遺伝子を選択的に増幅させるためのプライマーの機能は不十分であることが示された。以上の結果から、大腸菌を同定するためのプライマーとして、プライマーセット1 (E. coli__468F19/E. coli__567R18)を採用した。

[0133] 3. プローブの開発と選定

増幅されたPCR産物を基板上のプロープによって検出する工程に用いるためのプロープについて、以下のように複数の候補プロープを評価し、敗血症の原因細菌同定に用いるプロープを決定した。

リアルタイムPCRの検討では、プライマーセット1は、大腸菌の鋳型を対象にPCRを行うことによって、大腸菌の標的遺伝子に特異的なPCR産物を得られることが示された。このPCR産物を検出するためのプロープとして、E. coli__531P16及びE. coli__526P15を設計

した。

プライマーセット1では、大腸菌の鋳型を対象に、PCRによる増幅及び基板上のプロープとのハイブリダイゼーション反応及び標識化、蛍光測定を行った。このとき、リバースプライマーには5'末端側にリンカーを介しビオチン修飾を行ったプライマーを使用した。候補となるプロープの配列番号及び配列については以下の表に示す。測定手順は以下の検出工程の概要に示す。

[0134] [表6]

プロープ名称	配列 (5'→3')	配列番号
E.coli_531P16	TTTTTTTTTCAATGTGACCGAGTTC	121
E.coli_526P15	TTTTTTTTTTTTTCAACCAATGTGACC	159

[0135] 検出工程の概要

(1) PCR増幅反応

大腸菌のゲノムDNAを鋳型として、以下の条件でPCR増幅反応を行った。

変性工程：94℃ 30秒

アニーリング工程：60℃ 60秒→94℃ 30秒（サイクル数30回）

伸長工程：72℃ 600秒

[0136] PCR反応液の組成は以下の表のとおりである。

[表7]

PCR反応液組成		
PCR mix	使用量/μL	終濃度
Multiplex PCR Enzyme Mix	0.1	1 U
2xMultiplex PCR Buffer	10	1x
20uM フォワードプライマー	0.2	0.2 uM
20uM リバースプライマー	0.2	0.2 uM
鋳型	5	—
dH ₂ O	4.5	
total	20	

[0137] (2) PCR産物の熱変性

基板上に固定化されたプローブにPCR産物を供する前に、以下の条件で熱変性反応を行った。

熱変性条件：95℃ 5分、その後4℃へ急冷

[0138] (3) 基板上のプローブとPCR産物のハイブリダイゼーション反応及び標識化

基板上に固定化された各プローブ（表6参照）とPCR産物とのハイブリダイゼーション反応を行った。反応液には、Saline-sodium-phosphate-EDTA buffer (SPE-buffer) を含んでいる。基板上のプローブによって捕捉されたPCR産物は5'末端側にビオチン修飾されており、それをStreptavidin-Phycoerythrin (PlexBio社) によって標識化した。基板上でのハイブリダイゼーション反応及び標識化は、PlexBio社の機器であるIntelliPlex 1000 πcode Processorを用いて以下の条件で行った。

ハイブリダイズ条件：37℃ 20分インキュベート

標識化条件：37℃ 10分インキュベート

[0139] (4) 基板上で標識化されたPCR産物の検出

各基板上には識別できるIDが付与されており、各IDに特定のプローブが固定化されている。各プローブに対応するPCR産物が基板上で捕捉され、そのPCR産物は標識化される。基板上で標識化されたPCR産物は、蛍光を発するため検出器によって蛍光値を測定することができる。蛍光測定装置(100 Fluorescent Analyzer PlexBio社)を用いて蛍光値を測定した。PlexBio社の100 Fluorescent Analyzerは、基板のIDの識別と基板単位での蛍光値の測定が可能であるため、特定のプローブが固定化された基板の蛍光値を測定することにより、PCR産物に対するプローブの反応性を評価することができる。

[0140] 4. 結果

プライマーセット1 (E. coli__468F19/E. coli__567R18) を用いて、大腸菌ゲノムDNAを鋳型として得たPCR産物を、2種のプローブ (E. coli__531P16及びE. coli__526P15) によって評価した結果を図2に示す。E. coli__526P15が9000以下の蛍光値であった一方、E. coli__531P16は40000以上の蛍光値を示していた。これより、E. coli__531P16を用いた場合に、有意に大腸菌のPCR産物を検出できることが示された。

[0141] 以上の結果から、プライマーセット1と、プローブとしてE. coli__531P16を利用することで大腸菌を検出できることが示された。

[0142] [実施例2 シトロバクター属菌検出のためのプライマー及びプローブの開発]

もう一つの代表例として、シトロバクター属菌 (*Citrobacter* spp.) のゲノムDNAを検出するためのプライマー及びプローブの具体的な開発の方法について説明する。本実施例の検出方法も、実施例1と同様に、細菌のゲノムDNAの標的遺伝子をPCR増幅する工程と増幅したPCR産物を基板上のプローブによって検出する工程を含む。

[0143] 1. プライマーの開発と選定

シトロバクター属菌DNAの遺伝子 (ompA) の特定の領域を増幅するために、3種類のプライマーセットを候補として設計した。以下の表に示すプライマーセット1、2及び3と、シトロバクター・フロインディー (*Citrobacter freundii*) 由来ゲノムDNA及びシトロバクター・コセリ (*Citrobacter koseri*) 由来ゲノムDNAのそれぞれを鋳型として用いてPCR反応液を調製し、Light Cycler (登録商標) 480 II (Roche社) を用いて、リアルタイムPCRによる増幅を行った。増幅に用いた試薬はTakara multiplex assay kit Ver2 (タカラバイオ社)、インターカラー色素に20xEvaGreen (biotium社) を使用した。各プライマーは終濃度0.2µM、TemplateのゲノムDNAは1µg

／Lとなるように添加し、Takara multiplex assay kit Ver2内の2xMultiplex PCR Bufferは1x、Multiplex PCR Enzyme Mixは1Uを使用し、鋳型DNAを混合してPCR反応液を調製した。

[0144] [表8]

プライマーセット	プライマー名称	配列 (5'→3')	配列番号
1	C. spp_449F17	GCTGCTTCTTCCTGCTG	5
	C. spp_551R19	GTCTGGAATACCAGTGGAC	7
2	C. spp_443F18S	CAGCTTSTTCCTGCTGAC	6
	C. spp_551R19	GTCTGGAATACCAGTGGAC	7
3	C. spp_568F18	TCYGATAGCCAGCCGATG	160
	C. spp(3)_670R18	CATTGCGTGGGTCAGTTT	161

[0145] 以下の条件で増幅反応を行った。

変性工程：94℃ 30秒

アニーリング工程：60℃ 60秒→94℃ 30秒（サイクル数40回）

伸長工程：72℃ 600秒

[0146] PCR反応液の組成は以下の表のとおりである。

[表9]

PCR 反応液組成

PCR mix	使用量/μL	終濃度
Multiplex PCR Enzyme Mix	0.1	1 U
2xMultiplex PCR Buffer	10	1x
20uM フォワードプライマー	0.2	0.2 uM
20uM リバースプライマー	0.2	0.2 uM
鋳型	2	—
20xEvaGreen	1	1x
dH ₂ O	6.3	
total	20	

[0147] 2. 結果

上記プライマーセット1、2及び3のそれぞれの各鋳型における増幅曲線の結果を図3～図5に示す。リアルタイムPCRを用いた検討の結果、プライマーセット1は、シトロバクター・フロインディー、シトロバクター・コセリの鋳型に対して増幅曲線の早い立ち上がりが見られた。プライマーセット1は、シトロバクター・ブラアキイ (*Citrobacter braakii*)、シトロバクター・ヤングエ (*Citrobacter youngae*)、シトロバクター・ウェルクマニイ (*Citrobacter werkmanii*) の標的遺伝子にも配列設計上マッチするため、シトロバクター属菌の標的遺伝子を増幅できることが示された。プライマーセット2では、シトロバクター・コセリ、シトロバクター・フロインディーにおいて、増幅曲線が立ち上がっているが立ち上がりは比較的遅く、プラトーに達していなかった。プライマーセット3では、シトロバクター・コセリの鋳型に対して選択的に増幅曲線が立ち上がっていたが、シトロバクター・フロインディーの鋳型に対しては、十分なPCR産物の増幅はみられなかった。これより、プライマーセット3では、シトロバクター属菌の標的遺伝子を選択的に増幅させるためのプライマーの機能は不十分であることが示された。

[0148] プライマーセット2は、シトロバクター・フロインディー及びシトロバクター・コセリの標的遺伝子に対する配列網羅性は低い、シトロバクター・フロインディー、シトロバクター・コセリ以外のシトロバクター属菌標的遺伝子の配列網羅性が高くなるように設計している。つまり、プライマーセット1と2の両方を反応系に用いることにより、シトロバクター属菌の標的遺伝子を網羅的かつ選択的に増幅させることができる。シトロバクター属菌のゲノムDNAを検出するために用いるプライマーとして、3種 (*C. spp*__449F17、*C. spp*__443F18、*C. spp*__551R19) を採用した。

[0149] 3. プローブの開発と選定

増幅されたPCR産物を基板上のプロープによって検出する工程に用いる

ためのプローブについて、以下のように複数の候補プローブを評価し、敗血症の原因細菌同定に用いるプローブを決定した。

- [0150] リアルタイムPCRの検討では、シトロバクター・フロインディー及びシトロバクター・コセリの鋳型を対象にPCRを行うことによって、シトロバクター属菌に特異的なPCR産物を得られることが示された。このPCR産物を検出するためのプローブとして、C. spp_24P17R、C. spp_55P15Y及びC. spp_65P19Rを設計した。
- [0151] プライマーセット1ではシトロバクター・フロインディー及びシトロバクター・コセリの鋳型を対象に、PCRによる増幅及び基板上のプローブとのハイブリダイゼーション反応及び標識化、蛍光測定を行った。このとき、リバースプライマーには5'末端側にリンカーを介しビオチン修飾を行ったプライマーを使用した。候補となるプローブの配列番号及び配列については以下の表に示す。測定手順は以下の検出工程の概要に示す。

[0152] [表10]

プローブ名称	配列 (5'→3')	配列番号
C. spp_24P17R	TTTTTTTTGAAACGGTARGAAACAC	119
C. spp_55P15Y	TTTTTTTTTTCCGTTATCYGGACGA	162
C. spp_65P19R	TTTTTTGACGACCRCCAACGGTGTT	163

[0153] 検出工程の概要

(1) PCR増幅反応

シトロバクター・フロインディー及びシトロバクター・コセリのゲノムDNAを鋳型として、以下の条件でPCR増幅反応を行った。

変性工程：94℃ 30秒

アニーリング工程：60℃ 60秒→94℃ 30秒（サイクル数30回）

伸長工程：72℃ 600秒

[0154]

[表11]

PCR 反応液組成		
PCR mix	使用量/ μ L	終濃度
Multiplex PCR Enzyme Mix	0.1	1 U
2xMultiplex PCR Buffer	10	1x
20 μ M フォワードプライマー	0.2	0.2 μ M
20 μ M リバースプライマー	0.2	0.2 μ M
鋳型	5	—
dH ₂ O	4.5	
total	20	

[0155] (2) PCR産物の熱変性

基板上に固定化されたプローブにPCR産物を供する前に、以下の条件で熱変性反応を行った。

熱変性条件：95℃ 5分、その後4℃へ急冷

[0156] (3) 基板上的プローブとPCR産物のハイブリダイゼーション反応及び標識化

基板上に固定化された各プローブ（表10参照）とPCR産物とのハイブリダイゼーション反応を行った。反応液には、Saline-sodium-phosphate-EDTA buffer (SSPE-buffer) を含んでいる。基板上的プローブによって捕捉されたPCR産物は5'末端側にビオチン修飾されており、それをStreptoavidin-Phycoerythrin (PlexBio社) によって標識化した。基板上的のハイブリダイゼーション反応及び標識化は、PlexBio社の機器であるIntelliPlex 1000 π code Processor を用いて以下の条件で行った。

ハイブリダイズ条件：37℃ 20分インキュベート

標識化条件：37℃ 10分インキュベート

[0157] (4) 基板上で標識化されたPCR産物の検出

各基板上には識別できるIDが付与されており、各IDに特定のプローブが固定化されている。各プローブに対応するPCR産物が基板上で捕捉され、そのPCR産物は標識化される。基板上で標識化されたPCR産物は、蛍光を発するため検出器によって蛍光値を測定することができる。実施例1と同様に蛍光測定装置（100 Fluorescent Analyzer PlexBio社）を用いて蛍光値を測定した。

[0158] 4. 結果

プライマーセット1（C. spp__449F17R／C. spp__551R19R）を用いて、シトロバクター・フロインディー及びシトロバクター・コセリのゲノムDNAを鋳型として得たPCR産物を、3種のプローブ（C. spp__24P17R、C. spp__55P15Y及びC. spp__65P19R）によって評価した結果を図6に示す。シトロバクター・フロインディー及びシトロバクター・コセリでは、C. spp__55P15Y及びC. spp__65P19Rが、2000以下の蛍光値であった一方、C. spp__24P17Rは6000以上の蛍光値を示していた。なお、水を鋳型とした場合には、いずれのプローブを用いた場合にも蛍光値は確認されなかった。これより、C. spp__24P17Rを用いた場合に、有意にシトロバクター属菌のPCR産物を検出できることが示された。

[0159] 以上の結果から、プライマーセット1と、プローブとしてC. spp__24P17Rを利用することでシトロバクター属菌を検出できることが示された。

[0160] [実施例3 マルチプレックス系におけるプライマー及びプローブの性能評価]

ここまでの検討で、大腸菌のゲノムDNAを検出するために用いるプライマーとしてE. coli__468F19／E. coli__567R18を選定した。プローブについては、反応性の評価からプローブE. coli__531P16を選定した。また、シトロバクター属菌のゲノムDNAを検出するために用いるプライマーとしてC. spp__449F17、C. spp__

4 4 3 F 1 8 及び C. s p p _ 5 5 1 R 1 9 を選定した。プローブについては、反応性の評価から C. s p p _ 2 4 P 1 7 R を選定した。大腸菌及びシトロバクター属菌以外の細菌種においても、同様の手順でプライマー及びプローブを開発した。また、同様の手順で細菌の薬剤耐性遺伝子（AMR）を同時项目的に検出するためのプライマー及びプローブを開発した。

[0161] 細菌の標的遺伝子を検出するために選定したプライマーのセット、及びプライマーのセットにより増幅される DNA の配列を表 1 2 に示す。

[0162] [表12]

菌種	標的 遺伝 子名	プライマー 名称	プライマー配列 (5'→3')	配 列 番 号	増幅される DNA (ビオチン 付加の Rev 鎖表記) 配列 5'→3'	配 列 番 号
アシネト バクテ ー 属菌	rpoB	A.spp_3923 F21	CAGCATTGCC AGAATAACTT TC	1	GATCCGTAAGAATTTTG GTAAATTGCCCCAAGTA ATGGATGCACCGTACTT ATTATCGATTTCAGGTCG ATTCGTACAGAACATTCT	47
		A.spp_4056 R25Y	GATYCGTAAG AATTTTGGTA AATTG	2	TGCAAGATGGCAAATCA CCAAAAAACCGCAAGA TATCGGTCTCCAAGCCG CATTTCTGTTCAGTTTTTC CTATCGAAAGTTATTCTG GCAATGCTG	
アシネト バクテ ー・バウ マンニ	16S- 23S ITS	A.bau_373F 23	TGATCTGACG AAGACACATT AAC	3	ATTTTCAGTTTAGAGCACT GTGCACTTAAGCACCGT ACAGCTTCAATCTAAATT CACATACCAAACGCTT GATTCAGTTAATTTGCTA	48
		A.bau_552R 22	ATTTTCAGTTT AGAGCACTGT GC	4	GTTCTCAATTCATCTAGA TTAATTGCTTAACCTAAA CTCTTGAGTGAACAATTT ATTTTCAGACTCAATTTTG CCAATCTGTTAATGAGTT AATGTGTCTTCGTCAGAT CA	

シトロバ クター属 菌	ompA	C. spp_449F17	GCTGCTTCTT CCTGCTG	5	GTCTGGAATACCAGTGG ACTAACAACATCGGCGA CGCAAACACCGTTGGCG GTCGTCCAGATAACGGC CTGCTGAGCGTTGGTGT TTCCTACCGTTTCGGCC AGCAGGAAGAAGCAGC	49
		C. spp_443F18 S	CAGCTTSTTC CTGCTGAC	6		
		C. spp_551R1 9	GTCTGGAATA CCAGTGGAC	7		
エンテロ バクター 属菌	rpoS	Enb.spp_21 6F17	GGCCGAAGA AGAAGTCT	8	GCGGATGAGACCTAAGT TGCCCTCTTCAATCAGA TCCAGCAGAGCCAGACC ACGATTGCCGTAACGGC GGGCAATTTTCACGACC AGTCGCAGGTTACTTTC GATCATGCGACGACGCG AGGCAACATCACCACGC AAAGCACGACGTGCGAA ATAGACTTCTTCTTCGG CC	50
		Enb.spp_36 9R19	GCGGATGAG ACCTAARTTG	9		
大腸菌	gyrB	E.coli_468F 19	GGTTACCGG CGAGACTGA A	10	GACAACTCACGCAGACG TTTCGCCAGAATTCATA TTCGAACTCGGTCACAT TGGTGAAGGTTTCGAGG CTGGGCCAGAAACGCAC CATGGTGCCGGTTTTTT CAGTCTCGCCGGTAACC	51
		E.coli_567R 18	GACAACTCAC GCAGACGT	11		

クレブシ エラ・ア エロゲ ネス	gyrB	K.aer_2097 F18	GCGTCGTCTT CGATAAGC	12	GAAGTTTGATATTCGTGA AAACAGCGAGCTGCAGC AGTTCGAGCCCATCGTG CGCGTGCGTACCCACGG CGTCGATACCGACTACC	52
		K.aer_1941 R25	GAAGTTTGAT ATTCGTGAAA ACAG	13	CGTTGGATAACGAGTTC ATCACCGGCGCGGAATA TCGCCGCATCTGCACCC TCGGCGAGAAGCTGCGT GGGCTTATCGAAGACGA CGC	
クレブシ エラ・ニ ューモニ エ	gyrB	K.pne_1886 F19	GGTGAACAC CCTGGTCTC	14	GATATTCCGGCCCCATA ATGAACTCGTTATCCAG CGGATAGTCGGTATCCA CGCCGTGGGTACGTACG CGAATAACCGGCTCAAA	53
		K.pne_2043 R20	GATATTCCGG CCCCATAATG	15	ATGCTGCAGTTCTTTGTT CTCGTGGAGATCGAATT TCCACTGGCTGCCGTGC TGTTCTTTCTCGTTCAGC TCGGAGACCAGGGTGTT CACC	
クレブシ エラ・オ キシトカ	pehX	K.oxy_261F 17	CCATTTCGGC TACCGTC	16	CGATGAAAGATATCGCC AAAGAGCCGTTTCGTTTTT ACTATCAAATACAGCGC CGACGTGAATGATACGA CCCCTGCCGACGAGCCC	54
		K.oxy_423R 21	CGATGAAAGA TATCGCCAAA G	17	GCTCAGTTCCGCGACGT TCAGGTGCAGGACGTCA CCGTCGATGGTACTTCG GCTAAGCACAGCATCCT GATTGACGGCATGACGG TAGCCGAAATGG	

クレブシ エラ・バ リイコー ラ	gyrB	K.var_1886 F18	GGTGAACAC CCTGGTTTC	18	CGATATTCCGGCCCCAT GATGAACTCGTTATCCA GCGGATAGTCGGTATCC ACCCCGTGGGTACGGAC GCGGATAATCGGCTCAA	55
		K.var_2046 R18	CGATATTCCG GCCCCATG	19	ACTGCTGCAATTCACCG TTCTCGCGGACATCAAA TTTCCACTGGCTGCCGT GCTGCTCTTTCTCATTCA GCTCGGAAACCAGGGTG TTCACC	
シュード モナス・ エルギノ ーザ	oprL	Pse.aer_43 0F18	GGTAAAGAG CGTCCGGTC	20	TTACTTCTTCAGCTCGAC GCGACGGTTCTGAGCCC AGGACTGCTCGTCGTGG	56
		Pse.aer_48 9R19	TTACTTCTTC AGCTCGACG	21	CCGGTAGCGACCGGACG CTCTTTACC	
プロテウ ス属菌	rpoB	Pro.spp_23 56F20Y	CAACTCACTA YGGTCGTGTG	22	CATCTGTTACAGCGTTG TTTTCTACAACACGGTAA GGCGTTTCTAAGAATCC GTA CTGTTAGTCTGTG	57
		Pro.spp_22 26R22	CATCTGTTAC AGCGTTGTTT TC	23	CATAAACAGATAATGAG TTAATCAGACCGATATTT GGACCTTCAGGTGTTTC GATTGGACACACACGAC CATAGTGAGTTG	
セラチ ア・マル セツセン ス	hasA	Ser.mar_34 9F17Y	GGCCTGAAC CTCAGYAG	24	CCGTAGTCGTCGAGGAT GCCGTTTCAGCGCGGTTT CCAGCGCGCCGGTATCG	58
		Ser.mar_45 9R19	CCGTAGTCGT CGAGGATG	25	CCGGACATCAGGCCGTA CACCACCTGGTGACCA CGCCATCGTGGCCCTGC GCCTGCAGGCTGCTGAG GTT CAGGCC	

エンテロ コッカス 属菌	rpoB	Enc.fae_12 1F23	AGTCCCTCAT CTAAAAACCA TTG	26	AGCTTGGCTGGACACGT AGTAAAATACGGAAAGC ATCGCGAACGTAGAAGT TTCGCACGTATCAGTGA AGTATTGGAATTACCAA ATTTAATTGAA	59
		Enc.spp_35 66F24Y	TCAATCAAAT TCGGTAATTC YAAT	27		
		Enc.spp_35 63F23Y	CGATCAAATT YGGTAATTCC AAC	28		
		Enc.spp_36 39R18R	ARCTTGGCTG GACACGTA	29		
リステリ ア属菌	iap p60	L.spp_444F 25	ATGAATATGA AAAAAGCAAC TATCG	30	GCGATACCCCAAAGAGT ATCACCAGCTTCAACTA CTACAGTGCTTGCGGAT GCGATTGTTGGAGCAGC AAATGCTGTTACCGCAA TCCCAGCTGTAGCCGCG ATAGTTGCTTTTTTCATA TTCAT	60
		L.spp_551R 20W	GCGATACCC CAAAGWGTA TC	31		
黄色ブド ウ球菌	nuc	Sta.aur_566 F21W	GTAGCGAAA WAGAAAAAC CTC	32	ATACTTATTAAGTGCTGG CATATGTATGGCAATTGT TTCAATATTACTTATAGG GATGGCTATCAGTAATG TTTCGAAAGAACAATAC GCAAAGAGGTTTTTCTTT TTCGCTAC	61
		Sta.aur_656 R24	ATACTTATTA AGTGCTGGC ATATG	33		
		Sta.sch_22 6F25Y	TTCAACTTCA ATTTTYTTAG CATTC	34		

スタフィ ロコッカ ス・アル ゲンテ ウス	nuc	Sta.arg_226 F25	TTCCACTTCT ATTTTCTTAG CATTG	35	ATTAATTGATACGCCTGA AACGAAACATCCTAAAA AAGGCGTTGAAAAATAT GGCCCAGAAGCAAGTGC	62
		Sta.arg_319 R22Y	ATTAATTGAT ACGCCYGAAA CG	36	ATTTACGAAGAATATGGT AGAGAATGCTAAGAAAA TAGAAGTGGAA	
表皮ブド ウ球菌	atlE	Sta.epi_409 F20	AGTTGAGACA GGAAATGGTC	37	AGGAGTGGTCCAATTCT TCTGTTTAGCAAACTCT TACCAGTCTTTACAGCA TCTTCATCAAAAGCACC	63
		Sta.epi_544 R19	AGGAGTGGT CCTTCTTC	38	AATACCAAAAAAGTTATA ATAGTGATGGTTACCTTC TTTAATTCCTTTTGATAA ATCTGATTGACCATTTC TGTCTCAACT	
ブドウ球 菌属	tuf	Sta.spp_59 5F20Y	TACATYCCAA CTCCAGAAC G	39	ACTTTGATTTGACCACGT TCAACACGGCCTGTAGC AACAGTACCACGACCAG TGATTGAGAATACGTCC	64
		Sta.spp_69 7R20	ACTTTGATTT GACCACGTTC	40	TCAACTGGCATCATGAA TGGTTTGTGAGAATCAC GTTCTGGAGTTGGAATG TA	

レンサ球菌属	rnpB	Str.spp_rnp B F20	ATGAGGAAAG TCCATGCTAG	41	TTGGGTTGCTAGCTTGA GGGGTTTACCGCGTTCC ACTCTCTCTGTTTCCAGA AAGACTTCGTCACTGTG GCACTTTCAAGCCTACT CTGGCCTATCCAAGGAC TTAGCCATTTCAACTGC CGTAACGATTTCTCGTC CCTAGGCTTATGGTTTC GCCTAGCACAAACACTA CAGGCATCACAGCCTGT GCTAGCATGGACTTTCC TCATGAGAAGCAATTCT CCTCACGCGATTATCCA AAAAT	65
		Str.spp_rnp B R18	TTGGGTTGCT AGCTTGAG	42		
肺炎レンサ球菌	xisco	Str.pneu_37 1F21	CCTTTGATTT CATCCTGCTT G	43	CACAAAACCTCAGCTCAA TCACAAGCTTCTAAGCA ATTAGCTACTGAAAAAG AATCAGCTAAAAATGCC	66
		Str.pneu_45 9R21	CACAAAACCTC AGCTCAATCA C	44	ATTGAAAAAGCAGCCAA GAACAAGCAGGATGAAA TCAAAGG	
化膿レンサ球菌	gyrB	Str.pyo_162 3F22	GCCACCTATT TATGGTGTTA AG	45	AACGATTTTCAGGATCC ATAGTAGTTTCCCAAAGT TGATGGTCATCCATTTT CCCAAGACCTTTATAAC GTTGAACAGTTGGTTTTG AACGACCAATACTATATT TTTCAAGAGCTGTTTTTA ATTGGTCTTCTTGATCAA TACCTGGCTGAATGTAC TCTTTAATCTCACTACCG ACCTTAACACCATAAATA GGTGGC	67
		Str.pyo_180 0R23	AACGATTTTC AGGATCCATA GTA	46		

[0163] 細菌の薬剤耐性遺伝子を検出するために選定したプライマーのセット及び

プライマーのセットにより増幅されるDNAを表13に示す。

[0164] [表13]

菌種	薬剤耐性遺伝子名	プライマー名称	プライマー配列 (5'→3')	配列番号	増幅されるDNA(ビオチン付加のRev鎖表記) 配列 5'⇒3'	配列番号
クレブシエラ・ニューモニエ	ベータラクタマーゼ_KPC	KPC_167 F20	CTGTAAGTTA CCGCGCTGA G	68	GGCGTTATCACTGTAT TGCACGGCGGCCGCGG ACAGCTCCGCCACCGT CATGCCTGTTGTCAGA TATTTTCCGAGATGG GTGACCACGGAACCAG CGCATTTTTGCCGTAA CGGATGGGTGTGTCCA GCAAGCCGGCCTGCTG CTGGCTGCGAGCCAGC ACAGCGGCAGCAAGAA AGCCCTTGAATGAGCT GCACAGTGGGAAGCGC TCCTCAGCGCGGTAAC TTACAG	100
		KPC_376 R21_B	GGCGTTATCA CTGTATTGCA C	69		
クレブシエラ・ニューモニエ	ベータラクタマーゼ_NDM	NDM_178 F19	CAGCACACTT CCTATCTCG	70	CATTGGCATAAGTCGC AATCCCCGCCGCATGC AGCGCGTTCATACCGC CCATCTTGTCTGATG CGCGTGAGTCACCACC GCCAGCGCGACCGGCA GGTTGATCTCCTGCTT GATCCAGTTGAGGATC TGGGCGGTCTGGTCAT CGGTCCAGGCGGTATC GACCACCAGCACGCGG CCGCCATCCCTGACGA TCAAACCGTTGGAAGC GACTGCCCCGAAACCC GGCATGTCGAGATAGG AAGTGTGCTG	101
		NDM_408 R20	CATTGGCATA AGTCGCAATC	71		

シュードモ ナス・エル ギノーザ	ベータラ クタマー ゼ__IMP 85	IMP_307F 22	GGAATAGRGT GGCTTAATTC TC	72	AGCCAAACCACTACGT TATCTGGAGTGTGCCC TGGACCAGGATAAAAA ACTTCAATCTTTTCTT AACTAGCCAATAGCTA GCTCCGCTAAATGAAT TTTTAGCTTGTACTTTA CCGTCTTTTTTAAGAAG TTCATTTGTTAATTCAG ATGCATACGTGGGGAT AGATTGAGAATTAAGC CACTCTATTCC	102
		IMP_478 R20	ARCCAAACCA CTACGTTATC	73		
シトロバク ター・フロ インディー	ベータラ クタマー ゼ__VIM	VIM_155F 18	GTGTTTGGTC GCATATCG	74	CCCCACGCTGTATCAA TCAAAAGCAACTCATC ACCATCACGGACAATG AGACCATTGGACGGGT AGACCGCGCCATCAAA CGACTGCGTTGCGATA TGCGACCAAACAC	103
		VIM_246 R18	CCCCACGCT GTATCAATC	75		
サルモネ ラ・エンテ リカ	ベータラ クタマー ゼ__CTX -M1	CTX-M1_ 402F20	TAACGTGGC GATGAATAAG C	76	TTGCCTTTCATCCATGT CACCAGCTGCGCCCGT TGGCTGTCACCCAATG CTTTACCCAGCGTCAG ATTACGCAGAGTTTGC GCCATTGCCGAGGTG AAGTGGTATCACGCGG ATCGCCCGGAATGGCG GTGTTTAACGTCGGCT CGGTACGGTCGAGACG GAACGTTTCGTCTCCC AGCTGTCGGCGAACG CGGTGACGCTAGCCGG GCCGCCAACGTGAGAA ATCAGCTTATTCATCG CCACGTTA	104
		CTX-M1_ 631R20	TTGCCTTTC TCCAYGTCAC	77		

サルモネラ・エンテリカ	ベータラクタマーゼ__CTX-M2	CTX-M2_414F20	GAAYAAGCTG ATTGCCCATC	78	TTGCCCTTAAGCCACG TCACCAACTGTGCCCG	105
		CTX-M2_633R18	TTGCCCTTAA GCCACGTC	79	CTGAGTTTCCGCCAGC GCTTTACCCAGCGTCA GATTTTTCAGGGTCTG CGCCATCGCGAGCGGC GTGGTGGTATCACGCG GGTCGCCTGGAATGGC GGTATTGAGCGTGGGC TCGGTTCTGTCCAGAC GGAAGGTCTCATCACC CAACGAGCGAGCAAAC GCCGTCACCTTTATCGG GACCACCCAGATGGGC AATCAGCTTATTC	
シトロバクター・アマロナティクス	ベータラクタマーゼ__CTX-M8	CTX-M2_414F20	GAAYAAGCTG ATTGCCCATC	80	GTGTTATCCCCAATCG CACGGGCAAACGCCGT CACTTTATCCGGCCCC	106
		CTX_M8_485R19	GTGTYATCCC CAATCGCA	81	CCAAGATGGGCAATCA GCTTGTTTC	
大腸菌	ベータラクタマーゼ__CTX-M25	CTX-M2_414F20	GAAYAAGCTG ATTGCCCATC	82	GTGTCATCGCCAATCG TACGGGCAAATGCCGT CACTTTATCCGGCCCC	107
		CTX_M25_485R21	GTGTCATCGC CAATCGTACG	83	CCGAGATGGGCAATCA GCTTATTC	
大腸菌	ベータラクタマーゼ__CTX-M9	CTX-M9_291F18	TGTCGAGATC AAGCCTG	84	GGGCAATCAATTTGTT CATGGCGGTATTGTGCG CTGTACTGCAACGCGG CCGCGCTCAGCTCTGC CAGCGTCATTGTGCCG TTGACGTGTTTTTCGG CAATCGGATTGTAGTT AACCAGATCGGCAGGC TTGATCTCGACA	108
		CTX-M9_411R20	GGGCAATCA ATTTGTTCAT G	85		

アシネトバ クター・バ ウマンニ	ベータラ クタマー ゼ__OX A-23	OXA23_2 62F18	ATCGGATTGG AGAACCAG	86	CGCAAGTTCCTGATAG ACTGGGACTGCAGAAA GCTTCATGGCTTCTCC TAGTGTCATGTCTTTTT CCCAAGCGGTAAATGA CCTTTTCTCGCCCTTC CATTTAAATATTTTCATT AATATCCGTTTTCTGGT TCTCCAATCCGAT	109
		OXA23_3 86R20	CGCAAGTTCC TGATAGACTG	87		
アシネトバ クター・バ ウマンニ	ベータラ クタマー ゼ__OX A-40	OXA40_1 31F22	GCTATTTTGA TGAAGCTCAA AC	88	CTTAAATGTTGATGCA GGGACATATTCTTTATT TGCTCGTGCAAGAGCA TTACCATAGGTGCTAA GATTTTTACCGTCTTTA ATAATAATTACACCCT GTGTTTGAGCTTCATC AAAATAGC	110
		OXA40_2 32R22	CTTAAATGTT GATGCAGGG AC	89		
クレブシエ ラ・ニュー モニエ	ベータラ クタマー ゼ__OX A-48	OXA48_1 48F21	AATAAGCAGC AAGGATTTAC C	90	GTGTTTCATCCTTAACC ACGCCCAAATCGAGGG CGATCAAGCTATTGGG AATTTTAAAGGTAGATG CGGGTAAAAATGCTTG GTTGCGCCGTTTAAGA TTATTGGTAAATCCTTG CTGCTTATT	111
		OXA48_2 52R19	GTGTTTCATCC TTAACCACG	91		
アシネトバ クター・ヘ モリティカ ス	ベータラ クタマー ゼ__OX A-58	OXA58_5 16F23	GCCTTTGACA ATTACACCTA TAC	92	CGCTCTACATACAACA TCTCTTTCACTTGTTGC TGAACCTCAGGTTTAAA AGGCAATTGCCCTTGG GCTAAATCATACACAA ACTTTACTTCTTGTATA GGTGTAATTGTCAAAG GC	112
		OXA58_6 13R20	CGCTCTACAT ACAACATCTC	93		

黄色ブドウ球菌	mecA	mecA_76 3F22	GTTATGTTGG TCCCATTAAC TC	94	GATAGCCATGTTTCATG TTGGAGCTTTTTATCGT AAAGTTTTTCGAGTCC	113
		mecA_87 5R20	GATAGCCATC TTCATGTTGG	95	CTTTTACCAATAACTG CATCATCTTTATAGCCT TTATATTCTTTTTGTTT TAATTCTTCAGAGTTAA TGGGACCAACATAAC	
エンテロコッカス・ファエカリス	vanA	vanA_808 F18	GGACGGATA CAGGAAACG	96	ATTGACTTCGTTTCAGTA CAATGCGGCGGTTATC TTGTAAAAACATATCCA	114
		vanA_900 R22	ATTGACTTCG TTCAGTACAA TG	97	CACGGGCTAGACCTCT ACAGCCGAGCGCTTTA TATATTTTTTTTGCCGT TTCCTGTATCCGTCC	
エンテロコッカス・フェシウム	vanB	vanB_264 F19	GCGTATTGAT GTGGCTTTC	98	CTTTGAATATCAGAGC CCACATAGGGGATACC AGACAATACAAACAGC	115
		vanB_355 R20	CTTTGAATAT CACAGCCCA C	99	CCCTGTATCGCACCAT CCTCCCGCATTGTC ATGCAAAACCGGGAAA GCCACATCAATACGC	

[0165] 細菌の標的遺伝子を検出するために選定したプローブを表14に示す。

[表14]

菌種	標的遺伝子名	プローブ名称	プローブ配列 (5'→3')	配列番号
アシネトバクター属菌	rpoB	A.spp.P1 (rpoB)	TTTTTTTTTTTCGGGTTTTTTTGG	116
アシネトバクター属菌	rpoB	A.spp.172P17	TTTTTTTTATAGGAAAAAAGTGAACG	117
アシネトバクター・バウマンニ	16S-23S ITS	A.bau.P19	TTTTTGAATTTAGATTGAAGCTGT	118
シトロバクター属菌	ompA	C.spp.24P17R	TTTTTTTTGAAACGGTARGAAACAC	119
エンテロバクター属菌	rpoS	Enb.spp.349P17	TTTTTTTTCTGGATCTGATTGAAGA	120
大腸菌	gyrB	E.coli.531P16	TTTTTTTTTCAATGTGACCGAGTTC	121
クレブシエラ・アエロゲネス	gyrB	K.aer.2034P17	TTTTTTTTTGGTGATGAACTCGTTAT	122
クレブシエラ・オキシトカ	pehX	K.oxy.392P17R	TTTTTTTTGCRCTGATTTGATAGT	123
クレブシエラ・ニューモニエ	gyrB	K.pne.P16	TTTTTTTTTGAAGTGCAGCATTTTG	124
クレブシエラ・バライコーラ	gyrB	K.var.1968P16	TTTTTTTTTGTTCAGCAGTTTGAG	125
シュードモナス・エルギノーザ	oprL	Pse.aer.430P15	TTTTTTTTTGGTAAAGAGCGTCCG	126
プロテウス属菌	rpoB	Pro.spp.P16	TTTTTTTTTITAGAAACGCCTTACCG	127
セラチア・マルセッセンス	hasA	Ser.mar.424P14	TTTTTTTTTTTATGTCCGGCGGATAC	128
エンテロコッカス属菌	rpoB	Enc.spp.3607P14	TTTTTTTTTTTCTTCTACGTTCCGG	129
エンテロコッカス属菌	rpoB	Enc.spp.3606P15	TTTTTTTTTTTGGTCTTCTACGTTCTCG	130
エンテロコッカス属菌	rpoB	Enc.spp.Probe A	TTTTTTTTTGATGCTTTCCGTATTTT	131
リステリア属菌	iap.p60	L.spp.533P16.1	TTTTTTTTTTGTAGTAGTCGAAGCTG	132
リステリア属菌	iap.p60	L.spp.533P17.2	TTTTTTTTTTGTAGTAGTTGAAGCTGG	133
黄色ブドウ球菌	nuc	Sta.aer.625P21	TTTTCCCTATAAGTAATATTGAAAC	134
スタフィロコッカス・アルゲンテウス	nuc	Sta.arg.288P17	TTTTTTTTTCATATTTTCAACGCCCT	135
表皮ブドウ球菌	atfE	Sta.epi.505P20	TTTTTGATGCTGTAAAGACTGGTAA	136
ブドウ球菌属菌	tuf	Sta.spp.626P16	TTTTTTTTTAACCATTCATGATGCC	137
肺炎レンサ球菌	xisco	Str.pneu.440P17	TTTTTTTTTGGTAATTGCTTAGAAGC	138
化膿レンサ球菌	gyrB	Str.pyo.1783P17	TTTTTTTTTCATCAACITTTGGGAAAC	139
レンサ球菌属菌	rnpB	Str.spp.Probe B	TTTTTTTTTTTTTGGCACAGTGACG	140

[0166] 細菌の薬剤耐性遺伝子を検出するために選定したプローブを表 15 に示す

。

[表15]

菌種	薬剤耐性遺伝子名	プローブ名称	プローブ配列 (5'→3')	配列番号
クレブシエラ・ニューモニエ	ベータラクタマーゼ_NDM	NDM_365P16	TTTTTTTTTATCAG GACAAGATGGG	141
クレブシエラ・ニューモニエ	ベータラクタマーゼ_KPC	KPC_330P18	TTTTTTTATATCTG ACAACAGGCAT	142
シトロバクター・フロインディー	ベータラクタマーゼ_VIM	VIM_232P17	TTTTTTTTTGATGAG TTGCTTTTGAT	143
シュドモナス・エルギノーザ	ベータラクタマーゼ_IMP85	IMP_378P16K	TTTTTTTTTAGACG GTAAGGTKCAA	144
アシネトバクター・バウマンニ	ベータラクタマーゼ_OXA-23	OXA23_373P15	TTTTTTTTTCTTT CTGCAGTCCCA	145
アシネトバクター・バウマンニ	ベータラクタマーゼ_OXA-40	OXA40_217P19	TTTTTGGCAAATAA AGAATATGTCC	146
クレブシエラ・ニューモニエ	ベータラクタマーゼ_OXA-48	OXA48_223P16	TTTTTTTTTCCCAA TAGCTTGATCG	147
アシネトバクター・ヘモリティカス	ベータラクタマーゼ_OXA-58	OXA58_596P16	TTTTTTTTTTCAG CAACAAGTGAA	148
サルモネラ・エンテリカ	ベータラクタマーゼ_CTX-M1	CTX-M1_594P15	TTTTTTTTTTGGGT AAAGCATTGGG	149
サルモネラ・エンテリカ	ベータラクタマーゼ_CTX-M2	CTX-M2_465P14	TTTTTTTTTTTTCG CTCGTTGGGTG	150
シトロバクター・アマロナティクス	ベータラクタマーゼ_CTX-M8	CTX-M8_485P20	TTTTTTTATAAAGT GACGGCGTTTG	151
大腸菌	ベータラクタマーゼ_CTX-M9	CTX-M9_393P16	TTTTTTTTTGTACA GCGACAATACC	152
大腸菌	ベータラクタマーゼ_CTX-M25	CTX-M25_485P20	TTTTTTTATAAAGT GACGGCATTG	153
黄色ブドウ球菌	mecA	mecA_822P17	TTTTTTTTTGATGAT GCAGTTATTGG	154
エンテロコッカス・ファエカリス	vanA	vanA_867P16	TTTTTTTTTCCGTG TGGATATGTTT	155
エンテロコッカス・フェシウム	vanB	vanB_331P18	TTTTTTTTTTGTAT TGTCTGGTATC	156

[0167] 本発明は複数の菌種及び薬剤耐性遺伝子に対する同時多項目測定を可能とする技術であるため、M u l t i p l e x P C R及び多項目のプロープが固定化された基板を用いた評価において、各鋳型に対する反応性及び特異性を評価する必要がある。

[0168] 代表菌種の鋳型を対象にM u l t i p l e x P C Rによって増幅したP C R産物を全プロープが含まれる系で反応させ、同時多項目測定を実施した。薬剤耐性遺伝子の鋳型を対象にM u l t i p l e x P C Rによって増幅したP C R産物を全プロープが含まれる系で反応させ、同時多項目測定を実施した。測定手順は、以下の検出工程の概要に示す。

[0169] 検出工程の概要

(1) P C R 増幅反応

対象となる菌種のゲノムD N A又は薬剤耐性遺伝子を鋳型としてP C R増幅を行った。

変性工程：94℃ 30秒

アニーリング工程：60℃ 60秒→94℃ 30秒（サイクル数30回）

伸長工程：72℃ 600秒

[0170] P C R 反応液の組成は以下の表のとおりである。

[0171] [表16]

PCR 反応液組成		
PCR mix	使用量/uL	終濃度
Multiplex PCR Enzyme Mix	0.1	1 U
2xMultiplex PCR Buffer	10	1x
PMBAC※又は PMAMR※※	4.9	—
鋳型	5	—
total	20	

※細菌同定における細菌検出用のプライマー混合液（組成は表17参照）

※※薬剤耐性遺伝子同定における薬剤耐性遺伝子検出用のプライマー混合液（組成は表18参照）

[0172] [表17]

PMBAC 調製表

添加溶液 (プライマー又は ddH ₂ O)	原液濃 度 (uM)	添加 量 (uL)	終濃度 (uM)
A.bau_373F23	100	8.2	0.82
A.bau_552R22_B	100	8.2	0.82
A.spp_3923F22	100	8.2	0.82
A.spp_4056R25Y_B	100	16.3	1.63
C. spp_449F17	100	8.2	0.82
C. spp_443F18S	100	16.3	1.63
C. spp_551R19_B	100	8.2	0.82
Enb.spp_216F17	100	8.2	0.82
Enb.spp_369R19R_B	100	16.3	1.63
E.coli_468F19	100	8.2	0.82
E.coli_567R18_B	100	8.2	0.82
K.aer_2097F18	100	8.2	0.82
K.aer_1941R25_B	100	8.2	0.82
K.oxy_261F17	100	8.2	0.82
K.oxy_423R21_B	100	8.2	0.82
K.pne_1886F19	100	8.2	0.82
K.pne_2043R20_B	100	8.2	0.82
K.var_1886F18	100	8.2	0.82
K.var_2046R18_B	100	8.2	0.82
Pse.aer_430F18	100	8.2	0.82
Pse.aer_489R19_B	100	20.4	2.04
Pro.spp_2356F20Y	100	8.2	0.82
Pro.spp_2226R22_B	100	8.2	0.82
Ser.mar_349F17Y	100	8.2	0.82
Ser.mar_459R19_B	100	8.2	0.82
Enc.fae_121F23	100	8.2	0.82
Enc.spp_3563F23Y	100	16.3	1.63
Enc.spp_3566F24Y	100	16.3	1.63
Enc.spp_3639R18R_B	100	16.3	1.63

L.spp_444F25	100	16.3	1.63
L.spp_551R20_B	100	16.3	1.63
Sta.spp_595F20Y	100	16.3	1.63
Sta.spp_697R20_B	100	40.8	4.08
Sta.aur_566F21W	100	8.2	0.82
Sta.aur_656R24	100	20.4	2.04
Sta.arg_226F25	100	8.2	0.82
Sta.sch_226F25Y	100	16.3	1.63
Sta.arg_319R22Y	100	16.3	1.63
Sta.epi_409F20	100	8.2	0.82
Sta.epi_544R19	100	8.2	0.82
Str.spp_rnpB F20	100	8.2	0.82
Str.spp_rnpB R18	100	8.2	0.82
Str.pneu_371F21	100	8.2	0.82
Str.pneu_459R21	100	8.2	0.82
Str.pyo_1623F22	100	8.2	0.82
Str.pyo_1800R23	100	8.2	0.82
ddH ₂ O	–	478	–

[0173]

[表18]

PMAMR 調製表

添加溶液 (プライマー又は ddH ₂ O)	原液濃度 (μM)	添加量 (μL)	終濃度 (μM)
KPC_167F20	100	8.2	0.82
KPC_376R21_B	100	8.2	0.82
NDM_178F19	100	8.2	0.82
NDM_408R20_B	100	8.2	0.82
IMP_307F22	100	16.3	1.63
IMP_478R20_B	100	16.3	1.63
VIM_155F18	100	8.2	0.82
VIM_246R18_B	100	8.2	0.82
CTX-M1_402F20	100	8.2	0.82
CTX-M1_631R20_B	100	8.2	0.82
CTX-M2_414F20	100	8.2	0.82
CTX-M2_633R18_B	100	8.2	0.82
CTX_M8_485R19_B	100	8.2	0.82
CTX_M25_485R21_B	100	16.3	1.63
CTX-M9_291F17	100	8.2	0.82
CTX-M9_411R20_B	100	8.2	0.82
OXA23_262F18	100	8.2	0.82
OXA23_386R20_B	100	8.2	0.82
OXA40_131F22	100	8.2	0.82
OXA40_232R22_B	100	8.2	0.82
OXA48_148F21	100	8.2	0.82
OXA48_252R19_B	100	8.2	0.82
OXA58_516F23	100	8.2	0.82
OXA58_613R20_B	100	8.2	0.82
mecA_763F22	100	8.2	0.82
mecA_875R20_B	100	8.2	0.82
vanA_808F18	100	8.2	0.82
vanA_900R22_B	100	8.2	0.82
vanB_264F19	100	8.2	0.82
vanB_355R20_B	100	8.2	0.82
ddH ₂ O	—	730.6	—

[0174] (2) PCR産物の熱変性

基板上に固定化されたプローブにPCR産物を供する前に、以下の条件で熱変性反応を行った。

熱変性条件：95℃ 5分、その後4℃へ急冷

[0175] (3) 基板上のプローブとPCR産物のハイブリダイゼーション反応及び標識化

基板上に固定化された各プローブとPCR産物とのハイブリダイゼーション反応を行った。反応液は、Saline-sodium-phosphate-EDTA buffer (SSPE-buffer) を含んでいる。基板上のプローブによって捕捉されたPCR産物は5'末端側にビオチン修飾されており、それをStreptavidin-Phycoerythrin (PlexBio社) によって標識化した。基板上でのハイブリダイゼーション反応及び標識化は、PlexBio社の機器であるIntelliPlex 1000 πcode Processorを用いて以下の条件で行った。

ハイブリダイズ条件：37℃ 20分インキュベート

標識化条件：37℃ 10分インキュベート

[0176] (4) 基板上で標識化されたPCR産物の検出

各基板上には識別できるIDが付与されており、各IDに特定のプローブが固定化されている。各プローブに対応するPCR産物が基板上で捕捉され、そのPCR産物は標識化される。基板上で標識化されたPCR産物は、蛍光を発するため検出器によって蛍光値を測定することができる。実施例1と同様に蛍光測定装置(100 Fluorescent Analyzer PlexBio社)を用いて蛍光値を測定した。

[0177] 4. 結果

各菌種のPCR産物に対する全プローブの反応性及び特異性について評価した結果を表19及び図8～10に示す。各プローブの蛍光値からカットオフ値(一律3000)を差し引いた値を用いて図8～10のグラフを作成し

た。プローブ E. coli__531P16 は大腸菌において蛍光シグナルがみられたが、それ以外の菌種では蛍光シグナルがみられなかった。これにより、大腸菌に対する特異的な反応が示された。したがって、Multiplex系 (Multiplex PCRの全プローブ同時多項目測定系) においても、大腸菌検出用のプライマー (E. coli__468F19とE. coli__567R18との2種) 及びプローブ (E. coli__531P16) が、大腸菌のゲノムDNAを特異的に検出できる性能が示された。大腸菌以外の各菌種についても、各プローブは対応する菌ゲノムのPCR産物に対して蛍光シグナルを発していた。各プローブは対応しない菌ゲノムのPCR産物に対しては、蛍光シグナルを発していなかった。したがって、Multiplex系においても各菌種に対応するプライマー及びプローブが機能し、各菌種を特異的に検出できることが示された。

[0178]

[表19]

	A.spp_P1 (rpoB)	A.spp_172P17	A.bau_P19	C.spp_24P17R	Enb.spp_349P17	E.coli_531P16	K.aer_2034P17	K.oxy_392P17R	K.pne_P16	K.var_1968P16	P.aer_430P15	Pro.spp_P16
<i>Acinetobacter baumannii/haemolyticus</i>	13646	20547	28112	141	63	65	0	6	0	183	0	1486
<i>Citrobacter koseri</i>	73	0	27	22660	35	0	35	130	48	0	28	55
<i>Enterobacter cloacae</i>	0	136	0	30	38325	0	0	0	21	0	0	0
<i>Escherichia coli</i>	0	0	0	0	1	32968	23	2	129	70	43	21
<i>Klebsiella aerogenes</i>	0	511	0	72	2195	21	15690	0	0	1357	0	0
<i>Klebsiella oxytoca</i>	62	628	0	0	0	93	263	45679	25	658	61	740
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	109	495	0	250	0	185	164	131	28094	1904	18	173
<i>Klebsiella variicola</i>	83	69	43	0	33	0	1653	187	175	42531	104	171
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	64	0	64	26	422	45	11	0	628	93552	0
<i>Proteus mirabilis</i>	0	754	142	0	0	0	0	0	0	0	19	38187
<i>Serratia marcescens</i>	44	557	0	105	0	0	139	23	93	1869	423	34
<i>Enterococcus faecium</i>	79	3	53	0	71	150	0	0	0	379	0	100
<i>Enterococcus avium</i>	22	0	197	0	77	51	0	147	63	281	65	194
<i>Listeria monocytogenes</i>	16	404	0	0	5	143	39	956	37	425	209	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	429	0	62	0	0	355	153	0	0	2	21	105
<i>Staphylococcus argenteus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0	0	0	0	10	79	0	0	139	0	46	157
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	89	0	2042	1335	0	1517	0	0	0	0	0	0
<i>Streptococcus pyogenes</i>	23	0	0	418	30	29	39	6	94	701	105	213

	Sermar_424P14	Enc.spp_3607P14	Enc.spp_3606P15	L.spp_533P16_1	L.spp_533P17_2	Sta.aer_625P21	Sta.arg_288P17	Sta.epi_505P20	Sta.spp_626P16	Str.pneu_440P17	Str.pyo_1783P17	Str.spp_Probe B
<i>Acinetobacter baumannii/haemolyticus</i>	43	8	6	0	111	0	38	0	0	63	97	10
<i>Citrobacter koseri</i>	0	36	4	37	96	6	99	35	0	0	0	81
<i>Enterobacter cloacae</i>	2	46	61	0	0	69	0	0	0	0	27	290
<i>Escherichia coli</i>	0	5	93	18	15	90	29	0	0	12	30	0
<i>Klebsiella aerogenes</i>	0	0	0	0	0	136	28	333	971	0	0	127
<i>Klebsiella oxytoca</i>	0	105	0	0	95	33	0	0	419	0	645	937
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	0	189	0	213	58	41	1421	0	2	223	0
<i>Klebsiella varicola</i>	52	7	0	82	41	143	20	66	0	0	452	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1186	0	0	0	135	182	0	574	875	137	0	276
<i>Proteus mirabilis</i>	0	0	150	0	112	0	10	0	0	0	0	0
<i>Serratia marcescens</i>	23190	0	0	0	0	75	4	782	1649	22	61	322
<i>Enterococcus faecium</i>	0	42699	1047	0	196	0	108	411	232	150	142	224
<i>Enterococcus avium</i>	69	185	42596	268	31	176	0	21	0	0	454	284
<i>Listeria monocytogenes</i>	90	66	0	33365	56207	0	0	574	259	0	463	598
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	10	277	0	64	52794	55	80	42759	26	38	0
<i>Staphylococcus argenteus</i>	0	67	0	391	23	0	24832	0	50809	0	696	0
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0	114	0	0	39	0	0	26833	42065	65	6	59
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	27	0	20	84	55	116	26	54	0	43323	0	23870
<i>Streptococcus pyogenes</i>	48	0	2	0	14	249	0	16	0	0	31132	35146

[0179] 各薬剤耐性遺伝子のPCR産物に対する全プローブの反応性及び特異性に

ついて評価した結果を表 20、図 11 及び図 12 に示す。各プローブの蛍光値からカットオフ値（表 20 参照）を差し引いた値を用いて図 11 及び図 12 のグラフを作成した。各薬剤耐性遺伝子を検出するためのプローブは対応する薬剤耐性遺伝子の PCR 産物に対して蛍光シグナルを発していた。各プローブは対応しない薬剤耐性遺伝子の PCR 産物に対しては、蛍光シグナルがみられなかった。これにより、M u l t i p l e x 系においても各薬剤耐性遺伝子に対応するプライマー及びプローブは機能し、各薬剤耐性遺伝子の特異的に検出できることが示された。

[0180]

請求の範囲

[請求項1]

敗血症の原因細菌を同定する方法であって、

対象から採取した試料と、大腸菌 (*Escherichia coli*) の *gyrB* 遺伝子、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) の *nuc* 遺伝子、表皮ブドウ球菌 (*Staphylococcus epidermidis*) の *atlE* 遺伝子、クレブシエラ・ニューモニエ (*Klebsiella pneumoniae*) の *gyrB* 遺伝子、及びエンテロコッカス属菌 (*Enterococcus spp.*) の *rpoB* 遺伝子の全長又は一部の領域にそれぞれ特異的なプライマーのセットの組み合わせとを用いて、PCR法を実施する工程、並びに

各遺伝子の前記全長又は一部の領域のDNAにそれぞれ特異的なプローブの組み合わせを用いて、前記全長又は一部の領域の増幅の有無を検出する工程、を含む、方法。

[請求項2]

前記大腸菌の *gyrB* 遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットが、配列番号10の塩基配列又は配列番号10の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプライマーと、配列番号11の塩基配列又は配列番号11の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプライマーとを含み、

前記黄色ブドウ球菌の *nuc* 遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットが、配列番号32の塩基配列若しくは配列番号32の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプライマー、配列番号34の塩基配列若しくは配列番号34の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプライマー、及びこれらの組み合わせから選択される1又は複数のプライマーと、配列番号33の塩基配列若しくは配列番号33の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプライマーとを含み、

前記表皮ブドウ球菌の *atI* E 遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットが、配列番号 37 の塩基配列又は配列番号 37 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列を含むプライマーと、配列番号 38 又は配列番号 38 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列の塩基配列を含むプライマーとを含み、

前記クレブシエラ・ニューモニエの *gyrB* 遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットが、配列番号 14 の塩基配列又は配列番号 14 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列を含むプライマーと、配列番号 15 又は配列番号 15 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列の塩基配列を含むプライマーとを含み、

前記エンテロコッカス属菌の *rpoB* 遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットが、配列番号 26 の塩基配列若しくは配列番号 26 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列を含むプライマー、配列番号 27 の塩基配列若しくは配列番号 27 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列を含むプライマー、配列番号 28 の塩基配列若しくは配列番号 28 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列を含むプライマー、及びこれらの組み合わせから選択される 1 又は複数のプライマーと、配列番号 29 の塩基配列若しくは配列番号 29 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列を含むプライマーとを含む、請求項 1 に記載の方法。

[請求項3]

前記大腸菌の *gyrB* 遺伝子の前記全長又は一部の領域の DNA が、配列番号 51 の塩基配列又は配列番号 51 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列を含み、

前記黄色ブドウ球菌の *nuc* 遺伝子の前記全長又は一部の領域の DNA が、配列番号 61 の塩基配列又は配列番号 61 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列を含み、

前記表皮ブドウ球菌の *atI* E 遺伝子の前記全長又は一部の領域の DNA が、配列番号 63 の塩基配列又は配列番号 63 の塩基配列と配

列同一性が90%以上の塩基配列を含み、

前記クレブシエラ・ニューモニエのg y r B遺伝子の前記全長又は一部の領域のDNAが、配列番号53の塩基配列又は配列番号53の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含み、

前記エンテロコッカス属菌のr p o B遺伝子の前記全長又は一部の領域のDNAが、配列番号59の塩基配列又は配列番号59の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含む、請求項1又は2に記載の方法。

[請求項4] 前記プローブが、前記全長又は一部の領域のDNAとストリンジェントな条件下でそれぞれハイブリダイズするプローブである、請求項3に記載の方法。

[請求項5] 前記大腸菌のg y r B遺伝子の前記全長又は一部の領域のDNAに特異的なプローブが、配列番号121の塩基配列又は配列番号121の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含み、

前記黄色ブドウ球菌のn u c遺伝子の前記全長又は一部の領域のDNAに特異的なプローブが、配列番号134の塩基配列又は配列番号134の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含み、

前記表皮ブドウ球菌のa t l E遺伝子の前記全長又は一部の領域のDNAに特異的なプローブが、配列番号136の塩基配列又は配列番号136の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含み、

前記クレブシエラ・ニューモニエのg y r B遺伝子の前記全長又は一部の領域のDNAに特異的なプローブが、配列番号124の塩基配列又は配列番号124の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含み、

前記エンテロコッカス属菌のr p o B遺伝子の前記全長又は一部の領域のDNAに特異的なプローブが、配列番号129の塩基配列若しくは配列番号129の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプローブ、配列番号130の塩基配列若しくは配列番号130

の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプローブ、配列番号131の塩基配列若しくは配列番号131の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプローブ、及びこれらの組み合わせから選択される、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。

[請求項6] 前記プローブが、それぞれ異なる識別子を含むか、又は固体支持体上の異なる識別子にそれぞれ結合している、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。

[請求項7] PCR法により増幅したDNAが標識を含む、請求項1～6のいずれか一項に記載の方法。

[請求項8] 敗血症の原因細菌を同定するためのキットであって、
大腸菌 (*Escherichia coli*) の *gyrB* 遺伝子、
黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) の *nuc* 遺伝子、表皮ブドウ球菌 (*Staphylococcus epidermidis*) の *atlE* 遺伝子、クレブシエラ・ニューモニエ (*Klebsiella pneumoniae*) の *gyrB* 遺伝子、及びエンテロコッカス属菌 (*Enterococcus* spp.) の *rpoB* 遺伝子の全長又は一部の領域にそれぞれ特異的なPCR用のプライマーのセットを含む第1の試薬と、
各遺伝子の前記全長又は一部の領域のDNAにそれぞれ特異的なプローブの組み合わせを含む第2の試薬とを含む、キット。

[請求項9] 大腸菌の *gyrB* 遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットが、配列番号10の塩基配列又は配列番号10の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプライマーと、配列番号11の塩基配列又は配列番号11の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプライマーとを含み、

黄色ブドウ球菌の *nuc* 遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットが、配列番号32の塩基配列若しくは配列番号32の塩基配列と配列同一性が90%以上の塩基配列を含むプライマー、

配列番号 34 の塩基配列若しくは配列番号 34 の塩基配列と配列同一性が 90%以上の塩基配列を含むプライマー、及びこれらの組み合わせから選択される 1 又は複数のプライマーと、配列番号 33 の塩基配列若しくは配列番号 33 の塩基配列と配列同一性が 90%以上の塩基配列を含むプライマーとを含み、

表皮ブドウ球菌の *atlE* 遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットが、配列番号 37 の塩基配列又は配列番号 37 の塩基配列と配列同一性が 90%以上の塩基配列を含むプライマーと、配列番号 38 又は配列番号 38 の塩基配列と配列同一性が 90%以上の塩基配列の塩基配列を含むプライマーとを含み、

クレブシエラ・ニューモニエの *gyrB* 遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットが、配列番号 14 の塩基配列又は配列番号 14 の塩基配列と配列同一性が 90%以上の塩基配列を含むプライマーと、配列番号 15 又は配列番号 15 の塩基配列と配列同一性が 90%以上の塩基配列の塩基配列を含むプライマーとを含み、

エンテロコッカス属菌の *rpoB* 遺伝子の全長又は一部の領域に特異的なプライマーのセットが、配列番号 26 の塩基配列若しくは配列番号 26 の塩基配列と配列同一性が 90%以上の塩基配列を含むプライマー、配列番号 27 の塩基配列若しくは配列番号 27 の塩基配列と配列同一性が 90%以上の塩基配列を含むプライマー、配列番号 28 の塩基配列若しくは配列番号 28 の塩基配列と配列同一性が 90%以上の塩基配列を含むプライマー、及びこれらの組み合わせから選択される 1 又は複数のプライマーと、配列番号 29 の塩基配列若しくは配列番号 29 の塩基配列と配列同一性が 90%以上の塩基配列を含むプライマーとを含む、請求項 8 に記載のキット。

[請求項10]

前記大腸菌の *gyrB* 遺伝子の前記全長又は一部の領域の DNA が、配列番号 51 の塩基配列又は配列番号 51 の塩基配列と配列同一性が 90%以上の塩基配列を含み、

前記黄色ブドウ球菌の *nuc* 遺伝子の前記全長又は一部の領域の DNA が、配列番号 61 の塩基配列又は配列番号 61 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列を含み、

前記表皮ブドウ球菌の *atlE* 遺伝子の前記全長又は一部の領域の DNA が、配列番号 63 の塩基配列又は配列番号 63 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列を含み、

前記クレブシエラ・ニューモニエの *gyrB* 遺伝子の前記全長又は一部の領域の DNA が、配列番号 53 の塩基配列又は配列番号 53 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列を含み、

前記エンテロコッカス属菌の *rpoB* 遺伝子の前記全長又は一部の領域の DNA が、配列番号 59 の塩基配列又は配列番号 59 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列を含む、請求項 8 又は 9 に記載のキット。

[請求項11] 前記プローブが、前記全長又は一部の領域の DNA とストリンジェントな条件下でそれぞれハイブリダイズするプローブである、請求項 10 に記載のキット。

[請求項12] 前記大腸菌の *gyrB* 遺伝子の前記全長又は一部の領域の DNA に特異的なプローブが、配列番号 121 の塩基配列又は配列番号 121 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列を含み、

前記黄色ブドウ球菌の *nuc* 遺伝子の前記全長又は一部の領域の DNA に特異的なプローブが、配列番号 134 の塩基配列又は配列番号 134 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列を含み、

前記表皮ブドウ球菌の *atlE* 遺伝子の前記全長又は一部の領域の DNA に特異的なプローブが、配列番号 136 の塩基配列又は配列番号 136 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列を含み、

前記クレブシエラ・ニューモニエの *gyrB* 遺伝子の前記全長又は一部の領域の DNA に特異的なプローブが、配列番号 124 の塩基配列又は配列番号 124 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配

列を含み、

前記エンテロコッカス属菌の *rpoB* 遺伝子の前記全長又は一部の領域の DNA に特異的なプローブが、配列番号 129 の塩基配列若しくは配列番号 129 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列を含むプローブ、配列番号 130 の塩基配列若しくは配列番号 130 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列を含むプローブ、配列番号 131 の塩基配列若しくは配列番号 131 の塩基配列と配列同一性が 90% 以上の塩基配列を含むプローブ、及びこれらの組み合わせから選択される、請求項 8～11 のいずれか一項に記載のキット。

[請求項13] 前記第2の試薬に含まれるプローブが、それぞれ異なる識別子を含むか、又は固体支持体上の異なる識別子にそれぞれ結合している、請求項 8～12 のいずれか一項に記載のキット。

[請求項14] 前記プライマーのセットを用いて PCR 法により増幅した DNA が標識を含むようにプライマーのセットが設計されているか、又は前記増幅した DNA を標識化するための第3の試薬をさらに含む、請求項 8～13 のいずれか一項に記載のキット。