

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2012-525850

(P2012-525850A)

(43) 公表日 平成24年10月25日(2012.10.25)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12Q 1/02 (2006.01)	C12Q 1/02	2G043
C12Q 1/68 (2006.01)	C12Q 1/68 A	2G059
GO1N 33/536 (2006.01)	GO1N 33/536 D	4B063
GO1N 33/569 (2006.01)	GO1N 33/569 B	
GO1N 21/64 (2006.01)	GO1N 21/64 F	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 65 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2012-509974 (P2012-509974)
 (86) (22) 出願日 平成22年5月6日 (2010.5.6)
 (85) 翻訳文提出日 平成23年12月26日 (2011.12.26)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2010/033879
 (87) 国際公開番号 W02010/129779
 (87) 国際公開日 平成22年11月11日 (2010.11.11)
 (31) 優先権主張番号 61/215,594
 (32) 優先日 平成21年5月7日 (2009.5.7)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 502073946
 ビオメリュー・インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国27712 ノースカロライ
 ナ州ダーラム、ロドルフ・ストリート10
 0番
 (74) 代理人 100147485
 弁理士 杉村 憲司
 (74) 代理人 100119530
 弁理士 富田 和幸
 (74) 代理人 100174001
 弁理士 結城 仁美
 (72) 発明者 ジョン ウォルシュ
 アメリカ合衆国 ノースカロライナ州 2
 7713 ダーラム ウェリングハム ド
 ライブ 704

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗生物質耐性測定方法

(57) 【要約】

本発明は、微生物の抗生物質耐性状態を測定するための方法およびシステムに関するものである。さらに本発明は、単独のシステム内でインサイチュで微生物の抗生物質耐性状態を測定する方法を提供する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

微生物の抗生物質耐性状態を測定するための方法であって、

(a) 前記微生物と耐性測定親和性リガンドとを、微生物/耐性測定親和性リガンド複合体が形成可能な条件下で接触させるステップと、

(b) 前記ステップ(a)にて形成された前記微生物/耐性測定親和性リガンド複合体を、未結合の耐性測定親和性リガンドから分離するステップと、

(c) 前記微生物/耐性測定親和性リガンド複合体内の、前記微生物に対する前記耐性測定親和性リガンドの結合量を測定するステップと、および、

(d) 前記微生物/耐性測定親和性リガンド複合体内の、前記微生物に対する前記耐性測定親和性リガンドの結合量を、同じ微生物の既知の抗生物質感受性株もしくは抗生物質耐性株、または既知の抗生物質感受性株もしくは抗生物質耐性株の個体群による耐性測定親和性リガンドの結合量に対して比較するステップと、を含み、

前記微生物/耐性測定親和性リガンド複合体内の前記微生物が、抗生物質感受性微生物によって結合される量とは異なる量の耐性測定親和性リガンドに結合する場合、または、

前記微生物/耐性測定親和性リガンド複合体内の前記微生物が、抗生物質耐性微生物によって結合される量と同量の耐性測定親和性リガンドに結合する場合には、

前記微生物を抗生物質耐性として同定することを特徴とする、方法。

【請求項 2】

前記ステップ(a)~(d)の1つまたは複数は、密閉容器内で実施されることを特徴とする、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

前記耐性測定親和性リガンドは、抗生物質、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、又はこれらの抗体断片、核酸プローブ、酵素基質、アプタマー、ペプチド模倣物、ファージ由来の結合タンパク質、レクチン、宿主防御ペプチド、バクテロシン、バクテリオファージ、ならびに、核酸、脂質、炭水化物、多糖類、タンパク質、およびこれらの組み合わせに対して選択的な色素を含む群から選択されることを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項 4】

前記耐性測定親和性リガンドは抗生物質であることを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項 5】

前記耐性測定親和性リガンドは、β-ラクタム抗生物質またはグリコペプチド抗生物質であることを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項 6】

前記耐性測定親和性リガンドは、検出可能な標識を有することを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項 7】

前記検出可能な標識は、蛍光性、発光性、りん光性、放射性、ラマン活性、質量分光分析反応性、および/または、比色分析化合物標識を含むことを特徴とする、請求項6に記載の方法。

【請求項 8】

前記微生物は、臨床試料または非臨床試料であることを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項 9】

前記試料は、陽性血液培養物由来であることを特徴とする、請求項8に記載の方法。

【請求項 10】

分離する前記ステップ(b)の前に、前記微生物を含む前記試料を、前記試料内に存在しうるあらゆる非微生物細胞を選択的に溶解するように処理することを特徴とする、請求項1に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 1 1】

前記微生物を容器内の密度クッション上に積層し、前記容器の遠心分離によって分離する前記ステップ (b) を実施することを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 2】

前記密度クッションは、顕微鏡の液浸油、鉱物油、シリコーン油、フルオロシリコーン油、シリコーンゲル、コロイドシリカ、ヨウ化造影剤、スクロース、メトリゾエート F i c o l l (登録商標)、ジアトリゾエート デキストラン、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリエチレンオキシド (高分子量)、P l u r o n i c (登録商標) F 1 2 7、P l u r o n i c (登録商標) F 6 8、ポリアクリル酸、架橋したポリビニルアルコール、架橋したポリビニルピロリジン、P E Gメチルエーテルメタクリレート、ペクチン、アガロース、キサントラン、ジェラン、P h y t a g e l (登録商標)、ソルビトール、F i c o l l (登録商標)、グリセロール、デキストラン、グリコーゲン、塩化セシウム、パーフルオロカーボン液および/またはハイドロフルオロカーボン液、これらの任意の組み合わせ、のうちの1つまたは複数を含むことを特徴とする、請求項 1 1 に記載の方法。

10

【請求項 1 3】

前記密度クッションは約 1 . 0 2 5 ~ 約 1 . 1 2 0 g / m l の密度を有することを特徴とする、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記容器は、底部、上部および/または側面に光学窓を備え、該光学窓は、少なくとも近赤外光、紫外光、および/または可視光スペクトルの少なくとも一部について透過性であることを特徴とする、請求項 1 1 に記載の方法。

20

【請求項 1 5】

測定する前記ステップ (c) は、分光法を含むことを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記分光法は、蛍光分光法、拡散反射分光法、透過吸収分光法、赤外分光法、テラヘルツ分光法、ラマン分光法、表面増強ラマン分光法、空間オフセットラマン分光法、共鳴ラマン分光法、およびこれらのあらゆる組み合わせを含む群から選択されることを特徴とする、請求項 1 5 に記載の方法。

30

【請求項 1 7】

前記分光法は、全面蛍光分光法であることを特徴とする、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記分光法は、励起発光マトリクス (E E M) を測定するステップを含むことを特徴とする、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記 E E M は、少なくとも2つの異なる波長を含むことを特徴とする、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記 E E M は、既知の微生物の E E M のデータベースと比較されることを特徴とする、請求項 1 8 に記載の方法。

40

【請求項 2 1】

前記微生物の結合量を微生物の固有特性と比較して、前記耐性測定親和性リガンド結合の量を細胞ベースで測定することを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記固有特性は固有蛍光であることを特徴とする、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記ステップ (c) は、回収した微生物を得るために微生物を回収するステップを含むことを特徴とする、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 2 4】

50

前記ステップ(d)は同じ微生物の抗生物質感受性株および抗生物質耐性株の両方による、耐性測定親和性リガンド結合量と耐性測定親和性リガンド結合量とを比較するステップを含むことを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項25】

同一微生物の既知の抗生物質感受性株または抗生物質耐性株による結合量は、事前に測定されていることを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項26】

少なくとも一部が自動化されていることを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項27】

微生物の抗生物質耐性状態を測定するための方法であって、

10

(a)前記微生物と耐性測定親和性リガンドとを、微生物/耐性測定親和性リガンド複合体が形成可能な条件下で接触させるステップと、

(b)前記ステップ(a)にて形成された前記微生物/耐性測定親和性リガンド複合体を、未結合の耐性測定親和性リガンドから分離するステップと、

(c)前記微生物/耐性測定親和性リガンド複体内の、前記微生物に対する前記耐性測定親和性リガンドの結合親和性を測定するステップと、および、

(d)前記微生物/耐性測定親和性リガンド複体内の、前記微生物に対する前記耐性測定親和性リガンドの前記結合親和性を、同じ微生物の既知の抗生物質感受性株もしくは抗生物質耐性株、または既知の抗生物質感受性株もしくは抗生物質耐性株の個体群による耐性測定親和性リガンドの結合親和性に対して比較するステップと、を含み、

20

前記微生物/耐性測定親和性リガンド複体内の前記微生物が、抗生物質感受性微生物による結合親和性とは異なる、耐性測定親和性リガンドの結合親和性を示す場合、または、

前記微生物/耐性測定親和性リガンド複体内の前記微生物が、抗生物質耐性微生物による結合親和性と同じ、耐性測定親和性リガンドの結合親和性を示す場合には、前記微生物を抗生物質耐性として同定することを特徴とする、方法。

【請求項28】

微生物の抗生物質耐性状態を測定するための方法であって、

(a)微生物を含むことが既知であるまたは微生物を含む可能性がある試験試料を採取するステップと、

30

(b)前記試験試料内の前記微生物と耐性測定親和性リガンドとを、微生物/耐性測定親和性リガンド複合体が形成可能な条件下で接触させるステップと、

(c)細胞の代謝または膜の完全性を測定する1種又は複数種の蛍光色素を任意で添加するステップと、

(d)前記試料内に存在する可能性のある非微生物細胞を選択的に溶解させて、任意で溶解試料を生成するステップと、

(e)前記試験試料の他の構成成分、または任意には前記溶解試料から前記微生物を分離して、微生物ペレットを形成するステップと、

(f)前記ペレットを解析して前記微生物の測定値を得るステップと、

(g)前記測定値を、同じ種の微生物の抗生物質耐性および/または抗生物質感受性微生物について得られた測定値またはその予測値と比較して、前記試験試料内の前記微生物の抗生物質耐性状態を測定するステップと、を含む方法。

40

【請求項29】

1種または複数種の蛍光色素を前記ステップ(c)で添加することを特徴とする、請求項28に記載の方法。

【請求項30】

前記ステップ(g)における前記抗生物質耐性測定は、誘導性の耐性の測定であることを特徴とする、請求項28に記載の方法。

【請求項31】

50

前記解析ステップ (f) は、分光法による解析を含むことを特徴とする、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 32】

前記分光法は、蛍光分光法、拡散反射分光法、透過吸収分光法、赤外分光法、テラヘルツ分光法、ラマン分光法、表面増強ラマン分光法、空間オフセットラマン分光法、共鳴ラマン分光法、およびこれらのあらゆる組み合わせを含む群から選択されることを特徴とする、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 33】

前記微生物を容器内の密度クッション上に積層し、前記容器の遠心分離によって分離する前記ステップ (b) を実施することを特徴とする、請求項 29 に記載の方法。

10

【請求項 34】

微生物の抗生物質耐性状態を測定するシステムであって、該システムは、

(a) 前記微生物または、前記微生物および耐性測定親和性リガンドを含む試料を含む容器と、

(b) 密度クッションと、および、

(c) 測定を行うための分光器と、を備え、

前記システム内におけるインサイチュ分離により前記容器内で濃縮された前記微生物の抗生物質耐性状態が、前記測定によって決定されることを特徴とする、システム。

【請求項 35】

更に、遠心分離機を備えることを特徴とする、請求項 34 に記載のシステム。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願の相互参照)

本願は、2009年5月7日出願した米国仮特許出願第61/215,594号「Methods for Antimicrobial Resistance Determination (抗生物質耐性測定方法) 」の恩典を主張する。この米国仮特許出願の開示内容を本明細書に援用する。

【0002】

本発明は微生物の抗生物質耐性状態を測定するための方法およびシステムに関するものである。さらに、本発明は、単一システム内におけるインサイチュ (in situ) の微生物の抗生物質抵抗性を測定するための方法を提供するものである。

30

【背景技術】

【0003】

血流感染症は高い罹患率および死亡率と関連付けられるが、培養後に生化学的同定および抗生物質感受性試験を行う現行の診断法は実施期間が数日に及ぶこともある。典型的には、臨床症状に基づく経験的治療が開始されるが、試験結果が臨床決定に影響を及ぼすのは初期治療が失敗したときだけである。陽性の血液培養結果が出てから最初の1時間以内に血流感染をキャラクタリゼーションすることができれば診断情報の臨床的意義が大きく高まるはずである。この必要性を満足するために分子増幅法が提案されているが、この手法にも大きな難題が残っている。陽性の血液培養プロス自体は種々の同定 (ID) 試験で使用され得る微生物の自然増殖個体群である。

40

【0004】

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA: Methicillin-resistant Staphylococcus aureus) は、健康な患者においてさえ早期に感染を引き起こす恐れがある、地域感染型および院内感染型の危険な病原体である。MRSAは、一般に年配患者および病気の患者の多くに常在細菌叢として存在し、医療現場において複数の患者間で早期に交差感染する能力を有する。「メチシリン耐性」のメカニズムは、PBP2aとして知られる、改変されたペニシリン結合タンパク質2の生成によって実質的に媒介される。PBP2aは、機能的酵素活性を維持するが、 β -ラクタム抗生物質に対する親和性が有意に低い。バンコマイシン耐性腸球菌 (VRE: Vancomycin-Resistant Enterococci) は、迅速な同定を必要とする、

50

他の危険な病原体の群に属する。メチシリン耐性と同様に、バンコマイシン耐性は、それらの細胞膜標的に対する抗生物質の親和性を低減することによって媒介される。

【0005】

MRSAおよびVREを同定するための従来の方法は労働集約的であり、さらに、使用者がエアロゾルに曝される恐れがあるステップが存在する故に安全性も欠く恐れがあった。血液培養ブロスに含まれる微生物を単離するために、耐性の迅速な測定に適合した、迅速でその上安全な信頼性のある方法が至急必要とされている。本発明により、そのような方法が提供される。

【発明の概要】

【0006】

本発明は、微生物の抗生物質耐性状態を測定するための方法を提供するものである。これらの方を用いると、微生物の抗生物質耐性状態の測定を従来技術よりも迅速に行うことができ、それにより（例えば敗血症および/または他の感染症を患うまたはその疑いがある被験者の）より迅速な診断が可能となり、また（例えば食品、水道、および医薬品の）汚染材料のキャラクタリゼーションも可能となる。試料の採取から微生物の抗生物質耐性状態の測定に至る本発明の方法に含まれる各ステップを非常に短い時間枠、例えば約240分未満で実行して臨床的に意義のある実用的な情報を生成することができる。また、本発明の方法は完全に自動化することもでき、それにより感染性材料および/または汚染試料を取り扱うリスクを低減することができる。

【0007】

第1の観点によれば、本発明は微生物の抗生物質耐性状態を測定するための方法であって、

(a) 前記微生物と耐性測定親和性リガンドとを、微生物/耐性測定親和性リガンド複合体が形成可能な条件下で接触させるステップと、

(b) 前記ステップ(a)にて形成された前記微生物/耐性測定親和性リガンド複合体を、未結合の耐性測定親和性リガンドから分離するステップと、

(c) 前記微生物/耐性測定親和性リガンド複体内の、前記微生物に対する前記耐性測定親和性リガンドの結合量を測定するステップと、および、

(d) 前記微生物/耐性測定親和性リガンド複体内の、前記微生物に対する前記耐性測定親和性リガンドの結合量を、同じ微生物の既知の抗生物質感受性株もしくは抗生物質耐性株、または既知の抗生物質感受性株もしくは抗生物質耐性株の個体群による耐性測定親和性リガンドの結合量に対して比較するステップと、を含み、

前記微生物/耐性測定親和性リガンド複体内の前記微生物が、抗生物質感受性微生物によって結合される量とは異なる量の耐性測定親和性リガンドに結合する場合、または、

前記微生物/耐性測定親和性リガンド複体内の前記微生物が、抗生物質耐性微生物によって結合される量と同量の耐性測定親和性リガンドに結合する場合には、

前記微生物を抗生物質耐性として同定する方法に関するものである。

【0008】

他の観点によれば、本発明は微生物の抗生物質耐性状態を測定するための方法であって、

(a) 微生物を含むことが既知であるまたは微生物を含む可能性がある試験試料を採取するステップと、

(b) 前記試験試料内の前記微生物と耐性測定親和性リガンドとを、微生物/耐性測定親和性リガンド複合体が形成可能な条件下で接触させるステップと、

(c) 細胞の代謝または膜の完全性を測定する1種又は複数種の蛍光色素を任意で添加するステップと、

(d) 前記試料内に存在する可能性のある非微生物細胞を選択的に溶解させて、任意で溶解試料を生成するステップと、

(e) 前記試験試料の他の構成成分、または任意には前記溶解試料から前記微生物を分離して、微生物ペレットを形成するステップと、

10

20

30

40

50

(f) 前記ペレットを解析して前記微生物の測定値を得るステップと、

(g) 前記測定値を、同じ種の微生物の抗生物質耐性および/または抗生物質感受性微生物について得られた測定値またはその予測値と比較して、前記試験試料内の前記微生物の抗生物質耐性状態を測定するステップと、
を含む方法に関するものである。

【 0 0 0 9 】

一実施形態において、分離ステップは、微生物/耐性測定親和性リガンド複合体を容器(例えば、密閉容器)内の密度クッション上に積層し、容器を遠心分離することで、微生物/耐性測定親和性リガンド複合体をペレット化すると共に、未結合のリガンドを含む溶媒を密度クッションの上面に残す。他の実施形態では、容器は、底部および/または側面に光学窓を備え、微生物/体制測定親和性リガンド複合体ペレットを測定ステップにて分光解析することができる。微生物の抗生物質耐性状態は、ペレットのスペクトルを抗生物質耐性状態が既知の微生物のスペクトルと比較することで決定することができる。更なる操作を要することなくペレット内および/または密閉容器内から微生物の抗生物質耐性状態を直接測定することができるという能力は、微生物同定の安全性を向上させる。

10

【 0 0 1 0 】

一実施形態において、測定ステップは微生物/耐性測定親和性リガンド複合体ペレットを回収して、微生物を適切な溶媒に再懸濁して、再懸濁した微生物を解析する(例えば、分光学的に)ことで実施する。他の実施形態では、本発明による方法は、再懸濁した微生物に対して、更なる同定および/又はキャラクタリゼーション試験(例えば、薬剤耐性、毒性因子、耐性記録)を、更に実施することを含む。

20

【 0 0 1 1 】

更なる観点において、本発明は微生物の抗生物質耐性状態を測定するシステムであって、該システムは、

(a) 前記微生物または、前記微生物および耐性測定親和性リガンドを含む試料を含む容器と、

(b) 密度クッションと、および、

(c) 測定を行うための分光器と、を備え、

前記システム内におけるインサイチュ分離により前記容器内で濃縮された前記微生物の抗生物質耐性状態が、前記測定によって決定されることを特徴とするものである。他の実施形態において、本発明によるシステムは、未結合の耐性測定親和性リガンドから微生物を分離するための遠心分離機を備えるシステムに関するものである。

30

【 0 0 1 2 】

以下、添付図面を参照しながら本発明の詳細な説明を行う。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 1 3 】

【 図 1 】メチシリン感受性(MSSA)およびメチシリン耐性(MRSA)のS. aureus株のBOCILLIN(商標)-FL(BODIPY FL-標識ペニシリン)による代謝標識を示す図である。

【 図 2 】MSSAおよびMRSAに対するBOCILLIN(商標)-FLの結合の時間経過を示す図である。

40

【 図 3 】MSSAおよびMRSAに対するBOCILLIN(商標)-FLの滴定を示す図である。

【 図 4 】様々なMSSAおよびMRSAに対するBOCILLIN(商標)-FLの結合を示す図である。

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 1 4 】

本発明は様々な形態で実施することができる。本発明は本明細書に記載した実施形態に限定されるものと解釈すべきではない。そうではなく、これらの実施形態は本開示が詳細で完全なものとなり、本発明の範囲が当業者に十分伝わるようにするために提示するもの

50

である。例えば、一実施形態に関して例示した特徴を他の実施形態に組み込むことができ、特定の一実施形態に関して例示した特徴をその実施形態から削除することもできる。また、本開示に照らせば、本明細書に示した実施形態に対する本発明から逸脱しない様々な変更および追加が当業者には理解されるであろう。

【0015】

別段の定めがない限り、本明細書で使用する技術用語および科学用語はすべて本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書では、発明の説明で使用する用語は特定の実施形態を説明するためのものであって本発明を限定するものではない。

【0016】

[定義]

本明細書で使用する「a」、「an」または「the」は1つまたは2つ以上のものを意味する可能性がある。例えば「細胞(a cell)」という場合は単一の細胞を意味することも複数の細胞を意味することもある。

【0017】

また、本明細書で使用する「および/または(and/or)」という表現は、列挙した関連アイテムの1つまたは複数を対象とする任意の可能な組合せに加えて選択肢(「または(or)')として解釈した場合の組合せの欠如も指し、それらをすべて包含するものである。

【0018】

更に、本明細書で使用する「約(about)」という用語は、本発明の化合物または作用物質の量、投与量、時間、温度といった測定可能な値を指すときは、指定された量の $\pm 20\%$ 、 $\pm 10\%$ 、 $\pm 5\%$ 、 $\pm 1\%$ 、 $\pm 0.5\%$ または $\pm 0.1\%$ のばらつきを含むものとする。

【0019】

本明細書で使用する「微生物」という用語は、一般に単細胞であり、研究室で繁殖および取り扱い可能な有機体を包含する。このような有機体としてはグラム陽性バクテリア、グラム陰性バクテリア、イースト、カビ、寄生虫、モリキューテス、およびこれらのあらゆる組み合わせが挙げられるが、これらに限定されるものではない。本発明のグラム陰性バクテリアの非限定的な例としては下記の属のバクテリアが挙げられるが、これらに限定されるものではない：シュードモナス属、エシェリキア属、サルモネラ属、赤痢菌属、エンテロバクター属、クレブシエラ属、セラチア属、プロテウス属、カンピロバクター属、ヘモフィルス属、モルガネラ属、ビブリオ属、エルシニア属、アシネトバクター属、ステノトロフォモナス属、プレブディモナス属、ラルストニア属、アクロモバクター属、フゾバクテリウム属、プレボテラ属、ブランハメラ垂属、ナイセリア属、パークホルデリア属、シトロバクター属、ハフニア属、エドワードシエラ属、アエロモナス属、モラクセラ属、ブルセラ属、パストレラ属、プロピデンシア属およびレジオネラ属。本発明のグラム陽性バクテリアの非限定的な例は、以下の属のバクテリアを含む：腸球菌、連鎖球菌、ブドウ球菌、バチルス属、パエニバチルス属、乳酸桿菌属、リステリア属、ペプトストレプトコッカス属、プロピオン酸菌属、クロストリジウム属、バクテロイデス属、ガードネラ属、コクリア属、ラクトコッカス属、ロイコノストック属、マイクロコッカス、マイコバクテリウム属およびコリネバクテリウム属。本発明のイーストおよびカビの非限定的な例としては下記の属のイーストおよびカビが挙げられるが、これらに限定されるものではない：カンジダ属、クリプトコックス属、ノカルジア属、アオカビ属、アルタナリア属、ロドトルラ属、アスペルギルス属、フザリウム属、サッカロミセス属およびトリコスボロン属。本発明の寄生虫の非限定的な例としては下記の属の寄生虫が挙げられるが、これらに限定されるものではない：トリパノソーマ属、バベシア属、リーシュマニア属、マラリア原虫属、ブケリア属(Wucheria)、ブルギア属、オンコセルカ属およびネグレリア属。本発明のモリキューテスの非限定的な例としてはマイコプラズマ属およびウレアプラズマ属のモリキューテスが挙げられる。

10

20

30

40

50

【0020】

本明細書で使用する「分離 (separate)」という用語は、それ自体の初期状態すなわち培養培地または培養基から除去、濃縮または他の方法で切り離された微生物の任意の試料を包含するものとする。例えば、本発明によれば、通常なら抗生物質耐性状態の測定に干渉する恐れがある非微生物または非微生物構成成分から微生物を（例えば分離試料として）分離することができる。この用語は、他の2層に挟まれた微生物、例えば遠心分離後に高密度クッションの上面に集められた微生物の層、または固体表面（例えばフィルター膜）上に集められた微生物の層を含む。この用語は、ある層（例えば密度クッション）を部分的に通過した一群の微生物も含む可能性がある。したがって、分離する微生物試料は、当初の試料よりも濃縮されたまたは当初の試料から切り離された一群または一層の微生物および/または微生物の構成成分を含む可能性があり、微生物が密集した高密度凝集塊から微生物の拡散層に及ぶ様々なものが存在する可能性がある。分離フォームまたは分離試料に含まれ得る微生物構成成分としては線毛、鞭毛、フィルムリエおよびカプセルの任意の組合せが挙げられるが、これらに限定されるものではない。微生物から分離する非微生物構成成分は非微生物細胞（例えば血球および/または他の組織細胞）および/またはそれらの任意の構成成分を含む可能性がある。

10

【0021】

本明細書で使用する「ペレット (pellet)」という用語は、一塊の微生物として圧縮または堆積した微生物の任意の試料を包含するものとする。例えば、ある試料に由来する微生物を遠心分離または当業界で知られる他の方法によりチューブの底部に一塊に圧縮または堆積させることができる。この用語は、遠心分離後の容器の底部および/または側面上に存在する一群の微生物（および/またはその構成成分）を含む。ペレットに含まれ得る微生物構成成分としては線毛、鞭毛、フィルムリエおよびカプセルの任意の組合せが挙げられるが、これらに限定されるものではない。本発明によれば、通常なら抗生物質耐性状態の測定に干渉する恐れがある非微生物または非微生物構成成分から微生物を（例えばほぼ浄化された微生物ペレットとして）切り離してペレット化することができる。微生物から分離する非微生物構成成分は非微生物細胞（例えば血球および/または他の組織細胞）および/またはそれらの任意の構成成分を含む可能性がある。

20

【0022】

本明細書で使用する「密度クッション (density cushion)」という用語は、全体的に均質な密度を有する溶液を指す。

30

【0023】

本明細書で使用する「耐性測定親和性リガンド」という用語は、抗生物質感受性株の微生物よりも、耐抗生物質微生物に対して、（例えば、リガンド結合の量、結合の度合い、および/または結合の親和性等において）様々な程度で結合する、あらゆる検出可能な化合物又は分子を指す。本明細書で使用するように、この用語は標識されていないリガンドや、検出可能な標識に対して結合されたりリガンドを含む。いくつかの実施形態では、耐性測定親和性リガンドは、抗生物質感受性株と比較して抗生物質耐性株に対して弱く結合する。他の実施形態では、耐性測定親和性リガンドは、抗生物質感受性株と比較して抗生物質耐性株に対して強く結合する。

40

【0024】

本明細書で使用する「結合」という用語は、耐性測定親和性リガンドに対して用いるように、微生物とリガンドとの物理的な関連性を指す。この用語は、微生物に対するリガンドの実際の物理的結合、例えば、微生物の構造（例えば、細胞内または表面タンパク質、核酸、細胞小器官、細胞膜、細胞壁等）に対する共有結合性又は非共有結合性の結合を含む。また、この用語は、物理的結合を伴わない微生物とリガンドとの関連性を含み、例えば、微生物内のリガンドの捕捉を含む。例えば、耐性測定親和性リガンドは、細胞内酵素のための酵素基質および酵素の作用を受けた後に細胞内に捕捉されるリガンドを含む。

【0025】

本明細書で使用する「同一微生物」という用語は、対象とする微生物と同一の属および

50

種に属する微生物を指す。

【0026】

本明細書で使用する「異なる量を結合する」、「リガンド結合量の差異」、およびこれらの変形は、2つの微生物間の耐性測定親和性リガンドの結合量の統計的に有意な差異を指す。

結合における「統計的に有意な」差異とは、少なくとも約5%、例えば、少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、またはそれ以上である。「同じ量を結合する」という用語およびその変形は、2つの微生物間の耐性測定親和性リガンドの結合量であって、約20%よりも少ない結合量を指す。約20%よりも少ない結合量とは、例えば、15%、10%、5%、1%、またはそれ未満である。リガンド結合量は、当業者に既知のあらゆる方法によって測定することができる。リガンド結合量は、例えば、リガンドの先天的特性や、リガンドにリンクされた検知可能な標識の特性を計測することで測定することができる。

10

【0027】

本明細書で使用する、「異なる結合親和性」、「リガンドの結合親和性の差異」およびこれらの変形は、2つの微生物の間の体制測定親和性リガンドの結合親和性における差異であって、少なくとも約5%の差異である。少なくとも約5%の差異とは、例えば、少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、またはそれ以上である。「同一の結合親和性」およびその変形は、2つの微生物の間の体制測定親和性リガンドの結合親和性における差異であって、少なくとも約20%未満の差異である。少なくとも約20%未満の差異とは、例えば、15%、10%、5%、1%、またはそれ未満である。リガンドの結合親和性は、当業者に既知のあらゆる方法によって測定することができる。リガンドの結合親和性は、例えば、リガンドの先天的特性や、リガンドにリンクされた検知可能な標識の特性を計測することで測定することができる。

20

【0028】

本発明は、試料中の微生物の抗生物質耐性状態の測定方法を提供する。これらの迅速な方法を用いると、微生物の抗生物質耐性状態の測定を従来技術よりも迅速に行うことができ、それにより（例えば敗血症、および/またはその他の感染症を患っているまたはその疑いがある被験者の）より迅速な診断が可能となり、また（例えば食品、水道、および医薬品の）汚染材料のより迅速な特定も可能となる。試料の採取から微生物の抗生物質耐性状態の測定に至る本発明の方法に含まれる各ステップを非常に短い時間枠で実行して臨床上に意義のある実用的な情報を生成することができる。いくつかの実施形態では、本発明の方法を約240分未満、例えば約180、120、110、100、90、80、70、60、50、40、30、20、15、10、5、4、3、2または1分未満で実行することができる。従来方法よりも優れた本発明の方法の改良点はこの迅速さにある。これらの方法を使用して本明細書に記載した任意の微生物の抗生物質耐性状態の測定を行うことができる。一実施形態において、微生物はバクテリアである。別の実施形態において、微生物はイーストである。別の実施形態では、微生物はカビである。他の一実施形態において、微生物は寄生虫である。別の実施形態において、微生物はモリキューテスである。また、本発明の方法は部分的にまたは完全に自動化することもでき、それにより感染性材料を取り扱うリスクおよび/または試料を汚染するリスクを低減することができる。

30

40

【0029】

第1の態様において、本発明は微生物の抗生物質耐性状態を測定するための方法であって、

(a) 前記微生物と耐性測定親和性リガンドとを、微生物/耐性測定親和性リガンド複合体が形成可能な条件下で接触させるステップと、

(b) 前記ステップ(a)にて形成された前記微生物/耐性測定親和性リガンド複合体を、未結合の耐性測定親和性リガンドから分離するステップと、

(c) 前記微生物/耐性測定親和性リガンド複体内の、前記微生物に対する前記耐性

50

測定親和性リガンドの結合量を測定するステップと、および、

(d) 前記微生物/耐性測定親和性リガンド複合体内の、前記微生物に対する前記耐性測定親和性リガンドの結合量を、同じ微生物の既知の抗生物質感受性株もしくは抗生物質耐性株、または既知の抗生物質感受性株もしくは抗生物質耐性株の個体群による耐性測定親和性リガンドの結合量に対して比較するステップと、を含み、

前記微生物/耐性測定親和性リガンド複合体内の前記微生物が、抗生物質感受性微生物によって結合される量とは異なる量の耐性測定親和性リガンドに結合する場合、または、

前記微生物/耐性測定親和性リガンド複合体内の前記微生物が、抗生物質耐性微生物によって結合される量と同量の耐性測定親和性リガンドに結合する場合には、

前記微生物を抗生物質耐性として同定することを特徴とする方法に関するものである。

10

【0030】

他の態様において、本発明は微生物の抗生物質耐性状態を測定するための方法であって、

(a) 微生物を含むことが既知であるまたは微生物を含む可能性がある試験試料を採取するステップと、

(b) 前記試験試料内の前記微生物と耐性測定親和性リガンドとを、微生物/耐性測定親和性リガンド複合体が形成可能な条件下で接触させるステップと、

(c) 細胞の代謝または膜の完全性を測定する1種又は複数種の蛍光色素を任意で添加するステップと、

(d) 前記試料内に存在する可能性のある非微生物細胞を選択的に溶解させて、任意で溶解試料を生成するステップと、

20

(e) 前記試験試料の他の構成成分、または任意には前記溶解試料から前記微生物を分離して、微生物ペレットを形成するステップと、

(f) 前記ペレットを解析して前記微生物の測定値を得るステップと、

(g) 前記測定値を、同じ種の微生物の抗生物質耐性および/または抗生物質感受性微生物について得られた測定値またはその予測値と比較して、前記試験試料内の前記微生物の抗生物質耐性状態を測定するステップと、

を含む方法に関するものである。

【0031】

本発明による方法の一つの利点は、方法を実施するにあたっての迅速性である。他の利点は、本発明による方法は無傷の微生物について実施することができるという点である。本発明による方法は、溶解済みの、または無傷ではない微生物についても実施することができるにもかかわらず、微生物を溶解し、あるいは、例えば、細胞内成分を露出させるためまたは細胞膜を単離するために微生物を破壊することなく、抗生物質耐性微生物の同定を実施することができる。したがって、過剰なpH、界面活性剤、又は熱などの過酷な条件は不要である。さらに、微生物を測定方法によって破壊する必要が無いので、その微生物を更なる試験又は用途に用いることができる。

30

【0032】

[試料]

本発明の幾つかの実施形態において、抗生物質耐性に関する試験の対象である微生物は、1つまたは複数の試料である。本発明の方法によって試験可能な試料は、微生物の存在および/または増殖が疑われるまたは疑われる可能性がある臨床試料と非臨床試料の両方を含み、また微生物の有無を定期的にまたは臨時に検査する材料の試料も含む。利用する試料の量は方法の汎用性および/または感度に応じて大きく変化する可能性がある。試料調製は当業者に既知の任意の数の技法を利用して実行することができるが、本発明の一つの効果は、複雑な試料タイプ、例えば血液、体液および/または他の不透明物質等を、多くの前処理を殆どまたはまったく伴わないシステムを利用して直接試験することができる点にある。

40

【0033】

試験可能な臨床試料としては、典型的には臨床検査室または研究所で試験される任意の

50

タイプの試料が含まれ、例えば血液、血清、血漿、血液分画、関節液、尿、精液、唾液、糞便、脳脊髄液、胃内容物、腔分泌物、組織ホモジェネート、骨髄穿刺液、骨ホモジェネート、痰、吸引液、ぬぐい液 (swab) およびぬぐい液残滓 (swab rinsate)、他の体液等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0034】

本発明は研究用途ならびに獣医学および医学用途に適用される。臨床試料が採取可能な適切な被検者は一般には哺乳類の被験者であるが、どのような動物であってもよい。本明細書で使用する「哺乳類」という用語には、それらに限らないが、人間、人間以外の霊長類、牛、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウマ、ネコ、イヌ、ウサギ、齧歯動物 (例えばラットまたはマウス) 等が含まれる。人間の被験者には新生児、乳児、幼児、成人および老人の被験者を含む。試料が採取可能な被験者としては哺乳類、鳥類、爬虫類、両生類および魚類が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

10

【0035】

また、試験可能な非臨床試料としては、食品、飲料、医薬品、化粧品、水 (例えば飲料水、非飲料水および廃水)、海水パラスト、空気、土壌、汚水、植物材料 (例えば種、葉、茎、根、花、果実)、血液製剤 (例えば血小板、血清、血漿、白血球分画等)、ドナー臓器または組織試料、生物戦試料 (biowarfare sample) 等を含めた物質が挙げられるが、これらに限定されるものではない。本方法は工業環境、商業環境、および/または臨床環境の汚染レベル、工程管理、品質管理等をモニタリングするための実時間試験にも特に適している。

20

【0036】

本発明の一実施形態では、微生物感染症を患うまたはその疑いがある被験者 (例えば患者) から試料を採取する。一実施形態において、被験者は敗血症、例えば菌血症または真菌血症を患っているまたはその疑いがある。試料は、被験者に直接由来する血液試料であってよい。試料は、患者の血液の試料から培養した血液培養物、例えば B a c T / A L E R T (登録商標) 血液培養物に由来するものであってもよい。血液培養試料は陽性血液培養物、例えば微生物の存在を示す血液培養物に由来するものであってもよい。いくつかの実施形態では、陽性血液培養物が陽性になった時点から短い時間のうちに、例えば約 6 時間以内、例えば約 5、4、3 もしくは 2 時間以内、または約 60 分以内、例えば約 55、50、45、40、35、30、25、20、15、10、5、4、3、2 もしくは 1 分以内に、該陽性血液培養物から試料を採取する。一実施形態では、微生物が対数増殖期にある培養物から試料を採取する。別の実施形態では、微生物が定常期にある培養物から試料を採取する。

30

【0037】

本発明は、微生物の検出、抗生物質耐性状態の測定に関して高い感度をもたらす。これにより、最初に微生物を単離するステップを経る必要のない検出が可能となる。このような検出は、固体または半固体培地上で微生物を培養し、培養したコロニーをサンプリングすることにより実現される。しかし、本発明の一実施形態において、試料は固体または半固体表面上で培養した微生物 (例えばバクテリア、イーストまたはカビ) のコロニーに由来する。

40

【0038】

試料の体積は、本発明の方法における分離/単離ステップを実行した後に解析され得る検出可能な量 (例えば、ペレット) の微生物を生成するのに十分大きいものとする必要がある。適切な体積は試料のソースおよび試料中の予想微生物レベルに依存する。例えば、陽性血液培養物の体積当たりの微生物レベルが汚染の有無を検査すべき飲料水試料よりも高く、したがって飲料水試料に比べて小さい体積の血液培養基が必要となる可能性もある。一般に、試料サイズは約 50 ml 未満とすることができ、例えば約 40、30、20、15、10、5、4、3 または 2 ml 未満とすることができる。いくつかの実施形態では、試料サイズを約 1 ml とすることができ、例えば約 0.75、0.5 または 0.25 ml とすることができる。分離をマイクロスケールで実行するいくつかの実施形態では、試

50

料サイズを約200 μ l未満とすることができ、例えば約150、100、50、25、20、15、10または5 μ l未満とすることができる。いくつかの実施形態（例えば試料が少数の微生物を含むことが予想される場合）では、試料サイズを約100ml以上とすることができ、例えば約250、500、750または1000ml以上とすることができる。

【0039】

[接触ステップ]

本発明の1つの態様において、微生物または微生物含有試料を耐性測定親和性リガンドと接触させる。一実施形態では、例えば、試料にリガンドを添加するなどして、試料培地にて接触を実施する。他の実施形態では、接触は、微生物およびリガンドを含む結合混合物または組成物内で生じる。更に他の実施形態では、耐性測定親和性リガンドは分離容器内の密度クッションに含まれる。一実施形態では、耐性測定親和性リガンドは、ペニシリン又は他の β -ラクタム系抗生物質、バンコマイシン又は他のグリコペプチド抗生物質、ポリミキシンB又はセフトピプロール、およびこれらのあらゆる組み合わせである。他の実施形態では、耐性測定親和性リガンドは、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、又は抗体断片、核酸プローブ、アプタマー、リガンド、酵素基質、ペプチド模倣物、ファージ由来の結合タンパク質、脂質、炭水化物、ポリサッカライド、若しくはタンパク質、又はこれらのあらゆる組み合わせである。耐性測定親和性リガンド自体が検出可能な信号を発しない場合には、リガンドをマーカー（例えば、可視又は蛍光マーカー）に結合させるなどして、リガンドを標識して検出可能な信号を生成させることができる。マーカーには、蛍光性マーカー、発光性マーカー、りん光性マーカー、放射性マーカー、ラマン活性マーカー、質量分光分析反応性マーカー、および/または、比色分析化合物を含み、これらに限られない。標識付き耐性測定親和性リガンドは、標識ペニシリン（例えば、BOCILLIN FLペニシリン）および標識バンコマイシン（例えば、BODIPY FLバンコマイシン）である（Life Technologies社、カリフォルニア州カールズバッド）。

10

20

30

40

50

【0040】

耐性測定親和性リガンドと、微生物又は微生物含有試料との接触は、リガンドと微生物との間で検出可能な量の結合が生じ（例えば、微生物/耐性測定親和性リガンド複合体が形成され）、さらに抗生物質感受性微生物および抗生物質耐性微生物に対する結合の量または結合親和性に測定可能な差異がある限りにおいて、あらゆる方法で実施される。微生物と接触するように配置される耐性測定親和性リガンドの量および接触時間は、リガンドを微生物に対して結合させて微生物/耐性測定親和性リガンド複合体の形成がなされるために十分なように決定する。そして、リガンドの量および接触時間は、幾つかの因子、例えば微生物の種類、リガンドの種類、リガンドの微生物に対する親和性、リガンドに対する結合ターゲットが細胞外又は細胞内のいずれに存在するか、温度、バッファの状態等、当業者によく知られた種々の因子に応じて調節する。接触時間は、例えば、約240分以下であり、例えば、約180、120、90、60、50、40、30、20、10、10、5、4、3、2、1分以下であり得る。接触は、微生物に対するリガンドの結合の生成に適したあらゆる温度で実施することができ、例えば、約4度~約50度、例えば、約15度~約40度、約37度、又は室温程度であり得る。接触ステップは、適切な容器内で実施することができ、例えば、分離ステップを実施する容器と同じ容器内、又は異なる容器内で行うこともできる。

【0041】

[分離ステップ]

微生物又は微生物含有試料を体制測定親和性リガンドと接触させて、検出可能な量または測定可能な量の微生物に対するリガンドの結合が生じた後に、分離ステップを実行する。分離ステップを実行することにより、未結合の耐性測定親和性リガンドから微生物/耐性測定親和性リガンド複合体を分離し、また、試料の他の構成成分および/または結合混合物または構成成分から微生物を分離する。一実施形態では、分離ステップによって微生物

／耐性測定親和性リガンド複合体をペレットに濃縮して、かかるペレットを解析して微生物の抗生物質耐性状態を測定することができる。試料および／または結合混合物または構成成分（例えば、未結合のリガンド）から微生物を分離することは、必ずしも完全なものである必要はない。すなわち、必ずしも100%の分離を行う必要はない。ここで必要なことは、他の構成成分による実質的な干渉がない微生物の解析が可能となる程度まで、試料の他の構成成分から微生物を分離することである。例えば、分離によって少なくとも約10、20、30、40、50、60、70、80、90、95、96、97、98もしくは99%またはそれ以上の純度の微生物ペレットを得ることができる。

【0042】

一実施形態では、この分離を遠心分離ステップによって実行する。遠心分離ステップでは、微生物／耐性測定親和性リガンド複合体を分離容器内の密度クッションの上面に配置し、容器の底部および／または側面に複合体がペレットとなる条件で容器を遠心分離にかける。さらに、未結合のリガンドおよび試料の他の構成成分および／または結合混合物または構成成分は密度クッションの上面または密度クッションの上面部分内に留まる。この分離ステップは材料、例えば培地、細胞残屑および／または微生物に対する耐性測定親和性リガンドの結合の検出および／または測定に干渉する可能性がある他の構成成分から微生物を単離する。一実施形態では、密度クッションは生きている微生物を死んだ微生物（密度クッションを完全に通過しない微生物）から分離する働きもする。別の実施形態では、密度クッションは遠心分離前または遠心分離後に密度勾配を有さない。換言すれば、密度クッションを構成する材料が密度勾配を形成するに足る量の時間および／または加速度に至るまで分離容器を遠心分離にかけることはしない。

10

20

【0043】

クッションの密度は、試料および／または結合混合物または配合物の中の微生物／耐性測定親和性リガンド複合体はクッションを通過するが、未結合の耐性測定親和性リガンドおよび試料の他の構成成分および／または結合混合物または配合物（例えば血液培養ブロス、細胞残屑）はクッションの上面に残るか、または密度クッションを完全には通過しないような密度を選択する。密度は、生きている微生物（クッションを通過する微生物）を死んだ微生物（クッションを通過しない微生物）から分離するように選択することもできる。適切な密度は密度クッションで使用する材料および分離すべき試料に依存する。一実施形態では、クッションの密度を約1.025～約1.120 g/mlの範囲とし、例えば約1.030～約1.070 g/ml、約1.040～約1.060 g/mlまたは約1.025～約1.120 g/mlの任意の範囲とする。他の実施形態では、クッションの密度を約1.025、1.030、1.035、1.040、1.045、1.050、1.055、1.060、1.065、1.070、1.075、1.080、1.085、1.090、1.095、1.100、1.105、1.110、1.115または1.120 g/mlとする。

30

【0044】

密度クッション用の材料または材料の組み合わせは、本発明の方法に適した密度範囲を有する任意の材料とすることができる。密度クッションを調製するために用いることができる適切な材料としては、顕微鏡の液浸油（例えば、Cargille Labs社（ニューヨーク）のタイプDF）や、鉱物油（例えば、Penreco社（ペンシルバニア）Drakeol（登録商標）5、Draketex 50、Penetec（登録商標））のような、低粘度、高密度の油である。他の適切な材料はコロイドシリカである。コロイドシリカは非被覆とすることも（例えばLudox（登録商標）（W.R. Grace社（コネティカット州））、例えばシランで被覆することも（例えばPureSperm（登録商標）（Nidaccon Int'l社（スウェーデン））、Isolate（登録商標）（Irvine Scientific社（カリフォルニア州サンタアナ）等）、または、Percol1（商標）Plus（Sigma Aldrich社ミズーリ州セントルイス）、または、ポリビニルピロリドン（例えばPercol1（商標）（Sigma Aldrich社（ミズーリ州セントルイス））で被覆することもできる。一実施形態では、分光解析で最小干渉を示したコロイ

40

50

ドシリカ、例えば最も低い固有蛍光を有する材料を選択する。このコロイドシリカを適切な密度を形成するのに適した任意の培地、例えば平衡塩類溶液、生理的食塩水および/または0.25Mスクロースで希釈することができる。適切な密度は約15~約80v/v%の濃度、例えば約20~約65v/v%の濃度のコロイドシリカで得ることができる。適切な別の材料はヨウ化造影剤、例えばイオヘキソール(Omnipaque(商標)Nycoprep(商標)またはNycodenz(登録商標))およびイオジキサノール(Visipaque(商標)またはOptiprep(商標))である。適切な密度は、血液培養試料の場合は約10~約25w/v%の濃度、例えば約14~約18w/v%の濃度のイオヘキソールまたはイオジキサノールで得ることができる。スクロースは、血液培養物試料の場合は約10~約30w/v%の濃度、例えば約15~約20w/v%の密度クッションとして使用することができる。密度クッションに使用可能な他の適切な材料としては、シリコン油(ポリジメチルシロキサン)、フルオロシリコン油、シリコンゲル、例えば血液培養試料の場合は約75~約100%の濃度のメトリゾエート Ficol1(登録商標)(Lymphoprep(商標))、例えば血液培養試料の場合は約25~約50%の濃度のジアトリゾエート デキストラン(Polymorphoprep(商標))、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリエチレンオキシド(高分子量)、Pluronic(登録商標)F127、Pluronic(登録商標)F68、Pluronic(登録商標)化合物の混合物、ポリアクリル酸、架橋したポリビニルアルコール、架橋したポリビニルピロリジン、PEGメチルエーテルメタクリレート、ペクチン、アガロース、キサンタン、ジェラン、Phytage1(登録商標)、ソルビトール、Ficol1(登録商標)(例えば血液培養試料の場合は約10~約15%の濃度のFicol1(登録商標)400)、グリセロール、デキストラン(例えば血液培養試料の場合は約10~約15%の濃度)、グリコーゲン、塩化セシウム(例えば血液培養試料の場合は約15~約35%の濃度)、パーフルオロカーボン液(例えばパーフルオロ n オクタン)、ハイドロフルオロカーボン液(例えばVertrel XF)等が挙げられる。密度クッションは材料の組合せ、例えば上述した材料の2つ以上の組み合わせで構成することもできる。一実施形態では、密度クッションは液浸油および鉱物油の組み合わせ(例えば、比率が約0.7~約1.0部鉱物油対約0.8~約1.2部液浸油)で構成される。一実施形態では、密度クッションはDF液浸油およびDrakeoil 5鉱物油の混合物(例えば、1000部のタイプDF液浸油:0.875部Drakeoil 5鉱物油)を含む。他の実施形態では、密度クッションは塩化セシウム(例えば、24%w/v塩化セシウム)で構成される。

【0045】

密度クッションの体積/高さは、未結合の耐性測定親和性リガンドおよび他の試料構成成分および/または結合混合物または配合物からの微生物/耐性測定親和性リガンド複合体の分離を実現するのに十分なものとする必要がある。体積は分離容器のサイズおよび形状に依存する。一般には約0.1~約5mlの体積を使用することができ、例えば約0.2~約1ml、例えば約0.2ml~約0.5mlの体積を使用することができる。分離をマイクロスケールで実行する場合は、密度クッションの体積を約1 μ l~約100 μ l、例えば約5 μ l~約50 μ lとすることができる。密度クッションの上面に積み上がるまたは積層する試料および/または結合混合物または配合物の体積は、検出および/または測定可能な微生物を得るために十分な、例えば、解析に適したペレットを生産するのに十分な微生物を得るに足る大きさにする必要がある。一般には容器に収まる任意の体積を使用することができる。例えば、約0.1ml~約5mlの体積を使用することができ、例えば約0.2ml~約1ml、例えば約0.2ml~約0.5mlの体積を使用することができる。分離をマイクロスケールで実行する場合は、体積を約1 μ l~約100 μ l、例えば約5 μ l~約50 μ lとすることができる。ある実施形態では、試料および/または結合混合物または配合物を分離容器内に配置する前に、体積を小さくし、および/または、微生物の濃度を上げておき、試料および/または結合混合物または配合物が容器内に適切な体積となるようにする。例えば、試料および/または結合混合物または配合物を

る過して体積を減少させ、および/または微生物を収集する。容器内の試料および/または結合混合物または配合物の利用可能なスペースは容器のサイズおよび形状に依存する。いくつかの実施形態では、密度クッションと試料および/または結合混合物または配合物の混合を防止するために、試料および/または結合混合物または配合物が積み上がる前または積層する前に密度クッションの上面に中間層（液体または固体）を配置することができる。一実施形態では、中間層をポリプロピレンビーズとすることができる。他の実施形態では、密度クッションと試料および/または結合混合物または配合物の間に小気泡を配置して混合を防止することができる。別の実施形態では、微生物/耐性測定親和性リガンド複合体が分離中に密度クッションを通過し、密度クッションと高密度材料の間の界面に集まるように高密度材料（例えばペルフルオロカーボン液）の上面に密度クッションを積層することができる。

【0046】

本発明の一実施形態では、分離容器を遠心分離にかけ、微生物/耐性測定親和性リガンド複合体が容器の底部直上にペレットを形成するようにする。この容器を、微生物/耐性測定親和性リガンド複合体をペレット化および/または未結合のリガンドおよび試料の他の構成成分および/または結合混合物または配合物から分離するに足る加速度および時間にわたって遠心分離にかけ、遠心加速度は約 $1,000 \times g$ ~ 約 $20,000 \times g$ とすることができる、例えば約 $2,500 \times g$ ~ 約 $15,000 \times g$ 、例えば約 $7,500 \times g$ ~ 約 $12,500 \times g$ 等とすることができる。遠心時間は約30秒 ~ 約30分とすることができる、例えば約1分 ~ 約15分、例えば約1分 ~ 約5分とすることができる。遠心分離は約2 ~ 約45の温度で実行することができる、例えば約15 ~ 約40、例えば約20 ~ 約30の温度で実行することができる。一実施形態において、分離容器は閉鎖部を備え、この閉鎖部を遠心分離に先立って容器に取り付けることで気密シールを形成する。閉鎖部の存在により、感染性および/または有害性を有する恐れがある微生物を取り扱うリスクと共に試料および/または結合混合物または配合物の汚染リスクも低減する。本発明の方法の1つの利点は、微生物を封止容器（例えば密封容器）内に入れた状態で本方法の1つまたは複数の任意のステップ（例えば接触、分離、検出および/または比較）を実行することができる点である。本方法は、直接試験で実施される試料からの微生物の回収のような毒性の高い微生物の取扱いに関連する健康および安全上のリスクを、自動化システムを利用して回避するものである。一実施形態では、密度クッションに密度勾配が生じるのに十分な時間にわたって且つ/またはそのような力をもって容器を遠心分離にけることはしない。本発明は超遠心分離、例えば約 $100,000 \times g$ を超える力の遠心分離を必要としない。更に、本発明は等密度（平衡）沈殿またはバンディングも必要としない。

【0047】

分離容器は密度クッションおよび試料および/または結合混合物または配合物を保持するのに十分な容積を有する任意の容器であってよい。一実施形態では、容器が遠心ローターに嵌合する、または容器をそのように嵌合させることができる。容器の容積は約0.1 ml ~ 約25 mlとすることができる、例えば約1 ml ~ 約10 ml、例えば約2 ml ~ 約8 mlとすることができる。分離をマイクロスケールで実行する場合は、容器の容積を約 $2 \mu\text{l}$ ~ 約 $100 \mu\text{l}$ 、例えば約 $5 \mu\text{l}$ ~ 約 $50 \mu\text{l}$ とすることができる。一実施形態において、容器は試料および/または結合混合物または配合物、および密度クッションの大部分を保持するために上部の内径が広くなっており、微生物/耐性測定親和性リガンド複合体のペレットを集める下部の内径は狭くなっている。狭い部分の内径は約0.04 ~ 約0.12インチ（約0.1016 ~ 0.3048 cm）とすることができ、例えば約0.06 ~ 約0.10インチ（約0.1524 ~ 約0.2540 cm）、例えば約0.08インチ（約0.2032 cm）とすることができる。広い部分の内径は約0.32 ~ 約0.40インチ（約0.8128 ~ 約1.0160 cm）とすることができ、例えば約0.34 ~ 約0.38インチ（約0.8636 ~ 約0.9652 cm）、例えば約0.36インチ（約0.9144 cm）とすることができる。マイクロスケール分離の場合は内径を更

[選択的溶解ステップ]

本発明の方法の幾つかの実施形態では、例えば分離ステップの前に、微生物を含む試料を処理して、試料内に存在する可能性のある非微生物細胞（例えば、不要な細胞）、例えば、血液細胞および/または組織細胞を溶解させる。細胞を溶解させることで、試料の他の構成成分から微生物を分離することが可能になる。他の構成成分から微生物を分離することで、検出ステップ中の干渉を防止する。微生物細胞が試料内に存在しないと予想されるか又は存在しない可能性が高いか、又は検出ステップに干渉しないと予想される場合、溶解ステップを実施する必要は無い。一実施形態では、溶解されるべき細胞は試料内に存在する非微生物細胞であり、試料内に存在しうる微生物は溶解されない。しかし、幾つかの実施形態では、特定の綱（class）の微生物を選択的に溶解させることが望ましく、したがって、本明細書に記載の方法および当業界にてよく知られた方法に従って実施することができる。例えば、不要な微生物の綱について選択的に溶解させる（例えば、酵母は溶解されるが細菌は分解されない、あるいはその逆となる）。他の実施形態では、所望の微生物を溶解させて、微生物の特定の細胞成分、例えば、細胞膜又は細胞小器官を分離することができる。一実施形態では、非微生物細胞を全て溶解させる。他の実施形態では、非微生物細胞の一部、例えば検出ステップにおける干渉を回避するために十分な細胞を溶解させる。細胞の溶解は、微生物の溶解を伴う或いは伴わない、細胞を選択的に溶解させるのに効果的な当業界で既知のあらゆる方法で実施することができる。そのような方法は、例えば、溶解液の添加、超音波処理、浸透圧衝撃、凍結 - 融解サイクル、化学的処理、および/またはこれらの組み合わせである。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 1 】

溶解溶液は、細胞、例えば、非微生物細胞（例えば、真核生物細胞膜を可溶化による）、および/または微生物細胞を溶解させることができる溶液である。一実施形態では、溶解溶液は、1種または複数種の界面活性剤（洗剤）を含むことができ、1種又は複数種の酵素、または1種又は複数種の界面活性剤および1種又は複数種の酵素の組み合わせを含み、更に添加剤を含むことができる。一実施形態では、界面活性剤は、例えば、Triton（登録商標）X-100、Triton（登録商標）X-100-R、Triton（登録商標）X-114、NP-40、ジェナポールC-100、ジェナポールX-100、Igepal（登録商標）CA630、Arlasolve（商標）200、Brij（登録商標）96/97、CHAPS、オクチル-D-グルコピラノシド、サポニン、ノナエチレングリコールモノデシルエーテル（C12E9、ポリドカノール（polidocanol）、およびポリオキシエチレンエーテル（C12E10、例えば、ジェナポール（登録商標）C-100）でありうる。任意には、非変性溶解界面活性剤は、ドデシル硫酸ナトリウム、N-ラウリルサルコシン、デオキシコール酸ナトリウム、胆汁酸塩、ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミド、SB3-10、SB3-12、アミドスルホベタイン-14、およびC7BzOなどを含んでも良い。任意には、可溶化剤は、Brij（登録商標）98、Brij（登録商標）58、Brij（登録商標）35、Tween（商標）80、Tween（商標）20、Pluronic（商標）L64、Pluronic（登録商標）P84、Pluronic（登録商標）F108、非界面活性剤スルフォベタイン（NDSB201）、アンフィポール（PMAL-C8）、およびメチル-β-シクロデキストリンなどを含んでも良い。一般に非変性界面活性剤および可溶化剤は臨界ミセル濃度（CMC）を超える濃度で用いられる一方、変性界面活性剤はそのCMCを下回る濃度で添加されうる。例えば、非変性溶解性界面活性剤は、濃度約0.010%~約10%、例えば、約0.015%~約1.0%、例えば、約0.05%~約0.5%、約0.10%~約0.30%（試料希釈後の採集濃度）で用いることができる。他の実施形態では、ポリオキシエチレン界面活性剤が好適でありうる。ポリオキシエチレン界面活性剤は、構造C₁₂₋₁₈/E₉₋₁₀を有し、C₁₂₋₁₈は、炭素鎖の長さが12~18炭素原子であることを示し、E₉₋₁₀は、9~10のオキシエチレン親水性頭基を表す。例えば、ポリオキシエチレン界面活性剤は、Brij（登録商標）97、Brij（登録商標）96V、ジェナポールC-100、ジェナポールX-100、ポリドカノール、またはこれらの組み合わせからなる群から選択さ

れうる。溶解溶液に用いられる酵素は、核酸および他の膜ファウリング材料（例えば、プロテイナーゼ X X I I I、D N a s e、ノイラミニダーゼ、ポリサッカリダーゼ、Glucan ex（登録商標）、および Pectinex（登録商標））を含む。使用されうる他の添加物は、2-メルカプトエタノール（2-M e）またはジチオスレイトール（D T T）のような還元剤、ならびに、マグネシウム、ピルビン酸、および保湿剤のような安定化剤を含む。溶解溶液は、所望の細胞を溶解するために適切な、さらには、試料の種類、溶解対象の細胞、および使用される界面活性剤等を含む種々の要因に応じた、あらゆる pH で緩衝することができる。幾つかの実施形態では、pH は約 2 ~ 約 13 の範囲、約 6 ~ 約 13 の範囲、約 8 ~ 約 13 の範囲、約 10 ~ 約 13 の範囲である。適切な pH 緩衝液は、pH を所望範囲に維持することができるあらゆる緩衝液を含み、例えば、約 0.05 M ~ 約 1.0 M の C A P S である。

10

【0052】

一実施形態では、試料および溶解溶液を混合して十分な時間培養して細胞膜の溶解および可溶化を生じさせる。十分な時間とは、例えば、約 1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、40、50、又は 60 秒、又は約 2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、又は 20 分、或いはそれ以上であり、例えば、約 1 秒 ~ 約 20 分、約 1 秒 ~ 約 5 分、約 1 秒 ~ 約 2 分である。培養時間は溶解溶液の強度、例えば、界面活性剤および/または酵素の濃度や、溶解温度に応じて変更される。一般的に、マイルドな溶解緩衝液は、比較的長い時間を要し、そして、非微生物細胞を完全に可溶化するために試料を比較的強く希釈する必要がある。溶解溶液の強度は、試料に含まれることが既知である、或いは含まれる疑いのある微生物に基づいて選択することができる。比較的溶解しやすい微生物については、マイルドな溶解溶液を用いることができる。溶解は、約 2 度 ~ 約 45 度、例えば約 15 度 ~ 約 40 度、例えば約 30 度 ~ 約 40 度で生じうる。一実施形態では、溶解溶液を注射器に入れ、さらに試料を注射器に吸引して、注射器内で混合し、培養することができる。

20

【0053】

幾つかの実施形態では、溶解状態（例えば、溶解時間又は培養時間）や、分離および/または解析ステップは、試料内の微生物の一部又は全てを死滅させるために十分であり得る。本発明による方法は、非常に多用途であり、単離および同定を実施するために微生物が生存した状態であることを必要としない。ある実施形態では、微生物の一部又は全てが死滅した状態であり、方法のステップが実施される前、最中、および/または後のいずれにおいて死滅しても良い。

30

【0054】

[検出 / 比較ステップ]

微生物 / 耐性測定親和性リガンド複合体を未結合の耐性測定親和性リガンドから分離した後、微生物に対して結合した耐性測定親和性リガンドの量、すなわちリガンドの結合親和性を検出および/または計測することができる。微生物 / 耐性測定親和性リガンド複合体が遠心分離によってペレットを形成した場合、当該ペレットを解析して結合量、すなわち耐性測定親和性リガンドの結合親和性を検査することができる。一実施形態では、解析を非侵襲的に実行する。すなわち、ペレットを分離容器に入れたまま解析を行う。別の実施形態において、解析中は分離容器を終始封止した状態に保つ。抗生物質耐性微生物を非侵襲的に同定する能力は、任意選択で、分離およびキャラクタリゼーションプロセスの全体にわたって容器の封止状態を保ち、手順の一部または全部を自動化する能力と相まって、汚染された且つ/または感染性の試料を絶えず取り扱う状況を回避し、プロセス全体の安全性を高めることになる。更に、試料またはペレットの更なる処理（例えば再懸濁、平板培養およびコロニーの培養）を伴わない直接解析により微生物をキャラクタリゼーションする能力は、耐抗生物質微生物の同定の実行速度を大幅に向上させる。

40

【0055】

本発明のある観点では、方法は、微生物の解析に先立って、分離ステップ中に形成された微生物 / 耐性測定親和性リガンド複合体のペレットの全てを、又はその一部を分離容器

50

から回収するステップを含む。例えば、ペレット形成の後に、流動体をペレットから吸引して、さらにペレットを適切な溶媒（例えば、微生物が生存可能な溶媒）に再懸濁する。再懸濁した微生物を分離容器から取り除く。そして、微生物をリガンド結合すなわち親和性について検査するために、例えば懸濁液内で、または再ペレット化した後に解析する。他の実施形態では、再懸濁微生物を分離容器内、例えば、懸濁液内で、または再ペレット化した後に解析する。一実施形態では、ペレットを解析に先立って回収および/または再懸濁し、任意選択で分離容器から取り出す。別の実施形態では、試料またはペレットをインサイチュ解析後に回収および/または再懸濁し、その後更なる解析を実行する。例えば、微生物ペレット以外の単離微生物に適用可能なラテックス凝集試験または自動化した表現型同定試験のような技法を回収および/または再懸濁した微生物に対して実行することができる。さらなる実施形態では、ペレットから回収した微生物を再懸濁することなく更なる解析（例えば、質量分光分析）に直接用いることもできる。

10

【0056】

いくつかの実施形態では、ペレットおよび/または再懸濁微生物を分光解析することができる。分光解析を用いて、耐性測定親和性リガンドの特性（例えば、微生物の固有特性または微生物に付された標識の特性）を分析して、結合を検出することができる。耐性測定親和性リガンドの検出に加えて、分光解析を用いて、複合体内の微生物の1つ又は複数の微生物の固有特性（例えば、固有蛍光）、例えば、例えば染色剤、色素、結合剤のような付加的な作用物質の不存在下で微生物の固有特性を分析することができる。微生物、特に細菌の固有蛍光すなわち内部蛍光は、細菌が天然のフルオロフォア（例えば、トリプトファン、チロシン、フェニルアラニン、NADH、およびフラビン）であって、多波長光源によって励起されうるものを含有するという事実を利用したものである。これらの実施形態では、耐性測定親和性リガンドの結合を微生物の固有特性信号と比較して、リガンド結合量を細胞ベースで算出することができる。解析は、例えば蛍光分光法、拡散反射分光法、透過吸収分光法、赤外分光法、テラヘルツ分光法、ラマン分光法を使用して実行することができる。ラマン分光法には表面増強ラマン分光法（SERS）、空間オフセットラマン分光法、および/または、共鳴ラマン分光法が含まれる。ラマン（SERS）および蛍光シグナルを増強するために、微生物を遠心分離に先立って金および/または銀ナノ粒子で被覆することができ、且つ/または内部光学面を特定のサイズおよび形状の金属コロイドでプレコーティングすることができる（Lakowicz, *Anal. Biochem.* 337:171 (2005) for fluorescence; Efrima et al., *J. Phys. Chem. B. (Letter)* 102:5947 (1998) for SERS参照）。他の実施形態では、遠心分離に先立ってナノ粒子を密度クッション中に存在させ、微生物が密度クッションを通過するときに微生物と関連付けられるようにする。他の実施形態では、MALDI TOF質量分析、DESI質量分析、GC質量分析、LC質量分析、選択イオンフローチューブ（SIFT）分析等の質量分析法を使用して（再懸濁された、またはペレット中の）微生物を解析することができる。一実施形態では、ペレットを分離容器に入れたまま解析する。容器は容器の光学窓を介して解析することができる。光学窓は容器の底部および/または任意の1つまたは複数の側面および/または上部に配置することができる。一実施形態では、分離容器が分光計内の解析に適した位置にあるホルダーに嵌合する、または分離容器をそのように嵌合させることができる。分光解析は、耐性測定親和性リガンドおよび/または微生物の1つまたは複数の内因的または外因的特性を検出するのに効果的であることが当業者に知られる任意の技法によって実行することができる。例えば、ペレット中の微生物の検出に前面蛍光を使用することができる（励起発光が同じ光学面に入出入りする場合、且つ試料が一般に光学的に厚い場合、励起光は非常に短い距離だけ試料に浸透する（例えば、Eisinger, J., and J. Flores, "Front-face fluorometry of liquid samples," *Anal. Biochem.* 94:15 (1983)参照）。本発明の幾つかの観点では、細胞ベースのリガンド結合を測定する目的で、1又は複数の微生物の固有特性を分析することに加えて、固有特性を用いて微生物を同定することができる。一実施形態では、微生物の固有特性を既知の生物の固有特性のデータベースと比較して、微生物を同定することができる。

20

30

40

50

【 0 0 5 7 】

更に他の実施形態では、試験微生物の計測された特性の変化（例えば、固有蛍光特性の変化）を計測し、および/または、代謝又は膜の完全性の測定に用いられる蛍光色素を使用することで、耐性を測定することができる。本実施形態によれば、リガンド又は試薬が試験対象の微生物に対して結合したことに起因して計測可能な特性の変化（例えば、固有蛍光特性の変化）を間接的に計測することで、耐性を測定することができるため、リガンド又は試薬自体が検出可能な信号を発するかまたは検出可能な信号により標識される必要はない。例えば、未結合の抗生物質の結合および/または暴露は、微生物の細胞壁を改変し、変化させ、あるいは劣化させる。微生物を解析して（例えば、本明細書にて述べたように分光分析によって）、細胞壁における変化を間接的に計測して、既知の耐性および/または感受性微生物のデータベースと比較して、微生物の抗生物質耐性状態を測定することができる。あるいは、改変または劣化した細胞壁は、1種又は複数種の蛍光性色素に対して透過性（或いは、比較的透過性）であるため、1種又は複数種の蛍光性色素を試料に添加して試料を解析して蛍光性色素を検出および/または計測して、微生物の抗生物質耐性状態を間接的に測定することができる（例えば、実施例5参照）。

10

【 0 0 5 8 】

試料照明源すなわち励起源は、当業者に知られる任意の数の適切な光源から選択することができる。電磁スペクトルのうち有用なデータをもたらす任意の部分を使用することができる。紫外、可視および/または近赤外スペクトルならびに電磁スペクトルの他の部分で発光可能な光源であって、当業者に既知の光源を利用することができる。例えば、光源は、紫外光を生成するための重水素もしくはキセノンアークランプおよび/または可視/近赤外励起を生成するためのタングステンハロゲンランプのような連続ランプであってよい。これらの光源は広範な発光範囲を提供し、また当業界で周知の光学干渉フィルタ、プリズムおよび/または光回折格子を使用して特定の励起波長のスペクトル帯域幅を減少させることができる。

20

【 0 0 5 9 】

別法として、発光ダイオードおよび/またはレーザーのような複数の狭帯域光源を空間多重化して多波長励起源を提供することもできる。例えば、190 nm ~ 900 nm超の発光ダイオードが利用可能であり、ソースのスペクトル帯域幅は20 nm ~ 40 nm（半値全幅）である。紫外ないし近赤外の離散波長におけるレーザーが利用可能である。レーザーは当業者に周知の多重化方法で採用することができる。

30

【 0 0 6 0 】

任意の光源のスペクトル選択性を、走査モノクロメータのようなスペクトル弁別手段を使用することにより改善することができる。当業者に既知の他の弁別方法を利用することもでき、音響光学チューナブルフィルタ、液晶チューナブルフィルタ、光学干渉フィルタアレイ、プリズム分光器等、およびそれらの任意の組合せを利用することができる。スペクトル弁別器を選択する際は同調性範囲および選択性レベルを考慮に入れる。例示として、例えば弁別器は10 nmの選択性を有する300 nm ~ 800 nmの波長範囲を利用することができる。これらのパラメータは一般に同調性範囲および選択性を達成するのに必要な最適技術を決定する。

40

【 0 0 6 1 】

典型的には、光源によって試料を励起した後、試料の蛍光の放出を所定の時点でまたは連続的に測定する。同様に、励起源と試料の相互作用に由来する反射光を測定して検出および/またはキャラクタリゼーションに関連するデータを提供することができる。

【 0 0 6 2 】

試料からの放出は任意の適切なスペクトル弁別手段により測定することができ、いくつかの実施形態では分光計を利用して測定することができる。分光計は、特定の発光波長を検出することによりモノクロメータからの出力を光電子増倍管によって検出する走査モノクロメータとすることができ、且つ/または分光計を撮像分光器として構成することにより、その出力を電荷結合素子（CCD）検出器アレイのような撮像検出器アレイによって

50

検出することができる。一実施形態では、弁別器を用いることにより光検出手段（例えば光電子増倍管、アバランシェフォトダイオード、CCD検出器アレイおよび/または電子増倍電荷結合素子（EMCCD）検出器アレイ）による蛍光および/または散乱シグナルの観察が可能となる。

【0063】

分光技法を使用して、好ましくは励起発光マトリクス（EEM）測定値として提供される測定値を取得する。本明細書で使用するEEMは、励起と発光波長の両方の関数として蛍光物質の発光スペクトル発光強度と定義し、フルスペクトルまたはそのサブセットを含む。この場合のサブセットは単一または複数の励起/発光対を含む可能性がある。また、固定の励起波長を有するEEMの断面を使用して特定の励起波長の発光スペクトルを示し、固定の発光波長を有するEEMの断面を使用して試料の励起スペクトルを示すこともできる。一実施形態では、複数のEEMを2つ以上の特定の励起/発光波長対、例えば少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれ以上の特定の励起/発光波長対で測定する。例えば、1又は複数のEEMを、耐性測定親和性リガンドを検出する波長で取得し、さらに1または複数の追加のEEMを微生物の固有特性を検出する波長で取得する。そのような波長は、レイリー散乱ポイント（260～580nm）、トリプトファン（285/350nm）、コラーゲン（305/315-330nm）、NADH（345/460nm）、およびフラビン（460/520nm）である。

10

【0064】

本発明の一実施形態によれば、前面蛍光分光法は散乱性および消光性が高い試料の蛍光および/または反射特性を測定する際に利点をもたらすことが分かった。前面法は、その構成は血球および微生物学的培養基の干渉性の構成成分から受ける影響が小さいため、非常に有益な分光法である。当業者に知られるように、容器の光学面は許容可能な結果をもたらされるような角度で照明することができる（例えば、Eisinger, J., and J. Flores, "Front-face fluorometry of liquid samples," Anal. Biochem. 94:15-21 (1983)参照）。一実施形態では、分光システムが拡散反射光を少なくとも1つの固定角度で測定するとともに、放出された蛍光を少なくとも1つの固定角度で測定するようにシステムを設計する。

20

【0065】

本発明によれば、既知の微生物（抗生物質感受性および/または抗生物質耐性）について対照測定値（control measurement）を取得し、したがって測定したテストデータと該当する微生物のキャラクタリゼーションとの関連付けを当業者に既知の様々な数学的方法を使用して行うことが可能となる。例えば、当業者に既知のソフトウェアシステムを利用して試料からのデータとベースラインすなわち対照測定値とを比較することができる。より詳細には、データの分析をいくつかの多変量分析法、例えば一般判別分析（GDA）、部分最小二乗法判別分析（PLSDA）、部分最小二乗回帰、主成分分析（PCA）、平行因子分析（PARAFAC）、ニューラルネットワーク分析（NNA）および/またはサポートベクターマシン（SVM）によって行うことができる。一実施形態では、比較ステップは、同じ微生物の抗生物質感受性株又は抗生物質耐性株のいずれかに対する耐性測定親和性リガンド結合量又は結合親和性を比較することを含む。他の実施形態では、比較ステップは、同じ微生物の抗生物質感受性株および抗生物質耐性株の両方に対する耐性測定親和性リガンド結合量又は結合親和性を比較することを含む。一実施形態では、同じ微生物の既知の抗生物質感受性株又は抗生物質耐性株に対する結合量または結合親和性は、微生物による結合量として同時に測定することができる。他の実施形態では、既知の抗生物質感受性株又は抗生物質耐性株に対する結合量または結合親和性は、予め測定することができる。予め測定されたデータは、データベース内にある。

30

40

【0066】

微生物の抗生物質耐性および任意の1又は複数の固有特性（固有蛍光等）の測定に加えて、本発明の方法は更に、分離および/またはキャラクタリゼーションプロセスに役立つ付加的な同定作用物質（identifier agent）の使用を含むことができる。親和性配位子の

50

ような特定の微生物と結合する作用物質を使用することにより、微生物の分離、微生物のクラスまたは種の同定（例えばユニークな表面タンパク質または受容体との結合を利用）、および/または微生物の特徴の同定を行うことができる。有用な同定作用物質または親和性リガンドとしては、それらに限らないが、単クローンおよび多クローン抗体ならびにそれらの断片（例えば*S. aureus*同定のためのanti-Eap）、核酸プローブ、アプタマー、ペプチド模倣体、ファージ由来の結合タンパク質、レクチン、宿主防御ペプチド（例えばデフェンシン、カテリシジン、プロテオグリン（proteogrin）、マガイニン）、バクテロシン（bacterocin）（例えばランチビオティクス（例えばナイシン、メルサシジン、エピデルミン、ガリデルミンおよびプランタリシンCおよびクラスIIペプチド）、バクテリオファージ、および核酸、脂質、炭水化物、多糖類もしくはタンパク質、またはそれらの任意の組合せに対して選択的な色素が挙げられる。作用物質自体が検出可能なシグナルを示さない場合は、作用物質をマーカーと共役させる（例えば可視状態にするまたは蛍光性をもたせる）こと等により、作用物質を標識して検出可能なシグナルが提供されるようにすることができる。マーカーとしては、それらに限らないが、蛍光性化合物、発光性化合物、燐光性化合物、放射性化合物、ラマン活性、質量分光分析反応性、および/または比色化合物が挙げられる。作用物質は、本発明の方法の任意のステップ、例えば試料の接触ステップ中、分離ステップ中、および/または検出ステップ中に採取するときに微生物に添加することができる。いくつかの実施形態では、ペレット中の作用物質の存在をペレットの解析中に判定することができる。他の有用な同定作用物質としては、微生物酵素の基質、キレート剤、感光剤、消光剤、還元剤、酸化剤、緩衝液、酸、基剤、溶媒、固定剤、洗浄剤、界面活性剤、消毒薬（例えばアルコール、漂白剤、過酸化水素）、毒性化合物（例えばアジ化ナトリウム、シアン化カリウム）、シクロヘキサミドのような代謝阻害剤等が挙げられる。同様に、微生物細胞生存度、代謝および/または膜電位の測定のための多くの蛍光性化合物を本発明の同定作用物質として使用することができる。当業者には容易に理解されるように、それ自体の物理的状态または代謝に影響を及ぼす抗生物質のような任意の化合物に対する特定の微生物の感受性は、その化合物を試料、溶解緩衝液、密度クッションまたはそれらの任意の混合物に加えることにより迅速に確認することができる。

10

20

30

40

50

【0067】

本発明の一態様において、本方法は更に微生物/耐性測定親和性リガンド複合体ペレットを回収し付加的な試験を実行するステップを含むことができる。一実施形態では、ペレットを試料培地および/または結合混合物又は配合物および密度クッションから吸い出すことによって回収することができる。別の実施形態では、注射器を容器に挿入し、試料培地および/または結合混合物又は配合物および密度クッションをそのままの状態に保持したままペレットを吸い出すことにより、ペレットを回収することができる。その後、回収したペレットを適切な培地、例えば食塩水中に再懸濁させることができる。再懸濁の際は、微生物を更に当業者に知られる上述の所望の試験にかけることができる。特に、清浄な微生物試料を必要とする任意の試験を再懸濁させた微生物に対して実行することができる。いくつかの実施形態では、付加的な同定試験を実行することができる。同定試験の例としては、Vitek 2、増殖および非増殖核酸試験（nucleic acid test: NAT）、色素産生およびラテックス接着アッセイ、イムノアッセイ（例えば標識した抗体および/または他のリガンドを利用）、質量分析（例えばMALDI TOF質量分析）および/または赤外分光法（FTIR）やラマン分光法のような他の光学的技法が挙げられる。薬剤に対する耐性のような付加的なキャラクタリゼーション試験も実行することができる。付加的なキャラクタリゼーションは、本方法の最初の分離およびキャラクタリゼーションステップ中に開始した試験の一部とすることもできる。

【0068】

本発明の一態様では、方法ステップの一部または全部を自動化することができる。本明細書で使用する用語「自動化」とは、コンピュータによる制御を意味する。一実施形態では、種々の蛍光発光検出および関連ステップを自動化し、本方法によって得られた情報を

自動的にデータベースの構築に用いる。別の実施形態では、本方法における他のステップ、例えば、接触、分離、および/または検出ステップについても、自動化することができる。方法ステップを自動化することによってより多くの試料をより迅速に試験することが可能となるだけでなく、さらに、有害性および/または感染性のある微生物を含む恐れがある試料を取り扱う際の人為的ミスリスクを低減することもできる。

【0069】

本発明の更なる態様は、微生物の抗生物質耐性状態を測定するシステムであって、該システムは、

(a) 前記微生物または、前記微生物および耐性測定親和性リガンドを含む試料を含む容器と、

10

(b) 密度クッションと、および、

(c) 測定を行うための分光器と、を備え、

前記システム内におけるインサイチュ分離により前記容器内で濃縮された前記微生物の抗生物質耐性状態が、前記測定によって決定されることを特徴とするシステムに関するものである。他の実施形態では、システムは未結合の耐性測定親和性リガンドから微生物を分離するための遠心分離機を備える。

【0070】

下記の実施例では本発明について更に詳細に説明するが、下記の実施例は例示的なものであり本発明を決して限定するものではない。利用した技法は当業者に周知の標準的な技法、または以下において具体的に説明する技法である。

20

【実施例】

【0071】

[実施例1]

BOCILLIN (商標) - FL を MRSA 株および MSSA 株に対して結合

2つの実験的手法を用いて、BOCILLIN (商標) - FL (Molecular Probes, Invitrogen) の *S. aureus* に対する結合を試験した。2つの実験的手法とは、(1) 細胞を水酸化ナトリウム (NaOH) で処理して、中性化し、BOCILLIN (商標) - FL を加え、そして細胞を分離する手法 (荒い前処理) と、(2) BOCILLIN (商標) - FL で細胞を培養して、細胞を分離する手法 (代謝的標識) である。

30

【0072】

第1の手法において、*S. aureus* 株の、ATCC 25923 (Methicillin感受性: MSSA) および D14906 (Methicillin耐性: MRSA) を、トリブチックソイブロス (TSB) 中で対数増殖期 (6時間) まで培養した。各試料の懸濁液 (TSB 中 0.9 ml) および 0.1 N NaOH (0.1 ml、 $\pm 20 \mu\text{l}$ 7.5% TRITON (登録商標) X100-R) を5秒間ボルテックスし、1MのKH₂PO₄ (0.125 ml) を加えて即座または1分後のいずれかに中性化し、5秒間ボルテックスした。BOCILLIN (商標) - FL (1.0 mg/ml、15 μl) を加えて懸濁し、ボルテックスし、室温で5分間培養した。0.2 ml の油混合物 (タイプDF顕微鏡液浸油 1.0部 + Drake oil 5 鉱物油 0.875部) 上で 10,000 rpm で1分間遠心分離にかけて、未結合のBOCILLIN (商標) - FL を培養基から微生物を分離した。上澄みおよび油の層を除去し、ペレットを pH 7.4 の 3.0 ml PBS に再懸濁した。試料を FluoroLog-3 システムで、励起波長 490 nm で走査し、510 nm の蛍光発光を記録した。

40

【0073】

表1に結果を示す。細胞を pH 12 で5秒間処理した場合、MSSA細胞に対するBOCILLIN (商標) - FL の結合の方が、MRSA細胞に対する結合よりも多かった (条件 a = 2.3倍)。Triton X = 100 を反応混合物に含ませても、何らの利益も無かった。pH 12 で60秒間処理して、細胞の処理時間を延長しても、何らの利益も得られず、むしろ細胞を損失した。

50

【 0 0 7 4 】

【表 1】

条件	MSSA (25923)	MRSA (D14906)	MSSA/MRSA 割合
A=5分、pH12	3.7×10^6	1.6×10^6	2.3
b=60分、pH12	1.0×10^6	0.9×10^6	1.1
c=5分、pH12+TX100	0.9×10^6	0.6×10^6	1.5
d=60分、pH12+TX100	0.8×10^6	0.4×10^6	2.0

10

【 0 0 7 5 】

第2の手法において、2種類の細菌懸濁液(13ml)をBOCILLIN(商標)-FL(1.0mg/mlストック溶液、175 μ l)と混合した。混合物を0.2ml油混合物入りのマイクロチューブに1.0ml試料に等分した。チューブを37度で種々の時間で培養した(T₀時間時点で1セットのチューブを氷に取った)。1セットのチューブを30分で取り出し、PBSで2度洗浄して、未結合のBOCILLIN(商標)-FLから細胞を分離した。1セットのチューブは、30、52、68、および86分で取り出し、油混合物を用いた遠心分離によって、未結合のBOCILLIN(商標)-FLから細胞を分離した。細胞を回収して、3mlPBSに再懸濁した。試料をFluorolog-3システムで、励起波長490nmで走査し、510nmの蛍光発光を記録した。

20

【 0 0 7 6 】

結果を、表2(生データ)および図1(正規化データ)に示す。BOCILLIN(商標)-FL信号を微生物性のトリプトファン信号に対して正規化して(図1)、細胞ベースで推定した場合、MRSA株は、MSSA株の2~7倍少ない、または3~4倍少ないBOCILLIN(商標)-FLを結合させた。MRSAおよびMSSAの間の大きな差異は、37度で約60分間培養した後に生じた。油ベースの分離方法において(時間T₀での)背景信号が高かったにも関わらず、油混合物を用いた細菌の遠心分離によって、PBSで2度洗浄した場合よりも、より高レベルのBOCILLIN(商標)-FL結合が得られた。

30

【 0 0 7 7 】

【表 2】

アッセイ条件	分離方法	MSSA (25923)	MRSA (D14906)	MSSA/MRSA 割合
T ₀ (氷)	油	2,745,600	1,163,240	2.36
37度で30分	洗浄×2(PBS)	410,830	206,250	2.00
37度で30分	油	1,831,790	326,790	5.60
37度で52分	油	1,941,930	363,000	5.35
37度で68分	油	2,481,450	346,270	7.17
37度で86分	油	2,285,980	510,150	4.48

40

【 0 0 7 8 】

[実施例 2]

経時変化実験

S.aureus株の、ATCC25923(MSSA)およびD14906(MRSA)の試料をBact/ALERT SA培養基内で37度で対数増殖期に達するまで(8~10時間)培養した。各培養物のOD660nmを測定し、SA培養基で両懸濁液を0.50に調節した。BOCILLIN(商標)-FLを予め暖めたSA培養基に希釈し、0.2 μ mフィルターでろ過し、37度に維持した。細菌試料(9.0ml)を1.0

50

mlの100 μ M BOCILLIN(商標)-FLと混合し、実施例1にて用いたものと同様の0.2ml油混合物入りのマイクロチューブに1.0mlずつ10等分した。T₀チューブを除いた全てのチューブを37度においた。6、11、16、22、45、60、75、および91分の時点でチューブを取り出し、処理を行った。各チューブを1分間遠心分離し、上澄みを吸引し、さらに、ペレットを0.1mlPBSに再懸濁し、そしてアクリルキュベット内の3.0mlPBSに添加した。試料をFluorolog-3システムで、励起波長490nmで走査し、510nmの蛍光発光を記録した。

【0079】

油を用いた方法によって評価したように、BOCILLIN(商標)-FLのS.aureus株に対する結合が迅速に生じた(図2)。二次多項式近似を用いてデータをプロットした。最大の結合は、わずか5分後(すなわち、T₀チューブ)に測定された。そのようなBOCILLIN(商標)-FLの濃度では、培養時間に関らず、MSSA株はMRSA株よりも細胞ベースで約2~3倍のBOCILLIN(商標)-FLに結合した。

10

【0080】

[実施例3]

BOCILLIN(商標)-FLの滴定

S.aureus株の、ATCC25923(MSSA)およびD14906(MRSA)の試料をBact/ALERT SA培養基内で37度で6時間、約0.35でOD660nmに達するまで培養した。BOCILLIN(商標)-FL(0.1ml)の希釈液をSA培養基内で調製し、培養チューブに入れた。細菌懸濁液(0.9)の試料をチューブに加えて混合した。チューブにキャップをして、37度のインキュベーターに60分間入れた。試料(1.0ml)を、実施例1にて用いたものと同様の0.2ml油混合物入りのマイクロチューブに移して、1分間遠心分離にかけて、吸引し、ペレットを0.1mlPBSに再懸濁し、さらに、アクリルキュベット内の3.0mlのpH7.4PBSに加えた。試料をFluorolog-3システムで、励起波長490nmで走査し、510nmの蛍光発光を記録した。

20

【0081】

BOCILLIN(商標)-FL濃度に依存して、細胞ベースで推定した場合、MSSA株は、MRSA株の2~4倍多いBOCILLIN(商標)-FLを結合させた(図3)。

30

二次多項式近似を用いてデータをプロットした。MSSA結合曲線は2相性であった。初期の飽和曲線は0.5から約10 μ Mまでであり、結合が増加することに伴い第2相が続く。約5 μ MBOCILLIN(商標)-FLでは、MSSA株とMRSA株の間には3倍の差があった。約0.5 μ MBOCILLIN(商標)-FLではMSSA株とMRSA株の間には4倍の差があった。

【0082】

[実施例4]

MRSA株およびMSSA株のパネルの評価

20の異なるS.aureus株(MRSAが10株、MSSAが10株、セフォキシチンディスクおよびVitek-2で確認済)を増殖させた。24時間プレートから培養物を1白金耳量(1 μ L)取り出し、Bact/ALERT SA培養基(ガラス製スクリーキャップチューブ内に8ml)に懸濁した。チューブをよくボルテックスして、36度で6時間培養した。各懸濁物のODを660nmで測定し、ほぼ同じ密度(0.50~0.75OD、ただし試料12166は0.28)となるように調節した。50 μ MBOCILLIN(商標)-FL(0.1ml)を、ラベルをつけた20本のマイクロチューブにそれぞれ入れた。各株の試料(0.9ml)を各チューブに加え、37度で30分培養した。そして、反応混合物を取り出し、0.2mlの油混合物(タイプDF顕微鏡液混油1.000部+Drakeoil 5 μ 物油0.875部)を含む第2のチューブセットに加えた。A-8-11ローター(Eppendorf 5417R)内でチューブを10,000rpmで2分間遠心分離にかけた。吸引機で上澄みおよび油の大部分を吸引

40

50

した。残りの油を Gilson P200チップを用いて除去し、ペレットを100 μ l PBSも再懸濁した。PBSを3ml含むアクリルキュベットに細胞を移し、Fluorolog-3システムにおいて表3に示すFluoroScan「Bocillin」ポイントを用いて読み取った。さらに、(同じ24時間プレート由来の)20個の単離株のそれぞれについて Vitek ASTカードを実施した。

【0083】

【表3】

レイリーポイント	260-580
トリプトファンピーク	285/350
MRSA/MRSE	305/315-330
コラーゲン	320/405
NADH	345/460
フラビン	460/520
BOCILLIN (商標) - FL	490/510

10

【0084】

BOCILLIN (商標) - FL 信号 (Ex 490 __ Em 510) をトリプトファン信号 (Ex 285 __ Em 350) に対して正規化した場合に最良の結果が得られた。15のベンジル - ペニシリン耐性株と比較して、5のベンジル - ペニシリン感受性株が2倍超の量の BOCILLIN (商標) - FL を結合した (図4)。この結果は、分析が特異的であり、Vitek MIC (最小発育阻止濃度) と相関があることを証明した。10のオキサシリン感受性 (MSSA) 株のうち5つは、MRSA 感受性50%および特異性100%で、比較的高レベルで BOCILLIN (商標) - FL と結合した。これら5株は、Vitekカードによってベンジル - ペニシリン耐性およびオキサシリン感受性として分類され、5株中の3株はオキサシリンのMICが0.5であった。

20

【0085】

上記の説明は本発明を例示するものであり、本発明を限定するものと解釈すべきではない。本発明は添付の特許請求の範囲で定義されるものであり、各請求項には均等物も含まれる。本明細書に列挙した刊行物、特許出願、特許、特許文献および他の参考文献はすべて、参照する文および/または段落の教示内容全体が本明細書に援用されるものとする。

30

【0086】

[実施例5]

固有蛍光および/または膜の完全性の変化を通じた微生物の耐性状態の間接的な測定
本実験のために、4株の *E. faecium* を選択した。2株 (No. 12406、No. 13185) は、VITEK 2 によるバンコマイシン MIC's が $> 32 \mu\text{g}/\text{mL}$ である VRE であり、2株 (No. 14054、No. 12480) は VITEK 2 によるバンコマイシン MIC's が $> 0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ である VSE である。

40

【0087】

各試験株について、24~48時間プレート由来のコロニーを1 μ l白金耳量を10~12mlの Bact/ALERT SA 培養基に懸濁し、37度で4~9時間培養した。それぞれの対数期の試料は、0、0.25、2.5、および12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のバンコマイシン - HCl を1:5000希釈の Sytox Green ストック液と組み合わせる。Sytox Green は生存可能な細胞不透過性 DNA 株 (Molecular Probes、cat No. S7020) である。直後 (T₀)、1時間後、2.5時間後、4時間後に培養物を等分量を取り出して分析した。

【0088】

適切な時点で、0.5培養物 (0.5ml) の0.5ml等分量を、2009年10月

50

30日出願の、関連米国特許出願第12/589,969号「Separation Device for Use in the Separation, Characterization and/or Identification of Microorganisms」に記載されているような、特注の光学的遠心分離チューブ内の密度クッション(pH7.4のCsCl24% w/v + Hepes 10mM、およびPluronic F-108 0.005%からなる)上に重ねた。チューブを密閉して10,000rpmで2分間遠心分離して、無傷微生物を培養基および未結合の薬剤から分離した。そして、チューブを基台に光ファイバプローブが組み込まれている特注のチューブホルダに直接移した。プローブはFluoroLog-3分光蛍光光度計に接続されていた。チューブをUV透過性基台を通じて解析して、核酸反射率測定値を収集した。

【0089】

微生物のNADH蛍光(Ex340nm/Em440nm)の結果を表4に示す。2つのVSE株に対して抑制性であったバンコマイシンレベル(2.5および12.5µg/mL)において、細胞のNADHレベルは、時間を経るにつれて次第に減少した。対照的に、同じバンコマイシンレベルで処理した2種類のVRE株におけるNADHレベルは約1時間培養した後に上昇し、培養時間4時間を過ぎても継続的に上昇した。1つのVRE株(No.12406)は、NADH生成において比較的長く遅延したが、この遅延はこの期間におけるSytox Greenの流入に相関するものであった。

【0090】

表4：バンコマイシン感受性株およびバンコマイシン耐性株における微生物性のNAD Aの経時変化

10

20

【表 4】

株No.	バンコマイシン ($\mu\text{g/mL}$)	0時間	1時間	2.5時間	4時間
12406 (VRE)	0	176,514	514,368	690,324	588,224
12406 (VRE)	0.25	207,307	616,448	703,451	598,853
12406 (VRE)	2.5	440,416	253,323	573,926	931,786
12406 (VRE)	12.5	172,372	207,520	279,170	765,401
14054 (VSE)	0	385,933	323,090	710,289	479,486
14054 (VSE)	0.25	449,599	298,998	733,656	534,989
14054 (VSE)	2.5	290,986	195,152	349,287	96,954
14054 (VSE)	12.5	248,332	188,273	128,491	109,080
13185 (VRE)	0	345,051	516,677	564,287	624,663
13185 (VRE)	0.25	316,618	708,442	496,545	627,392
13185 (VRE)	2.5	256,533	237,463	965,305	782,908
13185 (VRE)	12.5	234,554	226,769	775,629	710,100
12480 (VSE)	0	201,074	487,559	477,522	500,649
12480 (VSE)	0.25	184,649	271,470	500,618	483,445
12480 (VSE)	2.5	221,692	254,828	149,686	100,931
12480 (VSE)	12.5	178,982	210,963	171,994	127,042

10

20

30

【0091】

微生物のトリプトファン蛍光 ($E \times 300 \text{ nm} / E_m 360 \text{ nm}$) の結果を表 5 に示す。2つのVSE株に対して抑制性であったバンコマイシンレベル (2.5および12.5 $\mu\text{g/mL}$) において、細胞のトリプトファンレベルは、時間が経過しても一定に維持された。対照的に、同じバンコマイシンレベルで処理した2種類のVRE株におけるトリプトファンレベルは約1時間培養した後に上昇した。

【0092】

表 5 : バンコマイシン感受性株およびバンコマイシン耐性株における微生物性のトリプトファンの経時変化

40

【表 5】

株No.	バンコマイシン ($\mu\text{g/mL}$)	0時間	1時間	2.5時間	4時間
12406 (VRE)	0	451,075	661,339	761,500	869,806
12406 (VRE)	0.25	463,942	666,793	679,880	800,658
12406 (VRE)	2.5	425,860	560,948	656,768	651,886
12406 (VRE)	12.5	463,985	433,269	560,607	738,461
14054 (VSE)	0	395,244	583,435	673,219	826,840
14054 (VSE)	0.25	387,455	601,874	670,217	808,566
14054 (VSE)	2.5	369,386	431,754	437,349	428,796
14054 (VSE)	12.5	384,046	421,876	387,066	403,029
13185 (VRE)	0	535,014	565,301	852,060	923,848
13185 (VRE)	0.25	546,862	557,453	809,317	880,899
13185 (VRE)	2.5	531,239	569,043	489,661	868,768
13185 (VRE)	12.5	537,160	579,537	537,067	782,106
12480 (VSE)	0	405,128	497,676	662,021	745,217
12480 (VSE)	0.25	425,539	460,266	678,352	706,797
12480 (VSE)	2.5	361,962	438,541	466,525	416,780
12480 (VSE)	12.5	389,264	428,402	455,446	438,978

10

20

30

【0093】

Sytox Green (Ex 510 nm / Em 530 nm) の結果を表 6 に示し、生存細胞のバイオマスを補償するために NADH 蛍光に対する Sytox Green 蛍光の比率として示した。このデータは、2 つの VRE 株のうちの 1 つ (No. 12406) が培養初期の 2 時間にわたってバンコマイシンの影響を受け、そして回復し始めるということを示している。この知見によって、この株は数時間バンコマイシンと共培養させることで、耐性表現型がこの個体群内で優位となることが示された。この挙動は、この株が本方法によって検出可能な誘導性の耐性を保持しているであろうことを示唆している。

40

【0094】

この実験により、抗生物質と共培養した微生物の固有蛍光の変化を測定することで、微生物が抗生物質に対して耐性であるか否かを迅速に決定することができることが示された。さらに、蛍光色素を添加して試験対象の微生物個体群における細胞膜の完全性をモニタリングすることで、微生物個体群の生存能力および耐性誘導性に関する有益な情報が得られることが示された。

【0095】

表 6 : バンコマイシン感受性株およびバンコマイシン耐性株に対する Sytox Green の流入の経時変化

【表 6】

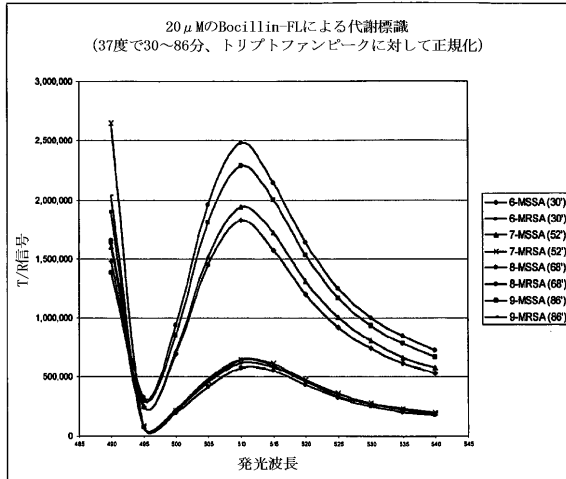
株No.	バンコマイシン ($\mu\text{g/mL}$)	0時間	1時間	2.5時間	4時間
12406 (VRE)	0	0.4	0.7	0.4	0.5
12406 (VRE)	0.25	0.3	0.6	0.4	0.5
12406 (VRE)	2.5	0.2	17.7	4.5	1.2
12406 (VRE)	12.5	0.4	19.8	14.6	1.9
14054 (VSE)	0	0.6	1.2	0.6	1.0
14054 (VSE)	0.25	0.4	1.4	0.6	0.8
14054 (VSE)	2.5	0.7	30.1	17.6	43.4
14054 (VSE)	12.5	0.9	14.1	39.1	35.4
13185 (VRE)	0	0.2	0.4	0.3	0.3
13185 (VRE)	0.25	0.3	0.3	0.3	0.2
13185 (VRE)	2.5	0.3	1.8	0.4	0.3
13185 (VRE)	12.5	0.4	1.4	0.5	0.3
12480 (VSE)	0	0.2	0.5	0.7	0.5
12480 (VSE)	0.25	0.3	1.0	0.6	0.6
12480 (VSE)	2.5	0.2	6.7	20.9	20.8
12480 (VSE)	12.5	0.2	1.5	7.8	8.7

10

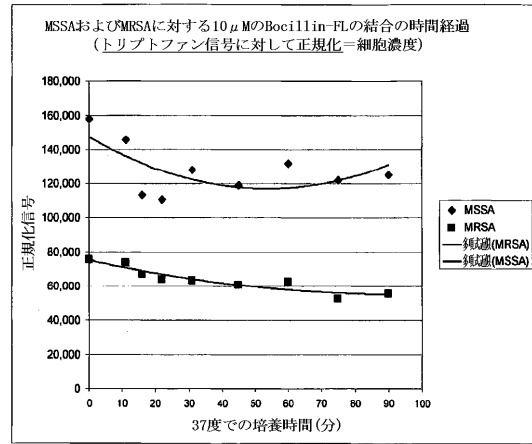
20

30

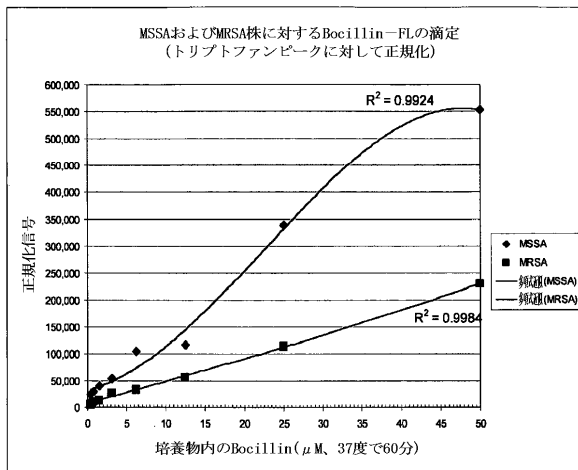
【 図 1 】



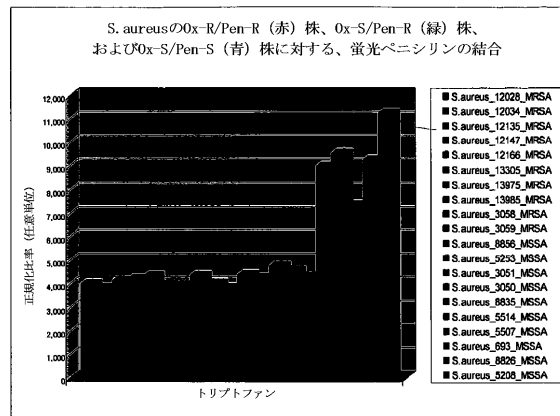
【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】



【手続補正書】

【提出日】平成24年4月24日(2012.4.24)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【書類名】明細書

【発明の名称】抗生物質耐性測定方法

【技術分野】

【0001】

(関連出願の相互参照)

本願は、2009年5月7日出願した米国仮特許出願第61/215,594号「Methods for Antimicrobial Resistance Determination(抗生物質耐性測定方法)」の恩典を主張する。この米国仮特許出願の開示内容を本明細書に援用する。

【0002】

本発明は微生物の抗生物質耐性状態を測定するための方法およびシステムに関するものである。さらに、本発明は、単一システム内におけるインサイチュ(in situ)の微生物の抗生物質抵抗性を測定するための方法を提供するものである。

【背景技術】

【0003】

血流感染症は高い罹患率および死亡率と関連付けられるが、培養後に生化学的同定および抗生物質感受性試験を行う現行の診断法は実施期間が数日に及ぶこともある。典型的には、臨床症状に基づく経験的治療が開始されるが、試験結果が臨床決定に影響を及ぼすのは初期治療が失敗したときだけである。陽性の血液培養結果が出てから最初の1時間以内に血流感染をキャラクタリゼーションすることができれば診断情報の臨床的意義が大きく高まるはずである。この必要性を満足するために分子増幅法が提案されているが、この手法にも大きな難題が残っている。陽性の血液培養プロス自体は種々の同定(ID)試験で使用され得る微生物の自然増殖個体群である。

【0004】

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA: Methicillin-resistant Staphylococcus aureus)は、健康な患者においてさえ早期に感染を引き起こす恐れがある、地域感染型および院内感染型の危険な病原体である。MRSAは、一般に年配患者および病気の患者の多くに常在細菌叢として存在し、医療現場において複数の患者間で早期に交差感染する能力を有する。「メチシリン耐性」のメカニズムは、PBP2aとして知られる、改変されたペニシリン結合タンパク質2の生成によって実質的に媒介される。PBP2aは、機能的酵素活性を維持するが、 β -ラクタム抗生物質に対する親和性が有意に低い。バンコマイシン耐性腸球菌(VRE: Vancomycin-Resistant Enterococci)は、迅速な同定を必要とする、他の危険な病原体の群に属する。メチシリン耐性と同様に、バンコマイシン耐性は、それらの細胞膜標的に対する抗生物質の親和性を低減することによって媒介される。

【0005】

MRSAおよびVREを同定するための従来の方法は労働集約的であり、さらに、使用者がエアロゾルに曝される恐れがあるステップが存在する故に安全性も欠く恐れがあった。血液培養プロスに含まれる微生物を単離するために、耐性の迅速な測定に適合した、迅速でその上安全な信頼性のある方法が至急必要とされている。本発明により、そのような方法が提供される。

【発明の概要】

【0006】

本発明は、微生物の抗生物質耐性状態を測定するための方法を提供するものである。これらの方法を用いると、微生物の抗生物質耐性状態の測定を従来技術よりも迅速に行うこ

とができ、それにより（例えば敗血症および／または他の感染症を患うまたはその疑いがある被験者の）より迅速な診断が可能となり、また（例えば食品、水道、および医薬品の）汚染材料のキャラクタリゼーションも可能となる。試料の採取から微生物の抗生物質耐性状態の測定に至る本発明の方法に含まれる各ステップを非常に短い時間枠、例えば約240分未満で実行して臨床的に意義のある実用的な情報を生成することができる。また、本発明の方法は完全に自動化することもでき、それにより感染性材料および／または汚染試料を取り扱うリスクを低減することができる。

【0007】

第1の観点によれば、本発明は微生物の抗生物質耐性状態を測定するための方法であって、

(a) 前記微生物と耐性測定親和性リガンドとを、微生物／耐性測定親和性リガンド複合体が形成可能な条件下で接触させるステップと、

(b) 前記ステップ(a)にて形成された前記微生物／耐性測定親和性リガンド複合体を、未結合の耐性測定親和性リガンドから分離するステップと、

(c) 前記微生物／耐性測定親和性リガンド複体内の、前記微生物に対する前記耐性測定親和性リガンドの結合量を測定するステップと、および、

(d) 前記微生物／耐性測定親和性リガンド複体内の、前記微生物に対する前記耐性測定親和性リガンドの結合量を、同じ微生物の既知の抗生物質感受性株もしくは抗生物質耐性株、または既知の抗生物質感受性株もしくは抗生物質耐性株の個体群による耐性測定親和性リガンドの結合量に対して比較するステップと、を含み、

前記微生物／耐性測定親和性リガンド複体内の前記微生物が、抗生物質感受性微生物によって結合される量とは異なる量の耐性測定親和性リガンドに結合する場合、または、

前記微生物／耐性測定親和性リガンド複体内の前記微生物が、抗生物質耐性微生物によって結合される量と同量の耐性測定親和性リガンドに結合する場合には、

前記微生物を抗生物質耐性として同定する方法に関するものである。

【0008】

他の観点によれば、本発明は微生物の抗生物質耐性状態を測定するための方法であって、

(a) 微生物を含むことが既知であるまたは微生物を含む可能性がある試験試料を採取するステップと、

(b) 前記試験試料内の前記微生物と耐性測定親和性リガンドとを、微生物／耐性測定親和性リガンド複合体が形成可能な条件下で接触させるステップと、

(c) 細胞の代謝または膜の完全性を測定する1種又は複数種の蛍光色素を任意で添加するステップと、

(d) 前記試料内に存在する可能性のある非微生物細胞を選択的に溶解させて、任意で溶解試料を生成するステップと、

(e) 前記試験試料の他の構成成分、または任意には前記溶解試料から前記微生物を分離して、微生物ペレットを形成するステップと、

(f) 前記ペレットを解析して前記微生物の測定値を得るステップと、

(g) 前記測定値を、同じ種の微生物の抗生物質耐性および／または抗生物質感受性微生物について得られた測定値またはその予測値と比較して、前記試験試料内の前記微生物の抗生物質耐性状態を測定するステップと、

を含む方法に関するものである。

【0009】

一実施形態において、分離ステップは、微生物／耐性測定親和性リガンド複合体を容器（例えば、密閉容器）内の密度クッション上に積層し、容器を遠心分離することで、微生物／耐性測定親和性リガンド複合体をペレット化すると共に、未結合のリガンドを含む溶媒を密度クッションの上面に残す。他の実施形態では、容器は、底部および／または側面に光学窓を備え、微生物／体制測定親和性リガンド複合体ペレットを測定ステップにて分光解析することができる。微生物の抗生物質耐性状態は、ペレットのスペクトルを抗生物

質耐性状態が既知の微生物のスペクトルと比較することで決定することができる。更なる操作を要することなくペレット内および/または密閉容器内から微生物の抗生物質耐性状態を直接測定することができるという能力は、微生物同定の安全性を向上させる。

【0010】

一実施形態において、測定ステップは微生物/耐性測定親和性リガンド複合体ペレットを回収して、微生物を適切な溶媒に再懸濁して、再懸濁した微生物を解析する(例えば、分光学的に)ことで実施する。他の実施形態では、本発明による方法は、再懸濁した微生物に対して、更なる同定および/又はキャラクタリゼーション試験(例えば、薬剤耐性、毒性因子、耐性記録)を、更に実施することを含む。

【0011】

更なる観点において、本発明は微生物の抗生物質耐性状態を測定するシステムであって、該システムは、

(a) 前記微生物または、前記微生物および耐性測定親和性リガンドを含む試料を含む容器と、

(b) 密度クッションと、および、

(c) 測定を行うための分光器と、を備え、

前記システム内におけるインサイチュ分離により前記容器内で濃縮された前記微生物の抗生物質耐性状態が、前記測定によって決定されることを特徴とするものである。他の実施形態において、本発明によるシステムは、未結合の耐性測定親和性リガンドから微生物を分離するための遠心分離機を備えるシステムに関するものである。

【0012】

以下、添付図面を参照しながら本発明の詳細な説明を行う。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】メチシリン感受性(MSSA)およびメチシリン耐性(MRSA)の*S. aureus*株のBOCILLIN(商標)-FL(BODIPY FL-標識ペニシリン)による代謝標識を示す図である。

【図2】MSSAおよびMRSAに対するBOCILLIN(商標)-FLの結合の時間経過を示す図である。

【図3】MSSAおよびMRSAに対するBOCILLIN(商標)-FLの滴定を示す図である。

【図4】様々なMSSAおよびMRSAに対するBOCILLIN(商標)-FLの結合を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0014】

本発明は様々な形態で実施することができる。本発明は本明細書に記載した実施形態に限定されるものと解釈すべきではない。そうではなく、これらの実施形態は本開示が詳細で完全なものとなり、本発明の範囲が当業者に十分伝わるようにするために提示するものである。例えば、一実施形態に関して例示した特徴を他の実施形態に組み込むことができ、特定の一実施形態に関して例示した特徴をその実施形態から削除することもできる。また、本開示に照らせば、本明細書に示した実施形態に対する本発明から逸脱しない様々な変更および追加が当業者には理解されるであろう。

【0015】

別段の定めがない限り、本明細書で使用する技術用語および科学用語はすべて本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書では、発明の説明で使用する用語は特定の実施形態を説明するためのものであって本発明を限定するものではない。

【0016】

[定義]

本明細書で使用する「a」、「an」または「the」は1つまたは2つ以上のものを意味す

る可能性がある。例えば「細胞 (a cell)」という場合は単一の細胞を意味することも複数の細胞を意味することもある。

【0017】

また、本明細書で使用する「および/または (and/or)」という表現は、列挙した関連アイテムの1つまたは複数を対象とする任意の可能な組合せに加えて選択肢(「または (or) 」)として解釈した場合の組合せの欠如も指し、それらをすべて包含するものである。

【0018】

更に、本明細書で使用する「約 (about)」という用語は、本発明の化合物または作用物質の量、投与量、時間、温度といった測定可能な値を指すときは、指定された量の $\pm 20\%$ 、 $\pm 10\%$ 、 $\pm 5\%$ 、 $\pm 1\%$ 、 $\pm 0.5\%$ または $\pm 0.1\%$ のばらつきを含むものとする。

【0019】

本明細書で使用する「微生物」という用語は、一般に単細胞であり、研究室で繁殖および取扱い可能な有機体を包含する。このような有機体としてはグラム陽性バクテリア、グラム陰性バクテリア、イースト、カビ、寄生虫、モリキューテス、およびこれらのあらゆる組み合わせが挙げられるが、これらに限定されるものではない。本発明のグラム陰性バクテリアの非限定的な例としては下記の属のバクテリアが挙げられるが、これらに限定されるものではない：シュードモナス属、エシェリキア属、サルモネラ属、赤痢菌属、エンテロバクター属、クレブシエラ属、セラチア属、プロテウス属、カンピロバクター属、ヘモフィルス属、モルガネラ属、ビブリオ属、エルシニア属、アシネトバクター属、ステノトロフォモナス属、プレブディモナス属、ラルストニア属、アクロモバクター属、フゾバクテリウム属、プレボテラ属、ブランハメラ垂属、ナイセリア属、パークホルデリア属、シトロバクター属、ハフニア属、エドワードシエラ属、アエロモナス属、モラクセラ属、ブルセラ属、パストツレラ属、プロビデンシア属およびレジオネラ属。本発明のグラム陽性バクテリアの非限定的な例は、以下の属のバクテリアを含む：腸球菌、連鎖球菌、ブドウ球菌、パチルス属、パエニパチルス属、乳酸桿菌属、リステリア属、ペプトストレプトコッカス属、プロピオン酸菌属、クロストリジウム属、バクテロイデス属、ガードネラ属、コクリア属、ラクトコッカス属、ロイコノストック属、マイクロコッカス、マイコバクテリウム属およびコリネバクテリウム属。本発明のイーストおよびカビの非限定的な例としては下記の属のイーストおよびカビが挙げられるが、これらに限定されるものではない：カンジダ属、クリプトコックス属、ノカルジア属、アオカビ属、アルタナリア属、ロドトルラ属、アスペルギルス属、フザリウム属、サッカロミセス属およびトリコスポロン属。本発明の寄生虫の非限定的な例としては下記の属の寄生虫が挙げられるが、これらに限定されるものではない：トリパノソーマ属、パベシア属、リーシュマニア属、マラリア原虫属、ブケリア属 (Wucheria)、ブルギア属、オンコセルカ属およびネグレリア属。本発明のモリキューテスの非限定的な例としてはマイコプラズマ属およびウレアプラズマ属のモリキューテスが挙げられる。

【0020】

本明細書で使用する「分離 (separate)」という用語は、それ自体の初期状態すなわち培養培地または培養基から除去、濃縮または他の方法で切り離された微生物の任意の試料を包含するものとする。例えば、本発明によれば、通常なら抗生物質耐性状態の測定に干渉する恐れがある非微生物または非微生物構成成分から微生物を(例えば分離試料として)分離することができる。この用語は、他の2層に挟まれた微生物、例えば遠心分離後に高密度クッションの上面に集められた微生物の層、または固体表面(例えばフィルター膜)上に集められた微生物の層を含む。この用語は、ある層(例えば密度クッション)を部分的に通過した一群の微生物も含む可能性がある。したがって、分離する微生物試料は、当初の試料よりも濃縮されたまたは当初の試料から切り離された一群または一層の微生物および/または微生物の構成成分を含む可能性があり、微生物が密集した高密度凝集塊から微生物の拡散層に及ぶ様々なものが存在する可能性がある。分離フォームまたは分離試

料に含まれ得る微生物構成成分としては線毛、鞭毛、フィムブリエおよびカプセルの任意の組合せが挙げられるが、これらに限定されるものではない。微生物から分離する非微生物構成成分は非微生物細胞（例えば血球および/または他の組織細胞）および/またはそれらの任意の構成成分を含む可能性がある。

【0021】

本明細書で使用する「ペレット (pellet)」という用語は、一塊の微生物として圧縮または堆積した微生物の任意の試料を包含するものとする。例えば、ある試料に由来する微生物を遠心分離または当業界で知られる他の方法によりチューブの底部に一塊に圧縮または堆積させることができる。この用語は、遠心分離後の容器の底部および/または側面上に存在する一群の微生物（および/またはその構成成分）を含む。ペレットに含まれ得る微生物構成成分としては線毛、鞭毛、フィムブリエおよびカプセルの任意の組合せが挙げられるが、これらに限定されるものではない。本発明によれば、通常なら抗生物質耐性状態の測定に干渉する恐れがある非微生物または非微生物構成成分から微生物を（例えばほぼ浄化された微生物ペレットとして）切り離してペレット化することができる。微生物から分離する非微生物構成成分は非微生物細胞（例えば血球および/または他の組織細胞）および/またはそれらの任意の構成成分を含む可能性がある。

【0022】

本明細書で使用する「密度クッション (density cushion)」という用語は、全体的に均質な密度を有する溶液を指す。

【0023】

本明細書で使用する「耐性測定親和性リガンド」という用語は、抗生物質感受性株の微生物よりも、耐抗生物質微生物に対して、（例えば、リガンド結合の量、結合の度合い、および/または結合の親和性等において）様々な程度で結合する、あらゆる検出可能な化合物又は分子を指す。本明細書で使用するように、この用語は標識されていないリガンドや、検出可能な標識に対して結合されたリガンドを含む。いくつかの実施形態では、耐性測定親和性リガンドは、抗生物質感受性株と比較して抗生物質耐性株に対して弱く結合する。他の実施形態では、耐性測定親和性リガンドは、抗生物質感受性株と比較して抗生物質耐性株に対して強く結合する。

【0024】

本明細書で使用する「結合」という用語は、耐性測定親和性リガンドに対して用いるように、微生物とリガンドとの物理的な関連性を指す。この用語は、微生物に対するリガンドの実際の物理的結合、例えば、微生物の構造（例えば、細胞内または表面タンパク質、核酸、細胞小器官、細胞膜、細胞壁等）に対する共有結合性又は非共有結合性の結合を含む。また、この用語は、物理的結合を伴わない微生物とリガンドとの関連性を含み、例えば、微生物内のリガンドの捕捉を含む。例えば、耐性測定親和性リガンドは、細胞内酵素のための酵素基質および酵素の作用を受けた後に細胞内に捕捉されるリガンドを含む。

【0025】

本明細書で使用する「同一微生物」という用語は、対象とする微生物と同一の属および種に属する微生物を指す。

【0026】

本明細書で使用する「異なる量を結合する」、「リガンド結合量の差異」、およびこれらの変形は、2つの微生物間の耐性測定親和性リガンドの結合量の統計的に有意な差異を指す。

結合における「統計的に有意な」差異とは、少なくとも約5%、例えば、少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、またはそれ以上である。「同じ量を結合する」という用語およびその変形は、2つの微生物間の耐性測定親和性リガンドの結合量であって、約20%よりも少ない結合量を指す。約20%よりも少ない結合量とは、例えば、15%、10%、5%、1%、またはそれ未満である。リガンド結合量は、当業者に既知のあらゆる方法によって測定することができる。リガンド結合量は、例えば、リガンドの先天的特性や、リガン

ドにリンクされた検知可能な標識の特性を計測することで測定することができる。

【0027】

本明細書で使用する、「異なる結合親和性」、「リガンドの結合親和性の差異」およびこれらの変形は、2つの微生物の間の体制測定親和性リガンドの結合親和性における差異であって、少なくとも約5%の差異である。少なくとも約5%の差異とは、例えば、少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、またはそれ以上である。「同一の結合親和性」およびその変形は、2つの微生物の間の体制測定親和性リガンドの結合親和性における差異であって、少なくとも約20%未満の差異である。少なくとも約20%未満の差異とは、例えば、15%、10%、5%、1%、またはそれ未満である。リガンドの結合親和性は、当業者に既知のあらゆる方法によって測定することができる。リガンドの結合親和性は、例えば、リガンドの先天的特性や、リガンドにリンクされた検知可能な標識の特性を計測することで測定することができる。

【0028】

本発明は、試料中の微生物の抗生物質耐性状態の測定方法を提供する。これらの迅速な方法を用いると、微生物の抗生物質耐性状態の測定を従来技術よりも迅速に行うことができ、それにより（例えば敗血症、および/またはその他の感染症を患っているまたはその疑いがある被験者の）より迅速な診断が可能となり、また（例えば食品、水道、および医薬品の）汚染材料のより迅速な特定も可能となる。試料の採取から微生物の抗生物質耐性状態の測定に至る本発明の方法に含まれる各ステップを非常に短い時間枠で実行して臨床的に意義のある実用的な情報を生成することができる。いくつかの実施形態では、本発明の方法を約240分未満、例えば約180、120、110、100、90、80、70、60、50、40、30、20、15、10、5、4、3、2または1分未満で実行することができる。従来方法よりも優れた本発明の方法の改良点はこの迅速さにある。これらの方法を使用して本明細書に記載した任意の微生物の抗生物質耐性状態の測定を行うことができる。一実施形態において、微生物はバクテリアである。別の実施形態において、微生物はイーストである。別の実施形態では、微生物はカビである。他の一実施形態において、微生物は寄生虫である。別の実施形態において、微生物はモリキューテスである。また、本発明の方法は部分的にまたは完全に自動化することもでき、それにより感染性材料を取り扱うリスクおよび/または試料を汚染するリスクを低減することができる。

【0029】

第1の態様において、本発明は微生物の抗生物質耐性状態を測定するための方法であって、

(a) 前記微生物と耐性測定親和性リガンドとを、微生物/耐性測定親和性リガンド複合体が形成可能な条件下で接触させるステップと、

(b) 前記ステップ(a)にて形成された前記微生物/耐性測定親和性リガンド複合体を、未結合の耐性測定親和性リガンドから分離するステップと、

(c) 前記微生物/耐性測定親和性リガンド複体内の、前記微生物に対する前記耐性測定親和性リガンドの結合量を測定するステップと、および、

(d) 前記微生物/耐性測定親和性リガンド複体内の、前記微生物に対する前記耐性測定親和性リガンドの結合量を、同じ微生物の既知の抗生物質感受性株もしくは抗生物質耐性株、または既知の抗生物質感受性株もしくは抗生物質耐性株の個体群による耐性測定親和性リガンドの結合量に対して比較するステップと、を含み、

前記微生物/耐性測定親和性リガンド複体内の前記微生物が、抗生物質感受性微生物によって結合される量とは異なる量の耐性測定親和性リガンドに結合する場合、または、

前記微生物/耐性測定親和性リガンド複体内の前記微生物が、抗生物質耐性微生物によって結合される量と同量の耐性測定親和性リガンドに結合する場合には、

前記微生物を抗生物質耐性として同定することを特徴とする方法に関するものである。

【0030】

他の態様において、本発明は微生物の抗生物質耐性状態を測定するための方法であって

- 、
- (a) 微生物を含むことが既知であるまたは微生物を含む可能性がある試験試料を採取するステップと、
 - (b) 前記試験試料内の前記微生物と耐性測定親和性リガンドとを、微生物 / 耐性測定親和性リガンド複合体が形成可能な条件下で接触させるステップと、
 - (c) 細胞の代謝または膜の完全性を測定する 1 種又は複数種の蛍光色素を任意で添加するステップと、
 - (d) 前記試料内に存在する可能性のある非微生物細胞を選択的に溶解させて、任意で溶解試料を生成するステップと、
 - (e) 前記試験試料の他の構成成分、または任意には前記溶解試料から前記微生物を分離して、微生物ペレットを形成するステップと、
 - (f) 前記ペレットを解析して前記微生物の測定値を得るステップと、
 - (g) 前記測定値を、同じ種の微生物の抗生物質耐性および / または抗生物質感受性微生物について得られた測定値またはその予測値と比較して、前記試験試料内の前記微生物の抗生物質耐性状態を測定するステップと、
- を含む方法に関するものである。

【 0 0 3 1 】

本発明による方法の一つの利点は、方法を実施するにあたっての迅速性である。他の利点は、本発明による方法は無傷の微生物について実施することができるという点である。本発明による方法は、溶解済みの、または無傷ではない微生物についても実施することができるにもかかわらず、微生物を溶解し、あるいは、例えば、細胞内成分を露出させるためまたは細胞膜を単離するために微生物を破壊することなく、抗生物質耐性微生物の同定を実施することができる。したがって、過剰な pH、界面活性剤、又は熱などの過酷な条件は不要である。さらに、微生物を測定方法によって破壊する必要が無いので、その微生物を更なる試験又は用途に用いることができる。

【 0 0 3 2 】

[試料]

本発明の幾つかの実施形態において、抗生物質耐性に関する試験の対象である微生物は、1 つまたは複数の試料である。本発明の方法によって試験可能な試料は、微生物の存在および / または増殖が疑われるまたは疑われる可能性がある臨床試料と非臨床試料の両方を含み、また微生物の有無を定期的にまたは臨時に検査する材料の試料も含む。利用する試料の量は方法の汎用性および / または感度に応じて大きく変化する可能性がある。試料調製は当業者に既知の任意の数の技法を利用して実行することができるが、本発明の一つの効果は、複雑な試料タイプ、例えば血液、体液および / または他の不透明物質等を、多くの前処理を殆どまたはまったく伴わないシステムを利用して直接試験することができる点にある。

【 0 0 3 3 】

試験可能な臨床試料としては、典型的には臨床検査室または研究所で試験される任意のタイプの試料が含まれ、例えば血液、血清、血漿、血液分画、関節液、尿、精液、唾液、糞便、脳脊髄液、胃内容物、腔分泌物、組織ホモジェネート、骨髓穿刺液、骨ホモジェネート、痰、吸引液、ぬぐい液 (swab) およびぬぐい液残滓 (swab rinsate)、他の体液等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【 0 0 3 4 】

本発明は研究用途ならびに獣医学および医学用途に適用される。臨床試料が採取可能な適切な被検者は一般には哺乳類の被験者であるが、どのような動物であってもよい。本明細書で使用する「哺乳類」という用語には、それらに限らないが、人間、人間以外の霊長類、牛、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウマ、ネコ、イヌ、ウサギ、齧歯動物 (例えばラットまたはマウス) 等が含まれる。人間の被験者には新生児、乳児、幼児、成人および老人の被験者を含む。試料が採取可能な被験者としては哺乳類、鳥類、爬虫類、両生類および魚類が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0035】

また、試験可能な非臨床試料としては、食品、飲料、医薬品、化粧品、水（例えば飲料水、非飲料水および廃水）、海水パラスト、空気、土壌、汚水、植物材料（例えば種、葉、茎、根、花、果実）、血液製剤（例えば血小板、血清、血漿、白血球分画等）、ドナー臓器または組織試料、生物戦試料（biowarfare sample）等を含めた物質が挙げられるが、これらに限定されるものではない。本方法は工業環境、商業環境、および/または臨床環境の汚染レベル、工程管理、品質管理等をモニタリングするための実時間試験にも特に適している。

【0036】

本発明の一実施形態では、微生物感染症を患うまたはその疑いがある被験者（例えば患者）から試料を採取する。一実施形態において、被験者は敗血症、例えば菌血症または真菌血症を患っているまたはその疑いがある。試料は、被験者に直接由来する血液試料であってよい。試料は、患者の血液の試料から培養した血液培養物、例えばB a c T / A L E R T（登録商標）血液培養物に由来するものであってもよい。血液培養試料は陽性血液培養物、例えば微生物の存在を示す血液培養物に由来するものであってもよい。いくつかの実施形態では、陽性血液培養物が陽性になった時点から短い時間のうちに、例えば約6時間以内、例えば約5、4、3もしくは2時間以内、または約60分以内、例えば約55、50、45、40、35、30、25、20、15、10、5、4、3、2もしくは1分以内に、該陽性血液培養物から試料を採取する。一実施形態では、微生物が対数増殖期にある培養物から試料を採取する。別の実施形態では、微生物が定常期にある培養物から試料を採取する。

【0037】

本発明は、微生物の検出、抗生物質耐性状態の測定に関して高い感度をもたらす。これにより、最初に微生物を単離するステップを経る必要のない検出が可能となる。このような検出は、固体または半固体培地上で微生物を培養し、培養したコロニーをサンプリングすることにより実現される。しかし、本発明の一実施形態において、試料は固体または半固体表面上で培養した微生物（例えばバクテリア、イーストまたはカビ）のコロニーに由来する。

【0038】

試料の体積は、本発明の方法における分離/単離ステップを実行した後に解析され得る検出可能な量（例えば、ペレット）の微生物を生成するのに十分大きいものとする必要がある。適切な体積は試料のソースおよび試料中の予想微生物レベルに依存する。例えば、陽性血液培養物の体積当たりの微生物レベルが汚染の有無を検査すべき飲料水試料よりも高く、したがって飲料水試料に比べて小さい体積の血液培養基が必要となる可能性もある。一般に、試料サイズは約50ml未満とすることができ、例えば約40、30、20、15、10、5、4、3または2ml未満とすることができる。いくつかの実施形態では、試料サイズを約1mlとすることができ、例えば約0.75、0.5または0.25mlとすることができる。分離をマイクロスケールで実行するいくつかの実施形態では、試料サイズを約200 μ l未満とすることができ、例えば約150、100、50、25、20、15、10または5 μ l未満とすることができる。いくつかの実施形態（例えば試料が少数の微生物を含むことが予想される場合）では、試料サイズを約100ml以上とすることができ、例えば約250、500、750または1000ml以上とすることができる。

【0039】

[接触ステップ]

本発明の1つの態様において、微生物または微生物含有試料を耐性測定親和性リガンドと接触させる。一実施形態では、例えば、試料にリガンドを添加するなどして、試料培地にて接触を実施する。他の実施形態では、接触は、微生物およびリガンドを含む結合混合物または組成物内で生じる。更に他の実施形態では、耐性測定親和性リガンドは分離容器内の密度クッションに含まれる。一実施形態では、耐性測定親和性リガンドは、ペニシリ

ン又は他のβ-ラクタム系抗生物質、バンコマイシン又は他のグリコペプチド抗生物質、ポリミキシンB又はセフトピブロール、およびこれらのあらゆる組み合わせである。他の実施形態では、耐性測定親和性リガンドは、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、又は抗体断片、核酸プローブ、アプタマー、リガンド、酵素基質、ペプチド模倣物、ファージ由来の結合タンパク質、脂質、炭水化物、ポリサッカライド、若しくはタンパク質、又はこれらのあらゆる組み合わせである。耐性測定親和性リガンド自体が検出可能な信号を発しない場合には、リガンドをマーカー（例えば、可視又は蛍光マーカー）に結合させるなどして、リガンドを標識して検出可能な信号を生成させることができる。マーカーには、蛍光性マーカー、発光性マーカー、りん光性マーカー、放射性マーカー、ラマン活性マーカー、質量分光分析反応性マーカー、および/または、比色分析化合物を含み、これらに限られない。標識付き耐性測定親和性リガンドは、標識ペニシリン（例えば、BOCILIN FL ペニシリン）および標識バンコマイシン（例えば、BODIPY FL バンコマイシン）である（Life Technologies社、カリフォルニア州カールズバッド）。

【0040】

耐性測定親和性リガンドと、微生物又は微生物含有試料との接触は、リガンドと微生物との間で検出可能な量の結合が生じ（例えば、微生物/耐性測定親和性リガンド複合体が形成され）、さらに抗生物質感受性微生物および抗生物質耐性微生物に対する結合の量または結合親和性に測定可能な差異がある限りにおいて、あらゆる方法で実施される。微生物と接触するように配置される耐性測定親和性リガンドの量および接触時間は、リガンドを微生物に対して結合させて微生物/耐性測定親和性リガンド複合体の形成がなされるために十分なように決定する。そして、リガンドの量および接触時間は、幾つかの因子、例えば微生物の種類、リガンドの種類、リガンドの微生物に対する親和性、リガンドに対する結合ターゲットが細胞外又は細胞内のいずれに存在するか、温度、バッファの状態等、当業者によく知られた種々の因子に応じて調節する。接触時間は、例えば、約240分以下であり、例えば、約180、120、90、60、50、40、30、20、10、10、5、4、3、2、1分以下であり得る。接触は、微生物に対するリガンドの結合の生成に適したあらゆる温度で実施することができ、例えば、約4度～約50度、例えば、約15度～約40度、約37度、又は室温程度であり得る。接触ステップは、適切な容器内で実施することができ、例えば、分離ステップを実施する容器と同じ容器内、又は異なる容器内で行うこともできる。

【0041】

[分離ステップ]

微生物又は微生物含有試料を体制測定親和性リガンドと接触させて、検出可能な量で測定可能な量の微生物に対するリガンドの結合が生じた後に、分離ステップを実行する。分離ステップを実行することにより、未結合の耐性測定親和性リガンドから微生物/耐性測定親和性リガンド複合体を分離し、また、試料の他の構成成分および/または結合混合物または構成成分から微生物を分離する。一実施形態では、分離ステップによって微生物/耐性測定親和性リガンド複合体をペレットに濃縮して、かかるペレットを解析して微生物の抗生物質耐性状態を測定することができる。試料および/または結合混合物または構成成分（例えば、未結合のリガンド）から微生物を分離することは、必ずしも完全なものである必要はない。すなわち、必ずしも100%の分離を行う必要はない。ここで必要なことは、他の構成成分による実質的な干渉がない微生物の解析が可能となる程度まで、試料の他の構成成分から微生物を分離することである。例えば、分離によって少なくとも約10、20、30、40、50、60、70、80、90、95、96、97、98もしくは99%またはそれ以上の純度の微生物ペレットを得ることができる。

【0042】

一実施形態では、この分離を遠心分離ステップによって実行する。遠心分離ステップでは、微生物/耐性測定親和性リガンド複合体を分離容器内の密度クッションの上面に配置し、容器の底部および/または側面に複合体がペレットとなる条件で容器を遠心分離にか

ける。さらに、未結合のリガンドおよび試料の他の構成成分および/または結合混合物または構成成分は密度クッションの上面上または密度クッションの上部分内に留まる。この分離ステップは材料、例えば培地、細胞残屑および/または微生物に対する耐性測定親和性リガンドの結合の検出および/または測定に干渉する可能性がある他の構成成分から微生物を単離する。一実施形態では、密度クッションは生きている微生物を死んだ微生物(密度クッションを完全に通過しない微生物)から分離する働きもする。別の実施形態では、密度クッションは遠心分離前または遠心分離後に密度勾配を有さない。換言すれば、密度クッションを構成する材料が密度勾配を形成するに足る量の時間および/または加速度に至るまで分離容器を遠心分離にかけることはしない。

【0043】

クッションの密度は、試料および/または結合混合物または配合物の中の微生物/耐性測定親和性リガンド複合体はクッションを通過するが、未結合の耐性測定親和性リガンドおよび試料の他の構成成分および/または結合混合物または配合物(例えば血液培養ブロス、細胞残屑)はクッションの上面に残るか、または密度クッションを完全には通過しないような密度を選択する。密度は、生きている微生物(クッションを通過する微生物)を死んだ微生物(クッションを通過しない微生物)から分離するように選択することもできる。適切な密度は密度クッションで使用する材料および分離すべき試料に依存する。一実施形態では、クッションの密度を約1.025~約1.120 g/mlの範囲とし、例えば約1.030~約1.070 g/ml、約1.040~約1.060 g/mlまたは約1.025~約1.120 g/mlの任意の範囲とする。他の実施形態では、クッションの密度を約1.025、1.030、1.035、1.040、1.045、1.050、1.055、1.060、1.065、1.070、1.075、1.080、1.085、1.090、1.095、1.100、1.105、1.110、1.115または1.120 g/mlとする。

【0044】

密度クッション用の材料または材料の組み合わせは、本発明の方法に適した密度範囲を有する任意の材料とすることができる。密度クッションを調製するために用いることができる適切な材料としては、顕微鏡の液浸油(例えば、Cargille Labs社(ニューヨーク)のタイプDF)や、鉱物油(例えば、Penreco社(ペンシルバニア)Drakeol(登録商標)5、Draketex 50、Peneteck(登録商標))のような、低粘度、高密度の油である。他の適切な材料はコロイドシリカである。コロイドシリカは非被覆とすることも(例えばLudox(登録商標)(W.R. Grace社(コネティカット州))、例えばシランで被覆することも(例えばPureSperm(登録商標)(Nidaccon Int'l社(スウェーデン))、Isolate(登録商標)(Irvine Scientific社(カリフォルニア州サンタアナ)等)、または、Percol(商標)Plus(Sigma Aldrich社ミズーリ州セントルイス)、または、ポリビニルピロリドン(例えばPercol(商標)(Sigma Aldrich社(ミズーリ州セントルイス))で被覆することもできる。一実施形態では、分光解析で最小干渉を示したコロイドシリカ、例えば最も低い固有蛍光を有する材料を選択する。このコロイドシリカを適切な密度を形成するのに適した任意の培地、例えば平衡塩類溶液、生理的食塩水および/または0.25 Mスクロースで希釈することができる。適切な密度は約15~約80 v/v%の濃度、例えば約20~約65 v/v%の濃度のコロイドシリカで得ることができる。適切な別の材料はヨウ化造影剤、例えばイオヘキソール(Omnipaque(商標)Nycoprep(商標)またはNycodenz(登録商標))およびイオジキサノール(Visipaque(商標)またはOptiprep(商標))である。適切な密度は、血液培養試料の場合は約10~約25 w/v%の濃度、例えば約14~約18 w/v%の濃度のイオヘキソールまたはイオジキサノールで得ることができる。スクロースは、血液培養物試料の場合は約10~約30 w/v%の濃度、例えば約15~約20 w/v%の密度クッションとして使用することができる。密度クッションに使用可能な他の適切な材料としては、シリコン油(ポリジメチルシロキサン)、フルオロシリコン油、シリコ

ーンゲル、例えば血液培養試料の場合は約75～約100%の濃度のメトリゾエート F i c o l l (登録商標) (L y m p h o P r e p (商標))、例えば血液培養試料の場合は約25～約50%の濃度のジアトリゾエート デキストラン (P o l y m o r p h o P r e p (商標))、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリエチレンオキシド (高分子量)、P l u r o n i c (登録商標) F 1 2 7、P l u r o n i c (登録商標) F 6 8、P l u r o n i c (登録商標) 化合物の混合物、ポリアクリル酸、架橋したポリビニルアルコール、架橋したポリビニルピロリジン、PEGメチルエーテルメタクリレート、ペクチン、アガロース、キサンタン、ジェラン、P h y t a g e l (登録商標)、ソルビトール、F i c o l l (登録商標) (例えば血液培養試料の場合は約10～約15%の濃度のF i c o l l (登録商標) 4 0 0)、グリセロール、デキストラン (例えば血液培養試料の場合は約10～約15%の濃度)、グリコーゲン、塩化セシウム (例えば血液培養試料の場合は約15～約35%の濃度)、パーフルオロカーボン液 (例えばパーフルオロ n オクタン)、ハイドロフルオロカーボン液 (例えばV e r t r e l X F) 等が挙げられる。密度クッションは材料の組合せ、例えば上述した材料の2つ以上の組み合わせで構成することもできる。一実施形態では、密度クッションは液浸油および鉱物油の組み合わせ (例えば、比率が約0.7～約1.0部鉱物油対約0.8～約1.2部液浸油) で構成される。一実施形態では、密度クッションはDF液浸油およびD r a k e o l 5 鉱物油の混合物 (例えば、1000部のタイプDF液浸油: 0.875部D r a k e o l 5 鉱物油) を含む。他の実施形態では、密度クッションは塩化セシウム (例えば、24% w / v 塩化セシウム) で構成される。

【0045】

密度クッションの体積/高さは、未結合の耐性測定親和性リガンドおよび他の試料構成成分および/または結合混合物または配合物からの微生物/耐性測定親和性リガンド複合体の分離を実現するのに十分なものとする必要がある。体積は分離容器のサイズおよび形状に依存する。一般には約0.1～約5mlの体積を使用することができ、例えば約0.2～約1ml、例えば約0.2ml～約0.5mlの体積を使用することができる。分離をマイクロスケールで実行する場合は、密度クッションの体積を約1 μ l～約100 μ l、例えば約5 μ l～約50 μ lとすることができる。密度クッションの上面に積み上がるまたは積層する試料および/または結合混合物または配合物の体積は、検出および/または測定可能な微生物を得るために十分な、例えば、解析に適したペレットを生産するのに十分な微生物を得るに足る大きさにする必要がある。一般には容器に収まる任意の体積を使用することができる。例えば、約0.1ml～約5mlの体積を使用することができ、例えば約0.2ml～約1ml、例えば約0.2ml～約0.5mlの体積を使用することができる。分離をマイクロスケールで実行する場合は、体積を約1 μ l～約100 μ l、例えば約5 μ l～約50 μ lとすることができる。ある実施形態では、試料および/または結合混合物または配合物を分離容器内に配置する前に、体積を小さくし、および/または、微生物の濃度を上げておき、試料および/または結合混合物または配合物が容器内に適切な体積となるようにする。例えば、試料および/または結合混合物または配合物をろ過して体積を減少させ、および/または微生物を収集する。容器内の試料および/または結合混合物または配合物の利用可能なスペースは容器のサイズおよび形状に依存する。いくつかの実施形態では、密度クッションと試料および/または結合混合物または配合物の混合を防止するために、試料および/または結合混合物または配合物が積み上がる前または積層する前に密度クッションの上面に中間層 (液体または固体) を配置することができる。一実施形態では、中間層をポリプロピレンビーズとすることができる。他の実施形態では、密度クッションと試料および/または結合混合物または配合物の間に小気泡を配置して混合を防止することができる。別の実施形態では、微生物/耐性測定親和性リガンド複合体が分離中に密度クッションを通過し、密度クッションと高密度材料の間の界面に集まるように高密度材料 (例えばペルフルオロカーボン液) の上面に密度クッションを積層することができる。

【0046】

本発明の一実施形態では、分離容器を遠心分離にかけ、微生物/耐性測定親和性リガンド複合体が容器の底部直上にペレットを形成するようにする。この容器を、微生物/耐性測定親和性リガンド複合体をペレット化および/または未結合のリガンドおよび試料の他の構成成分および/または結合混合物または配合物から分離するに足る加速度および時間にわたって遠心分離にかけ、遠心加速度は約 $1,000 \times g$ ~ 約 $20,000 \times g$ とすることができ、例えば約 $2,500 \times g$ ~ 約 $15,000 \times g$ 、例えば約 $7,500 \times g$ ~ 約 $12,500 \times g$ 等とすることができる。遠心時間は約30秒 ~ 約30分とすることができ、例えば約1分 ~ 約15分、例えば約1分 ~ 約5分とすることができ、遠心分離は約2 ~ 約45の温度で実行することができ、例えば約15 ~ 約40、例えば約20 ~ 約30の温度で実行することができる。一実施形態において、分離容器は閉鎖部を備え、この閉鎖部を遠心分離に先立って容器に取り付けることで気密シールを形成する。閉鎖部の存在により、感染性および/または有害性を有する恐れがある微生物を取り扱うリスクと共に試料および/または結合混合物または配合物の汚染リスクも低減する。本発明の方法の1つの利点は、微生物を封止容器(例えば密封容器)内に入れた状態で本方法の1つまたは複数の任意のステップ(例えば接触、分離、検出および/または比較)を実行することができる点である。本方法は、直接試験で実施される試料からの微生物の回収のような毒性の高い微生物の取扱いに関連する健康および安全上のリスクを、自動化システムを利用して回避するものである。一実施形態では、密度クッションに密度勾配が生じるのに十分な時間にわたって且つ/またはそのような力をもって容器を遠心分離にけることはしない。本発明は超遠心分離、例えば約 $100,000 \times g$ を超える力の遠心分離を必要としない。更に、本発明は等密度(平衡)沈殿またはバンディングも必要としない。

【0047】

分離容器は密度クッションおよび試料および/または結合混合物または配合物を保持するのに十分な容積を有する任意の容器であってよい。一実施形態では、容器が遠心ローターに嵌合する、または容器をそのように嵌合させることができる。容器の容積は約0.1 ml ~ 約25 mlとすることができ、例えば約1 ml ~ 約10 ml、例えば約2 ml ~ 約8 mlとすることができ、分離をマイクロスケールで実行する場合は、容器の容積を約 $2 \mu\text{l}$ ~ 約 $100 \mu\text{l}$ 、例えば約 $5 \mu\text{l}$ ~ 約 $50 \mu\text{l}$ とすることができ、一実施形態において、容器は試料および/または結合混合物または配合物、および密度クッションの大部分を保持するために上部の内径が広くなっており、微生物/耐性測定親和性リガンド複合体のペレットを集める下部の内径は狭くなっている。狭い部分の内径は約0.04 ~ 約0.12インチ(約0.1016 ~ 0.3048 cm)とすることができ、例えば約0.06 ~ 約0.10インチ(約0.1524 ~ 約0.2540 cm)、例えば約0.08インチ(約0.2032 cm)とすることができ、広い部分の内径は約0.32 ~ 約0.40インチ(約0.8128 ~ 約1.0160 cm)とすることができ、例えば約0.34 ~ 約0.38インチ(約0.8636 ~ 約0.9652 cm)、例えば約0.36インチ(約0.9144 cm)とすることができ、マイクロスケール分離の場合は内径を更に小さくすることができる。例えば、狭い部分の内径を約0.001 ~ 約0.04インチ(約0.00254 ~ 約0.10160 cm)とすることができ、例えば約0.002 ~ 約0.01インチ(約0.00508 ~ 約0.02540 cm)とすることができ、テーパ内径部を上側および下側の各部分に接続することができる。テーパ部分の角度は約20 ~ 約70度、例えば約30 ~ 約60度とすることができ、一実施形態において、下側の狭い部分は容器の全高の半分未満、例えば容器の全高の約40%、30%、20%または10%未満とする。容器には閉鎖具を取り付けることができ、または閉鎖具(例えば蓋)を受け入れるように容器をねじ切りすることができ、それにより遠心分離中の容器の密封が可能となる。いくつかの実施形態では、微生物ペレットを分離直後に手動でまたは自動的に(技術者が容器の内容物に曝されないような形で)容器から回収することができるように容器を設計する。例えば、容器はペレットを収容し容器の残部から分離できる取り外し可能部分または離脱部分を備えることができる。別の実施形態では、容器は分離後に

ペレットにアクセスするための手段、例えば注射器および/または他のサンプリング装置を挿入するための、および/またはペレットを取り出すための1つまたは複数のポートまたは浸透性表面を備える。一実施形態では、容器をチューブ、例えば遠心チューブとすることができる。別の実施形態では、容器をチップまたはカードとすることができる。一実施形態では、容器を独立容器、すなわち単一の試料を分離する装置とする。他の実施形態では、容器を2つ以上の分離容器を備え複数の試料を同時に分離することができる装置の一部とする。一実施形態において、この装置は2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、15、20、25、30、36、42、48、60、72、84、96またはそれ以上の分離容器を備える。一実施形態では、分離容器は、2009年10月30日出願の米国特許出願第12/589,969号「Separation Device for Use in the Separation, Characterization and/or Identification of Microorganisms」に開示の分離容器である。

【0048】

容器は光学窓を備えることができ、この光学窓を通じて結合の測定（例えば、結合量の測定および/または結合親和性の計測）を実施することができる。光学窓は容器の底部、上部および/または側面に配置することができる。この窓は光（例えば近赤外（NIR；700nm～1400nm）、紫外（UV；190nm～400nm）および/または可視（VIS；400nm～700nm）光スペクトルの少なくとも一部分）を透過する任意の材料で構成することができる。適切な材料の例としては、それらに限らないが、アクリル、メタクリレート、石英、溶融シリカ、サファイヤ、環状オレフィンコポリマー（COC）、ポリスチレン、ポリカーボネート、および/またはポリプロピレンが挙げられる。一実施形態では、容器全体を光学窓材料で構成する。別の実施形態では、容器を2つ以上の別々の部分から作製（例えば成形）することができ、例えば、光学窓を光学UV VIS NIR透過構成要素で構成し、容器の残部を別の材料（例えばより低コストの標準的な成形プラスチック）で構成することができる。一実施形態において、光学窓は分光解析が可能となる十分な薄さとする。この薄さは窓材料に依存する。別の実施形態では、分光解析に対する干渉を低減するために光学窓を可能な限り薄くする。例えば、窓の厚さを約0.20インチ未満とすることができ、例えば約0.15インチ未満、約0.10インチ未満または0.05インチ未満とすることができる。

【0049】

他の実施形態では、分離を濾過ステップによって実行する。この場合は、微生物を保持する細孔径を有する選択性フィルタまたはフィルタセットを装着した装置内に試料および/または結合混合物または配合物を配置する。保持された微生物は、フィルタに適切な緩衝液をゆっくりと通すことにより洗浄することができる。その後、フィルタの表面を直接サンプリングすることにより、またはフィルタを適切な水性緩衝液で逆洗することにより、洗浄した微生物をフィルタ上で直接解析することおよび/または解析のために回収することができる。

【0050】

[選択的溶解ステップ]

本発明の方法の幾つかの実施形態では、例えば分離ステップの前に、微生物を含む試料を処理して、試料内に存在する可能性のある非微生物細胞（例えば、不要な細胞）、例えば、血液細胞および/または組織細胞を溶解させる。細胞を溶解させることで、試料の他の構成成分から微生物を分離することが可能になる。他の構成成分から微生物を分離することで、検出ステップ中の干渉を防止する。微生物細胞が試料内に存在しないと予想されるか又は存在しない可能性が高いか、又は検出ステップに干渉しないと予想される場合、溶解ステップを実施する必要は無い。一実施形態では、溶解されるべき細胞は試料内に存在する非微生物細胞であり、試料内に存在する微生物は溶解されない。しかし、幾つかの実施形態では、特定の綱（class）の微生物を選択的に溶解させることが望ましく、したがって、本明細書に記載の方法および当業界にてよく知られた方法に従って実施することができる。例えば、不要な微生物の綱について選択的に溶解させる（例えば、酵母は溶

解されるが細菌は分解されない、あるいはその逆となる)。他の実施形態では、所望の微生物を溶解させて、微生物の特定の細胞成分、例えば、細胞膜又は細胞小器官を分離することができる。一実施形態では、非微生物細胞を全て溶解させる。他の実施形態では、非微生物細胞の一部、例えば検出ステップにおける干渉を回避するために十分な細胞を溶解させる。細胞の溶解は、微生物の溶解を伴う或いは伴わない、細胞を選択的に溶解させるのに効果的な当業界で既知のあらゆる方法で実施することができる。そのような方法は、例えば、溶解液の添加、超音波処理、浸透圧衝撃、凍結-融解サイクル、化学的処理、および/またはこれらの組み合わせである。

【0051】

溶解溶液は、細胞、例えば、非微生物細胞(例えば、真核生物細胞膜を可溶化による)、および/または微生物細胞を溶解させることができる溶液である。一実施形態では、溶解溶液は、1種または複数種の界面活性剤(洗剤)を含むことができ、1種又は複数種の酵素、または1種又は複数種の界面活性剤および1種又は複数種の酵素の組み合わせを含み、更に添加剤を含むことができる。一実施形態では、界面活性剤は、例えば、Triton(登録商標)X-100、Triton(登録商標)X-100-R、Triton(登録商標)X-114、NP-40、ジェナポールC-100、ジェナポールX-100、Igepal(登録商標)CA630、Arlasolve(商標)200、Brij(登録商標)96/97、CHAPS、オクチル-D-グルコピラノシド、サポニン、ノナエチレングリコールモノドデシルエーテル(C12E9)、ポリドカノール(polidocanol)、およびポリオキシエチレンエーテル(C12E10、例えば、ジェナポール(登録商標)C-100)でありうる。任意には、非変性溶解界面活性剤は、ドデシル硫酸ナトリウム、N-ラウリルサルコシン、デオキシコール酸ナトリウム、胆汁酸塩、ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミド、SB3-10、SB3-12、アミドスルホベタイン-14、およびC7BzOなどを含んでも良い。任意には、可溶化剤は、Brij(登録商標)98、Brij(登録商標)58、Brij(登録商標)35、Tween(商標)80、Tween(商標)20、Pluronic(商標)L64、Pluronic(登録商標)P84、Pluronic(登録商標)F108、非界面活性剤スルフォベタイン(NDSB201)、アンフィポール(PMAL-C8)、およびメチル-シクロデキストリンなどを含んでも良い。一般に非変性界面活性剤および可溶化剤は臨界ミセル濃度(CMC)を超える濃度で用いられる一方、変性界面活性剤はそのCMCを下回る濃度で添加されうる。例えば、非変性溶解性界面活性剤は、濃度約0.010%~約10%、例えば、約0.015%~約1.0%、例えば、約0.05%~約0.5%、約0.10%~約0.30%(試料希釈後の採集濃度)で用いることができる。他の実施形態では、ポリオキシエチレン界面活性剤が好適でありうる。ポリオキシエチレン界面活性剤は、構造C₁₂₋₁₈/E₉₋₁₀を有し、C₁₂₋₁₈は、炭素鎖の長さが12~18炭素原子であることを示し、E₉₋₁₀は、9~10のオキシエチレン親水性頭基を表す。例えば、ポリオキシエチレン界面活性剤は、Brij(登録商標)97、Brij(登録商標)96V、ジェナポールC-100、ジェナポールX-100、ポリドカノール、またはこれらの組み合わせからなる群から選択されうる。溶解溶液に用いられる酵素は、核酸および他の膜ファウリング材料(例えば、プロテイナーゼXXIII、DNase、ノイラミニダーゼ、ポリサッカリダーゼ、Glucanex(登録商標)、およびPectinex(登録商標))を含む。使用されうる他の添加物は、2-メルカプトエタノール(2-Me)またはジチオスレイトール(DTT)のような還元剤、ならびに、マグネシウム、ピルビン酸、および保湿剤のような安定化剤を含む。溶解溶液は、所望の細胞を溶解するために適切な、さらには、試料の種類、溶解対象の細胞、および使用される界面活性剤等を含む種々の要因に応じた、あらゆるpHで緩衝することができる。幾つかの実施形態では、pHは約2~約13の範囲、約6~約13の範囲、約8~約13の範囲、約10~約13の範囲である。適切なpH緩衝液は、pHを所望範囲に維持することができるあらゆる緩衝液を含み、例えば、約0.05M~約1.0MのCAPSである。

【0052】

一実施形態では、試料および溶解溶液を混合して十分な時間培養して細胞膜の溶解および可溶化を生じさせる。十分な時間とは、例えば、約1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、40、50、又は60秒、又は約2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、又は20分、或いはそれ以上であり、例えば、約1秒～約20分、約1秒～約5分、約1秒～約2分である。培養時間は溶解溶液の強度、例えば、界面活性剤および/または酵素の濃度や、溶解温度に応じて変更される。一般的に、マイルドな溶解緩衝液は、比較的長い時間を要し、そして、非微生物細胞を完全に可溶化するために試料を比較的強く希釈する必要がある。溶解溶液の強度は、試料に含まれることが既知である、或いは含まれる疑いのある微生物に基づいて選択することができる。比較的溶解しやすい微生物については、マイルドな溶解溶液を用いることができる。溶解は、約2度～約45度、例えば約15度～約40度、例えば約30度～約40度で生じうる。一実施形態では、溶解溶液を注射器に入れ、さらに試料を注射器に吸引して、注射器内で混合し、培養することができる。

【0053】

幾つかの実施形態では、溶解状態（例えば、溶解時間又は培養時間）や、分離および/または解析ステップは、試料内の微生物の一部又は全てを死滅させるために十分であり得る。本発明による方法は、非常に多用途であり、単離および同定を実施するために微生物が生存した状態であることを必要としない。ある実施形態では、微生物の一部又は全てが死滅した状態であり、方法のステップが実施される前、最中、および/または後のいずれにおいて死滅しても良い。

【0054】

[検出/比較ステップ]

微生物/耐性測定親和性リガンド複合体を未結合の耐性測定親和性リガンドから分離した後、微生物に対して結合した耐性測定親和性リガンドの量、すなわちリガンドの結合親和性を検出および/または計測することができる。微生物/耐性測定親和性リガンド複合体が遠心分離によってペレットを形成した場合、当該ペレットを解析して結合量、すなわち耐性測定親和性リガンドの結合親和性を検査することができる。一実施形態では、解析を非侵襲的に実行する。すなわち、ペレットを分離容器に入れたまま解析を行う。別の実施形態において、解析中は分離容器を終始封止した状態に保つ。抗生物質耐性微生物を非侵襲的に同定する能力は、任意選択で、分離およびキャラクタリゼーションプロセスの全体にわたって容器の封止状態を保ち、手順の一部または全部を自動化する能力と相まって、汚染された且つ/または感染性の試料を絶えず取り扱う状況を回避し、プロセス全体の安全性を高めることになる。更に、試料またはペレットの更なる処理（例えば再懸濁、平板培養およびコロニーの培養）を伴わない直接解析により微生物をキャラクタリゼーションする能力は、耐抗生物質微生物の同定の実行速度を大幅に向上させる。

【0055】

本発明のある観点では、方法は、微生物の解析に先立って、分離ステップ中に形成された微生物/耐性測定親和性リガンド複合体のペレットの全てを、又はその一部を分離容器から回収するステップを含む。例えば、ペレット形成の後に、流動体をペレットから吸引して、さらにペレットを適切な溶媒（例えば、微生物が生存可能な溶媒）に再懸濁する。再懸濁した微生物を分離容器から取り除く。そして、微生物をリガンド結合すなわち親和性について検査するために、例えば懸濁液内で、または再ペレット化した後に解析する。他の実施形態では、再懸濁微生物を分離容器内、例えば、懸濁液内で、または再ペレット化した後に解析する。一実施形態では、ペレットを解析に先立って回収および/または再懸濁し、任意選択で分離容器から取り出す。別の実施形態では、試料またはペレットをインサイチュ解析後に回収および/または再懸濁し、その後更なる解析を実行する。例えば、微生物ペレット以外の単離微生物に適用可能なラテックス凝集試験または自動化した表現型同定試験のような技法を回収および/または再懸濁した微生物に対して実行することができる。さらなる実施形態では、ペレットから回収した微生物を再懸濁することなく更なる解析（例えば、質量分光分析）に直接用いることもできる。

【0056】

いくつかの実施形態では、ペレットおよび/または再懸濁微生物を分光解析することができる。分光解析を用いて、耐性測定親和性リガンドの特性（例えば、微生物の固有特性または微生物に付された標識の特性）を分析して、結合を検出することができる。耐性測定親和性リガンドの検出に加えて、分光解析を用いて、複合体内の微生物の1つ又は複数の微生物の固有特性（例えば、固有蛍光）、例えば、例えば染色剤、色素、結合剤のような付加的な作用物質の不存在下で微生物の固有特性を分析することができる。微生物、特に細菌の固有蛍光すなわち内部蛍光は、細菌が天然のフルオロフォア（例えば、トリプトファン、チロシン、フェニルアラニン、NADH、およびフラビン）であって、多波長光源によって励起されるものを含むという事実を利用したものである。これらの実施形態では、耐性測定親和性リガンドの結合を微生物の固有特性信号と比較して、リガンド結合量を細胞ベースで算出することができる。解析は、例えば蛍光分光法、拡散反射分光法、透過吸収分光法、赤外分光法、テラヘルツ分光法、ラマン分光法を使用して実行することができる。ラマン分光法には表面増強ラマン分光法（SERS）、空間オフセットラマン分光法、および/または、共鳴ラマン分光法が含まれる。ラマン（SERS）および蛍光シグナルを増強するために、微生物を遠心分離に先立って金および/または銀ナノ粒子で被覆することができ、且つ/または内部光学面を特定のサイズおよび形状の金属コロイドでプレコーティングすることができる（Lakowicz, *Anal. Biochem.* 337:171 (2005) for fluorescence; Efrima et al., *J. Phys. Chem. B. (Letter)* 102:5947 (1998) for SERS参照）。他の実施形態では、遠心分離に先立ってナノ粒子を密度クッション中に存在させ、微生物が密度クッションを通過するときに微生物と関連付けられるようにする。他の実施形態では、MALDI TOF質量分析、DESI質量分析、GC質量分析、LC質量分析、選択イオンフローチューブ（SIFT）分析等の質量分析法を使用して（再懸濁された、またはペレット中の）微生物を解析することができる。一実施形態では、ペレットを分離容器に入れたまま解析する。容器は容器の光学窓を介して解析することができる。光学窓は容器の底部および/または任意の1つまたは複数の側面および/または上部に配置することができる。一実施形態では、分離容器が分光計内の解析に適した位置にあるホルダーに嵌合する、または分離容器をそのように嵌合させることができる。分光解析は、耐性測定親和性リガンドおよび/または微生物の1つまたは複数の内因的または外因的特性を検出するのに効果的であることが当業者に知られる任意の技法によって実行することができる。例えば、ペレット中の微生物の検出に前面蛍光を使用することができる（励起発光が同じ光学面に入入りする場合、且つ試料が一般に光学的に厚い場合、励起光は非常に短い距離だけ試料に浸透する（例えば、Eisinger, J., and J. Flores, "Front-face fluorometry of liquid samples," *Anal. Biochem.* 94:15 (1983)参照）。本発明の幾つかの観点では、細胞ベースのリガンド結合を測定する目的で、1又は複数の微生物の固有特性を分析することに加えて、固有特性を用いて微生物を同定することができる。一実施形態では、微生物の固有特性を既知の生物の固有特性のデータベースと比較して、微生物を同定することができる。

【0057】

更に他の実施形態では、試験微生物の計測された特性の変化（例えば、固有蛍光特性の変化）を計測し、および/または、代謝又は膜の完全性の測定に用いられる蛍光色素を使用することで、耐性を測定することができる。本実施形態によれば、リガンド又は試薬が試験対象の微生物に対して結合したことに起因して計測可能な特性の変化（例えば、固有蛍光特性の変化）を間接的に計測することで、耐性を測定することができるため、リガンド又は試薬自体が検出可能な信号を発するかまたは検出可能な信号により標識される必要はない。例えば、未結合の抗生物質の結合および/または暴露は、微生物の細胞壁を改変し、変化させ、あるいは劣化させる。微生物を解析して（例えば、本明細書にて述べたように分光分析によって）、細胞壁における変化を間接的に計測して、既知の耐性および/または感受性微生物のデータベースと比較して、微生物の抗生物質耐性状態を測定することができる。あるいは、改変または劣化した細胞壁は、1種又は複数種の蛍光性色素に対

して透過性（或いは、比較的透過性）であるため、1種又は複数種の蛍光性色素を試料に添加して試料を解析して蛍光性色素を検出および/または計測して、微生物の抗生物質耐性状態を間接的に測定することができる（例えば、実施例5参照）。

【0058】

試料照明源すなわち励起源は、当業者に知られる任意の数の適切な光源から選択することができる。電磁スペクトルのうち有用なデータをもたらす任意の部分を使用することができる。紫外、可視および/または近赤外スペクトルならびに電磁スペクトルの他の部分で発光可能な光源であって、当業者に既知の光源を利用することができる。例えば、光源は、紫外光を生成するための重水素もしくはキセノンアークランプおよび/または可視/近赤外励起を生成するためのタングステンハロゲンランプのような連続ランプであってよい。これらの光源は広範な発光範囲を提供し、また当業界で周知の光学干渉フィルタ、プリズムおよび/または光回折格子を使用して特定の励起波長のスペクトル帯域幅を減少させることができる。

【0059】

別法として、発光ダイオードおよび/またはレーザーのような複数の狭帯域光源を空間多重化して多波長励起源を提供することもできる。例えば、190nm～900nm超の発光ダイオードが利用可能であり、ソースのスペクトル帯域幅は20nm～40nm（半値全幅）である。紫外ないし近赤外の離散波長におけるレーザーが利用可能である。レーザーは当業者に周知の多重化方法で採用することができる。

【0060】

任意の光源のスペクトル選択性を、走査モノクロメータのようなスペクトル弁別手段を使用することにより改善することができる。当業者に既知の他の弁別方法を利用することもでき、音響光学チューナブルフィルタ、液晶チューナブルフィルタ、光学干渉フィルタアレイ、プリズム分光器等、およびそれらの任意の組合せを利用することができる。スペクトル弁別器を選択する際は同調性範囲および選択性レベルを考慮に入れる。例示として、例えば弁別器は10nmの選択性を有する300nm～800nmの波長範囲を利用することができる。これらのパラメータは一般に同調性範囲および選択性を達成するのに必要な最適技術を決定する。

【0061】

典型的には、光源によって試料を励起した後、試料の蛍光の放出を所定の時点でまたは連続的に測定する。同様に、励起源と試料の相互作用に由来する反射光を測定して検出および/またはキャラクタリゼーションに関連するデータを提供することができる。

【0062】

試料からの放出は任意の適切なスペクトル弁別手段により測定することができ、いくつかの実施形態では分光計を利用して測定することができる。分光計は、特定の発光波長を検出することによりモノクロメータからの出力を光電子増倍管によって検出する走査モノクロメータとすることができ、且つ/または分光計を撮像分光器として構成することにより、その出力を電荷結合素子（CCD）検出器アレイのような撮像検出器アレイによって検出することができる。一実施形態では、弁別器を用いることにより光検出手段（例えば光電子増倍管、アバランシェフォトダイオード、CCD検出器アレイおよび/または電子増倍電荷結合素子（EMCCD）検出器アレイ）による蛍光および/または散乱シグナルの観察が可能となる。

【0063】

分光技法を使用して、好ましくは励起発光マトリクス（EEM）測定値として提供される測定値を取得する。本明細書で使用するEEMは、励起と発光波長の両方の関数として蛍光物質の発光スペクトル発光強度と定義し、フルスペクトルまたはそのサブセットを含む。この場合のサブセットは単一または複数の励起/発光対を含む可能性がある。また、固定の励起波長を有するEEMの断面を使用して特定の励起波長の発光スペクトルを示し、固定の発光波長を有するEEMの断面を使用して試料の励起スペクトルを示すこともできる。一実施形態では、複数のEEMを2つ以上の特定の励起 発光波長対、例えば少な

くとも2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれ以上の特定の励起 発光波長対で測定する。例えば、1又は複数のEEMを、耐性測定親和性リガンドを検出する波長で取得し、さらに1または複数の追加のEEMを微生物の固有特性を検出する波長で取得する。そのような波長は、レイリー散乱ポイント(260~580nm)、トリプトファン(285/350nm)、コラーゲン(305/315-330nm)、NADH(345/460nm)、およびフラビン(460/520nm)である。

【0064】

本発明の一実施形態によれば、前面蛍光分光法は散乱性および消光性が高い試料の蛍光および/または反射特性を測定する際に利点をもたらすことが分かった。前面法は、その構成は血球および微生物学的培養基の干渉性の構成成分から受ける影響が小さいため、非常に有益な分光法である。当業者に知られるように、容器の光学面は許容可能な結果がもたらされるような角度で照明することができる(例えば、Eisinger, J., and J. Flores, "Front-face fluorometry of liquid samples," Anal. Biochem. 94:15-21 (1983)参照)。一実施形態では、分光システムが拡散反射光を少なくとも1つの固定角度で測定するとともに、放出された蛍光を少なくとも1つの固定角度で測定するようにシステムを設計する。

【0065】

本発明によれば、既知の微生物(抗生物質感受性および/または抗生物質耐性)について対照測定値(control measurement)を取得し、したがって測定したテストデータと該当する微生物のキャラクタリゼーションとの相関付けを当業者に既知の様々な数学的方法を使用して行うことが可能となる。例えば、当業者に既知のソフトウェアシステムを利用して試料からのデータとベースラインすなわち対照測定値とを比較することができる。より詳細には、データの分析をいくつかの多変量分析法、例えば一般判別分析(GDA)、部分最小二乗法判別分析(PLSDA)、部分最小二乗回帰、主成分分析(PCA)、平行因子分析(PARAFAC)、ニューラルネットワーク分析(NNA)および/またはサポートベクターマシン(SVM)によって行うことができる。一実施形態では、比較ステップは、同じ微生物の抗生物質感受性株又は抗生物質耐性株のいずれかに対する耐性測定親和性リガンド結合量又は結合親和性を比較することを含む。他の実施形態では、比較ステップは、同じ微生物の抗生物質感受性株および抗生物質耐性株の両方に対する耐性測定親和性リガンド結合量又は結合親和性を比較することを含む。一実施形態では、同じ微生物の既知の抗生物質感受性株又は抗生物質耐性株に対する結合量または結合親和性は、微生物による結合量として同時に測定することができる。他の実施形態では、既知の抗生物質感受性株又は抗生物質耐性株に対する結合量または結合親和性は、予め測定することができる。予め測定されたデータは、データベース内にある。

【0066】

微生物の抗生物質耐性および任意の1又は複数の固有特性(固有蛍光等)の測定に加えて、本発明の方法は更に、分離および/またはキャラクタリゼーションプロセスに役立つ付加的な同定作用物質(identifier agent)の使用を含むことができる。親和性配位子のような特定の微生物と結合する作用物質を使用することにより、微生物の分離、微生物のクラスまたは種の同定(例えばユニークな表面タンパク質または受容体との結合を利用)、および/または微生物の特徴の同定を行うことができる。有用な同定作用物質または親和性リガンドとしては、それらに限らないが、単クローンおよび多クローン抗体ならびにそれらの断片(例えば*S. aureus*同定のためのanti-Eap)、核酸プローブ、アプタマー、ペプチド模倣体、ファージ由来の結合タンパク質、レクチン、宿主防御ペプチド(例えばデフェンシン、カテリシジン、プロテオグリン(proteogrin)、マガイニン)、バクテロシン(bacterocin)(例えばランチビオティクス(例えばナイシン、メルサジジン、エピデルミン、ガリデルミンおよびプランタリシンCおよびクラスIIペプチド)、バクテリオファージ、および核酸、脂質、炭水化物、多糖類もしくはタンパク質、またはそれらの任意の組合せに対して選択的な色素が挙げられる。作用物質自体が検出可能なシグナルを示さない場合は、作用物質をマーカーと共役させる(例えば可視状態にす

るまたは蛍光性をもたせる) こと等により、作用物質を標識して検出可能なシグナルが提供されるようにすることができる。マーカーとしては、それらに限らないが、蛍光性化合物、発光性化合物、燐光性化合物、放射性化合物、ラマン活性、質量分光分析反応性、および/または比色化合物が挙げられる。作用物質は、本発明の方法の任意のステップ、例えば試料の接触ステップ中、分離ステップ中、および/または検出ステップ中に採取するときに微生物に添加することができる。いくつかの実施形態では、ペレット中の作用物質の存在をペレットの解析中に判定することができる。他の有用な同定作用物質としては、微生物酵素の基質、キレート剤、感光剤、消光剤、還元剤、酸化剤、緩衝液、酸、基剤、溶媒、固定剤、洗浄剤、界面活性剤、消毒薬(例えばアルコール、漂白剤、過酸化水素)、毒性化合物(例えばアジ化ナトリウム、シアン化カリウム)、シクロヘキサミドのような代謝阻害剤等が挙げられる。同様に、微生物細胞生存度、代謝および/または膜電位の測定のための多くの蛍光性化合物を本発明の同定作用物質として使用することができる。当業者には容易に理解されるように、それ自体の物理的状态または代謝に影響を及ぼす抗生物質のような任意の化合物に対する特定の微生物の感受性は、その化合物を試料、溶解緩衝液、密度クッションまたはそれらの任意の混合物に加えることにより迅速に確認することができる。

【0067】

本発明の一態様において、本方法は更に微生物/耐性測定親和性リガンド複合体ペレットを回収し付加的な試験を実行するステップを含むことができる。一実施形態では、ペレットを試料培地および/または結合混合物又は配合物および密度クッションから吸い出すことによって回収することができる。別の実施形態では、注射器を容器に挿入し、試料培地および/または結合混合物又は配合物および密度クッションをそのままの状態に保持したままペレットを吸い出すことにより、ペレットを回収することができる。その後、回収したペレットを適切な培地、例えば食塩水中に再懸濁させることができる。再懸濁の際は、微生物を更に当業者に知られる上述の所望の試験にかけることができる。特に、清浄な微生物試料を必要とする任意の試験を再懸濁させた微生物に対して実行することができる。いくつかの実施形態では、付加的な同定試験を実行することができる。同定試験の例としては、Vitek 2、増殖および非増殖核酸試験(nucleic acid test: NAT)、色素産生およびラテックス接着アッセイ、イムノアッセイ(例えば標識した抗体および/または他のリガンドを利用)、質量分析(例えばMALDI TOF質量分析)および/または赤外分光法(FTIR)やラマン分光法のような他の光学的技法が挙げられる。薬剤に対する耐性のような付加的なキャラクタリゼーション試験も実行することができる。付加的なキャラクタリゼーションは、本方法の最初の分離およびキャラクタリゼーションステップ中に開始した試験の一部とすることもできる。

【0068】

本発明の一態様では、方法ステップの一部または全部を自動化することができる。本明細書で使用する用語「自動化」とは、コンピュータによる制御を意味する。一実施形態では、種々の蛍光発光検出および関連ステップを自動化し、本方法によって得られた情報を自動的にデータベースの構築に用いる。別の実施形態では、本方法における他のステップ、例えば、接触、分離、および/または検出ステップについても、自動化することができる。方法ステップを自動化することによってより多くの試料をより迅速に試験することが可能となるだけでなく、さらに、有害性および/または感染性のある微生物を含む恐れがある試料を取り扱う際の人為的ミスリスクを低減することもできる。

【0069】

本発明の更なる態様は、微生物の抗生物質耐性状態を測定するシステムであって、該システムは、

(a) 前記微生物または、前記微生物および耐性測定親和性リガンドを含む試料を含む容器と、

(b) 密度クッションと、および、

(c) 測定を行うための分光器と、を備え、

前記システム内におけるインサイチュ分離により前記容器内で濃縮された前記微生物の抗生物質耐性状態が、前記測定によって決定されることを特徴とするシステムに関するものである。他の実施形態では、システムは未結合の耐性測定親和性リガンドから微生物を分離するための遠心分離機を備える。

【0070】

下記の実施例では本発明について更に詳細に説明するが、下記の実施例は例示的なものであり本発明を決して限定するものではない。利用した技法は当業者に周知の標準的な技法、または以下において具体的に説明する技法である。

【実施例】

【0071】

[実施例1]

BOCILLIN (商標) - FLをMRSA株およびMSSA株に対して結合
2つの実験的手法を用いて、BOCILLIN (商標) - FL (Molecular Probes, Invitrogen)のS. aureusに対する結合を試験した。2つの実験的手法とは、(1)細胞を水酸化ナトリウム(NaOH)で処理して、中性化し、BOCILLIN (商標) - FLを加え、そして細胞を分離する手法(荒い前処理)と、(2)BOCILLIN (商標) - FLで細胞を培養して、細胞を分離する手法(代謝的標識)である。

【0072】

第1の手法において、S. aureus株の、ATCC 25923 (Methicillin感受性: MSSA)およびD14906 (Methicillin耐性: MRSA)を、トリプチックソイブロス(TSB)中で対数増殖期(6時間)まで培養した。各試料の懸濁液(TSB中0.9ml)および0.1N NaOH(0.1ml、±20µl 7.5% TRITON (登録商標) X100-R)を5秒間ボルテックスし、1MのKH₂PO₄(0.125ml)を加えて即座または1分後のいずれかに中性化し、5秒間ボルテックスした。BOCILLIN (商標) - FL(1.0 mg/ml、15µl)を加えて懸濁し、ボルテックスし、室温で5分間培養した。0.2mlの油混合物(タイプDF顕微鏡液浸油1.0部+Drakeol 5鉱物油0.875部)上で10,000 rpmで1分間遠心分離にかけて、未結合のBOCILLIN (商標) - FLを培養基から微生物を分離した。上澄みおよび油の層を除去し、ペレットをpH 7.4の3.0ml PBSに再懸濁した。試料をFluoroLog-3システムで、励起波長490nmで走査し、510nmの蛍光発光を記録した。

【0073】

表1に結果を示す。細胞をpH 12で5秒間処理した場合、MSSA細胞に対するBOCILLIN (商標) - FLの結合の方が、MRSA細胞に対する結合よりも多かった(条件a=2.3倍)。Triton X=100を反応混合物に含ませても、何らの利益が無かった。pH 12で60秒間処理して、細胞の処理時間を延長しても、何らの利益も得られず、むしろ細胞を損失した。

【0074】

【表1】

条件	MSSA (25923)	MRSA (D14906)	MSSA/MRSA 割合
A=5分、pH12	3.7×10 ⁶	1.6×10 ⁶	2.3
b=60分、pH12	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶	1.1
c=5分、pH12+TX100	0.9×10 ⁶	0.6×10 ⁶	1.5
d=60分、pH12+TX100	0.8×10 ⁶	0.4×10 ⁶	2.0

【0075】

第2の手法において、2種類の細菌懸濁液(13ml)をBOCILLIN (商標) -

FL (1.0 mg/ml ストック溶液、175 μ l) と混合した。混合物を 0.2 ml 油混合物入りのマイクロチューブに 1.0 ml 試料に等分した。チューブを 37 度で種々の時間で培養した (T_0 時間時点で 1 セットのチューブを氷に取った)。1 セットのチューブを 30 分で取り出し、PBS で 2 度洗浄して、未結合の BOCILLIN (商標) - FL から細胞を分離した。1 セットのチューブは、30、52、68、および 86 分で取り出し、油混合物を用いた遠心分離によって、未結合の BOCILLIN (商標) - FL から細胞を分離した。細胞を回収して、3 ml PBS に再懸濁した。試料を Fluorolog - 3 システムで、励起波長 490 nm で走査し、510 nm の蛍光発光を記録した。

【0076】

結果を、表 2 (生データ) および図 1 (正規化データ) に示す。BOCILLIN (商標) - FL 信号を微生物性のトリプトファン信号に対して正規化して (図 1)、細胞ベースで推定した場合、MRSA 株は、MSSA 株の 2 ~ 7 倍少ない、または 3 ~ 4 倍少ない BOCILLIN (商標) - FL を結合させた。MRSA および MSSA の間の大きな差異は、37 度で約 60 分間培養した後に生じた。油ベースの分離方法において (時間 T_0 での) 背景信号が高かったにも関わらず、油混合物を用いた細菌の遠心分離によって、PBS で 2 度洗浄した場合よりも、より高レベルの BOCILLIN (商標) - FL 結合が得られた。

【0077】

【表 2】

アッセイ条件	分離方法	MSSA (25923)	MRSA (D14906)	MSSA/MRSA 割合
T_0 (氷)	油	2,745,600	1,163,240	2.36
37 度で 30 分	洗浄 \times 2 (PBS)	410,830	206,250	2.00
37 度で 30 分	油	1,831,790	326,790	5.60
37 度で 52 分	油	1,941,930	363,000	5.35
37 度で 68 分	油	2,481,450	346,270	7.17
37 度で 86 分	油	2,285,980	510,150	4.48

【0078】

[実施例 2]

経時変化実験

S. aureus 株の、ATCC 25923 (MSSA) および D14906 (MRSA) の試料を Bact/ALERT SA 培養基内で 37 度で対数増殖期に達するまで (8 ~ 10 時間) 培養した。各培養物の OD 660 nm を測定し、SA 培養基で両懸濁液を 0.50 に調節した。BOCILLIN (商標) - FL を予め暖めた SA 培養基に希釈し、0.2 μ m フィルターでろ過し、37 度に維持した。細菌試料 (9.0 ml) を 1.0 ml の 100 μ M BOCILLIN (商標) - FL と混合し、実施例 1 にて用いたものと同様の 0.2 ml 油混合物入りのマイクロチューブに 1.0 ml ずつ 10 等分した。 T_0 チューブを除いた全てのチューブを 37 度においた。6、11、16、22、45、60、75、および 91 分の時点でチューブを取り出し、処理を行った。各チューブを 1 分間遠心分離し、上澄みを吸引し、さらに、ペレットを 0.1 ml PBS に再懸濁し、そしてアクリルキュベット内の 3.0 ml PBS に添加した。試料を Fluorolog - 3 システムで、励起波長 490 nm で走査し、510 nm の蛍光発光を記録した。

【0079】

油を用いた方法によって評価したように、BOCILLIN (商標) - FL の S. aureus 株に対する結合が迅速に生じた (図 2)。二次多項式近似を用いてデータをプロットした。最大の結合は、わずか 5 分後 (すなわち、 T_0 チューブ) に測定された。そのような BOCILLIN (商標) - FL の濃度では、培養時間に関らず、MSSA 株は M

R S A株よりも細胞ベースで約2～3倍のBOCILLIN(商標)-FLに結合した。

【0080】

[実施例3]

BOCILLIN(商標)-FLの滴定

S.aureus株の、ATCC25923(MSSA)およびD14906(MRSA)の試料をBact/ALERT SA培養基内で37度で6時間、約0.35でOD660nmに達するまで培養した。BOCILLIN(商標)-FL(0.1ml)の希釈液をSA培養基内で調製し、培養チューブに入れた。細菌懸濁液(0.9)の試料をチューブに加えて混合した。チューブにキャップをして、37度のインキュベーターに60分間入れた。試料(1.0ml)を、実施例1にて用いたものと同様の0.2ml油混合物入りのマイクロチューブに移して、1分間遠心分離にかけて、吸引し、ペレットを0.1mlPBSに再懸濁し、さらに、アクリルキュベット内の3.0mlのpH7.4PBSに加えた。試料をFluoroLog-3システムで、励起波長490nmで走査し、510nmの蛍光発光を記録した。

【0081】

BOCILLIN(商標)-FL濃度に依存して、細胞ベースで推定した場合、MSSA株は、MRSA株の2～4倍多いBOCILLIN(商標)-FLを結合させた(図3)。

二次多項式近似を用いてデータをプロットした。MSSA結合曲線は2相性であった。初期の飽和曲線は0.5から約10μMまでであり、結合が増加することに伴い第2相が続く。約5μMBOCILLIN(商標)-FLでは、MSSA株とMRSA株の間には3倍の差があった。約0.5μMBOCILLIN(商標)-FLではMSSA株とMRSA株の間には4倍の差があった。

【0082】

[実施例4]

MRSA株およびMSSA株のパネルの評価

20の異なるS.aureus株(MRSAが10株、MSSAが10株、セフォキシチンディスクおよびVitek-2で確認済)を増殖させた。24時間プレートから培養物を1白金耳量(1μL)取り出し、Bact/ALERT SA培養基(ガラス製スクリーキャップチューブ内に8ml)に懸濁した。チューブをよくボルテックスして、36度で6時間培養した。各懸濁物のODを660nmで測定し、ほぼ同じ密度(0.50～0.75OD、ただし試料12166は0.28)となるように調節した。50μMBOCILLIN(商標)-FL(0.1ml)を、ラベルをつけた20本のマイクロチューブにそれぞれ入れた。各株の試料(0.9ml)を各チューブに加え、37度で30分培養した。そして、反応混合物を取り出し、0.2mlの油混合物(タイプDF顕微鏡液浸油1.000部+Drakeoil5鉱物油0.875部)を含む第2のチューブセットに加えた。A-8-11ローター(Eppendorf5417R)内でチューブを10,000rpmで2分間遠心分離にかけた。吸引機で上澄みおよび油の大部分を吸引した。残りの油をGilsonP200チップを用いて除去し、ペレットを100μlPBSも再懸濁した。PBSを3ml含むアクリルキュベットに細胞を移し、FluoroLog-3システムにおいて表3に示すFluoroScan「Bocillin」ポイントを用いて読み取った。さらに、(同じ24時間プレート由来の)20個の単離株のそれぞれについてVitekASTカードを実施した。

【0083】

【表3】

レイリーポイント	260-580
トリプトファンピーク	285/350
MRSA/MRSE	305/315-330
コラーゲン	320/405
NADH	345/460
フラビン	460/520
BOCILLIN (商標) -FL	490/510

【0084】

BOCILLIN (商標) - FL 信号 (Ex 490 __ Em 510) をトリプトファン信号 (Ex 285 __ Em 350) に対して正規化した場合に最良の結果が得られた。15のベンジル - ペニシリン耐性株と比較して、5のベンジル - ペニシリン感受性株が2倍超の量のBOCILLIN (商標) - FLを結合した (図4)。この結果は、分析が特異的であり、Vitek MIC (最小発育阻止濃度) と相関があることを証明した。10のオキサシリン感受性 (MSSA) 株のうちの5つは、MRSA 感受性50%および特異性100%で、比較的高レベルでBOCILLIN (商標) - FLと結合した。これら5株は、Vitek カードによってベンジル - ペニシリン耐性およびオキサシリン感受性として分類され、5株中の3株はオキサシリンのMICが0.5であった。

【0085】

上記の説明は本発明を例示するものであり、本発明を限定するものと解釈すべきではない。本発明は添付の特許請求の範囲で定義されるものであり、各請求項には均等物も含まれる。本明細書に列挙した刊行物、特許出願、特許、特許文献および他の参考文献はすべて、参照する文および/または段落の教示内容全体が本明細書に援用されるものとする。

【0086】

[実施例5]

固有蛍光および/または膜の完全性の変化を通じた微生物の耐性状態の間接的な測定
本実験のために、4株のE. faeciumを選択した。2株 (No. 12406、No. 13185) は、VITEK 2によるバンコマイシンMIC'sが $> 32 \mu\text{g}/\text{mL}$ であるVREであり、2株 (No. 14054、No. 12480) はVITEK 2によるバンコマイシンMIC'sが $> 0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ であるVSEである。

【0087】

各試験株について、24~48時間プレート由来のコロニーを1 μL 白金耳量を10~12mLのBact/ALERT SA培養基に懸濁し、37度で4~9時間培養した。それぞれの対数期の試料は、0、0.25、2.5、および12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のバンコマイシン-HClを1:5000希釈のSytox Greenストック液と組み合わせ、37度で4時間培養される。Sytox Greenは生存可能な細胞不透過性DNA 株 (Molecular Probes、cat No. S7020) である。直後 (T₀)、1時間後、2.5時間後、4時間後に培養物を等分量を取り出して分析した。

【0088】

適切な時点で、0.5培養物 (0.5mL) の0.5mL等分量を、2009年10月30日出願の、関連米国特許出願第12/589,969号「Separation Device for Use in the Separation, Characterization and/or Identification of Microorganisms」に記載されているような、特注の光学的遠心分離チューブ内の密度クッション (pH 7.4のCsCl 24% w/v + Hepes 10mM、およびPluronic F-108 0.005%からなる) 上に重ねた。チューブを密閉して10,000rpmで2分間遠心分離して、無傷微生物を培養基および未結合の薬剤から分離した。そして、チューブを基台に光ファイバプローブが組み込まれている特注のチューブホルダに直接移した。プ

ローブはFluoroLog-3分光蛍光光度計に接続されていた。チューブをUV透過性基台を通じて解析して、核酸反射率測定値を収集した。

【0089】

微生物のNADH蛍光(Ex340nm/Em440nm)の結果を表4に示す。2つのVSE株に対して抑制性であったバンコマイシンレベル(2.5および12.5 μ g/mL)において、細胞のNADHレベルは、時間を経るにつれて次第に減少した。対照的に、同じバンコマイシンレベルで処理した2種類のVRE株におけるNADHレベルは約1時間培養した後に上昇し、培養時間4時間を過ぎても継続的に上昇した。1つのVRE株(No.12406)は、NADH生成において比較的長く遅延したが、この遅延はこの期間におけるSytox Greenの流入に相関するものであった。

【0090】

表4：バンコマイシン感受性株およびバンコマイシン耐性株における微生物性のNAD Aの経時変化

【表4】

株No.	バンコマイシン (μ g/mL)	0時間	1時間	2.5時間	4時間
12406 (VRE)	0	176,514	514,368	690,324	588,224
12406 (VRE)	0.25	207,307	616,448	703,451	598,853
12406 (VRE)	2.5	440,416	253,323	573,926	931,786
12406 (VRE)	12.5	172,372	207,520	279,170	765,401
14054 (VSE)	0	385,933	323,090	710,289	479,486
14054 (VSE)	0.25	449,599	298,998	733,656	534,989
14054 (VSE)	2.5	290,986	195,152	349,287	96,954
14054 (VSE)	12.5	248,332	188,273	128,491	109,080
13185 (VRE)	0	345,051	516,677	564,287	624,663
13185 (VRE)	0.25	316,618	708,442	496,545	627,392
13185 (VRE)	2.5	256,533	237,463	965,305	782,908
13185 (VRE)	12.5	234,554	226,769	775,629	710,100
12480 (VSE)	0	201,074	487,559	477,522	500,649
12480 (VSE)	0.25	184,649	271,470	500,618	483,445
12480 (VSE)	2.5	221,692	254,828	149,686	100,931
12480 (VSE)	12.5	178,982	210,963	171,994	127,042

【0091】

微生物のトリプトファン蛍光(Ex300nm/Em360nm)の結果を表5に示す。2つのVSE株に対して抑制性であったバンコマイシンレベル(2.5および12.5 μ g/mL)において、細胞のトリプトファンレベルは、時間が経過しても一定に維持された。対照的に、同じバンコマイシンレベルで処理した2種類のVRE株におけるトリプトファンレベルは約1時間培養した後に上昇した。

【 0 0 9 2 】

表 5 : パンコマイシン感受性株およびパンコマイシン耐性株における微生物性のトリプトファンの経時変化

【表 5】

株No.	パンコマイシン ($\mu\text{g/mL}$)	0時間	1時間	2.5時間	4時間
12406 (VRE)	0	451,075	661,339	761,500	869,806
12406 (VRE)	0.25	463,942	666,793	679,880	800,658
12406 (VRE)	2.5	425,860	560,948	656,768	651,886
12406 (VRE)	12.5	463,985	433,269	560,607	738,461
14054 (VSE)	0	395,244	583,435	673,219	826,840
14054 (VSE)	0.25	387,455	601,874	670,217	808,566
14054 (VSE)	2.5	369,386	431,754	437,349	428,796
14054 (VSE)	12.5	384,046	421,876	387,066	403,029
13185 (VRE)	0	535,014	565,301	852,060	923,848
13185 (VRE)	0.25	546,862	557,453	809,317	880,899
13185 (VRE)	2.5	531,239	569,043	489,661	868,768
13185 (VRE)	12.5	537,160	579,537	537,067	782,106
12480 (VSE)	0	405,128	497,676	662,021	745,217
12480 (VSE)	0.25	425,539	460,266	678,352	706,797
12480 (VSE)	2.5	361,962	438,541	466,525	416,780
12480 (VSE)	12.5	389,264	428,402	455,446	438,978

【 0 0 9 3 】

Sytox Green (Ex 510 nm / Em 530 nm) の結果を表 6 に示し、生存細胞のバイオマスを補償するために NADH 蛍光に対する Sytox Green 蛍光の比率として示した。このデータは、2つの VRE 株のうちの 1つ (No. 12406) が培養初期の 2 時間にわたってパンコマイシンの影響を受け、そして回復し始めるということを示している。この知見によって、この株は数時間パンコマイシンと共培養させることで、耐性表現型がこの個体群内で優位となることが示された。この挙動は、この株が本方法によって検出可能な誘導性の耐性を保持しているであろうことを示唆している。

【 0 0 9 4 】

この実験により、抗生物質と共培養した微生物の固有蛍光の変化を測定することで、微生物が抗生物質に対して耐性であるか否かを迅速に決定することができることが示された。さらに、蛍光色素を添加して試験対象の微生物個体群における細胞膜の完全性をモニタリングすることで、微生物個体群の生存能力および耐性誘導性に関する有益な情報が得られることが示された。

【 0 0 9 4 】

表 6 : パンコマイシン感受性株およびパンコマイシン耐性株に対する Sytox Gr

e e n の流入の経時変化

【表 6】

株No.	バンコマイシン ($\mu\text{g/mL}$)	0時間	1時間	2.5時間	4時間
12406 (VRE)	0	0.4	0.7	0.4	0.5
12406 (VRE)	0.25	0.3	0.6	0.4	0.5
12406 (VRE)	2.5	0.2	17.7	4.5	1.2
12406 (VRE)	12.5	0.4	19.8	14.6	1.9
14054 (VSE)	0	0.6	1.2	0.6	1.0
14054 (VSE)	0.25	0.4	1.4	0.6	0.8
14054 (VSE)	2.5	0.7	30.1	17.6	43.4
14054 (VSE)	12.5	0.9	14.1	39.1	35.4
13185 (VRE)	0	0.2	0.4	0.3	0.3
13185 (VRE)	0.25	0.3	0.3	0.3	0.2
13185 (VRE)	2.5	0.3	1.8	0.4	0.3
13185 (VRE)	12.5	0.4	1.4	0.5	0.3
12480 (VSE)	0	0.2	0.5	0.7	0.5
12480 (VSE)	0.25	0.3	1.0	0.6	0.6
12480 (VSE)	2.5	0.2	6.7	20.9	20.8
12480 (VSE)	12.5	0.2	1.5	7.8	8.7

【手続補正 2】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

微生物の抗生物質耐性状態を測定するための方法であって、

(a) 前記微生物と耐性測定親和性リガンドとを、微生物/耐性測定親和性リガンド複合体が形成可能な条件下で接触させるステップと、

(b) 前記ステップ(a)にて形成された前記微生物/耐性測定親和性リガンド複合体を、未結合の耐性測定親和性リガンドから分離するステップと、

(c) 前記微生物/耐性測定親和性リガンド複体内の、前記微生物に対する前記耐性測定親和性リガンドの結合量を測定するステップと、および、

(d) 前記微生物/耐性測定親和性リガンド複体内の、前記微生物に対する前記耐性測定親和性リガンドの結合量を、同じ微生物の既知の抗生物質感受性株もしくは抗生物質耐性株、または既知の抗生物質感受性株もしくは抗生物質耐性株の個体群による耐性測定親和性リガンドの結合量に対して比較するステップと、を含み、

前記微生物 / 耐性測定親和性リガンド複合体内の前記微生物が、抗生物質感受性微生物によって結合される量とは異なる量の耐性測定親和性リガンドに結合する場合、または、前記微生物 / 耐性測定親和性リガンド複合体内の前記微生物が、抗生物質耐性微生物によって結合される量と同量の耐性測定親和性リガンドに結合する場合には、前記微生物を抗生物質耐性として同定することを特徴とする、方法。

【請求項 2】

前記ステップ (a) ~ (d) の 1 つまたは複数は、密閉容器内で実施されることを特徴とする、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

前記耐性測定親和性リガンドは、抗生物質、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、又はこれらの抗体断片、核酸プローブ、酵素基質、アプタマー、ペプチド模倣物、ファージ由来の結合タンパク質、レクチン、宿主防御ペプチド、バクテロシン、バクテリオファージ、ならびに、核酸、脂質、炭水化物、多糖類、タンパク質、およびこれらの組み合わせに対して選択的な色素を含む群から選択されることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記耐性測定親和性リガンドは抗生物質であることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記耐性測定親和性リガンドは、β-ラクタム抗生物質またはグリコペプチド抗生物質であることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記耐性測定親和性リガンドは、検出可能な標識を有することを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記検出可能な標識は、蛍光性、発光性、りん光性、放射性、ラマン活性、質量分光分析反応性、および / または、比色分析化合物標識を含むことを特徴とする、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記微生物は、臨床試料または非臨床試料であることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記試料は、陽性血液培養物由来であることを特徴とする、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

分離する前記ステップ (b) の前に、前記微生物を含む前記試料を、前記試料内に存在しうるあらゆる非微生物細胞を選択的に溶解するように処理することを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

前記微生物を容器内の密度クッション上に積層し、前記容器の遠心分離によって分離する前記ステップ (b) を実施することを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

前記密度クッションは、顕微鏡の液浸油、鉱物油、シリコン油、フルオロシリコン油、シリコンゲル、コロイドシリカ、ヨウ化造影剤、スクロース、メトリゾエート F i c o l l (登録商標)、ジアトリゾエート デキストラン、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリエチレンオキシド (高分子量)、P l u r o n i c (登録商標) F 1 2 7、P l u r o n i c (登録商標) F 6 8、ポリアクリル酸、架橋したポリビニルアルコール、架橋したポリビニルピロリジン、PEGメチルエテルメタクリレート、ペクチン、アガロース、キサンタン、ジェラン、P h y t a g e l (登録商標)、ソルビトール、F i c o l l (登録商標)、グリセロール、デキストラン、グリコーゲン、塩化セシウム、パーフルオロカーボン液および / またはハイドロフルオ

ロカーボン液、これらの任意の組み合わせ、のうちの1つまたは複数を含むことを特徴とする、請求項11に記載の方法。

【請求項13】

前記密度クッションは約1.025～約1.120 g/mlの密度を有することを特徴とする、請求項11に記載の方法。

【請求項14】

前記容器は、底部、上部および/または側面に光学窓を備え、該光学窓は、少なくとも近赤外光、紫外光、および/または可視光スペクトルの少なくとも一部について透過性であることを特徴とする、請求項11に記載の方法。

【請求項15】

測定する前記ステップ(c)は、分光法を含むことを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項16】

前記分光法は、蛍光分光法、拡散反射分光法、透過吸収分光法、赤外分光法、テラヘルツ分光法、ラマン分光法、表面増強ラマン分光法、空間オフセットラマン分光法、共鳴ラマン分光法、およびこれらのあらゆる組み合わせを含む群から選択されることを特徴とする、請求項15に記載の方法。

【請求項17】

前記分光法は、全面蛍光分光法であることを特徴とする、請求項15に記載の方法。

【請求項18】

前記分光法は、励起発光マトリクス(ELM)を測定するステップを含むことを特徴とする、請求項15に記載の方法。

【請求項19】

前記ELMは、少なくとも2つの異なる波長を含むことを特徴とする、請求項18に記載の方法。

【請求項20】

前記ELMは、既知の微生物のELMのデータベースと比較されることを特徴とする、請求項18に記載の方法。

【請求項21】

前記微生物の結合量を微生物の固有特性と比較して、前記耐性測定親和性リガンド結合量を細胞ベースで測定することを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項22】

前記固有特性は固有蛍光であることを特徴とする、請求項21に記載の方法。

【請求項23】

前記ステップ(c)は、回収した微生物を得るために微生物を回収するステップを含むことを特徴とする、請求項11に記載の方法。

【請求項24】

前記ステップ(d)は同じ微生物の抗生物質感受性株および抗生物質耐性株の両方による、耐性測定親和性リガンド結合量と耐性測定親和性リガンド結合量とを比較するステップを含むことを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項25】

同一微生物の既知の抗生物質感受性株または抗生物質耐性株による結合量は、事前に測定されていることを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項26】

少なくとも一部が自動化されていることを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項27】

微生物の抗生物質耐性状態を測定するための方法であって、

(a) 前記微生物と耐性測定親和性リガンドとを、微生物/耐性測定親和性リガンド複合体が形成可能な条件下で接触させるステップと、

(b) 前記ステップ(a)にて形成された前記微生物/耐性測定親和性リガンド複合体

を、未結合の耐性測定親和性リガンドから分離するステップと、

(c) 前記微生物/耐性測定親和性リガンド複合体内の、前記微生物に対する前記耐性測定親和性リガンドの結合親和性を測定するステップと、および、

(d) 前記微生物/耐性測定親和性リガンド複合体内の、前記微生物に対する前記耐性測定親和性リガンドの前記結合親和性を、同じ微生物の既知の抗生物質感受性株もしくは抗生物質耐性株、または既知の抗生物質感受性株もしくは抗生物質耐性株の個体群による耐性測定親和性リガンドの結合親和性に対して比較するステップと、を含み、

前記微生物/耐性測定親和性リガンド複合体内の前記微生物が、抗生物質感受性微生物による結合親和性とは異なる、耐性測定親和性リガンドの結合親和性を示す場合、または、

前記微生物/耐性測定親和性リガンド複合体内の前記微生物が、抗生物質耐性微生物による結合親和性と同じ、耐性測定親和性リガンドの結合親和性を示す場合には、前記微生物を抗生物質耐性として同定することを特徴とする、方法。

【請求項 28】

微生物の抗生物質耐性状態を測定するための方法であって、

(a) 微生物を含むことが既知であるまたは微生物を含む可能性がある試験試料を採取するステップと、

(b) 前記試験試料内の前記微生物と耐性測定親和性リガンドとを、微生物/耐性測定親和性リガンド複合体が形成可能な条件下で接触させるステップと、

(c) 細胞の代謝または膜の完全性を測定する 1 種又は複数種の蛍光色素を任意で添加するステップと、

(d) 前記試料内に存在する可能性のある非微生物細胞を選択的に溶解させて、任意で溶解試料を生成するステップと、

(e) 前記試験試料の他の構成成分、または任意には前記溶解試料から前記微生物を分離して、微生物ペレットを形成するステップと、

(f) 前記ペレットを解析して前記微生物の測定値を得るステップと、

(g) 前記測定値を、同じ種の微生物の抗生物質耐性および/または抗生物質感受性微生物について得られた測定値またはその予測値と比較して、前記試験試料内の前記微生物の抗生物質耐性状態を測定するステップと、を含む方法。

【請求項 29】

1 種または複数種の蛍光色素を前記ステップ(c)で添加することを特徴とする、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

前記ステップ(g)における前記抗生物質耐性測定は、誘導性の耐性の測定であることを特徴とする、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 31】

前記解析ステップ(f)は、分光法による解析を含むことを特徴とする、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 32】

前記分光法は、蛍光分光法、拡散反射分光法、透過吸収分光法、赤外分光法、テラヘルツ分光法、ラマン分光法、表面増強ラマン分光法、空間オフセットラマン分光法、共鳴ラマン分光法、およびこれらのあらゆる組み合わせを含む群から選択されることを特徴とする、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 33】

前記微生物を容器内の密度クッション上に積層し、前記容器の遠心分離によって分離する前記ステップ(b)を実施することを特徴とする、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 34】

微生物の抗生物質耐性状態を測定するシステムであって、該システムは、

(a) 前記微生物または、前記微生物および耐性測定親和性リガンドを含む試料を含む

容器と、

(b) 密度クッションと、および、

(c) 測定を行うための分光器と、を備え、

前記システム内におけるインサイチュ分離により前記容器内で濃縮された前記微生物の抗生物質耐性状態が、前記測定によって決定されることを特徴とする、システム。

【請求項 35】

更に、遠心分離機を備えることを特徴とする、請求項 34 に記載のシステム。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2010/033879

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/569 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, EMBASE, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ZHAO GENSHI ET AL: "BOCILLIN FL, a sensitive and commercially available reagent for detection of penicillin-binding proteins" ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, vol. 43, no. 5, May 1999 (1999-05), pages 1124-1128, XP002587010 ISSN: 0066-4804	1,3-8, 10, 15-17, 21,24
A	the whole document	2,9, 11-14, 18-20, 22,23, 25-35
----- -/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents:		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
15 June 2010	05/07/2010	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Hinchliffe, Philippe	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2010/033879

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JARZEMBOWSKI T ET AL: "Flow Cytometry as a Rapid Test for Detection of Penicillin Resistance Directly in Bacterial Cells in Enterococcus faecalis and Staphylococcus aureus" CURRENT MICROBIOLOGY, SPRINGER-VERLAG, NE, vol. 57, no. 2, 24 June 2008 (2008-06-24), pages 167-169, XP019625684 ISSN: 1432-0991	1, 3-8, 10, 15-17, 21, 24
A	* abstract	2, 9, 11-14, 18-20, 22, 23, 25-35
X	JARZEMBOWSKI TOMASZ ET AL: "Heterogeneity of methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains (MRSA) characterized by flow cytometry." CURRENT MICROBIOLOGY JUL 2009 LNKD-PUBMED:19330377, vol. 59, no. 1, 28 March 2009 (2009-03-28), pages 78-80, XP002587011 ISSN: 1432-0991	1, 3-8, 10, 15-17, 21, 24
A	see materials and methods section	2, 9, 11-14, 18-20, 22, 23, 25-35
A	RUSSELL J B ET AL: "CONCENTRATION OF AMMONIA ACROSS CELL MEMBRANES OF MIXED RUMEN BACTERIA" JOURNAL OF DAIRY SCIENCE, vol. 70, no. 5, 1987, pages 970-976, XP002587012 ISSN: 0022-0302 page 971; line 8 - column 2; line 34	11, 12, 34, 35
A	EISINGER J ET AL: "Front-face fluorometry of liquid samples" ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, ACADEMIC PRESS INC, NEW YORK LNKD- DOI:10.1016/0003-2697(79)90783-8, vol. 94, no. 1, 1 April 1979 (1979-04-01), pages 15-21, XP024819186 ISSN: 0003-2697 [retrieved on 1979-04-01] cited in the application * abstract	17

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 21/65	(2006.01)	G 0 1 N 21/65	
G 0 1 N 21/01	(2006.01)	G 0 1 N 21/01	B
G 0 1 N 21/27	(2006.01)	G 0 1 N 21/27	Z
G 0 1 N 21/35	(2006.01)	G 0 1 N 21/35	Z

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 ジョーンズ ハイマン

アメリカ合衆国 ノースカロライナ州 27587 ウェイク フォーレスト ダンモア コート
2501

Fターム(参考) 2G043 AA03 DA02 EA01 EA02 EA03 EA06 EA13 FA07 KA02 KA03
2G059 AA05 BB12 BB13 BB14 DD03 DD13 EE01 EE03 EE07 EE12
FF08 HH01 HH02 HH03 JJ01
4B063 QA01 QQ06 QR56 QS36 QX02

专利名称(译)	抗生物质耐性测定方法		
公开(公告)号	JP2012525850A	公开(公告)日	2012-10-25
申请号	JP2012509974	申请日	2010-05-06
[标]申请(专利权)人(译)	生物梅里埃公司		
申请(专利权)人(译)	生物梅里埃公司		
[标]发明人	ジョンウォルシュ ジョーンズハイマン		
发明人	ジョン ウォルシュ ジョーンズ ハイマン		
IPC分类号	C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/536 G01N33/569 G01N21/64 G01N21/65 G01N21/01 G01N21/27 G01N21/35		
FI分类号	C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/536.D G01N33/569.B G01N21/64.F G01N21/65 G01N21/01.B G01N21/27.Z G01N21/35.Z		
F-TERM分类号	2G043/AA03 2G043/DA02 2G043/EA01 2G043/EA02 2G043/EA03 2G043/EA06 2G043/EA13 2G043/FA07 2G043/KA02 2G043/KA03 2G059/AA05 2G059/BB12 2G059/BB13 2G059/BB14 2G059/DD03 2G059/DD13 2G059/EE01 2G059/EE03 2G059/EE07 2G059/EE12 2G059/FF08 2G059/HH01 2G059/HH02 2G059/HH03 2G059/JJ01 4B063/QA01 4B063/QQ06 4B063/QR56 4B063/QS36 4B063/QX02		
代理人(译)	杉村健二		
优先权	61/215594 2009-05-07 US		
其他公开文献	JP2012525850A5 JP5816164B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及测量微生物抗生素抗性状态的方法和系统。此外，本发明提供了用于在单一系统中原位测量微生物的抗生素抗性状态的方法。【选
型图】无

アッセイ条件	分離方法	MSSA (25923)	MRSA (D14906)	MSSA/MRSA 割合
T ₀ (氷)	油	2,745,600	1,163,240	2.36
37度で30分	洗浄×2 (PBS)	410,830	206,250	2.00
37度で30分	油	1,831,790	326,790	5.60
37度で52分	油	1,941,930	363,000	5.35
37度で68分	油	2,481,450	346,270	7.17
37度で86分	油	2,285,980	510,150	4.48