

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成25年5月16日(2013.5.16)

【公表番号】特表2011-527562(P2011-527562A)

【公表日】平成23年11月4日(2011.11.4)

【年通号数】公開・登録公報2011-044

【出願番号】特願2011-517312(P2011-517312)

【国際特許分類】

C 12 Q 1/06 (2006.01)

C 12 M 1/34 (2006.01)

【F I】

C 12 Q 1/06

C 12 M 1/34 A

【手続補正書】

【提出日】平成25年3月13日(2013.3.13)

【手続補正1】

【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】

検査試料中の培養可能な微生物細胞の数を示す定量的値を決定するための方法であって、

(i) 培養可能な微生物細胞を保持できる前記検査試料を、微生物細胞の膜と結合できる少なくとも1つの信号放出剤と接触させるステップであって、前記接触が、前記信号放出剤が前記微生物細胞内に内部移行(internalization)し、前記試料から放出された信号が平坦域に本質的に到達するレベルとなるのに十分である既定の第1期間(T1)行われるステップ、

(ii) 前記検査試料から内部移行しなかった(non-internalized)信号放出剤を除去するステップ、

(iii) 前記第1期間(T1)に続く、前記信号が前記平坦域において本質的に維持される第2期間(T2)の間、前記試料内の信号放出物から信号を放出する培養可能細胞を検出するステップであって、前記検出が前記培養可能細胞に対してあらかじめ決定された選択パラメータに基づくステップ、及び

(iv) 前記選択された信号放出物に基づき、前記検査試料中の培養可能細胞の数を示す定量的値を決定するステップ

を含む方法。

【請求項2】

前記信号放出剤で前記試料を染色する前に前記検査試料から液体の少なくとも一部を除去するステップを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

液体の除去が、ろ過又は遠心分離の1つ又は複数による、請求項2に記載の方法。

【請求項4】

前記試料が1つ又は複数の型の微生物細胞を含む、請求項1から3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項5】

前記信号放出剤がルミネセンス剤又は光放出剤である、請求項1から4のいずれか一項

に記載の方法。

【請求項 6】

前記試料を、前記試料に存在すると考えられる選択された微生物細胞に対して特異性を有する少なくとも 1 つの追加の信号放出剤と接触させるステップを含む、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記試料の各信号放出剤から放出された信号を検出し、そこから試料中の培養可能な特異的な微生物細胞の数を示す定量的値を決定するステップを含む、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

各値が試料において特異的な微生物細胞の数、又は特異的な群の微生物細胞の数を示す、複数の定量的値を決定するための、請求項 6 又は 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記選択パラメータが、信号放出物から放出された信号の強度、信号放出物の大きさ、信号放出物の形態から選択された 2 つ以上のパラメータを含む、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

既定の上限を下回る信号強度、及び物体の大きさのある範囲内の大きさを少なくとも有する信号放出物のみが検出される、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

既定の強度範囲内の信号強度、及び物体の大きさのある範囲内の大きさを少なくとも有する信号放出物のみが検出される、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 12】

前記選択された物体の前記定量的値を算出するステップを含む、請求項 9 から 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

前記定量的値が、前記選択された物体の平均平方根強度を含む、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記定量的値が、コロニー形成単位 ( C F U ) 数に対応するように正規化され、正規化された定量的値が C F U 当量である、請求項 12 又は 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記正規化が、既定の細胞特異的な正規化因子で前記定量的値を因数に分解し ( f a c t o r i n g ) 、前記 C F U 当量を得るステップを含む、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

検査試料中の培養可能な微生物細胞の数と等しい定量的値を決定するためのキットであって、

( i ) 微生物細胞の膜と結合できる少なくとも 1 つの信号放出剤、

( i i ) 1 つ以上の微生物フィルター、

( i i i ) 滅菌 P B S 緩衝剤、および

( i v ) 検査試料を信号放出剤と接触させる命令、前記検査試料から内部移行しなかつた ( n o n - i n t e r n a l i z e d ) 信号放出剤を除去するための命令、信号を放出する培養可能細胞を検出し選択するための命令、前記検査試料中の培養可能細胞の数を示す定量的値を決定するための命令、

を含むキット。

【請求項 17】

前記信号放出剤で試料を染色する前に前記試料から液体の少なくとも一部を除去するための命令を含む、請求項 16 に記載のキット。

【請求項 18】

2 つ以上の信号放出剤を含む、請求項 16 又は 17 に記載のキット。

**【請求項 19】**

信号放出剤がルミネセンス剤又は光放出剤である、請求項16から18のいずれか一項に記載のキット。

**【請求項 20】**

前記信号放出剤が蛍光色素である、請求項19に記載のキット。

**【請求項 21】**

選択パラメータ、及び前記試料内の信号放出物から信号を放出する培養可能な微生物細胞を選択するために前記選択パラメータの少なくとも2つを使用するための命令を含む、請求項16から20のいずれか一項に記載のキット。

**【請求項 22】**

前記選択パラメータが、既定の信号強度の上限、信号強度範囲、既定の信号放出物の大きさの範囲内の大きさ、及び信号放出形態を含む、請求項21に記載のキット。

**【請求項 23】**

既定の上限を下回る信号強度を有する、又は物体の大きさのある範囲内であり、既定の大きさの範囲内の大きさを有する信号放出物のみを選択するための前記選択パラメータの少なくとも2つを使用するための命令を含む、請求項22に記載のキット。

**【請求項 24】**

前記選択された物体から前記定量的値を算出するための命令を含む、請求項16から23のいずれか一項に記載のキット。

**【請求項 25】**

前記命令が、前記選択された物体の平均平方根強度を計算し、それから前記定量的値を得ることを含む、請求項24に記載のキット。

**【請求項 26】**

コロニー形成単位(CFU)数当量を得るために正規化因子で前記定量的値を正規化するための命令を含む、請求項16から25のいずれか一項に記載のキット。

**【請求項 27】**

1つ又は複数の既定の正規化因子、及び測定された定量的値から前記CFU当量を導き出すために前記既定の正規化因子を使用するための命令を含む、請求項26に記載のキット。

**【請求項 28】**

検査試料中の培養可能な微生物細胞の数を示す定量的値を決定するためのシステムであって、

(i) 試料を保持し、試料と1つ又は複数の信号放出剤との接触を可能とするための運搬体、

(ii) 試料内の信号放出物を検出し、それに対応するデータを出力するための検出器、

(iii) 既定の選択パラメータ及び複数の既定の正規化因子を有するデータベースを含むメモリユニットであって、各選択パラメータ及び各正規化因子が微生物細胞、又は微生物細胞群に特異的である、メモリユニット、

(iv) 検出器から出力データを受信し、前記メモリユニットから前記パラメータ及び前記正規化因子の1つ又は複数を受信し、前記パラメータ及び前記正規化因子で前記出力データを処理して、前記試料中の前記培養可能な微生物細胞の数を示す前記定量的値を決定するための処理ユニットを含むシステム。

**【請求項 29】**

前記運搬体が、前記試料から液体の少なくとも一部をろ過除去するためのフィルターを含む、請求項28に記載のシステム。

**【請求項 30】**

前記検出器が、前記検査試料中の信号放出物の画像を取得するためのカメラを含む、請求項28又は29に記載のシステム。

**【請求項 3 1】**

前記処理ユニットが、前記検出器から受信したデータから、検出された各信号放出物の信号強度、信号放出物の大きさ、信号放出物の形態を測定するように構成されている、請求項 3 0 に記載のシステム。

**【請求項 3 2】**

前記処理ユニットが、既定の強度閾値を下回る信号強度、及び既定の大きさの範囲内の大きさを有する信号放出物を選択するように構成されている、請求項 2 8 から 3 1 のいずれか一項に記載のシステム。

**【請求項 3 3】**

前記処理ユニットが、既定の強度範囲内の信号強度、及び既定の範囲内の大きさを有する信号放出物を選択するように構成されている、請求項 2 8 から 3 1 のいずれか一項に記載のシステム。

**【請求項 3 4】**

前記処理ユニットが、選択された信号放出物から放出された強度の平均平方根に基づいて定量的値を出力するように構成されている、請求項 3 2 又は 3 3 に記載のシステム。

**【請求項 3 5】**

前記処理ユニットが、前記データベースから検索された正規化因子で定量的値を正規化するように構成されている、請求項 2 8 から 3 4 のいずれか一項に記載のシステム。

**【請求項 3 6】**

1つ又は複数の信号放出剤のカセットを含み、

前記カセットが前記1つ又は複数の信号放出剤を前記運搬体に放出するのを可能にし、前記運搬体内での前記1つ又は複数の信号放出剤と検査試料との接触を可能にするよう、前記システムはあらかじめプログラムされている、請求項 2 8 から 3 5 のいずれか一項に記載のシステム。

**【請求項 3 7】**

それぞれが信号放出剤を運搬するカセットのアレイを含み、

前記カセットのアレイから1つ又は複数の信号放出剤を運搬体に放出するのを可能にするよう、前記システムはあらかじめプログラムされている、請求項 2 8 から 3 5 のいずれか一項に記載のシステム。

**【請求項 3 8】**

検査試料中の培養可能な微生物細胞の数を示す定量的値を決定するための方法を実施するマシンによって実行可能な命令のプログラムを確実に実装する、マシンによって読み取り可能なプログラムストレージデバイスであって、前記方法が、

( i ) 培養可能な微生物細胞を保持できる前記検査試料を、微生物細胞の膜と結合できる少なくとも1つの信号放出剤と接触させるステップであって、信号放出剤が微生物細胞内に内部移行(*internalization*)し、試料から放出された信号が平坦域に本質的に到達するレベルとなるのに十分である既定の第1期間(*T 1*)、前記接触が行われるステップ、

( ii ) 前記検査試料から非内部移行信号放出剤(*non-internalized signal emitting agent*)を除去するステップ、

( iii ) 前記第1期間(*T 1*)に続く、前記信号が前記平坦域において本質的に維持される第2期間(*T 2*)の間、前記試料内の信号放出物から信号を放出する培養可能細胞を検出及び選択するステップであって、前記検出が前記培養可能細胞に対してあらかじめ決定された選択パラメータに基づいているステップ、及び

( iv ) 前記選択された信号放出物に基づき、検査試料中の培養可能細胞の数を示す定量的値を決定するステップ

を含む方法。

**【請求項 3 9】**

請求項 1 から 1 5 のいずれか一項に記載の方法を実施するための前記マシンによって実行可能な、請求項 3 8 のプログラムストレージデバイス。

**【請求項 4 0】**

コンピュータ上で実行される場合、請求項 1 から 15 のいずれか一項に記載のすべてのステップを実施するためのコンピュータプログラムコード手段を含み、プログラムストレージデバイス内に実装されているコンピュータプログラム。

**【請求項 4 1】**

前記検査試料は、液体飲料水、半液体飲料水、飲料水の乾燥試料、食品、飲料、医薬品、パーソナルケア製品、市営水道水システム、井戸、飲用水、汚水、天然水源、娯楽用の水、土壤、地表空気、血漿試料、唾液試料、尿試料、咽頭試料、または胃腸液である、請求項 1 から 15 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 4 2】**

培養可能な微生物細胞は、細菌、カビ、酵母菌、原生動物、藻類、好酸性細菌、レジオネラ菌、又はビブリオ属の種を含む、請求項 1 から 15 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 4 3】**

前記細菌は、大腸菌群、サルモネラ菌、リストリア菌、赤痢菌等の腸内細菌、ショードモナス群、ブドウ球菌群、又はメタバクテリアを含む、請求項 4 2 に記載の方法。

**【請求項 4 4】**

前記カビは、黒色アスペルギルス、又はペニシリウム群を含む、請求項 4 2 に記載の方法。

**【請求項 4 5】**

前記酵母菌は、カンジダ群、又はサクラミセス群を含む、請求項 4 2 に記載の方法。

**【請求項 4 6】**

前記原生動物は、コクシジウム群、又はジアルジア群を含む、請求項 4 2 に記載の方法。

**【請求項 4 7】**

信号放出物の大きさが 0.8 ~ 2.0  $\mu\text{m}$  であり、

信号放出物によって放出される信号の強度が 60 ~ 254 GL であり、

信号放出物の形態が円形、長方形または棒状である、請求項 9 に記載の方法。

**【請求項 4 8】**

前記 T1 は 70 ~ 110 秒である、請求項 1 から 15 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 4 9】**

前記平坦域は、50 ~ 900 秒である、請求項 1 から 15 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 5 0】**

前記 T2 は 600 秒である、請求項 1 から 15 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 5 1】**

前記試料中の培養可能な細胞によって放出される信号は、生存可能で培養不能な細胞によって放出される信号よりも 1.5 ~ 20 倍、大きい、請求項 1 から 15 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 5 2】**

信号放出剤は光放出剤、比色剤、ルミネセンス放出剤、蛍光放出剤、燐光放出剤、化学ルミネセンス放出剤、放射線ルミネセンス放出剤、熱ルミネセンス放出剤、生物発光剤、又は親油性のリンカーに結合した蛍光成分を含む剤である、請求項 1 から 15 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 5 3】**

前記追加の信号放出剤は、微生物細胞の細胞外成分に対して結合特異性を有するリガンド、酵素物質、細胞特異的抗体、又はバクテリオファージを含む剤である、請求項 6 に記載の方法。

**【請求項 5 4】**

前記検査試料は、液体飲料水、半液体飲料水、飲料水の乾燥試料、食品、飲料、医薬品、パーソナルケア製品、市営水道水システム、井戸、飲用水、汚水、天然水源、娯楽用の

水、土壤、地表空気、血漿試料、唾液試料、尿試料、咽頭試料、または胃腸液である、請求項16から27のいずれか一項に記載のキット。

**【請求項55】**

信号放出剤は光放出剤、比色剤、ルミネセンス放出剤、蛍光放出剤、熒光放出剤、化学ルミネセンス放出剤、放射線ルミネセンス放出剤、熱ルミネセンス放出剤、生物発光剤、又は親油性のリンカーに結合した蛍光成分を含む剤である、請求項16から27のいずれか一項に記載のキット。