

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

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
28. November 2002 (28.11.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer

WO 02/095066 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12Q 1/68,
C12N 15/11

der Parforceheide 94, 14480 Potsdam (DE). **BERGHOF, Kornelia** [DE/DE]; Rhodeländer Weg 85, 12355 Berlin (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/05580

(74) **Anwalt: GRÜNECKER, KINKELDEY, STOCKMAIR & SCHWANHAÜSSER**; Maximilianstr. 58, 80538 München (DE).

(22) Internationales Anmeldedatum:
21. Mai 2002 (21.05.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

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

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) **Angaben zur Priorität:**
101 24 342.1 18. Mai 2001 (18.05.2001) DE

(71) **Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): BIOTECON DIAGNOSTICS GMBH** [DE/DE]; Tegeler Weg 33, 10589 Berlin (DE).

(84) **Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) **Erfinder; und**

(75) **Erfinder/Anmelder (nur für US): GRABOWSKI, Reiner** [DE/DE]; Theodor-Heuss-Strasse 39, 37075 Göttingen (DE). **KOHLHAUSSEN, Simone** [DE/DE]; An

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) **Title:** DETECTING MICROORGANISMS OF THE YERSINIA PESTIS/YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS SPECIES AND/OR DIFFERENTIATING BETWEEN YERSINIA PESTIS AND YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS.

(54) **Bezeichnung:** NACHWEIS VON MIKROORGANISMEN DER SPEZIES YERSINIA PESTIS/YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS UND/ODER ZUR DIFFERENZIERUNG ZWISCHEN YERSINIA PESTIS UND YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS

(57) **Abstract:** Method and nucleic acids for the detection of microorganisms of the *Yersinia pestis/Yersinia pseudotuberculosis* species and/or differentiation between *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis* in a sample. The invention aims to provide safe detection and differentiation methods for microorganisms of the *Yersinia pestis/Yersinia pseudotuberculosis* species. The method consists of several steps: (a) Bringing the sample into contact with a combination of at least two first nucleic acids (primers) which hybridize with an area of their microbial genome preserved in the species *Yersinia pestis/Yersinia pseudotuberculosis* or part thereof; (b) the amplification of the microbial genome or of a part of it to generate at least one amplification part; (c) bringing the amplification fragment of fragments obtained in step (b) into contact with at least one second nucleic acid (probe), which comprises a specific partial sequence of the amplified genome or a part thereof for the species *Yersinia pestis/Yersinia pseudotuberculosis*, wherein the second nucleic acid (probe) is specifically hybridized with at least one amplification fragment while forming at least one hybrid nucleic acid; (d) detecting the hybrid nucleic acid.

(57) **Zusammenfassung:** Verfahren und Nukleinsäuren zum Nachweis von Mikroorganismen der Spezies *Yersinia pestis/Yersinia pseudotuberculosis* und/oder der Differenzierung zwischen *Yersinia pestis* und *Yersinia pseudotuberculosis* in einer Probe. Es sollen sichere Nachweis- und/oder Differenzierungsverfahren für Mikroorganismen der Spezies *Yersinia pestis/Yersinia pseudotuberculosis* zur Verfügung gestellt werden. Das Verfahren beinhaltet mehrere Stufen: (a) Inkontaktbringen der Probe mit einer Kombination aus mindestens zwei ersten Nukleinsäuren (Primern), die mit einem in der Spezies *Yersinia pestis/Yersinia pseudotuberculosis* konservierten Bereich ihres mikrobiellen Genoms oder eines Teils desselben hybridisieren; (b) die Amplifikation des mikrobiellen Genoms oder eines Teils desselben zur Erzeugung von mindestens einem Amplifikationsfragment; (c) Inkontaktbringen des/der in Schritt (b) erhaltenen Amplifikationsfragmente(s) mit mindestens einer zweiten Nukleinsäure (Sonde), die eine für Mikroorganismen der Spezies *Yersinia pestis/Yersinia pseudotuberculosis* spezifische Teilsequenz des amplifizierten Genoms oder eines Teils desselben umfasst, wobei die zweite Nukleinsäure (Sonde) mit mindestens einem Amplifikationsfragment unter Bildung mindestens einer Hybridnukleinsäure spezifisch hybridisiert; (d) Nachweis der mindestens einen Hybridnukleinsäure.



WO 02/095066 A2



Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

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

Nachweis von Mikroorganismen der Spezies *Yersinia pestis*/*Yersinia pseudotuberculosis* und/oder zur Differenzierung zwischen *Yersinia pestis* und *Yersinia pseudotuberculosis*

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von Mikroorganismen der Spezies *Yersinia pestis*/*Yersinia pseudotuberculosis* und/oder zur Differenzierung zwischen *Yersinia pestis* und *Yersinia pseudotuberculosis*.

Die Pest, verursacht durch *Yersinia pestis*, stellt auch heute noch eine Gefahr für die öffentliche Gesundheit dar. Es bestehen weltweit natürliche Reservoirs in vielen Ländern Afrikas, Amerikas und Asiens. In dem Zeitraum von 1990 bis 1997 ist die Zahl der registrierten Pestfälle von 1257 auf 5419 gestiegen (WHO, 1999). Die Zunahme an internationalen Reisen bringt ein zusätzliches Risiko zur Verbreitung der Krankheit, ausgehend von endemischen Regionen, durch infizierte Reisende mit sich. Eine präzise und schnelle Diagnose der Pest würde ein schnelles Eingreifen im Falle eines Pestausbruchs ermöglichen. Dabei ist die Kenntnis der gerade zirkulierenden Stämme in jedem Herd die Voraussetzung für die Ergreifung wirksamer Maßnahmen (Leal *et al.*, 1999, *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 41, 339-342).

Die Gattung *Yersinia* gehört zur Familie der Enterobacteriaceae. Zu ihr zählen derzeit 11 Spezies, davon sind die Spezies *Yersinia pestis*/*Yersinia pseudotuberculosis* und *Yersinia enterocolitica* humanpathogen. *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis* weisen eine 90%ige DNA Sequenzhomologie auf, gegenüber *Y. enterocolitica* weisen beide jedoch nur eine 50%ige Homologie auf. *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis* gelten daher als Pathovaren einer einzigen Spezies. Trotz der hohen Sequenzhomologie gibt es jedoch fundamentale Unterschiede zwischen *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis*, wie den Modus der Übertragung sowie die unterschiedliche Letalität der ausgelösten Erkrankungen und, daraus resultierend, eine unterschiedliche historische Bedeutung der Erreger. Dennoch wurden die Pathovaren nicht als Subspezies reklassifiziert (Achtman *et al.*, 1999, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 14043-14048).

Yersinia pestis (syn. *Pasteurella pestis*), benannt nach dem französischen Bakteriologen A.J.E. Yersin, der das Bakterium 1894 erstmals isolierte, ist ein unbegeißeltes, sporenloses, pleomorphes, Gram-negatives Bakterium. Es ist der Erreger der Bubone- bzw. Beulenpest und kann durch Flöhe von infizierten Ratten und anderen Nagetieren

(Feldmäuse, Ziesel, Tarbaganen, Erdhörnchen) auf den Menschen übertragen werden. Früher war es weltweit verbreitet, heute kommt es jedoch nur noch in einzelnen enzootischen und epizootischen Herden vor (Bergwald- und Savannenregionen in Amerika, Zentral-, Ost- und Südafrika, Madagaskar, Zentral- und Südostasien). *Yersinia pestis* ist in der Lage, auch monatelang in Sputum, Kot, Eiter oder in Ektoparasiten eingetrocknet zu überleben, was die spontanen Restvorkommen (auch bei Affen, Schleichkatzen, Kamelen und Schafen) erklärt. Die drei bekannten Biovaren (*bv antiqua*, *bv medievalis*, *bv orientalis* bzw. *oceanic*) unterscheiden sich in ihrem geographischen Verbreitungsspektrum und Reservoir. Vollständig pathogene *Y. pestis* Isolate sind charakterisiert durch die Präsenz von drei unterschiedlichen Plasmiden. Das für *Y. pestis* spezifische 9,5 kb Plasmid pPla (auch genannt pPCP1 oder pPst) trägt ein Plasminogen-Aktivator/Koagulase-Gen (*pla*-Gen) und ein Pesticin-Gen (Neubauer *et al.*, 2000, *J. Vet. Med.*, B47, 573-580). Das zweite Pest-spezifische Plasmid pFra (bzw. pMT1) hat eine Größe von 110 kb. Dieses kodiert u.a. für das F1 Kapsel-Antigen. Das dritte Plasmid pYV (bzw. pCD1 oder pCad) ist 70 kb groß und kommt bei allen pathogenen Isolaten der humanpathogenen Spezies *Y. pestis*/*Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica* vor. Die dazu bereits bekannten Gensequenzen sind hinterlegt in der GenBank Sequence Database des National Centre for Biotechnology Information (NCBI) (*pla*-Gen (im Plasmid pPCP1): Accessionnummer AF053945-1; F1-Antigen: Accessionnummer X61996; 16S ribosomale RNA: Accessionnummer L37604). Es sind vier klinische Formen der Pest beschrieben (Pestsepsis, Beulen-, Lungen-, abortive Pest). Unbehandelt liegt die Letalität der Beulenpest bei ca. 30 - 40%. Deshalb begründet bereits der Verdachtsfall den sofortigen Beginn einer antibiotischen Therapie.

Yersinia pseudotuberculosis ist ein bei kleinen Nagern, Katzen und Vögeln weit verbreitetes Pathovar, das nur geringe humanmedizinische Bedeutung hat. Es handelt sich um pleomorphe, peritrich begeißelte, bewegliche Kurzstäbchen. Menschliche Infektionen nehmen immer ihren Ausgang von erkrankten Tieren. Die Übertragung erfolgt wahrscheinlich direkt durch Schmierinfektion oder eventuell indirekt über kontaminierte Lebensmittel. Dabei werden die Erreger oral aufgenommen. Die Pseudotuberkulose des Menschen tritt nur sporadisch und sehr selten auf. Der im allgemeinen gutartige Verlauf der Erkrankung erfordert keine spezifische Therapie.

Die Detektion und Identifikation von *Yersinia pestis* mit konventionellen mikrobiologischen Verfahren ist zum Einen sehr zeitaufwendig und zudem, auf Grund der hohen Pathogenität von *Y. pestis* (L3), mit Gefahren für das Laborpersonal des Analyselabors verbunden. Zum Anderen erhöht das vermehrte Auftreten von Resistenzen gegen bestimmte Antibiotika bei humanpathogenen Erregern die Notwendigkeit einer spezifisch auf den jeweiligen Erreger angepaßten Therapie und somit auch die Notwendigkeit einer schnellen und eindeutigen Identifikation des Erregers. Deshalb besteht ein erheblicher Bedarf an Schnellnachweismethoden für humanpathogene Erreger wie *Y. pestis*.

Für den routinemäßigen Einsatz zur Detektion von humanpathogenen Mikroorganismen sind in den letzten Jahren eine Reihe neuer Methoden entwickelt worden. Hierzu zählen z.B. immunologische Verfahren, die auf dem Einsatz polyvalenter oder monoklonaler Antikörper beruhen, sowie Verfahren, bei denen Nukleinsäure-Sonden zum Nachweis Erreger-spezifischer Nukleinsäuren mittels Hybridisierung eingesetzt werden. Als weitere Methoden werden diejenigen Verfahren beschrieben, die auf einer spezifischen Nukleinsäure-Amplifikation basieren, mit oder ohne anschließender Bestätigungsreaktion durch Nukleinsäure-Hybridisierung. Geeignete Verfahren zur Amplifikation von Nukleinsäuren sind z.B. die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) (US Patente 4683195; 4683202; 4965118), die Ligase-Kettenreaktion (WO 89/09835), die „self-sustained sequence replication“ (EP 329822), das „transcription based amplification system“ (EP 310229), das Q β RNA-Replikase-System (US 4957858) oder eine isotherme Nukleinsäureamplifikation. Die genannten auf Nukleinsäure basierenden Verfahren sind so sensitiv, dass im Gegensatz zu konventionellen mikrobiologischen Verfahren eine langwierige Anreicherung des nachzuweisenden Mikroorganismus aus der zu untersuchenden Probe nicht notwendig ist.

Allerdings ist eine Detektion der Erreger (DNA) über PCR und nachfolgende Visualisierung der PCR Produkte über Gelelektrophorese allein oft nicht ausreichend, da damit kein spezifischer Nachweis der Amplifikate durchgeführt wird. Eine Analyse über Gelelektrophorese zeigt lediglich die Größe und Menge des gebildeten Amplifikates an, nicht aber die Sequenz („Identität“) des Amplifikationsproduktes.

Für *Yersinia pestis* sind bereits einige spezifische DNA-Sequenzen bekannt. 1993 wurde bereits eine erste „nested“ PCR von Campbell *et al.* (1993, *J. Clin. Microbiol.* 31, 758-759) aus dem Plasminogen-Aktivator-Gen für den Nachweis von *Yersinia pestis* etabliert, wenig später im selben Jahr publizierten Hinnebusch und Schwan (1993, *J. Clin. Microbiol.* 31, 1511-1514) für denselben Genbereich auch einen PCR-gestützten Nachweis. Die Autoren amplifizierten nur einen Genbereich, was zu falsch negativen Resultaten führen kann, wenn dieser Genbereich fehlt oder nur teilweise vorhanden ist. Tsukano *et al.* (1996, *Microbiol. Immunol.* 40, 773-775) verwendet ein Multiplex-PCR-System zum Nachweis von *Y. pestis*. Diese Nachweissysteme haben den Nachteil, dass sie ausschließlich auf *Yersinia* Plasmide als diagnostische Zielmoleküle zurückgreifen. Plasmide können jedoch leicht verloren gehen oder auf andere Bakterien, insbesondere Enterobakterien, übertragen werden (Allen *et al.*, 1987, *Contr. Microbiol. Immunol.*, 9, 332-341). Der Nachweis von Plasmiden allein gewährleistet also keine Sicherheit bei der Identifizierung von *Yersinia pestis*.

Ein Nachteil aller bekannten Verfahren ist weiterhin, dass bei Einsatz von Nukleinsäuresequenzen als Primer bei der Polymerase-Kettenreaktion falsch negative Resultate auftreten können. Dies wurde bereits für andere Systeme zum Nachweis von Krankheitserregern wie *bovine leukemia virus* (BLV-PCR) und *feline infectious peritonitis virus* (FIPV-RT-PCR) gezeigt (Ballagi-Pordany *et al.* 1996, *Mol. Cell Probes* 10, 159-164). Der Nachweis von mehreren verschiedenen Nukleinsäuresequenzen, insbesondere von „Virulenz-Markern“ wurde auch von Leal *et al.* (1999, *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 41, 339-342) aufgezeigt. Da das Nachweissystem jedoch auch auf Plasmide zurückgreift, ist seine Spezifität nicht gewährleistet. Außerdem genügt die Sensitivität dieses PCR-Systems nicht den Anforderungen eines industriellen Qualitätsmanagements.

Auch Neubauer *et al.* (2000, *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health* 47, 573-580) kombinierten verschiedene „Virulenz-Marker“. Zusätzlich wird als „chromosomaler Marker“ ein Abschnitt der 16S rDNA nachgewiesen. Die vier Zielgenabschnitte werden hier nicht durch Multiplex-PCR, sondern über separate PCR-Ansätze nachgewiesen. Die Prüfung der Funktionalität dieses *Yersinia pestis* PCR-Systems (Neubauer *et al.*) zeigt jedoch, dass Primer angegeben sind, die nur zum Teil (F1-Antigen) bzw. gar nicht (16 S) die Zielsequenz amplifizieren. Darüber hinaus wurde bei diesen und den zuletzt

genannten Nachweissystemen für *Y. pestis* auf die Implementierung einer Spezifitätskontrolle verzichtet. Daher sind auch hier falsch positive bzw. falsch negative Resultate möglich.

Der vorliegenden Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, sichere Nachweis- und/oder Differenzierungsverfahren für Mikroorganismen der Spezies *Yersinia pestis*/*Yersinia pseudotuberculosis* zur Verfügung zu stellen.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch ein Verfahren zum Nachweis von Mikroorganismen der Spezies *Yersinia pestis*/*Yersinia pseudotuberculosis* und/oder zur Differenzierung zwischen den Pathovaren *Yersinia pestis* und *Yersinia pseudotuberculosis* in einer Probe, wobei das Verfahren folgende Schritte umfaßt:

- (a) Inkontaktbringen der Probe mit einer Kombination aus mindestens zwei ersten Nukleinsäuren (Primern), die mit einem in der Spezies *Yersinia pestis*/*Yersinia pseudotuberculosis* konservierten Bereich ihres mikrobiellen Genoms oder eines Teils desselben hybridisieren;
- (b) Amplifikation des mikrobiellen Genoms oder eines Teils desselben zur Erzeugung von mindestens einem Amplifikationsfragment;
- (c) Inkontaktbringen des/der in Schritt (b) erhaltenen Amplifikationsfragmente(s) mit mindestens einer zweiten Nukleinsäure (Sonde), die eine für Mikroorganismen der Pathovare *Yersinia pestis* und/oder *Yersinia pseudotuberculosis* spezifische Teilsequenz des amplifizierten Genoms oder eines Teils desselben umfaßt, wobei die zweite Nukleinsäure mit mindestens einem Amplifikationsfragment unter Bildung mindestens einer Hybridnukleinsäure spezifisch hybridisiert;
- (d) Nachweis der mindestens einen Hybridnukleinsäure.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist sicherer und schneller als bisherige mikrobiologische Nachweisverfahren durchführbar und erlaubt den Nachweis von in einer Probe vorhandenen Mikroorganismen der Spezies *Yersinia pestis*/*Y. pseudotuberculosis* und die Differenzierung der von der Spezies umfaßten Pathovaren innerhalb weniger Stunden. Es beinhaltet weiterhin eine Spezifitätskontrolle, die eine sichere Identifizierung der Reaktionsprodukte erlaubt und damit die Gefahr von falsch positiven bzw. falsch negativen Resultaten minimiert. Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht eine Automatisierbarkeit der Detektionsreaktion und eine Quantifizierung von *Yersinia pestis*/*Yersinia pseudotuberculosis* im Untersuchungsmaterial innerhalb nur eines Arbeitstages.

In der nachfolgenden Beschreibung soll unter „Identität“ der Grad der Verwandtschaft zwischen zwei oder mehr Nucleinsäuren, Peptiden oder Polypeptiden verstanden werden, der durch die Übereinstimmung zwischen den Sequenzen mittels bekannter Verfahren, z.B. der computergestützten Sequenzvergleiche (Basic local alignment search tool, S.F. Altschul et al., J. Mol. Biol. 215 (1990), 403-410) bestimmt werden kann. Der Prozentsatz der „Identität“ ergibt sich aus dem Prozentsatz identischer Bereiche in zwei oder mehr Sequenzen unter Berücksichtigung von Lücken oder anderen Sequenzbesonderheiten. Bevorzugte Verfahren zur Bestimmung der Identität erzeugen zunächst die größte Übereinstimmung zwischen den untersuchten Sequenzen. Computerprogramme zur Bestimmung der Identität zwischen zwei Sequenzen umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf das GAG Programmpaket, einschließlich GAP (Devereux, J., et al., *Nucleic Acids Research* 12 (12): 287 (1984); Genetics Computer Group University of Wisconsin, Madison, (WI)); BLASTP, BLASTN, und FASTA (Altschul, S., et al., J. Mol. Biol. 215:403-410) (1999)). Das BLASTX Programm kann vom National Centre for Biotechnology Information (NCBI) und aus weiteren Quellen bezogen werden (BLAST Handbuch, Altschul S., et al., NCB NLM NIH Bethesda MD 20894; Altschul, S., et al., Mol. Biol. 215:403-410 (1990). Auch der bekannte Smith Waterman-Algorithmus kann zur Bestimmung der Identität herangezogen werden.

Bevorzugte Parameter für den Aminosäuresequenz-Vergleich umfassen die nachstehenden:

Algorithmus:	Needleman und Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443-453 (1970);
Vergleichsmatrix:	BLOSUM 62 aus Henikoff und Henikoff, PNAS USA 89 (1992), 10915-10919;
Lückenwert: (GAP Penalty)	12;
Lückenlängen-Wert: (GAP Length Penalty)	4;
Homologie-Schwellenwert: (Threshold of Similarity)	0;

Das GAP-Programm ist auch zur Verwendung mit den vorstehenden Parametern geeignet. Die vorstehenden Parameter sind die Fehler-Parameter (default parameters) für Aminosäuresequenzvergleiche, wobei Lücken an den Enden den Identitätswert nicht verringern. Bei sehr kurzen Sequenzen im Vergleich zur Referenzsequenz kann es weiterhin notwendig sein, den Erwartungswert auf bis zu 100.000 (expectation value) zu erhöhen und gegebenenfalls die Wortlänge (word size) auf bis zu 2 zu verkleinern.

Weitere beispielhafte Algorithmen, Lücken-Öffnungs-Werte (gap opening penalties), Lückenausdehnungs-Werte (gap extension penalties), Vergleichsmatrizen einschließlich der im Programm-Handbuch, Wisconsin-Paket, Version 9, September 1997, genannten können verwendet werden. Die Auswahl wird von dem durchzuführenden Vergleich abhängen und weiterhin davon, ob der Vergleich zwischen Sequenzpaaren, wobei GAP oder Best Fit bevorzugt sind, oder zwischen einer Sequenz und einer umfangreichen Sequenz-Datenbank, wobei FASTA oder BLAST bevorzugt sind, durchgeführt wird.

Eine mit dem oben genannten Algorithmus ermittelte Übereinstimmung von 70% wird im Rahmen dieser Anmeldung als 70% Identität bezeichnet. Entsprechendes gilt für höhere Identitätsgrade.

Unter einer „Hybridisierung“ soll die Doppelstrangbildung zweier identischer oder ähnlicher Nukleinsäurefragmente (DNA, RNA, PNA) verstanden werden. Von spezifischer Hybridisierung spricht man, wenn die Hybridisierung unter stringenten Bedingungen durchgeführt wird und zu einer stabilen Hybridnukleinsäure führt. Im Sinne dieser Erfindung weist das Merkmal "Sequenz, die mit einer Sequenz nach (i) spezifisch hybridisiert" auf eine Sequenz hin, die unter stringenten Bedingungen mit der Sequenz

nach (i) hybridisiert. Beispielsweise können die Hybridisierungen bei 50 bzw. 55°C mit einer Hybridisierungslösung bestehend aus 2,5 x SSC, 2 x Denhardts Lösung, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,5 durchgeführt werden. Als Waschbedingungen eignen sich z.B. viermal wiederholte einminütige Waschungen in 0,1 x SSC bis 1,0 x SSC, 2 x Denhardts, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,6 bei 20 - 55°C.

Unter „mikrobiellem Genom“ wird die Gesamtheit der Erbinformation eines Mikroorganismus verstanden. Es erfaßt also das mikrobielle Chromosom sowie die vorhandene episomale DNA.

Eine „Nukleinsäure“ ist eine DNA, RNA oder PNA, die entweder durch Isolation aus genomischer DNA oder aus cDNA nach bekannten Standardverfahren (Sambrook *et al.*, 1989) erhalten und aufgereinigt oder künstlich durch bekannte Verfahren (Sambrook *et al.*, 1989), wie z.B. der Oligonukleotid-Synthese generiert wird oder als ribosomale RNA oder mRNA aus dem Organismus isoliert oder als PNA synthetisiert wird. Eine „PNA“ ist dabei eine Peptidnukleinsäure, bei der anstelle des Phosphorsäurerückgrates der DNA 2-Aminoethylglycin-Bindungen auftreten. Erfindungsgemäß können in den Nukleinsäuren bis zu 20% der Nukleotide in 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden, bevorzugt jedoch 1 Nukleotid aus einem Block von 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden durch Nukleotide (z.B. Inosin, etc.) ersetzt sein, die in Bakterien nicht natürlich vorkommen.

Die Nukleinsäuren können weiterhin Modifikationen enthalten, die die Erzeugung eines direkt oder indirekt nachweisbaren Signales erlauben. Dem Fachmann sind dabei folgende Modifikationen bekannt:

- (i) radioaktive Modifikationen, i.e. radioaktive Phosphorylierung oder radioaktive Markierung mit Schwefel, Wasserstoff, Kohlenstoff, Stickstoff,
- (ii) farbige Gruppen (z.B. Digoxigenin, etc.),
- (iii) fluoreszierende Gruppen (z.B. Fluorescein, etc.),
- (iv) chemolumineszierende Gruppen,
- (v) Gruppen zur Immobilisierung an einer festen Phase (z.B. Biotin, Streptag, Antikörper, Antigene, etc.) und/oder

- (vi) Gruppen, die eine indirekte oder direkte Reaktion, mit Hilfe von Antikörpern, Antigenen, Enzymen und/oder Substanzen mit Affinität zu Enzymen oder Enzymkomplexen erlauben,

oder Kombinationen von Modifikationen gemäß zwei oder mehr der unter (i) bis (vi) genannten Modifikationen. Als „Modifikation“ werden im Sinne dieser Erfindung direkt oder indirekt nachweisbare Gruppen oder Gruppen zur Immobilisierung an eine feste Phase bezeichnet, die an die Nukleinsäure angehängt sind. Direkt nachweisbar sind Metallatome, radioaktive, farbige oder fluoreszierende Gruppen. Indirekt nachweisbar sind immunologisch oder enzymatisch nachweisbare Gruppen, wie z.B. Antigene und Antikörper, Haptene oder Enzyme bzw. enzymatisch wirkende Teile von Enzymen. Diese indirekten Gruppen werden in nachfolgenden Reaktionen nachgewiesen. Bevorzugt sind Haptene, die an ein Oligonukleotid gekoppelt sind und die man in einer anschließenden Antikörperreaktion nachweist.

Als „Primer“ werden im Sinne dieser Erfindung Nukleinsäuren verstanden, die z.B. bei einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) spezifisch oder unspezifisch an eine Zielsequenz hybridisieren können. In einer besonderen Ausführungsform im Sinne dieser Erfindung ist ein Primer so modifiziert bzw. markiert, wie oben für Nukleinsäuren beschrieben. Primer umfassen mindestens 10 Nukleotide, bevorzugt 15 - 50 Nukleotide, besonders bevorzugt 16-26 Nukleotide.

Als „Sonde“ wird im Sinne dieser Erfindung eine Nukleinsäure verstanden, die spezifisch mit einer gewünschten Nukleinsäure hybridisiert. Je nach gewünschter Aussage werden Sonden eingesetzt, die entweder mit den Amplifikaten sämtlicher nachzuweisender *Yersinia pestis/Yersinia pseudotuberculosis* Pathovaren, einem einzelnen Pathovar oder der Amplifikationskontrolle reagieren. Eine Sonde ist daher entweder komplementär zu einer Teilsequenz des mikrobiellen Genoms der Spezies *Yersinia pestis/Yersinia pseudotuberculosis*, die in beiden Pathovaren konserviert ist, oder zu einer in nur einem Pathovar vorkommenden Sequenz, oder zu einer Amplifikationskontrollsequenz. In einer besonderen Ausführungsform im Sinne dieser Erfindung ist eine Sonde modifiziert bzw. markiert, wie oben für Nukleinsäuren beschrieben. Eine Sonde ist mindestens 10 Nukleotide, bevorzugt 15 - 50 Nukleotide, besonders bevorzugt 20-25 Nukleotide lang.

Als „konserviert“ werden Sequenzen bezeichnet, die zu mindestens 70% identisch sind. Ein konservierter Bereich ist dabei ein Bereich, bei dem zwischen den Pathovaren *Yersinia pestis* und *Yersinia pseudotuberculosis* 70% Identität oder mehr, bevorzugt 80% Identität oder mehr, noch bevorzugter 90% Identität oder mehr, besonders bevorzugt 95% Identität oder mehr und am stärksten bevorzugt 99% Identität oder mehr auftritt.

Erfindungsgemäß wird eine zu untersuchende Probe mit einer Kombination aus mindestens zwei ersten Nukleinsäuren (Primern) in Kontakt gebracht. Bei der Probe kann es sich um Blut, Serum, Plasma, Lymphe, Flüssigkeit aus „Pestbeulen“, Speichel, Sputum, Kot, Eiter oder Isolate aus Ektoparasiten handeln.

Bei den mindestens zwei ersten Nukleinsäuren handelt es sich in der Regel um einen Vorwärts- und einen Rückwärtsprimer, die eine Amplifikation des von ihnen eingegrenzten Bereiches erlauben. Sie hybridisieren hierbei mit einem Bereich einer mikrobiellen Nukleinsäure aus der Probe, der in den humanpathogenen Pathovaren der Spezies *Yersinia pestis*/*Yersinia pseudotuberculosis* konserviert ist, und somit unabhängig vom vorliegenden Pathovar der Spezies *Yersinia pestis*/*Yersinia pseudotuberculosis* eine Amplifikation erlaubt. Die zum Primer komplementären Sequenzen der Pathovare weisen dabei jeweils mindestens 70% Identität mit dem Primer auf. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung werden Primersequenzen verwendet, die mit genomischen Sequenzen aus den Pathovaren *Yersinia pestis*/*Yersinia pseudotuberculosis* hybridisieren, wobei die dem Primer entsprechenden Sequenzen der Pathovare jeweils zu mindestens 80%, bevorzugt 90%, noch mehr bevorzugt 95% und besonders bevorzugt 99% Identität mit dem Primer aufweisen.

Erfindungsgemäß wird in einem weiteren Schritt die zu untersuchende Probe aus dem ersten Schritt mit einer Kombination aus mindestens zwei ersten Nukleinsäuren (Primern) amplifiziert. Bei diesem Schritt wird mindestens ein Amplifikationsfragment erzeugt. Die Amplifikation kann erfindungsgemäß mit jedem gewünschten Verfahren durchgeführt werden, z.B. einer PCR (US 4 683 195, US 4 683 202, US 4 965 188), einer Ligasekettenreaktion, einer "self-sustained sequence replication" (EP 329 822),

einer "transcription based amplification" (EP 310 229), einer "β-RNA-Replicase-System" (US 4 957 858) oder einer isothermen Nukleinsäureamplifikation.

Erfindungsgemäß werden die im vorausgegangenen Verfahrensschritt erhaltenen Amplifikationsfragmente mit mindestens einer zweiten Nukleinsäure (Sonde) in Kontakt gebracht. Die Sonde/Sonden hybridisieren hierbei unter Bildung einer Hybridnukleinsäure spezifisch mit mindestens einem Amplifikationsfragment einer mikrobiellen Nukleinsäure, das eine Sequenz der mikrobiellen Nukleinsäure umfaßt, die in den humanpathogenen Pathovaren *Yersinia pestis* und/oder *Yersinia pseudotuberculosis* vorkommt ist. Die Hybridisierung erfolgt durch Paarung der Sonden mit Bereichen der mikrobiellen Nukleinsäure, die eine zumindest teilweise komplementäre Basensequenz aufweisen. Durch Auswahl einer geeigneten Sondensequenz kann dann bestimmt werden, ob die Sonde beide Pathovaren der Spezies *Yersinia pestis*/*Yersinia pseudotuberculosis* oder nur eines dieser Pathovare erkennen soll. Auf diese Weise kann entweder der Nachweis humanpathogener Yersinien überhaupt oder aber die Bestimmung eines einzelnen Pathovars erfolgen.

Erfindungsgemäß wird in einem weiteren Schritt die mindestens eine im vorausgegangenen Schritt entstandene Hybridnukleinsäure nachgewiesen, die aus einem Amplifikationsfragment und einer zweiten Nukleinsäure besteht. Der Nachweis der Hybridnukleinsäuren kann über verschiedene DNA-Nachweisverfahren erfolgen, wie z.B. Blot-Techniken, Nachweis von radioaktiven Isotopen, Fluoreszenzdetektionsverfahren, optischen Detektionsverfahren oder anderen Detektionsverfahren.

In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird der Primer aus einem konservierten Bereich des Genoms ausgewählt, der die bakteriellen 16S rDNA Gene enthält. Eine weitere bevorzugte Ausführungsform verwendet einen konservierten Bereich aus einem der in *Yersinia pestis* enthaltenen Plasmide pPla (bzw. pPCP1 oder pPst), pFra (bzw. pMT1) und/oder pYV (bzw. pCD1 oder pCad). Hierbei sind Sequenzen aus dem Plasminogen-Aktivator-Gen (pPla) oder dem F1-Antigen (pFra) bevorzugt. Besonders bevorzugt ist der Bereich zwischen Pos. 7359 und 7838 (pPla) bzw. 4879 und 5133 (pFra). Die erfindungsgemäßen Sequenzen nach SEQ ID NO: 1 - 9 sind aus dem Plasminogen-Aktivator-Gen, dem F1-Gen und dem 16S rDNA-Gen abgeleitet und entsprechen folgenden Positionen (vgl. Tab. No. 1):

Tabelle 1: Ursprung der Sequenzen der SEQ ID NO: 1-9

SEQ ID NO	Gen	Accession-No	Genregion	Länge
1	Plasminogen-Aktivator Gen	AF053945	7359-7378	20
2	Plasminogen-Aktivator Gen	AF053945	7819-7838	20
3	(F1)-capsulares Antigen, caf1	X61996	5110-5133	24
4	(F1)-capsulares Antigen, caf1	X61996	4879-4900	22
5	16S rDNA	L37604	989-1004	16
6	16S rDNA	L37604	985-1004	20
7	16S rDNA	L37604	1375-1400	26
8	16S rDNA	L37604	1375-1391	17
9	16S rDNA	L37604	1419-1398	22

SEQ ID NO: 1-9 entsprechen dabei den folgenden Sequenzen (vgl. Tab. No. 2):

Tabelle 2: Sequenzen der SEQ ID NO: 1-9

SEQ ID NO	Sequenz
1	ATCTTACTTTCCGTGAGAAG
2	CTTGGATGTTGAGCTTCCTA
3	GGATTATTGGTTAGATACGGTTAC
4	GGTGATCCCATGTACTIONAACAT
5	GGCAGAGATGCTAAAG
6	ATTTGGCAGAGATGCTAAAG
7	CTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGT
8	TGTGACGGGCGGTGTGT
9	CTACTTCTTTTGCAACCCACTC

In den Sequenzen nach SEQ ID NO: 1-13 werden Nukleotide folgendermaßen abgekürzt: G = Guanodin, A = Adenosin, T = Thymin, C = Cytosin.

Erfindungsgemäß wird eine Kombination aus mindestens zwei ersten Nucleinsäuren eingesetzt. Die eingesetzte Kombination aus mindestens zwei ersten Nucleinsäuren wird dabei so gewählt, dass sie als Primer in einer Amplifikationsreaktion einsetzbar sind, d.h. eine Nucleinsäure hybridisiert an einen ersten konservierten Bereich des ersten

Stranges der Ziel-DNA und die andere Nukleinsäure an einen zweiten konservierten Bereich des zum ersten Strang komplementären DNA-Stranges, wobei der gewünschte Zielbereich der DNA eingeschlossen wird. Beide Nukleinsäuren weisen jeweils eine Länge von mindestens 10 Nukleotiden, bevorzugt 15 - 50 Nukleotiden, noch bevorzugter 15 bis 30 Nukleotiden auf. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird eine Kombination aus mindestens zwei Paaren von ersten Nukleinsäuren gemäß dieser Erfindung eingesetzt, die zusammen also zu zwei amplifizierten Fragmenten führen. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform hybridisiert ein erstes Paar von Nukleinsäuren mit der bakteriellen 16S rDNA, während ein zweites und gegebenenfalls ein drittes, oder weiteres Primerpaar mit Sequenzen aus pPla, pFra oder pYV hybridisiert.

Jede erste Nukleinsäure (Primer) ist ausgewählt aus: (i) einer Nukleinsäure, die eine Nukleinsäuresequenz nach SEQ ID NO: 1-9 umfaßt oder ein mindestens 10, vorzugsweise 15 bis 25 Nukleotide langes Fragment derselben; (ii) einer Nukleinsäure, die mit einer Nukleinsäure nach (i) spezifisch hybridisiert; (iii) einer Nukleinsäure, die mindestens 70% identisch mit einer Nukleinsäure nach (i) oder (ii) ist oder (iv) einer Nukleinsäure, die komplementär zu einer Nukleinsäure nach (i) bis (iii) ist.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung umfaßt das Verfahren zur Amplifikation eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Die Polymerase-Kettenreaktion kann auch als eine Multiplex-PCR durchgeführt werden. Die „Multiplex-PCR“ ist ein Nachweis verschiedener Zielmoleküle in einer einzigen Polymerase-Kettenreaktion, wobei ein Gemisch von Primern verwendet wird. In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden in einer Multiplex-PCR vier erste Nukleinsäuren als Primer eingesetzt. Auch eine online- oder realtime-PCR sind möglich. Bei der online- oder realtime-PCR wird das Resultat der Amplifikation simultan mit seiner Entstehung aufgezeichnet. Im Idealfall, wie z.B. beim LightCycler, kann die Amplifikation auch bereits in Echtzeit detektiert werden. Ein wesentlicher Vorteil der realtime-PCR liegt somit in der Schnelligkeit, mit der das Resultat erhalten wird. Dadurch, dass sekundäre Arbeitsschritte, wie die Detektion der Amplifikationsprodukte mittels ELISA oder Gelelektrophorese entfallen, wird der Arbeitsaufwand beträchtlich reduziert. Schließlich bietet die realtime-PCR den Vorteil, dass sie eine „echte“ Quantifizierung der in der Probe vorhandenen DNA und somit der Anzahl der Mikroorganismen erlaubt. Wenn

anstelle von DNA RNA als Zielmolekül in einer RT-PCR detektiert wird, kann zwischen lebenden und toten *Yersinia pestis*-Keimen differenziert werden. Auch die online-PCR kann mit einem oder mehreren der Primer (SEQ ID NO: 1 – 9) durchgeführt werden. Im weiteren ist für die Funktionalität der online-PCR das Vorhandensein einer oder mehrerer Sonden, z.B. der SEQ ID NO: 10 – 13, im PCR-Reaktionsgemisch entscheidend. Die online-PCR selbst kann auf verschiedene Weisen durchgeführt werden. Im Wesentlichen unterscheiden sie sich von anderen PCR-Verfahren nur durch das Zustandekommen des Fluoreszenzsignals. Verwendet werden können z.B. der 5'-Nuklease-Assay mit TaqMan-Sonden oder Molecular Beacons. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, LightCycler-Sonden zu verwenden. In letzterem Fall werden zwei fluoreszenzmarkierte Sonden eingesetzt und das Signal entsteht durch einen Energietransfer von dem Farbstoff der einen Sonde zu dem Farbstoff einer benachbarten Sonde. Aus diesem Grunde wird hier neben den Sonden der SEQ ID: 10 - 13 eine „Nachbarsonde“ von den bekannten PCR-Zielsequenzen von *Yersinia pestis* ausgewählt werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung werden zum Nachweis humanpathogener Yersinien Sondensequenzen verwendet, die mit genomischen Sequenzen aus den Pathovaren *Yersinia pestis* und *Yersinia pseudotuberculosis* hybridisieren, wobei die zur Sonde komplementären Sequenzen der Pathovare untereinander zu mindestens 80% identisch sind. Bevorzugt werden dabei Sondensequenzen verwendet, die mit genomischen Sequenzen aus den Pathovaren *Yersinia pestis* und *Yersinia pseudotuberculosis* hybridisieren, wobei die zur Sonde komplementären Sequenzen der Pathovare untereinander zu mindestens 90%, bevorzugt 95%, besonders bevorzugt 99% identisch sind. In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird die Sonde aus einem konservierten Bereich des Genoms ausgewählt, der die bakteriellen 16S rDNA Gene enthält. Eine weitere bevorzugte Ausführungsform verwendet einen konservierten Bereich aus einem der in *Yersinia pestis* enthaltenen Plasmide pPla (bzw. pPCP1 oder pPst), pFra (bzw. pMT1) und/oder pYV (bzw. pCD1 oder pCad). Hierbei sind Sequenzen aus dem Plasminogen-Aktivator-Gen (pPla) oder dem F1-Antigen (pFra) bevorzugt.

Für den Nachweis eines einzelnen Pathovars sind dagegen Sonden bevorzugt, die eine Identität von 80% oder mehr, bevorzugt 90%, 95%, 99% oder mehr mit nur einem der

Pathovare aufweisen, während die Identität mit dem anderen Pathovar entsprechend geringer sein muß, um eine selektive Hybridisierung beobachten zu können. Bevorzugt beträgt der Unterschied im Identitätsgrad mindestens 5%, besser aber mindestens 10% oder 15%, und besonders bevorzugt mehr als 20 oder 25%.

Für Sonden besonders bevorzugt ist der Bereich zwischen Pos. 7583 und 7602 (pPla) bzw. 5008 und 5027 (pFra). Die erfindungsgemäß bevorzugten Sequenzen nach SEQ ID NO: 10 bis 12 sind aus dem Plasminogen-Aktivator-Gen, dem F1-Gen und dem 16S rDNA-Gen abgeleitet und entsprechen folgenden Positionen (vgl. Tab. 3):

Tabelle 3: Ursprung der Sequenzen der SEQ ID NO: 10-12

SEQ ID NO	Gen	Accession-No.	Genregion	Länge
10	16S rDNA	L37604	1178-1198	21
11	(F1)-capsulares Antigen, caf1	X61996	5008-5027	20
12	Plasminogen-Aktivator Gen	AF053945	7583-7602	20

SEQ ID NO: 10-12 entsprechen dabei den folgenden Sequenzen (vgl. Tab. 4):

Tabelle 4: Sequenzen der SEQ ID NO: 10-12

SEQ ID NO	Sequenz
10	AGTCATCATGGCCCTTACGAG
11	GATGACGTCGTCTTGGCTAC
12	GGTCTGCAATATCGCTTCTG

In den Sequenzen nach SEQ ID NO: 1 - 12 werden Nukleotide folgendermaßen abgekürzt: G = Guanodin, A = Adenosin, T = Thymin, C = Cytosin.

Sonden weisen eine Länge von mindestens 10 Nukleotiden, bevorzugt 15 - 50 Nukleotiden, noch bevorzugter 15 bis 30 Nukleotiden auf. Bevorzugte Sonden sind ausgewählt aus:

- (v) einer Nukleinsäure, die eine Nukleinsäuresequenz nach SEQ ID NO: 10-12 umfaßt oder ein mindestens 10, vorzugsweise 15 bis 20 Nukleotide langes Fragment derselben;
- (vi) einer Nukleinsäure, die mit einer Nukleinsäure nach (v) spezifisch hybridisiert;
- (vii) einer Nukleinsäure, die mindestens 80% identisch mit einer Nukleinsäure nach (v) oder (vi) ist; oder
- (viii) einer Nukleinsäure, die komplementär zu einer Nukleinsäure nach (v) bis (vii) ist.

Sonden können weiterhin Modifikationen enthalten, die die Erzeugung eines direkt oder indirekt nachweisbaren Signales erlauben.

Die Sonden der SEQ ID NO: 10-12 besitzen für die Pathovare *Yersinia pestis* und *Yersinia pseudotuberculosis* eine unterschiedliche Spezifität (vgl. Tab. 6). So kann mit den Sonden der SEQ ID NO: 11-12 das Pathovar *Yersinia pestis* spezifisch nachgewiesen werden, während hingegen mit der Sonde der SEQ ID NO: 10 die Pathovare *Yersinia pestis* und *Yersinia pseudotuberculosis* nachgewiesen werden können. Dadurch ist eine Differenzierung zwischen den Pathovaren *Yersinia pestis* und *Yersinia pseudotuberculosis* möglich.

Um falsch negative Ergebnisse zu vermeiden, wird in einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung bei der Amplifikation eine Amplifikationskontroll-Nukleinsäure zugesetzt. Dementsprechend wird nicht nur die mikrobielle Nukleinsäure oder ein Teil derselben amplifiziert, sondern auch die Amplifikationskontroll-Nukleinsäure, wodurch mindestens je ein Amplifikationsfragment erzeugt wird. Die Amplifikationskontroll-Nukleinsäure, z.B. ein DNA-Fragment, ist hierbei ein „internes Standard Molekül“, das als Indikator für die Effektivität der Reaktion dient (Ballagi-Pordany, Belak, 1996, *Mol. Cell. Probes* 10, 159-164). Es wird in einer definierten Menge der Amplifikationsreaktion zugesetzt und parallel amplifiziert. Die Amplifikationskontroll-Nukleinsäure ist bevorzugt einzel- oder doppelsträngig und kann unbegrenzt lang sein. Bewährt haben sich Amplifikationskontroll-Nukleinsäuren mit einer Länge von bis zu tausend Nukleotiden. In einer bevorzugten Ausführungsform dieser Erfindung enthält die

Amplifikationskontroll-Nukleinsäure eine zu der Sequenz der SEQ ID NO: 13 oder eines Teils derselben identische oder komplementäre Sequenz.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform dieser Erfindung findet die Amplifikation als kompetitive PCR statt. Bei der kompetitiven PCR werden die Ziel-DNA und die Amplifikationskontroll-DNA mit demselben Primerpaar amplifiziert. Bei einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung sind der 3'- und 5'-Bereich der Amplifikationskontroll-DNA so ausgestaltet, dass diese mit einem für die Amplifikation der Ziel-DNA ausgesuchten Primerpaar amplifiziert werden kann. In diesem Fall spricht man von einer kompetitiven Amplifikationskontrolle, da die Ziel-DNA und die Kontroll-DNA mit dem gleichen Primerpaar amplifiziert werden. In einer bevorzugten Ausführungsform dieser Erfindung wird die Amplifikationskontroll-Nukleinsäure mit Hilfe von mindestens zwei der Primer der SEQ ID NO: 5-9 amplifiziert.

In einer besonderen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird bei Verwendung einer Amplifikationskontrolle die amplifizierte Amplifikationskontroll-Nukleinsäure mit einer Sonde in Kontakt gebracht, die hierbei spezifisch mit mindestens einem Amplifikationsfragment der Amplifikationskontroll-Nukleinsäure hybridisiert. Die Sonde wird ausgewählt aus:

- (ix) einer Nukleinsäure, die eine Nukleinsäuresequenz nach SEQ ID NO: 13 umfaßt; oder ein mindestens 10, vorzugsweise 15 bis 19 Nukleotide langes Fragment derselben;
- (x) einer Nukleinsäure, die mit einer Nukleinsäure nach (ix) spezifisch hybridisiert;
- (xi) einer Nukleinsäure, die mindestens 80% identisch mit einer Nukleinsäure nach (ix) oder (x) ist; oder
- (xii) einer Nukleinsäure, die komplementär zu einer Nukleinsäure nach (ix) bis (xi) ist.

Eine Sonde nach SEQ ID NO: 13 kann weiterhin Modifikationen enthalten, die die Erzeugung eines direkt oder indirekt nachweisbaren Signales erlauben. Die Sonde nach SEQ ID NO: 13 kann getrennt oder in Kombination mit einer oder mehreren Sonden

nach SEQ ID NO: 10-12 verwendet werden. SEQ ID NO: 13 entspricht dabei folgender Sequenz:

SEQ ID NO: 13 GACTACGGAATTCCGCTGTC

Erfindungsgemäß erfolgt der Nachweis von mindestens einer Hybridnukleinsäure, die aus einem Amplifikationsfragment und einem im vorangegangenen Schritt eingebrachten zweiten Nukleinsäure besteht. Der Nachweis der Hybridnukleinsäuren kann über verschiedene DNA-Nachweisverfahren wie z.B. Blot-Techniken, Fluoreszenzdetektionsverfahren, optischen Detektionsverfahren oder anderen Detektionsverfahren erfolgen. In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Detektion der Hybridnukleinsäuren über ELISA-Techniken. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Detektion der Hybridnukleinsäure über Southern Blot-Verfahren.

Eine Vervielfältigung der mikrobiellen Nukleinsäure oder eines Teils derselben und eine anschließende Detektion dieser Moleküle kann z.B. mittels Hybridisierung mit markierten spezifischen Sonden erfolgen. In einer Multiplex-PCR können Nukleinsäuren eingesetzt werden, die es ermöglichen, von mehreren oder gar allen der relevanten Stämme, Subspezies oder Spezies sowie verschiedenen Zielmolekülen ein Amplifikationsprodukt zu erhalten. Die Spezifität des Nachweises wird durch die anschließende Hybridisierungsreaktion mit spezifischen Sonden erreicht. Auf diese Art und Weise können *Yersinia pestis* und *Y. pseudotuberculosis* in Gegenwart einer Amplifikationskontrolle simultan in einer einfachen Kombination aus Amplifikations- und Detektionsreaktion erfaßt werden. Diese Art der Amplifikation und Detektion ermöglicht die Automatisierbarkeit der Detektionsreaktion, so dass ein hoher Probendurchsatz ermöglicht wird. Es kann beispielsweise ein PCR-ELISA-Nachweisverfahren eingesetzt werden, bei dem die entsprechenden Sonden in verschiedene Kavitäten einer Mikrotiterplatte gebunden werden, in denen anschließend die Hybridisierung und der Nachweis der markierten Amplifikate geschieht. Der Nachweis kann auch durch die Verwendung eines Mikroarrays erfolgen, auf dem mehrere Sonden immobilisiert sind, wodurch die Nachweisreaktion schnell und ohne großen Aufwand durchgeführt werden kann. Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren können somit zum Nachweis und/oder zum Identifizieren und/oder Charakterisieren von *Yersinia pestis* bzw.

Y. pseudotuberculosis verwendet werden. Eine weitere Verwendung können die hier beschriebenen Primer und/oder Sonden auch bei der Detektion der beschriebenen Keime in verschiedenen Proben wie z.B. in Umwelt- oder klinischen Proben etc. finden.

Die Erfindung umfaßt weiterhin einen Kit für den Nachweis von Mikroorganismen der Spezies *Yersinia pestis*/*Yersinia pseudotuberculosis* sowie für die Differenzierung zwischen *Yersinia pestis* und *Yersinia pseudotuberculosis*, enthaltend zwei oder mehr Nukleinsäuren. Die Erfindung umfaßt weiterhin in einer besonderen Form der Ausführung einen Kit für den Nachweis von Mikroorganismen der Spezies *Yersinia pestis*/*Yersinia pseudotuberculosis* sowie für die Differenzierung zwischen *Yersinia pestis* und *Yersinia pseudotuberculosis*, enthaltend zwei oder mehr Nukleinsäuren und eine Amplifikationskontrolle für die Amplifikationsreaktion.

Die Figuren und Beispiele erläutern die Erfindung:

Figurenbeschreibung

Figur 1: Sensitivität des Multiplex-PCR-Systems
Fig. 1 zeigt eine invertierte Darstellung der Amplifikate von genomischer DNA (*Y. pestis*) nach der Amplifikation und gelelektrophoretischer Auftrennung;
Legende (Spuren von links nach rechts):
M: Marker, Spur 1 bis 7: *Y. pestis*, 1 ng bis 1 fg initial eingesetzte genomische DNA, Spur 8: Negativkontrolle;
pla: Amplifikat Plasminogen Aktivator Gen;
16S bzw. ST: Amplifikat 16 S bzw. Kontroll-DNA;
F1: Amplifikat F1 Antigen;

Beispiele

Beispiel 1: Nachweis von humanpathogenen Bakterien mit der Polymerase-Kettenreaktion

I. Amplifikation

Aus abgetöteten Reinkulturen der in Tabelle 5 aufgeführten Bakterien wurde über bekannte Standardverfahren genomische DNA isoliert. Verdünnungen (Konzentration im Bereich von ca. 1 ng - 1 pg) dieser Präparationen wurden anschließend in eine Multiplex-PCR mit folgender Zusammensetzung eingesetzt:

Primer 1 = SEQ ID NO: 1

Primer 2 = SEQ ID NO: 2

Primer 3 = SEQ ID NO: 3

Primer 4 = SEQ ID NO: 4

Primer 5 = SEQ ID NO: 6

Primer 6 = SEQ ID NO: 9

Komponenten:	Volumen [μ l]	Konzentration im Ansatz
H ₂ O	ad 25	-
PCR-Puffer	2,5	1x-Konz.
MgCl ₂	2,0	0,5 – 5,0 mM
dTTP-Mix	0,5	je 10 – 100 μ M
Primer: SEQ ID NO: 1 SEQ ID NO: 2* SEQ ID NO: 3* SEQ ID NO: 4 SEQ ID NO: 6 SEQ ID NO: 9*	je 0,5	0,2 – 1,0 μ M
Taq-Polymerase	0,2	1 - 5 U/ μ l
DNA-Extrakt/-Eluat der Probe	1,0	var.
Kontroll-DNA	1,0	var.
Σ	25 μ l	

* = Primer sind 5'-Digoxigenin markiert

Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen in dem Thermocycler Perkin Elmer, Modell 9700 durchgeführt:

Schritt	Zeit	Temperatur
initiale Denaturierung	5 min	95°C
"touch down": 5x (- 2 °C)		
Denaturierung	20 - 60 sec	94°C
Anlagerung	20 - 60 sec	68°C - 58°C
Synthese	30 - 90 sec	72 °C
30 – 35x		
Denaturierung	20 - 60 sec	94°C
Anlagerung	20 - 60 sec	58°C
Synthese	30 - 90 sec	72°C
finaler Syntheseschritt	5 min	72°C
Endtemperatur		4°C - 10°C

Primer 3 (SEQ ID NO: 3) und Primer 4 (SEQ ID NO: 4) wurden durch Sequenzvergleich bekannter F1 Antigen Sequenzen (GenBank Sequence Database des NCBI) bestimmt. Sie hybridisieren an hochkonservierte Sequenzabschnitte im F1 Antigen Genbereich. Primer 5 (SEQ ID NO: 6) und Primer 6 (SEQ ID NO: 7 bzw. 9) wurden durch Sequenzvergleich bekannter 16S rDNA Sequenzen (GenBank Sequence Database des NCBI) sowie eigener Sequenzdaten bestimmt.

II. Detektion im PCR-ELISA

Die Detektion erfolgt im PCR-ELISA. Dazu werden je verwendeter Sonde 5 µl Amplifikat mit 5 µl Denaturierungspuffer (pH 14; 100-200 mM NaOH, 10-25 mM EDTA) versetzt und 10 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Je Probe werden 1,5 pmol der jeweiligen biotinylierten Sonde (SEQ ID NO: 10 – 13) in 100 µl Hybridisierungspuffer (pH 7,5; 2 - 5x SSC, 1 - 5x Denhardts Lösung, 5 - 10 mM Tris, 0,1 - 1,5 mM EDTA) pipettiert. Nach der Denaturierung wird pro Kavität der Mikrotiterplatte 10 µl des Denaturierungsansatzes sowie 100 µl der jeweiligen Sonden-Hybridisierungspuffer-Mischung in die Kavitäten einer mit Streptavidin beschichteten Mikrotiterplatte überführt. Anschließend erfolgt die 30minütige Inkubation bei Hybridisierungstemperatur (45 - 55°C). Ist die Hybridisierung abgeschlossen, wird der Hybridisierungsansatz entfernt und 4x mit 200 µl Waschpuffer 1 (WP1: pH 7,6; 0,1 - 1 x SSC, 1 - 5x Denhardts, 5 - 10 mM Tris, 0,1 - 1,5 EDTA) jeweils für 1 bis 4 min. bei Hybridisierungstemperatur gewaschen. Anschließend werden 100 µl einer nach Herstellerangaben verdünnten Lösung eines mit einer Meerrettichperoxidase konjugierten Anti-Digoxigenin-Antikörpers zugegeben (Boehringer Mannheim). Das Konjugat wird in Waschpuffer 2 (WP2: pH 7,5; 50 - 100 mM Tris, 100 - 200 mM NaCl, 0,01 - 0,1 % Tween 20, 0,1 - 1,0 % Blocking-Reagenz, 50 - 120 µg/ml Heringssperma) verdünnt. Anschließend erfolgt die Antikörper-Inkubation bei 37°C für 30 min. Danach wird 4x mit 200 µl Waschpuffer 2 gewaschen (bei Raumtemperatur). Nach dem Waschen werden 100 µl POD-Substrat (Boehringer Mannheim) zugegeben und 15 min. bei RT inkubiert. Anschließend wird die Farbreaktion mit 100 µl 0,3 - 0,7 M H₂SO₄ abgestoppt und bei 450 nm gegen 650 nm im ELISA-Reader gemessen.

III. Auswertung

Gemäß dem oben aufgeführten Detektionsprotokoll wurde der Nachweis für alle untersuchten Bakterien unter Verwendung der entsprechenden spezifischen Sonden geführt. Als spezifische Sonden wurden für *Yersinia pestis* und *Y. pseudotuberculosis* SEQ ID NO: 10 - 13 eingesetzt.

War die gemessene Extinktion größer als 0.50, so wurde das Ergebnis positiv bewertet. Die Ergebnisse des PCR-ELISA sind in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 5: Verwendete Mikroorganismen

Spezies	Stamm-Nr. / biovar	Kürzel
<i>Yersinia aldovae</i>	ATCC 35236	
<i>Yersinia enterocolitica</i>	DSM 4780	
<i>Yersinia frederiksenii</i>	ATCC 33641	
<i>Yersinia intermedia</i>	ATCC 29909	
<i>Yersinia kristensenii</i>	ATCC 33638	
<i>Yersinia mollaretii</i>	ATCC 43969	
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	DSM 8992	
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	NC 1102	
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	NC 824	
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	NC 1779	
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	NC 9507	
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	NC 10277	
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	NC 10278	
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	NC 8580	
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	NC 8579	

Tabelle 5 (Fortsetzung): Verwendete Mikroorganismen

Spezies	Stamm-Nr. / biovar	Kürzel
<i>Yersinia pestis</i>	ATCC 19428	172
<i>Yersinia pestis</i>	biotype „O“	EV76
<i>Yersinia pestis</i>	biotype „O“	6/69
<i>Yersinia pestis</i>	biotype „O“	A1122
<i>Yersinia pestis</i>	biotype „O“	M23
<i>Yersinia pestis</i>	biotype „O“	G32
<i>Yersinia pestis</i>	biotype „A“	Yokuhama
<i>Yersinia pestis</i>	biotype „A“	Kuma
<i>Yersinia pestis</i>	biotype „M“	KIM
<i>Yersinia rohdei</i>	ATCC 43380	
<i>Yersinia ruckeri</i>	ATCC 29473	

Tabelle 6: Ergebnisse des PCR-ELISA (OD 450 nm)

Sonde Stamm		SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID
		NO 10	NO 11	NO 12	NO 13
		16S	F1	pla	ST
<i>Yersinia aldovae</i>	ATCC 35236	0,265	0,028	0,025	3,945
<i>Yersinia enterocolitica</i>	DSM 4780	0,058	0,033	0,023	3,809
<i>Yersinia frederiksenii</i>	ATCC 33641	0,293	0,025	0,025	3,630
<i>Yersinia intermedia</i>	ATCC 29909	0,069	0,018	0,021	3,495
<i>Yersinia kristensenii</i>	ATCC 33638	0,142	0,031	0,021	4,000
<i>Yersinia mollaretii</i>	ATCC 43969	0,105	0,023	0,023	3,641
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	DSM 8992	4,000	0,023	0,030	0,081
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	NC 1102	3,895	0,039	0,040	0,073
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	NC 824	4,000	0,039	0,036	0,069
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	NC 1779	3,841	0,042	0,036	0,161
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	NC 9507	4,000	0,040	0,038	0,050
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	NC 10277	3,859	0,040	0,038	0,041
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	NC 10278	4,000	0,041	0,038	0,040
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	NC 8580	4,000	0,037	0,037	0,132
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	NC 8579	3,934	0,038	0,033	0,071
<i>Yersinia pestis</i>	ATCC 19428	4,000	1,168	2,804	4,000
<i>Yersinia pestis</i>	EV76	4,000	4,000	4,000	0,166
<i>Yersinia pestis</i>	6/69	4,000	4,000	4,000	0,065
<i>Yersinia pestis</i>	A1122	4,000	4,000	4,000	0,061
<i>Yersinia pestis</i>	M23	3,890	4,000	3,916	0,063
<i>Yersinia pestis</i>	G32	4,000	4,000	1,970	0,056
<i>Yersinia pestis</i>	Yokuhama	4,000	4,000	4,000	0,045
<i>Yersinia pestis</i>	Kuma	4,000	4,000	4,000	0,086
<i>Yersinia pestis</i>	KIM	4,000	4,000	4,000	0,075
<i>Yersinia rohdei</i>	ATCC 43380	0,120	0,019	0,020	3,810
<i>Yersinia ruckeri</i>	ATCC 29473	0,154	0,020	0,020	3,743

Die in Tabelle 6 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die untersuchten Stämme der Spezies *Yersinia pestis* bzw. *Y. pseudotuberculosis* identifiziert wurden.

Beispiel 2: Sensitivität des Nachweises von humanpathogenen Bakterien mit der Polymerase-Kettenreaktion

Amplifikation und Detektion im PCR-ELISA und Auswertung wurden entsprechend der Beschreibung in Beispiel 1 durchgeführt. Als Probenmaterial wurde abweichend von Beispiel 1 die aus dem Stamm *Y. pestis* ATCC 19428 isolierte genomische DNA in dekadischen Verdünnungen in eine Multiplex-PCR eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Figur 1 und Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7: Ergebnisse des PCR-ELISA (OD 450 nm)

DNA (fg)	Sonde	SEQ ID NO 10	SEQ ID NO 11	SEQ ID NO 12	SEQ ID NO 13
		pla	F1	16S	ST
0		0,051	0,026	0,028	3,566
1		0,044	0,026	0,131	3,118
10		0,305	0,270	0,456	3,179
100		2,271	1,131	2,998	2,612
1000		4,000	3,537	4,000	2,694
10000		4,000	3,940	4,000	1,201
100000		4,000	4,000	4,000	0,254
1000000		4,000	4,000	4,000	0,057

Patentansprüche:

1. Verfahren zum Nachweis von Mikroorganismen der Spezies *Yersinia pestis*/*Yersinia pseudotuberculosis* und/oder zur Differenzierung zwischen den Pathovaren *Yersinia pestis* und *Yersinia pseudotuberculosis* in einer Probe, wobei das Verfahren folgende Schritte umfaßt:
 - (a) Inkontaktbringen der Probe mit einer Kombination aus mindestens zwei ersten Nucleinsäuren (Primern), die mit einem in der Spezies *Yersinia pestis*/*Yersinia pseudotuberculosis* konservierten Bereich ihres mikrobiellen Genoms oder eines Teils desselben hybridisieren;
 - (b) Amplifikation des mikrobiellen Genoms oder eines Teils desselben zur Erzeugung von mindestens einem Amplifikationsfragment;
 - (c) Inkontaktbringen des/der in Schritt (b) erhaltenen Amplifikationsfragmente(s) mit mindestens einer zweiten Nucleinsäure (Sonde), die eine für Mikroorganismen der Pathovare *Yersinia pestis* und/oder *Yersinia pseudotuberculosis* spezifische Teilsequenz des amplifizierten Genoms oder eines Teils desselben umfaßt, wobei die zweite Nucleinsäure (Sonde) mit mindestens einem Amplifikationsfragment unter Bildung mindestens einer Hybridnucleinsäure spezifisch hybridisiert;
 - (d) Nachweis der mindestens einen Hybridnucleinsäure.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die erste(n) Nucleinsäure(n) (Primer) mit einem konservierten Bereich der Plasmide pPla, pFra oder pYV aus *Yersinia pestis*/*Yersinia pseudotuberculosis* oder eines Teils derselben hybridisiert/hybridisieren.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die erste(n) Nucleinsäure(n) (Primer) mit einem konservierten Bereich eines Plasminogen-Aktivator-Genes und/oder eines F1-Genes aus *Yersinia pestis*/*Yersinia pseudotuberculosis* hybridisiert/hybridisieren.

4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die erste(n) Nukleinsäure(n) (Primer) mit einem konservierten Bereich eines bakteriellen 16S rDNA-Genes oder eines Teils desselben hybridisiert/hybridisieren.
5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die zweite(n) Nukleinsäure(n) (Sonde) mit einem konservierten Bereich der Plasmide pPla, pFra oder pYV aus *Yersinia pestis*/*Yersinia pseudotuberculosis* oder eines Teils derselben hybridisiert/hybridisieren.
6. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die zweite(n) Nukleinsäure(n) (Sonde) mit einem konservierten Bereich eines Plasminogen-Aktivator-Genes und/oder eines F1-Genes aus *Yersinia pestis*/*Yersinia pseudotuberculosis* hybridisiert/hybridisieren.
7. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die zweite(n) Nukleinsäure(n) (Sonden) mit einem konservierten Bereich aus den bakteriellen 16S rDNA-Genen oder eines Teils desselben hybridisiert/hybridisieren.
8. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass als erste Nukleinsäure(n) (Primer) eine oder mehrere Nukleinsäuren verwendet werden, die aus der folgenden Gruppe ausgewählt sind:
 - (i) einer Nukleinsäure, die eine Nukleinsäuresequenz nach SEQ ID NO: 1-9 umfaßt oder ein mindestens 10, vorzugsweise 15 bis 25 Nukleotide langes Fragment derselben;
 - (ii) einer Nukleinsäure, die mit einer Nukleinsäure nach (i) spezifisch hybridisiert;
 - (iii) einer Nukleinsäure, die mindestens 70% identisch mit einer Nukleinsäure nach (i) oder (ii) ist;

- (iv) einer Nucleinsäure, die komplementär zu einer Nucleinsäure nach (i) bis (iii) ist.
9. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass als zweite Nucleinsäure (Sonde) eine oder mehrere Nucleinsäuren verwendet werden, die aus der folgenden Gruppe ausgewählt sind:
- (v) einer Nucleinsäure, die eine Nucleinsäuresequenz nach SEQ ID NO: 10-12 umfaßt oder ein mindestens 10, vorzugsweise 15 bis 20 Nucleotide langes Fragment derselben;
- (vi) einer Nucleinsäure, die mit einer Nucleinsäure nach (v) spezifisch hybridisiert;
- (vii) einer Nucleinsäure, die mindestens 80% identisch mit einer Nucleinsäure nach (v) oder (vi) ist;
- (viii) einer Nucleinsäure, die komplementär zu einer Nucleinsäure nach (v) bis (vii) ist.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Nucleinsäure eine DNA, RNA oder PNA ist.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass bis zu 20% der Nucleotide, mindestens jedoch 1 Nucleotid in 10 aufeinanderfolgenden Nucleotiden durch Nucleotide ersetzt ist, die in Bakterien nicht natürlich vorkommen.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass in die Nucleinsäure zur Erzeugung eines direkt oder indirekt nachweisbaren Signals eine Modifikation eingeführt ist, wobei die Modifikation bestehen kann aus (i) einer radioaktiven Markierung, (ii) farbigen Gruppen, (iii) fluoreszierenden Gruppen, (iv) chemolumineszierenden Gruppen, (v) Gruppen zur Immobilisierung an einer festen Phase und/oder (vi) Gruppen, die eine indirekte oder direkte

Nachweisreaktion, mit Hilfe von Antikörpern, Antigenen, Enzymen und/oder Substanzen mit Affinität zu Enzymen oder Enzymkomplexen erlauben, oder eine Kombination von Modifikationen gemäß zwei oder mehr der unter (i) bis (vi) genannten Modifikationen.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass das Amplifizieren eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) umfaßt.
14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) eine Multiplex-PCR umfaßt und mit mindestens vier ersten Nucleinsäuren durchgeführt wird.
15. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) eine online- oder realtime-PCR umfaßt.
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass das Amplifizieren eine Ligase-Kettenreaktion, eine isotherme Nucleinsäureamplifikation oder eine Q β -Replikation umfaßt.
17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass bei der Amplifikation eine Amplifikationskontrolle durchgeführt wird.
18. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass die Amplifikationskontrolle eine DNA-Sequenz von maximal 1000 Nucleotiden umfaßt.
19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass die DNA-Sequenz der Amplifikationskontrolle aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist:
 - (ix) einer Nucleinsäure, die eine Nucleinsäuresequenz nach SEQ ID NO: 13 umfaßt oder ein mindestens 10, vorzugsweise 15 bis 19 Nucleotide langes Fragment derselben;

- (x) einer Nucleinsäure, die mit einer Nucleinsäure nach (ix) spezifisch hybridisiert;
 - (xi) einer Nucleinsäure, die mindestens 80% identisch mit einer Nucleinsäure nach (ix) oder (x) ist;
 - (xii) einer Nucleinsäure, die komplementär zu einer Nucleinsäure nach (ix) bis (xii) ist.
20. Nucleinsäure zum Nachweisen von Mikroorganismen der Spezies *Yersinia pestis*/*Yersinia pseudotuberculosis* und/oder zur Differenzierung zwischen *Yersinia pestis* und *Yersinia pseudotuberculosis*, ausgewählt aus:
- (i) einer Nucleinsäure, die eine Nucleinsäuresequenz nach SEQ ID NO: 1-9 umfaßt oder ein mindestens 10, vorzugsweise 15 bis 25 Nucleotide langes Fragment derselben;
 - (ii) einer Nucleinsäure, die mit einer Nucleinsäure nach (i) spezifisch hybridisiert;
 - (iii) einer Nucleinsäure, die mindestens 70% identisch mit einer Nucleinsäure nach (i) oder (ii) ist;
 - (iv) einer Nucleinsäure, die komplementär zu einer Nucleinsäure nach (i) bis (iii) ist.
 - (v) einer Nucleinsäure, die eine Nucleinsäuresequenz nach SEQ ID NO: 10-12 umfaßt oder ein mindestens 10, vorzugsweise 15 bis 20 Nucleotide langes Fragment derselben;
 - (vi) einer Nucleinsäure, die mit einer Nucleinsäure nach (v) spezifisch hybridisiert;

- (vii) einer Nucleinsäure, die mindestens 80% identisch mit einer Nucleinsäure nach (v) oder (vi) ist;
 - (viii) einer Nucleinsäure, die komplementär zu einer Nucleinsäure nach (v) bis (vii) ist.
21. Nucleinsäure zur Kontrolle einer Amplifikation, ausgewählt aus:
- (ix) einer Nucleinsäure, die eine Nucleinsäuresequenz nach SEQ ID NO: 13 umfaßt oder ein mindestens 10, vorzugsweise 15 bis 19 Nucleotide langes Fragment derselben;
 - (x) einer Nucleinsäure, die mit einer Nucleinsäure nach (ix) spezifisch hybridisiert;
 - (xi) einer Nucleinsäure, die mindestens 80% identisch mit einer Nucleinsäure nach (ix) oder (x) ist;
 - (xii) einer Nucleinsäure, die komplementär zu einer Nucleinsäure nach (ix) bis (xi) ist.
22. Nucleinsäure nach einem der Ansprüche 20 bis 21, dadurch gekennzeichnet, dass es eine DNA, RNA oder PNA ist.
23. Nucleinsäure nach einem der Ansprüche 20 bis 22, dadurch gekennzeichnet, dass die Nucleinsäure dadurch modifiziert ist, dass bis zu 20% der Nucleotide, mindestens jedoch 1 Nucleotid in 10 aufeinanderfolgenden Nucleotiden durch Nucleotide ersetzt sind, die in Bakterien nicht natürlich vorkommen.
24. Nucleinsäure nach einem der Ansprüche 20 bis 23, dadurch gekennzeichnet, dass in die Nucleinsäure zur Erzeugung eines direkt oder indirekt nachweisbaren Signals eine Modifikation eingeführt wird, wobei die Modifikation bestehen kann aus (i) einer radioaktiven Markierung (ii) farbigen Gruppen, (iii) fluoreszierenden Gruppen, (iv) chemoluminiszierenden Gruppen, (v) Gruppen zur Immobilisierung

an einer festen Phase und/oder (vi) Gruppen, die eine indirekte oder direkte Nachweisreaktion, mit Hilfe von Antikörpern, Antigenen, Enzymen und/oder Substanzen mit Affinität zu Enzymen oder Enzymkomplexen erlauben, oder eine Kombination von Modifikationen gemäß zwei oder mehr der unter (i) bis (vi) genannten Modifikationen.

25. Verwendung einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 20, 22 oder 24 zum Nachweisen von Mikroorganismen der Spezies *Yersinia pestis*/*Yersinia pseudotuberculosis* und/oder der Differenzierung zwischen *Yersinia pestis* und *Yersinia pseudotuberculosis*.
26. Verwendung einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 20 bis 24 in einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 19.
27. Kit für den Nachweis von Mikroorganismen der Spezies *Yersinia pestis*/*Yersinia pseudotuberculosis* sowie für die Differenzierung zwischen *Yersinia pestis* und *Yersinia pseudotuberculosis*, enthaltend zwei oder mehr Nukleinsäuren nach einem der Ansprüche 20 bis 23.
28. Kit nach Anspruch 27, enthaltend zusätzlich eine Amplifikationskontrolle für die Amplifikationsreaktion.

1/1

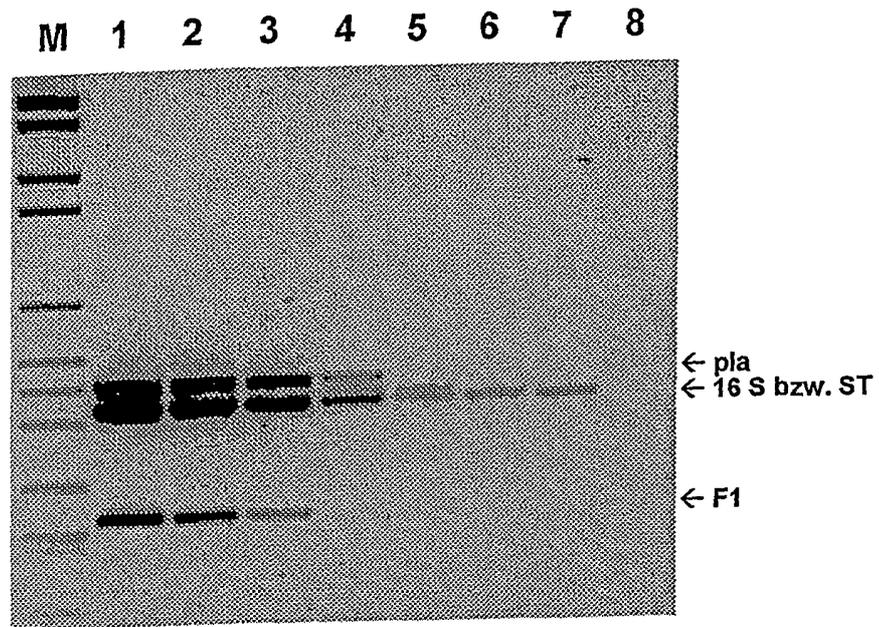


Abb. 1: Sensitivität des Multiplex-PCR-Systems

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Biotecon Diagnostics GmbH

<120> Nukleinsäuremolekülsatz für Yersinia-Nachweis

<130> BCD-2001-yp

<140>

<141>

<160> 13

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Yersinia sp.

<400> 1
atcttacttt ccgtgagaag 20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Yersinia sp.

<400> 2
cttggatggt gagcttccta 20

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> Yersinia sp.

<400> 3
ggattattgg ttagatcgg ttac 24

<210> 4

<211> 22

<212> DNA

<213> Yersinia sp.

<400> 4
ggtgatccca tgtacttaac at 22

<210> 5

<211> 16

<212> DNA

<213> Yersinia sp.

<400> 5
ggcagagatg ctaaag 16

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Yersinia sp.

<400> 6
atttggcaga gatgctaaag 20

<210> 7
<211> 26
<212> DNA
<213> Yersinia sp.

<400> 7
ctcccatggt gtgacgggcg gtgtgt 26

<210> 8
<211> 17
<212> DNA
<213> Yersinia sp.

<400> 8
tgtgacgggc ggtgtgt 17

<210> 9
<211> 22
<212> DNA
<213> Yersinia sp.

<400> 9
ctacttcttt tgcaaccac tc 22

<210> 10
<211> 21
<212> DNA
<213> Yersinia sp.

<400> 10
agtcacatg gcccttacga g 21

<210> 11
<211> 20
<212> DNA
<213> Yersinia sp.

<400> 11
gatgacgtcg tcttggctac 20

<210> 12
<211> 20
<212> DNA
<213> Yersinia sp.

<400> 12
ggtctgcaat atcgcttctg 20

<210> 13
<211> 20
<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: ST-Sonde

<400> 13

gactacggaa ttccgctgtc

20