(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2012-507283
(P2012-507283A)
(43)公表日　平成24年3月29日(2012.3.29)

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード（参考）
C12Q 1/04	(2006.01)	C１２Q　1/04	２G０４３
G01N 21/65	(2006.01)	G０１N　21/65	４B０６３

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　(全 31 頁)

(21)出願番号　特願2011-534514(P2011-534514)
(86)(22)出願日　平成21年10月30日(2009.10.30)
(85)翻訳文提出日　平成23年6月13日(2011.6.13)
(86)国際出願番号　PCT/US2009/005886
(87)国際公開番号　WO2010/062351
(87)国際公開日　平成22年6月3日(2010.6.3)
(31)優先権主張番号　61/110,187
(32)優先日　平成20年10月31日(2008.10.31)
(33)優先権主張国　米国(US)

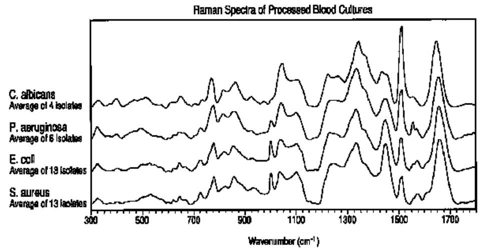
(71)出願人　502073946
バイオメリュー・インコーポレイテッド
ｂｉｏＭｅｒｉｅｕｘ，　Ｉｎｃ．
アメリカ合衆国２７７１２ノースカロライナ州ダーラム、ロドルフ・ストリート１００番
(74)代理人　100147485
弁理士　杉村　憲司
(74)代理人　100167623
弁理士　塚中　哲雄
(74)代理人　100174001
弁理士　結城　仁美

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ラマン分光法を使用した微生物の分離、キャラクタリゼーションおよび／または同定方法

(57)【要約】
本発明は、試験試料中の微生物の分離、キャラクタリゼーションおよび／または同定方法に関するものである。本発明の方法は、試験試料中に存在する可能性がある非微生物細胞を溶解させる任意選択の溶解ステップと、後続の分離ステップとを含む。本方法は、血液含有培養基のような複雑な試料に由来する微生物の分離、キャラクタリゼーションおよび／または同定に役立つ可能性がある。本発明は更に、ラマン分光測定を用いて、分離した微生物試料を分光解析して微生物の測定値を生成し、前記分光測定値を使用して試料中の微生物のキャラクタリゼーションおよび／または同定を行うことができる。
【選択図】図１

Fig. 1



【特許請求の範囲】
【請求項１】
試験試料に由来する微生物のキャラクタリゼーションおよび／または同定方法であり、
（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）前記試験試料中に非微生物細胞を選択的に溶解させて溶解試料を生産するステップと、
（ｃ）前記溶解試料の他の構成成分から微生物を分離して単離微生物試料を形成するステップと、
（ｄ）単離した前記微生物を１つ又は複数のラマン分光技術を用いて解析して前記微生物の分光測定値を生成するステップと、
（ｅ）前記分光測定値と既知の微生物に関して得られる分光測定値もしくは予測分光特性とを比較することにより前記単離試料中の前記微生物のキャラクタリゼーションおよび／または同定を行うステップとを含むことを特徴とする方法。
【請求項２】
請求項１に記載の方法であり、前記ステップ（ｃ）および（ｄ）は封止容器内で実行され、前記解析ステップ（ｄ）は非侵襲的であることを特徴とする、方法。
【請求項３】
請求項１に記載の方法であり、前記ラマン分光技術は、ラマン分光法、共焦点ラマン分光法、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、透過ラマン分光法、およびこれらの組み合わせを含む群から選択されることを特徴とする、方法。
【請求項４】
請求項１に記載の方法であり、前記微生物のキャラクタリゼーションは１つまたは複数の表現型特徴および／または形態学的特徴に基づいて行われることを特徴とする、方法。
【請求項５】
請求項１に記載の方法であり、前記微生物のキャラクタリゼーションは、検出時間、培養率ならびに微生物ペレットサイズ、形状、色および／または密度のうちの１つまたは複数の測定値に基づいて行われることを特徴とする、方法。
【請求項６】
請求項１に記載の方法であり、前記微生物は１つまたは複数の分類モデルにキャラクタリゼーションされ、前記分類モデルは、グラム群、臨床グラム群、治療群、および機能群を含む群から選択されることを特徴とする、方法。
【請求項７】
請求項１に記載の方法であり、前記微生物を、属レベル、種レベルまたは株レベルまで同定することを特徴とする、方法。
【請求項８】
請求項１に記載の方法であり、選択的に溶解させる前記ステップ（ｂ）は、１つまたは複数の洗浄剤を含む溶解溶液を使用して実行されることを特徴とする、方法。
【請求項９】
請求項８に記載の方法であり、前記１つまたは複数の洗浄剤は、Ｔｒｉｔｏｎ（登録商標）Ｘ－１００、Ｔｒｉｔｏｎ（登録商標）Ｘ－１００－Ｒ、Ｔｒｉｔｏｎ（登録商標）Ｘ－１１４、ＮＰ－４０、Ｇｅｎａｐｏｌ（登録商標）Ｃ－１００、Ｇｅｎａｐｏｌ（登録商標）Ｘ－１００、Ｉｇｅｐａｌ（登録商標）ＣＡ６３０、Ａｒｌａｓｏｌｖｅ（商標）２００、Ｂｒｉｊ（登録商標）９６／９７、ＣＨＡＰＳ、オクチルβ－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）、ナトリウムドデシルサルフェート、Ｎ－ラウロイルサルコシン、ナトリウムデオキシコレート、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、Ｃ７ＢｚＯ、Ｂｒｉｊ（登録商標）９８、Ｂｒｉｊ（登録商標）５８、Ｂｒｉｊ（登録商標）３５、Ｔｗｅｅｎ（登録商標）

８０、Ｔｗｅｅｎ（登録商標）２０、Ｐｌｕｒｏｎｉｃ（登録商標）Ｌ６４、Ｐｌｕｒｏｎｉｃ（登録商標）Ｐ８４、非洗浄剤スルホベタイン（ＮＤＳＢ２０１）、アンフィポル（ＰＭＡＬ－Ｃ８）およびメチル－β－シクロデキストリンを含む群から選択されることを特徴とする、方法。

【請求項１０】

請求項８に記載の方法であり、前記洗浄剤は構造C_{12-18}／E_{9-10}を有するポリオキシエチレン洗浄剤であることを特徴とする、方法。

【請求項１１】

請求項１０に記載の方法であり、前記ポリオキシエチレン洗浄剤は、Ｂｒｉｊ（登録商標）９７、Ｂｒｉｊ（登録商標）９６Ｖ、Ｇｅｎａｐｏｌ（登録商標）Ｃ－１００、Ｇｅｎａｐｏｌ（登録商標）Ｘ－１００およびポリドカノールからなる群から選択されることを特徴とする、方法。

【請求項１２】

請求項８に記載の方法であり、前記溶解溶液は１つまたは複数の酵素を更に含み、前記１つまたは複数の酵素は１つまたは複数のプロテイナーゼと１つまたは複数のヌクレアーゼの混合物を含むことを特徴とする、方法。

【請求項１３】

請求項８に記載の方法であり、前記溶解溶液は１つまたは複数の緩衝剤を含むことを特徴とする、方法。

【請求項１４】

請求項１に記載の方法であり、前記溶解試料を前記容器内の密度クッション上に積層し、前記容器を遠心分離にかけて微生物ペレットを形成することを特徴とする、方法。

【請求項１５】

請求項１４に記載の方法であり、前記密度クッションは、コロイドシリカ、ヨウ化造影剤、スクロース、顕微鏡用液浸油、鉱油、シリコーン油、フルオロシリコーン油、シリコーンゲル、メトリゾエート－Ｆｉｃｏｌｌ（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）、Ｐｌｕｒｏｎｉｃ（登録商標）Ｆ１２７、Ｐｌｕｒｏｎｉｃ（登録商標）Ｆ６８、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、Ｐｈｙｔａｇｅｌ（登録商標）、ソルビトール、Ｆｉｃｏｌｌ（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、ハイドロフルオロカーボン液、およびこれらの組み合わせを含む群から選択されることを特徴とする、方法。

【請求項１６】

請求項１に記載の方法であり、前記試験試料は微生物を含むことが既知である培養試料であることを特徴とする、方法。

【請求項１７】

血液培養物に由来する微生物のキャラクタリゼーションおよび／または同定方法であり、

（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血液培養物から試料を採取するステップと、

（ｂ）前記試料中に非微生物細胞を選択的に溶解させて溶解試料を生産するステップと、

（ｃ）前記溶解試料を封止容器内の密度クッション上に積層するステップと、

（ｄ）前記容器を遠心分離にかけて前記試料の他の構成成分から微生物を分離し微生物ペレットを形成するステップと、

（ｅ）単離した前記微生物を１つ又は複数のラマン分光技術を用いてインサイチュで分光解析して前記微生物の分光測定値を生成するステップと、

（ｆ）前記分光測定値と既知の微生物に関して得られる分光測定値もしくは予測分光特

性とを比較することにより前記単離試料中の前記微生物のキャラクタリゼーションおよび／または同定を行うステップとを含むことを特徴とする方法。

【請求項１８】

微生物のキャラクタリゼーションおよび／または同定方法であり、

（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）前記試験試料を封止容器内に配置するステップと、

（ｃ）前記試験試料の他の構成成分から微生物をインサイチュで分離して前記封止容器内の微生物の単離微生物試料を形成するステップと、

（ｄ）１つ又は複数のラマン分光技術を用いて単離した前記微生物をインサイチュで分光解析して前記微生物の分光測定値を生成するステップと、

（ｅ）前記分光測定値と既知の微生物に関して得られる分光測定値もしくは予測分光特性とを比較することにより前記単離試料中の前記微生物のキャラクタリゼーションおよび／または同定を行うステップとを含むことを特徴とする方法。

【請求項１９】

請求項１８に記載の方法であり、前記ラマン分光技術は、ラマン分光法、共焦点ラマン分光法、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、透過ラマン分光法、およびこれらの組み合わせを含む群から選択されることを特徴とする、方法。

【請求項２０】

請求項１８に記載の方法であり、前記微生物のキャラクタリゼーションは１つまたは複数の表現型特徴および／または形態学的特徴に基づいて行われることを特徴とする、方法。

【請求項２１】

請求項１８に記載の方法であり、前記微生物のキャラクタリゼーションは、検出時間、培養率ならびに微生物ペレットサイズ、形状、色および／または密度のうちの１つまたは複数の測定値に基づいて行われることを特徴とする、方法。

【請求項２２】

請求項１８に記載の方法であり、前記微生物は１つまたは複数の分類モデルにキャラクタリゼーションされ、前記分類モデルは、グラム群、臨床グラム群、治療群、および機能群を含む群から選択されることを特徴とする、方法。

【請求項２３】

請求項１８に記載の方法であり、前記微生物を、属レベル、種レベルまたは株レベルまで同定することを特徴とする、方法。

【請求項２４】

請求項１８に記載の方法であり、前記試料を前記容器内の密度クッション上に積層し、前記容器を遠心分離にかけて微生物ペレットを形成することを特徴とする、方法。

【請求項２５】

請求項１８に記載の方法であり、前記密度クッションは、コロイドシリカ、ヨウ化造影剤、スクロース、顕微鏡用液浸油、鉱油、シリコーン油、フルオロシリコーン油、シリコーンゲル、メトリゾエート－Ｆｉｃｏｌｌ（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）、Ｐｌｕｒｏｎｉｃ（登録商標）Ｆ１２７、Ｐｌｕｒｏｎｉｃ（登録商標）Ｆ６８、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、Ｐｈｙｔａｇｅｌ（登録商標）、ソルビトール、Ｆｉｃｏｌｌ（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のうちの１つまたは複数を含むことを特徴とする、方法。

【請求項２６】

請求項１８に記載の方法であり、前記試験試料は微生物を含むことが既知である培養試料であることを特徴とする、方法。

【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、２００８年１０月３１日に出願した米国仮特許出願第６１／１１０，１８７号「Method and System for Detection and/or Characterization of a Biological Particle in a Sample」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】

本発明は試料中の微生物を検出、単離および／または同定する方法およびシステムに関するものである。特に、本発明はラマン分光技術を使用した微生物の迅速なキャラクタリゼーションおよび／または同定方法に関するものである。

【背景技術】

【０００３】

生物学的流体中の病原微生物の検出は可能な限り短い時間で行う必要があり、医師が利用できる広範な抗生物質が存在するにも関わらず依然として死亡率が高い敗血症の場合は特にそうである。患者の体液、特に血液中の微生物のような生物学的活性剤の存在は通常血液培養瓶を使用して判定される。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数時間以内、好ましくは１時間以内に血流感染をキャラクタリゼーション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。陽性の血液培養ブ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】

Ｖｉｔｅｋ（登録商標）、Ｐｈｏｅｎｉｘ（商標）、Ｍｉｃｒｏｓｃａｎ（登録商標）システムのような従来の自動化表現型ＩＤ試験、またはＡＰＩのような手動表現型試験では、強固な結果を得るために、微生物が適切な発育相にあり且つ干渉する培地および血液製剤が存在しないことが必要である。これらのシステムでは陽性ブロスから１６～２４時間かけて平板培養培地上で培養したコロニーが使用される。しかしながら、より迅速な結果を得るための試みとして微生物を陽性血液培養瓶から隔離したシステムの使用が一部の研究室から報告されている。このようなダイレクトフロムボトル試験（direct-from-the-bottle test）は必ずしもすべての微生物（例えばグラム陽性球菌）に適しているわけではなく、試験製造業者によって検証されておらず、通常は結果が得られるまで３～８時間かかる。陽性の培養結果が出てから最初の数時間以内、好ましくは１時間以内に臨床的に意義のある結果を医師に提供するために、より迅速かつより広範な特異的試験の提供が急務である。

【０００５】

ラマン分光法は、非常に迅速な微生物の同定を可能にする可能性があるが、液体微生物学的培養基中および血液のような臨床試料中またはそれらの組合せに存在する蛍光性および吸光性の高い多くの化合物から干渉を受ける恐れがある。陽性血液培養ブロスから微生物を直接回収するために最も一般的に利用されている方法は、２ステップの分画遠心分離および血清分離チューブ内の遠心分離である。

【０００６】

他の微生物分離、キャラクタリゼーションおよび／または同定方法が下記の文献に記載されている。

【０００７】
米国特許第４，８４７，１９８号には、ＵＶ励起ラマン分光法を使用した微生物の同定方法が開示されている。４，８４７，１９８号特許によれば、細菌懸濁液に紫外領域の単一波長が接触する。使用する光エネルギーの一部は吸収され一部は放出される。放出された光エネルギー、すなわち共鳴増強ラマン散乱が後方散乱エネルギーとして測定される。このエネルギーを処理にかけることによってバクテリアに特徴的なスペクトルが生成される。

【０００８】
ボー・ディン（Ｖｏ‐Ｄｉｎｈ）の米国特許第５，９３８，６１７号は、試料をいくつかの波長の光で刺激し、発光強度を同期的にサンプリングすることにより試料の生物学的病原体を同定するシステムに関するものである。このシステムは試料を励起放射に曝すことにより発光放射を発生させる機構を含む。生物学的病原体はウイルスおよびバクテリアである可能性がある。

【０００９】
米国特許第６，１７７，２６６号には、細胞タンパク質抽出物または全細胞のマトリクス支援レーザー脱離イオン化／飛行時間型質量分析法（ＭＡＬＤＩ‐ＴＯＦ‐ＭＳ）分析によって生成される属、種および株固有のバイオマーカーによるバクテリアの化学分類方法が開示されている。

【００１０】
米国特許第７，０７０，７３９号には、２次元超遠心分離によりウイルスを含む微生物を体液または均質化組織から直接抽出、分離および浄化する方法が開示されている。第１の遠心分離ステップで、同定すべき微生物よりも沈殿速度が速い粒子がすべて除去される。第２の超遠心分離ステップで、特殊な鋸歯状の遠心チューブを使用して充填液体中で等密度バンディングを使用して広範な密度勾配を形成する。この特許によれば、核酸固有の色素を使用してバンディング粒子を光散乱または蛍光によって検出し、ウイルスタンパク質サブユニットおよび完全なウイルス粒子の質量分析、および核酸質量と制限酵素によって生産される断片の質量の両方に関する蛍光フロー血球計算測定により、非常に小さい体積のバンディング粒子を回収しキャラクタリゼーションするための分離技法を使用することができる。

【００１１】
米国特許出願第２００７／００３７１３５号には、液体中に懸濁した生物学的試料を同定および定量化するためのシステムが開示されている。このシステムは、少なくとも１つの励起光源を有する蛍光刺激モジュールと、少なくとも１つの励起光源から励起光を受け取るように生物学的試料を配置する蛍光刺激モジュールと光学的に結合した試料インターフェースモジュールと、試料インターフェースモジュールと光学的に結合した蛍光放出モジュールであって、生物学的試料の蛍光励起‐発光マトリクスを検出する少なくとも１つの検出装置を備える蛍光放出モジュールと、蛍光放出モジュールと動作可能に結合されたコンピュータモジュールとを含む。コンピュータモジュールは生物学的試料の蛍光励起‐発光マトリクスに関する多変量解析を実行して生物学的試料の同定および定量化を行う。しかしながら、米国特許出願第２００７／００３７１３５号では血液のような複雑な生物学的試料に由来する微生物の同定および定量化については論じられていない。

【００１２】
米国特許出願第２００７／０１７５２７８号には、対象試料を培養するための液体培養基の使用が記載されている。試料としては、例えば血液、尿、糞便、静脈内カテーテル等、工業生産ライン、水道システム、食品、化粧品、医薬品および法医学的試料が挙げられる。続いて、当業界で既知の方法、例えば遠心分離により液体培地から微生物を回収することができる。その後、これらの濃縮微生物を任意選択で乾燥後に担持材に移して振動スペクトルを得ることができる。この特許出願では微生物を同定および分類するためのラマン分光法のような振動分光法を含めた様々な方法が論じられている。

【先行技術文献】

【特許文献】
【００１３】
【特許文献１】米国特許第４，８４７，１９８号明細書
【特許文献２】米国特許第６，１７７，２６６号明細書
【特許文献３】米国特許第７，０７０，７３９号明細書
【特許文献４】米国特許出願第２００７／００３７１３５号明細書
【特許文献５】米国特許出願第２００７／０１７５２７８号明細書
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【００１４】
しかしながら、これらの方法は血液含有培養基のような複雑な試料から微生物を分離しキャラクタリゼーションを行おうとするときにいくつかの欠点を有する。結果として得られる微生物製剤がしばしば赤血球、血小板、脂質粒子、血漿酵素および細胞残屑の汚染を伴い、それによって思わしくない結果を招く恐れがある。また、これらの方法は、使用者が潜在的に危険な病原体の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非常に労働集約的であり安全性も欠く。臨床試料（例えば血液培養ブロス）および他の複雑な試料から微生物を単離するために、上記のような干渉材料が存在せず且つ迅速同定技術に適合した単純で安全な信頼性のある方法が必要とされている。
【課題を解決するための手段】
【００１５】
本発明は、試料中の微生物の単離、キャラクタリゼーションおよび／または同定方法を提供する。これらの方法を用いると、微生物のキャラクタリゼーションおよび／または同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（例えば食品および医薬品の）汚染材料の特定も可能となる。試料の採取から微生物のキャラクタリゼーションおよび／または同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１２０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。
【００１６】
一態様において、本発明は試験試料に由来する微生物のキャラクタリゼーションおよび／または同定方法であって、
（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）前記試験試料中に非微生物細胞を選択的に溶解させて溶解試料を生産するステップと、
（ｃ）前記溶解試料の他の構成成分から微生物を分離して単離微生物試料を形成するステップと、
（ｄ）単離した前記微生物を１つ又は複数のラマン分光技術を用いて解析して前記微生物の分光測定値を生成するステップと、
（ｅ）前記分光測定値と既知の微生物に関して得られる分光測定値もしくは予測分光特性とを比較することにより前記単離試料中の前記微生物のキャラクタリゼーションおよび／または同定を行うステップとを含む方法に関するものである。
【００１７】
一態様において、本発明は血液培養物に由来する微生物のキャラクタリゼーションおよび／または同定方法であって、
（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血液培養物から試料を採取するステップと、
（ｂ）前記試料中に非微生物細胞を選択的に溶解させて溶解試料を生産するステップと、

（ｃ）前記溶解試料を封止容器内の密度クッション上に積層するステップと、
（ｄ）前記容器を遠心分離にかけて前記試料の他の構成成分から微生物を分離し微生物ペレットを形成するステップと、
（ｅ）１つ又は複数のラマン分光技術を用いて単離した前記微生物をインサイチュで分光解析して前記微生物の分光測定値を生成するステップと、
（ｆ）前記分光測定値と既知の微生物に関して得られる分光測定値もしくは予測分光特性とを比較することにより前記単離試料中の前記微生物のキャラクタリゼーションおよび／または同定を行うステップとを含む方法に関するものである。

【００１８】
別の態様において、本発明は微生物のキャラクタリゼーションおよび／または同定方法であって、
（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）前記試験試料を封止容器内に配置するステップと、
（ｃ）前記試験試料の他の構成成分から微生物をインサイチュで分離して前記封止容器内の微生物の単離微生物試料を形成するステップと、
（ｄ）１つ又は複数のラマン分光技術を用いて単離した前記微生物をインサイチュで分光解析して前記微生物の分光測定値を生成するステップと、
（ｅ）前記分光測定値と既知の微生物に関して得られる分光測定値もしくは予測分光特性とを比較することにより前記単離試料中の前記微生物のキャラクタリゼーションおよび／または同定を行うステップとを含む方法に関するものである。

【００１９】
一実施形態において、前記分離は前記試料を容器内の密度クッション上に積層し、前記試験試料の培地が前記密度クッションの頂部に残っている間に容器を遠心分離にかけて微生物をペレット化することによって実行される。他の実施形態において、前記容器は微生物ペレットの分光解析を行うことができるように底部および／または側面に光学窓を有する。前記微生物は、前記ペレットのスペクトルと既知の微生物の１つまたは複数のスペクトルもしくは予測分光特性とを比較することにより同定することができる。更なる操作なしに微生物を前記ペレット中で直接同定することができれば、この微生物同定の安全性が高まる。

【００２０】
一実施形態において、前記分光解析は微生物を含む構成成分分子の振動構造に基づく。他の実施形態において、前記分光解析は、本発明の方法の間に加えられ且つ特定の微生物または微生物群と相互作用する付加的な作用物質から得られる信号に部分的に基づく。

【００２１】
他の実施形態では、前記方法は更に、前記微生物ペレットを回収し、前記微生物を再懸濁し、更なる同定また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（virulence factor）、耐性記録）を実行するステップを含む。

【００２２】
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】

【００２３】
【図１】血液培養物から処理および回収した様々な微生物のラマンスペクトルを示す図である。
【図２】血液培養ブロスから直接回収した１３のＳ．ａｕｒｅｕｓのラマンスペクトルを示す図である。
【図３】微生物を含む封止分離装置および含まない封止分離装置を介したラマンスペクトルを示す図である。
【図４】バックグラウンドを差し引いた、血液培養物から得た微生物ペレットの封止分離装置を介したラマンスペクトルを示す図である。

【発明を実施するための形態】

【００２４】

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。

【００２５】

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。

【００２６】

［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。

【００２７】

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。

【００２８】

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±２０％、±１０％、±５％、±１％、±０．５％または±０．１％のばらつきを含むものとする。

【００２９】

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またはグラム陰性バクテリア、イースト、カビ、寄生虫およびモリキューテスが挙げられるが、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、ブレブンディモナス属、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、ブランハメラ亜属、ナイセリア属、バークホルデリア属、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、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、ガードネレラ属、コクリア属、ラクトコッカス属、ロイコノストック属、ミクロコッカス、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、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。

【００３０】

一実施形態では、以下で詳細するように、試料または培養培地に由来する微生物を分離および解析して該試料中に存在する微生物のキャラクタリゼーションおよび／または同定を行うことができる。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、通常ならキャラクタリゼーションおよび／または同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頂部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。

【００３１】

また別の実施形態では、以下で詳述するように、試料または培養培地に由来する微生物を単離および解析して該試料中に存在する微生物のキャラクタリゼーションおよび／または同定を行うことができる。本明細書で使用する「単離（isolated）」という用語は、それ自体の初期状態すなわち培養培地もしくは培養基から少なくとも部分的に浄化された微生物の任意の試料、および任意の非微生物もしくはそれらに含まれる非微生物構成成分を包含するものとする。例えば、本発明によれば、分離しない場合はキャラクタリゼーションおよび／または同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。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。

【００３２】

また別の実施形態では、以下で詳述するように、試料または培養培地に由来する微生物をペレット化し解析して試料中に存在する微生物のキャラクタリゼーションおよび／または同定を行うことができる。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、通常ならキャラクタリゼーションおよび／または同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。

【００３３】

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。
【００３４】
　本発明は、試料中の微生物の単離、キャラクタリゼーションおよび／または同定方法を提供する。更に、本方法は、特に血液含有培養基のような複雑な試料に由来する微生物の分離、キャラクタリゼーションおよび／または同定に有用である可能性がある。これらの迅速な方法を用いると、微生物のキャラクタリゼーションおよび／または同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（例えば食品および医薬品の）汚染材料の特定も可能となる。試料の採取から微生物のキャラクタリゼーションおよび／または同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１２０分未満、例えば約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キャラクタリゼーションおよび／または同定を行うことができる。一実施形態おいて、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。
【００３５】
　一態様において、本発明は試験試料に由来する微生物のキャラクタリゼーションおよび／または同定方法であって、
　（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）前記試験試料中に非微生物細胞を選択的に溶解させて溶解試料を生産するステップと、
　（ｃ）前記溶解試料の他の構成成分から微生物を分離して単離微生物試料を形成するステップと、
　（ｄ）単離した前記微生物を１つ又は複数のラマン分光技術を用いて解析して前記微生物の分光測定値を生成するステップと、
　（ｅ）前記分光測定値と既知の微生物に関して得られる分光測定値もしくは予測分光特性とを比較することにより前記単離試料中の前記微生物のキャラクタリゼーションおよび／または同定を行うステップとを含む方法に関するものである。
【００３６】
　また別の態様において、本発明は微生物のキャラクタリゼーションおよび／または同定方法であって、
　（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）前記試験試料を封止容器内に配置するステップと、
　（ｃ）前記試験試料の他の構成成分から微生物をインサイチュで分離して前記封止容器内の微生物の単離微生物試料を形成するステップと、
　（ｄ）単離した前記微生物を１つ又は複数のラマン分光技術を用いてインサイチュで分光測定して前記微生物の分光測定値を生成するステップと、
　（ｅ）前記分光測定値と既知の微生物に関して得られる分光測定値もしくは予測分光特性とを比較することにより前記単離試料中の前記微生物のキャラクタリゼーションおよび／または同定を行うステップとを含む方法に関するものである。
【００３７】
　本発明の別の実施形態において、上記の方法は、微生物の解析に先立って分離ステップの間に形成された微生物のペレットまたはその一部分を分離容器から回収するステップを

含む。例えば、ペレット形成後にペレットから流体を吸い出し、ペレットを適切な培地（例えば微生物が生存可能な媒体）に再懸濁することができる。再懸濁した微生物を分離容器から取り出すことができる。次いで、これらの微生物をキャラクタリゼーションおよび／または同定のために例えば懸濁液中でまたは再ペレット化後に解析することができる。他の実施形態では、再懸濁した微生物を例えば懸濁液中でまたは再ペレット化後に分離容器内で解析することができる。別の実施形態では、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に直接使用することができる（例えばラマン分光法）。

【００３８】

［試料］

本発明の方法によって試験可能な試料（すなわち試験試料）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１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。一実施形態では、培養物から試料を採取する。別の実施形態では、微生物学的培養物（例えば血液培養物）から試料を採取する。別の実施形態では、試料が微生物を含むことが疑われるまたは微生物を含むことが既知である。

【００３９】

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、膣分泌物、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。別の実施形態では、臨床試料を培養し、培養試料を使用することができる。

【００４０】

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。

【００４１】

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）、海水バラスト、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。別の実施形態では、非臨床試料を培養し、培養試料を使用することができる。

【００４２】

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ＢａｃＴ／ＡＬＥＲＴ（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。

【００４３】

本発明は、微生物の検出、キャラクタリゼーションおよび／または同定の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、キャラクタリゼーションおよび／または同定が可能となる。このような検出、キャラクタリゼーションおよび／または同定は、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。したがって、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ものではない。したがって、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ものではない。

【００４４】

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単離微生物試料または微生物ペレットを生産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２００μｌ未満とすることができ、例えば約１５０、１００、５０、２５、２０、１５、１０または５μｌ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。

【００４５】

［任意選択の溶解ステップ］

いくつかの実施形態では、試料を採取した後に実行する本発明の方法の次のステップは、試料、例えば血球および／または組織細胞中に存在し得る望ましくない細胞を選択的に溶解させるステップである。細胞を溶解させることにより試料の他の構成成分からの微生物の分離を可能にすることができる。他の構成成分からの微生物の分離により解析ステップ中の干渉を防止する。非微生物細胞が試料中に存在することが予想されない場合、または非微生物細胞が解析ステップに干渉することが予想されない場合は、溶解ステップの実行が必要なくなる可能性がある。一実施形態において、溶解すべき細胞は試料中に存在する非微生物細胞であり、試料中に存在し得る微生物細胞は溶解させない。しかしながら、実施形態によっては特定のクラスの微生物を選択的に溶解させることが望ましい可能性がある。それ故、このような選択的な溶解を本明細書に記載する方法および当業界で周知の方法に従って実行することができる。例えば、あるクラスの望ましくない微生物を選択的に溶解させることができ、例えばイーストは溶解させるがバクテリアは溶解させないこと、またはその逆が可能である。他の実施形態では、微生物の特定の細胞下構成成分、例えば細胞膜または細胞小器官を分離するために所望の微生物を溶解させる。一実施形態では、非微生物細胞をすべて溶解させる。他の実施形態では、非微生物細胞の一部分、例えば解析ステップに対する干渉を防止するのに十分な細胞を溶解させる。細胞の溶解は、微生物を溶解させるか否かに関わらず、当業界で細胞を選択的に溶解させるのに効果的であることが知られる任意の方法によって実行することができる。このような方法としては溶解

溶液の添加、超音波処理、浸透圧衝撃処理、化学処理および／またはそれら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。
【００４６】
溶解溶液は、細胞、例えば非微生物細胞を（例えば真核細胞膜の可溶化により）溶解させること、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。一実施形態において、溶解溶液は１つ以上の洗浄剤、１つ以上の酵素または１つ以上の洗浄剤と１つ以上の酵素の組合せを含むことができ、更に付加的な作用物質も含むことができる。一実施形態において、洗浄剤は非変性溶解洗浄剤、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、Ｇｅｎａｐｏｌ（登録商標）Ｃ－１００、Ｇｅｎａｐｏｌ（登録商標）Ｘ－１００、Ｉｇｅｐａｌ（登録商標）ＣＡ　６３０、Ａｒｌａｓｏｌｖｅ（商標）２００、Ｂｒｉｊ（登録商標）９６／９７、ＣＨＡＰＳ、オクチルβ－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）等とすることができる。任意選択で下記のような変性溶解洗浄剤を含めることもできる：ナトリウムドデシルサルフェート、Ｎ－ラウロイルサルコシン、ナトリウムデオキシコレート、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。任意選択で下記のような可溶化剤を含めることもできる：Ｂｒｉｊ（登録商標）９８、Ｂｒｉｊ（登録商標）５８、Ｂｒｉｊ（登録商標）３５、Ｔｗｅｅｎ（登録商標）８０、Ｔｗｅｅｎ（登録商標）２０、Ｐｌｕｒｏｎｉｃ（登録商標）Ｌ６４、Ｐｌｕｒｏｎｉｃ（登録商標）Ｐ８４、非洗浄剤スルホベタイン（ＮＤＳＢ　２０１）、アンフィポル(amphipol)（ＰＭＡＬ－Ｃ８）およびメチル－β－シクロデキストリン。典型的には、非変性洗浄剤および可溶化剤をそれぞれの臨界ミセル濃度（ＣＭＣ）を上回る濃度で使用しながら、変性洗浄剤をそれぞれのＣＭＣを下回る濃度で添加することができる。例えば、非変性溶解洗浄剤は約０．０１０％～約１０％の濃度、例えば約０．０１５％～約１．０％、例えば約０．０５％～約０．５％、例えば約０．１０％～約０．３０％の濃度（試料で希釈した後の最終濃度）で使用することができる。別の実施形態では、ポリオキシエチレン洗浄剤洗浄剤が好ましい可能性もある。ポリオキシエチレン洗浄剤は構造$Ｃ_{１２－１８}$／$Ｅ_{９－１０}$を有することができる［ただし、Ｃ１２－１８は炭素原子数１２～１８の炭素鎖長を示し、Ｅ９－１０は９～１０のオキシエチレン親水性頭部基を示す］。例えば、ポリオキシエチレン洗浄剤は、Ｂｒｉｊ（登録商標）９７、Ｂｒｉｊ（登録商標）９６Ｖ、Ｇｅｎａｐｏｌ（登録商標）Ｃ－１００、Ｇｅｎａｐｏｌ（登録商標）Ｘ－１００、ノナエチレングリコールモノドデシルエーテル（ポリドカノール）またはそれらの組合せから成る群から選択することができる。
【００４７】
溶解溶液中で使用可能な酵素としては、それらに限らないが、核酸および他の膜汚染材料を消化する酵素（例えばプロテイナーゼＸＸＩＩＩ、デオキシリボヌクレアーゼ（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））が挙げられる。使用可能な他の添加剤としては、それらに限らないが、２－メルカプトエタノール（２－Ｍｅ）やジチオスレイトール（ＤＴＴ）のような還元剤、およびマグネシウム、ピルビン酸塩、湿潤剤のような安定化剤が挙げられる。溶解溶液は、所望の細胞を溶解させるのに適した任意のｐＨで緩衝することができ、複数の因子に依存する。これらの因子としては、それらに限らないが、試料のタイプ、溶解すべき細胞および使用する洗浄剤が挙げられる。いくつかの実施形態では、ｐＨ範囲を約２～約１３とすることができ、例えば約６～約１３、例えば約８～約１３、例えば約１０～約１３とすることができる。適切なｐＨ緩衝液には所望の範囲、例えば約０．０５Ｍ～約１．０Ｍ　ＣＡＰＳのｐＨを維持することができる任意の緩衝液が含まれる。
【００４８】
一実施形態では、試料および溶解溶液を混合し、次いで細胞膜の溶解および可溶化が生起するのに十分な時間、例えば約１、２、３、４、５、１０、１５、２０、２５、３０、

４０、５０もしくは６０秒間、または約２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５もしくは２０分間またはそれ以上の時間、例えば約１秒～約２０分間、約１秒～約５分間または約１秒～約２分間温置（incubate）する。温置時間は溶解溶液の強度、例えば洗浄剤および／または酵素の濃度に依存する。一般に、弱い溶解緩衝液ほど非微生物細胞を完全に可溶化するのに多くの時間を要し、試料のより高い希釈が必要となる。溶解溶液の強度は、試料中に存在することが既知であるまたは試料中に存在することが疑われる微生物に基づいて選択することができる。溶解の影響を受けやすい微生物ほど弱い溶解溶液を使用することができる。溶解は約２℃～約４５℃の温度、例えば約１５℃～約４０℃、例えば約３０℃～約４０℃の温度で生起させることができる。一実施形態では、溶解溶液を注射器に充填し、その後注射器に試料を吸引することができる。これにより混合および温置を注射器内で生起させる。一実施形態では、溶解溶液を注射器に充填し、その後注射器に試料を吸引することができる。これにより混合および温置を注射器内で生起させる。

【００４９】

いくつかの実施形態では、試料中の微生物の一部または全部を殺すのに十分な溶解条件（例えば溶液または温置時間）ならびに分離および／または解析ステップとすることができる。本発明の方法は汎用性が高く、また単離および同定を行う上で必ずしもすべての微生物が生存している必要はない。いくつかの実施形態では、本方法の各ステップの実行前、実行中および／または実行後に微生物の一部または全部が死んでいてもよい。

【００５０】

本発明の実施に当たって使用が予定される溶解バッファについての更なる詳細及び詳述は、２００９年１０月３０日に出願された、継続中の米国特許出願第ｘｘｘｘｘ号「Methods for Isolation and Identfication of Microorganisms」に開示されている。この出願の内容は参照により本明細書に組み込む。

【００５１】

［分離ステップ］

本発明の方法の次のステップ（例えば溶解ステップを実行する場合は試料を溶解させた後のステップ）は分離ステップである。分離ステップを実行することにより、試料の他の構成成分（例えば非微生物またはそれらの構成成分）から微生物を分離し、同定およびキャラクタリゼーションのために解析可能なペレットに微生物を濃縮することができる。分離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。

【００５２】

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、試料（例えば溶解試料）を分離容器内の密度クッションの頂部に配置し、この容器を微生物の単離が可能となる条件下で遠心分離にかける（例えば微生物は容器の底部および／または側面にペレットを形成する可能性がある）。本実施形態によれば、試料の他の構成成分（例えば試料培地中に存在し得る非微生物またはそれらの構成成分）は密度クッションの頂部上または密度クッションの頂部内に留まる。一般には、任意の既知の容器を分離ステップに使用することができる。一実施形態では、分離容器を２００９年１０月３０日に出願した関連米国特許出願第ｘｘｘｘｘ号「Separation Device for Use in the Separation, Characterization and/or Identification of Microorganisms」に開示されている分離装置とする。この分離ステップは試料中の材料、例えば培地、細胞残屑および／または微生物の解析に（例えば固有蛍光によって）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。

【００５３】

クッションの密度は、試料中の微生物はクッションを通過するが、試料の他の構成成分（例えば血液培養ブロス、細胞残屑）はクッションの頂部に残る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。密度クッションは、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１．１２０ｇ／ｍｌの範囲とし、例えば約１．０３０～約１．０７０ｇ／ｍｌ、約１．０４０～約１．０６０ｇ／ｍｌまたは約１．０２５～約１．１２０ｇ／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１．１２０ｇ／ｍｌとする。

【００５４】

密度クッション用の材料は、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。一実施形態において、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）（Ｎｉｄａｃｏｎ　Ｉｎｔ’ｌ社（スウェーデン））またはＩｓｏｌａｔｅ（登録商標）（Ｉｒｖｉｎｅ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社（カリフォルニア州サンタアナ）等）、ポリビニルピロリドンで被覆することもできる（例えばＰｅｒｃｏｌｌ（商標）またはＰｅｒｃｏｌｌ（商標）Ｐｌｕｓ（Ｓｉｇｍａ‐Ａｌｄｒｉｃｈ社（ミズーリ州セントルイス））。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０．２５Ｍ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。密度クッションに適した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。密度クッションの調製に使用可能な他の適切な密度クッションとしては低粘度且つ高密度の油、例えば当業界で周知のとおり、顕微鏡用液浸油（例えばＣａｒｇｉｌｌｅ　Ｌａｂｓ社（ニューヨーク州）のＴｙｐｅ　ＤＦ）、鉱油（例えばＰｅｎｒｅｃｏ社（ペンシルバニア州）のＤｒａｋｅｏｌ（登録商標）５、Ｄｒａｋｅｔｅｘ　５０、Ｐｅｎｅｔｅｃｋ（登録商標））、シリコーン油（ポリジメチルシロキサン）、フルオロシリコーン油、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‐Ｆｉｃｏｌｌ（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、Ｐｈｙｔａｇｅｌ（登録商標）、ソルビトール、Ｆｉｃｏｌｌ（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Ｆｉｃｏｌｌ（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２５％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。一実施形態において、密度クッションはコロイドシリカ、イオジキサノール、イオヘキソール、塩化セシウム、メトリゾエート－Ｆｉｃｏｌｌ（登録商標）、ジアトリゾエート－デキストラン、スクロース、Ｆｉｃｏｌｌ（登録商標）４００および／またはデキストランの任意の組合せのうちの１つまたは複数から選択される。密度クッションは材料の組合せ、例えばコロイドシリカと油の組合せで構成することもできる。上記の化合物のいくつかの組合せ、例えば塩化セシウムやイオヘキソールのようなＵＶ消光特性が異なる化合物の組合せは、本発明の分離および読み取りステップに有用である可能性がある。

【００５５】

密度クッションの体積／高さは、他の試料構成成分からの微生物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１μｌ～約１００μｌ、例えば約５μｌ～約５０μｌとすることができる。密度クッションの頂部に積み上がるまたは積層する試料の体積は、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、試料の体積を約１μｌ～約１００μｌ、例えば約５μｌ～約５０μｌとすることができる。容器内の試料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の混合を防止するために、試料が積み上がる前または積層する前に密度クッションの頂部に中間層（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、中間層をポリエチ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）の頂部に密度クッションを積層することができる。

【００５６】

本発明の一実施形態では、分離容器をスウィングアウトローターの遠心分離にかけ、微生物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、試料の他の構成成分から微生物を分離するに足る（例えばペレットを形成するのに十分な）加速度および時間にわたって遠心分離にかける。遠心加速度は約１，０００×ｇ～約２０，０００×ｇとすることができ、例えば約２，５００×ｇ～約１５，０００×ｇ、例えば約７，５００×ｇ～約１２，５００×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る。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（例えば溶解、分離、解析および／または同定）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かけることはしない。本発明は試料の超

遠心分離、例えば約１００，０００×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。

【００５７】

分離容器は密度クッションおよび試料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。なお、本発明を実施する際は、２００９年１０月３０日に出願した関連米国特許出願第ｘｘｘｘｘ号「Separation Device for Use in the Separation, Characterization and/or Identification of Microorganisms」に開示されている分離装置を使用することができる。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０．１ｍｌ～約２５ｍｌとすることができ、例えば約１ｍｌ～約１０ｍｌ、例えば約２ｍｌ～約８ｍｌ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２μｌ～約１００μｌ、例えば約５μｌ～約５０μｌ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０．１０１６～０．３０４８ｃｍ）とすることができ、例えば約０．０６～約０．１０インチ（約０．１５２４～約０．２５４０ｃｍ）、例えば約０．０８インチ（約０．２０３２ｃｍ）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１．０１６０ｃｍ）とすることができ、例えば約０．３４～約０．３８インチ（約０．８６３６～約０．９６５２ｃｍ）、例えば約０．３６インチ（約０．９１４４ｃｍ）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０．１０１６０ｃｍ）とすることができ、例えば約０．００２～約０．０１インチ（約０．００５０８～約０．０２５４０ｃｍ）とすることができる。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る。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、微生物試料または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または採取すなわち取り出す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、例えば注射器または他のサンプリング装置を挿入するための、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。

【００５８】

容器は光学窓を備えることができ、この光学窓を通じて解析を行うことができる。光学窓は容器の底部、頂部および／または側面に配置することができる。窓は、微生物のスペクトルとは区別可能な振動構造を有するあらゆる材料で構成されうる。共焦点ラマン分光法のような他の区別のための技術を利用して、微生物の振動スペクトルを取得するとともに窓材料のスペクトルをはねることができる。共焦点ラマン分光法技術は、当業者によく知られている。この他に、空間オフセットラマン分光法があるが、この方法では励起ファイバーを放射（レイリースペクトルおよびラマンスペクトル）からは窓沿いにずらす。この技術も、窓材料と窓の下にある被測定量とを区別するための手法として、当業者に知ら

れている。付加的な分光技術を用いて微生物ペレットの解析を可能にするために、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。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。この薄さは窓材料および解析に用いられる方法に依存する。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（約０．５０８ｃｍ）未満とすることができ、例えば約０．１５インチ（約０．３８１ｃｍ）未満、約０．１０インチ（約０．２５４ｃｍ）未満または０．０５インチ（約０．１２７ｃｍ）未満とすることができる。

【００５９】

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（例えば溶解試料）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。

【００６０】

［解析ステップ］

微生物を分離、単離および／またはペレット化した後は、分離試料、単離試料またはペレットを解析して試料またはペレット中の微生物の同定および／またはキャラクタリゼーションを行うことができる。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。微生物を非侵襲的に同定する能力は、任意選択で、分離および同定／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、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る微生物の同定能力は、同定の可能な実行速度を大幅に向上させる。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、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。

【００６１】

いくつかの実施形態では、単離試料またはペレットを分光解析することができる。分光法を使用して微生物の１つまたは複数の内因的特性、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内に存在する特性を分析することができる。他の実施形態では、分光法を使用して微生物の１つまたは複数の外因的特性、例えば付加的な作用物質を利用して検出可能な特性を分析することができる。解析は、例えば赤外分光法、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（ＳＯＲＳ）、透過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）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（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。一実施形態では、単離試料また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／

または頂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、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および／または同定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。別の実施形態では、本明細書で説明するように単離試料またはペレットを解析のために取り出すことができる（例えば当業界で周知のとおり、単離試料またはペレットを取り出し、質量分析による解析準備を整えることができる）。また他の実施形態では、２つ以上の手段を使用して単離試料またはペレットの解析を行うことができる。例えば、蛍光分光法およびラマン分光法を使用して単離試料またはペレットの解析を行うことができる。本実施形態によれば、これらの解析ステップは順次実行しても同時に実行してもよい。

【００６２】

試料励起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。概して、ラマンスペクトルの生成は、非効率な工程であるため（例えば、１００万の衝突光子ごとに１つのラマン光子が生成される）、ラマンは、光子フラックスが大きい光源を必要とする。１９６０年にレーザーが発明されてから（Ｍａｉｍａｎ，Ｎａｔｕｒｅ）、ラマンシステムはレーザーライトをラマンスペクトルを取得するために用いてきた。レーザーライトは非常に選択的な（ノッチ）フィルタを通過する。このフィルタは、レーザー放射を狭い帯域幅で通過させるとともに、レーザによって生成される他のアーチファクト（例えば、増幅された自家発光、蛍光、プラズマ線等）を遮断する。

【００６３】

レーザーからの光は、リレーレンズシステム、光ファイバー又はこれら両方の組み合わせを用いた多様な光学システムによって試料に導かれる。（顕微鏡対物レンズのような）レンズによって試料上にレーザー光の焦点を合わせて、試料上における光学エネルギーを集中させた小さなスポットを得る。

【００６４】

ラマン後方散乱光および後方散乱励起光を、同一の顕微鏡対物レンズで集光し、コリメート光とする。散乱光は、ラマン散乱光を励起光から分離する光学フィルタを通過する。ラマン散乱光は、レンズおよび／または光ファイバーシステムによって分光計に伝播される。分光計は、ラマン散乱光を分散させてＣＣＤ検出器アレイ上に衝突させる。

【００６５】

ラマン散乱光の空間的な分散によって、（例えば、散乱波長対強度の）スペクトルが生成されて、キャラクタリゼーションのために保存されて参照スペクトルと比較される。

【００６６】

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、最も好ましく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。

【００６７】

本発明によれば、対照測定値（control measurement）を既知の微生物と見なし、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。これらの方法を使用することにより、先述したような有機体のモニタリング、検出および／またはキャラクタリゼーションを行うシステムを設計する際に、該当する未知の微生物を有機体の代謝、病原性および／または毒性に基づいて既存の命名法に基づく関連群および／または天然群に分類することができる。

【００６８】

また別の実施形態では、検出システムからの検出時間や培養率のような非分光測定値を、単離試料またはペレットに由来する微生物のキャラクタリゼーションおよび／または同定に役立てることができる。更に、分離装置の下部領域の写真像から得られる測定値は、ペレットサイズ、形状、色、密度といった分離株（isolate）の同一性に関する有益な情報をもたらすことができる。

【００６９】

本発明のいくつかの実施形態では、単離試料またはペレット中の微生物のキャラクタリゼーションおよび／または同定において必ずしも正確な種の同定を行う必要はない。キャラクタリゼーションは、生物学的粒子の広範なカテゴリ分けまたは分類だけでなく単一の種の実際の同定も包含する。単離試料またはペレットに由来する微生物の分類は、微生物の表現型および／または形態学的特徴の決定を含む可能性がある。例えば、生物学的粒子のキャラクタリゼーションは組成、形状、サイズ、クラスタリングおよび／または代謝のような観察可能な差異に基づいて達成することができる。いくつかの実施形態では、該当する生物学的粒子の分類を行うにあたって所与の生物学的粒子の特徴に関する予備知識の必要をなくすことができるが、経験的測定値との一貫性のある相関付けが必要となる。このため、本方法は特定の結合事象または代謝反応に基づく方法よりも汎用性が高くなり、容易に適合可能となる。本明細書で使用する「同定」とは、未知の微生物がどの科、属、種および／または株に属するのか判定すること、例えば未知の微生物を科、属、種および／または株レベルで同定することを意味する。

【００７０】

いくつかの例において、キャラクタリゼーションはアクションを起こすのに十分有用な情報をもたらす分類モデルを包含する。本明細書で使用する好ましい分類モデルは、（１）グラム群、（２）臨床グラム群、（３）治療群、および（４）機能群のうちの１つまたは複数の群への分類を含む。

【００７１】

（１）グラム群：このグラム群分類では、各微生物をそれぞれのグラム染色反応および全体のサイズに基づいて３種類の広範な分類カテゴリのうちの１つに含めることができる。前記群は下記のうちの１つまたは複数から選択される。（ａ）グラム染色で紺青色に染色するグラム陽性微生物、（ｂ）グラム染色で赤に染色するグラム陰性微生物および（ｃ）グラム染色で紺青色に染色するイースト細胞（ただし、形態学的特徴およびサイズによってバクテリアと区別される非常に大きい円形の細胞）。

【００７２】

（２）臨床グラム群：このグラム群は形態学的特徴によって区別されるいくつかのサブカテゴリに更に分割することができる。これらのサブカテゴリは熟練した研究室技術者から報告された臨床的に意義のある情報をすべて含むため、陽性または陰性グラム反応よりも高いレベルの同定を実現する。この特定の分類は下記の理由で非常に有用である。すなわち、グラム染色の品質および／またはスミアを読み取る技術者の技術レベルに左右される懸念が、臨床的に意義のある等価な情報に自動化システムを導入することによって解消されるからである。より詳細には、この分類モデルに基づく微生物のサブカテゴリは下記のうちの１つまたは複数から選択することができる：（ａ）球菌（小さい円形細胞）、（ｂ）双球菌（互いに結合した２つの小さい円形細胞）、（ｃ）矩形の桿菌（ｒｏｄｓ）および（ｄ）桿状の桿状菌（bacilli）。付加的な形態学的情報によって確認可能なサブカ

テゴリの例としては下記が挙げられる：（ｉ）グラム陽性球菌、（ｉｉ）鎖状のグラム陽性球菌、（ｉｉｉ）房状（すなわち「ブドウのような」房状）のグラム陽性球菌、（ｉｖ）グラム陽性双球菌、（ｖ）グラム陽性桿菌、（ｖｉ）内生胞子を含むグラム陽性桿菌、（ｖｉｉ）グラム陰性桿菌、（ｖｉｉｉ）グラム陰性球桿菌、（ｉｘ）グラム陰性双球菌、（ｘ）イーストおよび（ｘｉ）糸状の菌類。

【００７３】

（３）治療群：治療群は、特定の標本タイプから単離したときに同じクラスの抗生物質または抗生物質の混合物（例えば「Sanford Guide to Antimicrobial Therapy 2008」参照）で処置される複数の微生物種を含む。多くの場合、臨床医が初期の経験的治療を標的療法に近付ける上で種レベルまでの同定は必要ない。というのも、２つ以上の種を１つ（または複数）の同じ抗生物質で処置することができるからである。この分類レベルはこれらの「同じ処置の」微生物を単一の治療カテゴリに適宜含める。このキャラクタリゼーションレベルの例としては、高度耐性腸内細菌（ＥＢ）種と感受性ＥＢ種（Ｅｎｔｅｒｏｂａｃｔｅｒ ｓｐｐ．（エンテロバクター種）とＥ．ｃｏｌｉ（エシェリキアコリ））を区別する能力や、フルコナゾール耐性カンジダ種（Ｃ．ｇｌａｂｒａｔａ（カンジダグラブラータ）およびＣ．ｋｒｕｚｅｉ（カンジダクルセイ））と感受性カンジダ種（Ｃ．ａｌｂｉｃａｎｓ（カンジダアルビカンス）およびＣ．ｐａｒａｐｓｉｌｏｓｉｓ（カンジダパラプシロシス））を区別する能力等が挙げられる。

【００７４】

（４）機能群：本発明によれば、代謝、毒性および／または表現型特徴の組合せに基づくいくつかの群に微生物を含めることもできる。非発酵性の有機体を発酵性の有機体と明確に区別することができる。更に、溶血素を生産する微生物種を非溶血性種と別々に分類することができる。場合によっては、これらの群は属レベル（例えば腸球菌属、カンジダ属）と、より種に近いレベル（例えばコアグラーゼ陰性ブドウ球菌、α溶連菌、β溶連菌、コアグラーゼ陽性ブドウ球菌すなわちＳ．ａｕｒｅｕｓ（スタフィロコッカスアウレウス））とを区別して属レベル（例えば大腸菌、グラム陰性の非発酵性桿菌）よりも広範なカテゴリとなる。

【００７５】

同定を目的とする微生物の固有特性の測定に加えて、本発明の方法は更に、分離および／または同定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（例えば抗生抵抗）の同定を行うことができる。有用な同定作用物質としては、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、抗生物質（例えばペニシリン、バンコマイシン、ポリミキシンＢ）、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、宿主先天性免疫バイオマーカー（急性期タンパク質、ＬＰＳ結合タンパク質、ＣＤ １４、マンノース結合レクチン、トール様受容体）、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、カプセル／粘液（slime）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ラマンシグナルを示さない場合は、作用物質を、ジメチルアミノアゾベンゼン（ＤＡＢ）および４，４－ジピリジル（ＤＰＹ）（米国特許第５，３７６，５５６号および第７，５１８，７２１号参照）のようなラマン活性トレーサー（Raman active tracer）と共役させること等により、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。作用物質は、本発明の方法の任意のステップ、例えば試料を溶解中および／または分離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。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態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。

【００７６】

本発明の一態様において、本方法は更に微生物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（登録商標）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。抗生物質および／または他の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同定ステップ中に開始した試験の一部とすることもできる。例えばメチシリン耐性Ｓ．ａｕｒｅｕｓの検出では、まず、微生物の分離に先立ってラマントレーサー標識したペニシリンを試料に加えることができる。ペレットを回収し再懸濁させると、結合したペニシリンのレベルを判定することができる。

【００７７】

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。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り、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のリスクを低減することができる。

【００７８】

本発明の特定の実施形態では、本方法を使用して試験試料中の微生物の存在を検出することもできる。これらの実施形態において、本方法は

（ａ）試験試料を採取するステップと、

（ｂ）任意選択で前記試料中に細胞を溶解させて溶解試料を生産するステップと、

（ｃ）前記溶解試料の他の構成成分から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を含む。

ペレットの存在は微生物が前記試験試料中に存在することを示す。一実施形態では、ペレットを肉眼で検出する。他の実施態様では、ペレットを解析により、例えば分光器を利用して検出する。

【００７９】

いくつかの実施形態では、これらの検出方法を使用して試料、例えば食品、医薬品、飲料水等の微生物による汚染の有無をモニタリングすることができる。一実施形態において、本方法は汚染の有無を絶えずモニタリングするために反復的に実行することができ、例えば１か月に一度、１週間に一度、１日に一度、１時間に一度または他の任意の時間パターンで実行することができる。別の実施形態では、試料を必要に応じて、例えば汚染が疑われるときに試験することができる。更なる実施形態では、これらの検出方法を使用して臨床試料、例えば血液培養物中の微生物の有無を調べることができる。例えば、特定の時点で血液培養物から試料を取り出し、その試料に対して検出方法を実行することにより血液培養物が陽性であるかどうかを判定することができる。一実施形態では、培養物の接種後のある設定時点、例えば接種の２４時間後に試料を採取して血液培養物が陽性であるか

どうかを判定することができる。他の実施形態では、血液培養物から試料を定期的に、例えば１２、６、４もしくは２時間毎、または６０、５０、４０、３０、２０、１５、１０もしくは５分毎に採取して陽性検出可能な陽性血液培養物を短い時間で同定することができる。検出方法のいくつかの実施形態では、本明細書に記載するように、任意選択で検出ステップ後に同定方法を実行することができる。他の実施形態、特に試料の反復的なモニタリングを含む実施形態では、検出方法を部分的にまたは完全に自動化する。

【００８０】

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。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能率的に試験することが可能となり、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のリスクを低減することができる。しかしながら、自動化のより重要な点は、昼夜を問わず任意の時間に遅滞なく重要な結果を示すことができることである。いくつかの研究結果から、敗血症の原因となる有機体の同定を迅速化することが患者ケアの改善、病院滞在期間の短縮および全体的なコストの削減につながることが証明されている。

【００８１】

本発明による、微生物をキャラクタリゼーションおよび／または同定するための方法の更なる詳細及び詳述は、２００９年１０月３０日に出願された、継続中の米国特許出願第ｘｘｘｘｘ号および第ｘｘｘｘｘ号「Methods for Separation, Characterization and/or Identification of Microorganisms using Spectroscopy」および「Method of Separation, Characterization and/or Identification of Microorganiss using Mass Spectroscopy」にそれぞれ開示されている。これらの出願の内容は参照により本明細書に組み込む。

【００８２】

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後で具体的に説明する技法である。

【実施例】

【００８３】

［実施例１］

ラマン分光分析による血液培養からの微生物同定のための溶解‐遠心分離法

【００８４】

微生物を１０ｍＬのヒト血液を収容したＢａｃＴ／ＡＬＥＲＴ（登録商標）ＳＡ瓶に低接種原で「播種（seeded）」した。血液培養ブロス試料は、ＢａｃＴ／ＡＬＥＲＴ（登録商標）3D Ｍｉｃｒｏｂｉａｌ Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ Ｓｙｓｔｅｍにより陽性反応が出てから数分以内に瓶から取り出した。ブロス試料を処理して、血液由来の微生物と下記のような分析を阻害する恐れのある媒地成分とを分離した。

【００８５】

フレッシュな陽性血液培養由来の陽性ブロス４．０ｍＬを２．０ｍＬの溶解緩衝液（０．４５ｗ／ｖ％のＢｒｉｊ（登録商標）９７＋０．３Ｍ ＣＡＰＳ、ｐＨ１１．７）と混合し、５秒間渦混合し、次いで３７℃の水浴で９０秒間培養した。培養後、４つの１．５ｍＬ円錐遠心チューブのそれぞれについて、０．９５ｍＬの溶解物を０．５ｍＬの密度クッション（１０ｍＭのＨＥＰＥＳ（ｐＨ７．４）中 １４％ｗ／ｖ Ｉｏｈｅｘｏｌ、０．００５％ Ｐｌｕｒｏｎｉｃ Ｆ‐１０８）の表面上に積層した。その後、４つのチューブを全て、２５℃、１０，０００ｇで２分間遠心し、密度クッションを介して微生物を沈殿させた（ペレット化した）。溶解血液及び培地は、クッションの上部に留まった。

【００８６】

遠心サイクルの完了後、浮遊物を除去し、沈殿した（ペレット化した）各チューブ内の微生物を、１０μＬの純水で再懸濁した。４つのチューブ全てからの再懸濁した微生物を清潔なチューブに溜め、静かに混合した。各処理済み試料標本の量を調節して、最終的な懸濁液の光学密度６６０ｎｍ（$Ａ_{６６０}$）が２０／ｃｍに等しくなるようにした。処理済

み試料標本は、試験当日は２～８℃にて保存し、あるいは、分割して、その後の試験のために－７０℃で凍結保存した。

【００８７】

［実施例２］

ラマン分光法による、溶解‐遠心分離法を用いて陽性血液培養から処理した微生物片の分析

【００８８】

実施例１の手順に従って処理した標本を、（凍結の場合）３７℃で迅速に解凍し、静かに混合した。標本の一部は希釈せずにおき、残りを純水に1:2の割合で希釈した。希釈済み又は未希釈の標本を、それぞれ金コート顕微鏡スライドの第１表面に適用し、室温で乾燥させた。

【００８９】

乾燥後、各乾燥標本についてＲｘＮ１ラマン顕微鏡（Ｋａｉｓｅｒ　Ｏｐｔｉｃａｌ　Ｓｙｓｔｅｍｓ社、ミシガン州）によって、照射波長７８５ｎｍ、５×５グリッドパターンで、２５のスペクトルを取得した。顕微鏡は、４０倍対物レンズを備え、レーザー出力は４００ｍｗに設定し、そして、２５のスペクトルはそれぞれ蓄積時間５秒で取得した。

【００９０】

取得後、スペクトルを処理して、ダークサブトラクション、宇宙線アーチファクトの除去、スペクトルのトランケーション、基線減算、正規化、および異常値除去を多変量統計解析およびその準備のために実行した。

【００９１】

陽性血液培養液から回収された、選択された微生物の代表的なラマンスペクトルを、図１および２に示す。図１は、４種の微生物のスペクトル、すなわち、４つの単離Ｃ．ａｌｂｉｃａｎｓ、６つの単離Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ、１３の単離Ｅ．ｃｏｌｉ、および１３の単離Ｓ．ａｕｒｅｕｓのスペクトルである。明確な図示のため、４種それぞれのスペクトルについて平均化して示す。

【００９２】

これらの微生物に関して、種間における一貫した差異が一見して明らかである。つまり、処理後には、潜在的に不明りょうな質量は微生物の特徴スペクトルを得るのに十分な程度に除去されている。

【００９３】

図２は、図１では平均化して示した１３つの単離Ｓ．ａｕｒｅｕｓ質量スペクトルのそれぞれを示す図である。１３のスペクトルは、異なる血液提供者からの血液を異なる血液培養で培養した場合であっても、様々な臨床単離株についてのスペクトルが当該種の質量スペクトルに整合することを示す。

【００９４】

［実施例３］

ラマン分光法による、溶解-遠心分離法で陽性血液培養から処理された微生物標本の非侵襲分析

【００９５】

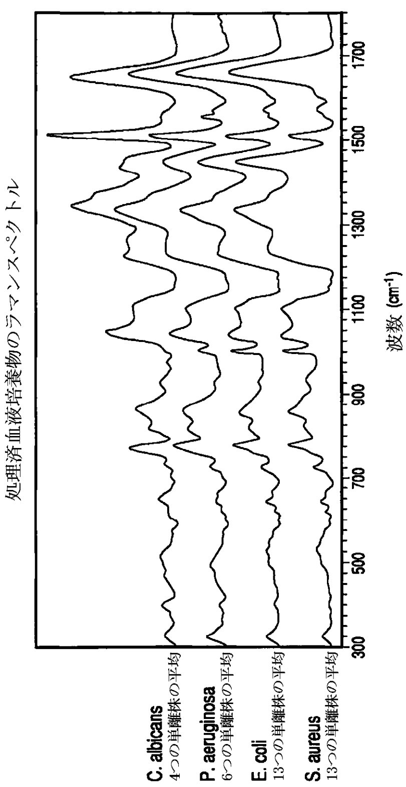
微生物を１０ｍＬのヒト血液を収容したＢａｃＴ／ＡＬＥＲＴ（登録商標）ＳＡ瓶に低接種原で「播種（seeded）」した。血液培養ブロス試料は、ＢａｃＴ／ＡＬＥＲＴ（登録商標）3D　Ｍｉｃｒｏｂｉａｌ　Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ　Ｓｙｓｔｅｍにより陽性反応が出てから数分以内に瓶から取り出した。以下のようにして試料を処理した。

１．　陽性ブロスの２．０ｍＬの試料を１．０ｍＬの選択性溶解緩衝液と混合し（０．４５ｗ／ｖ％のＢｒｉｊ（登録商標）９７＋０．３Ｍ　ＣＡＰＳ、ｐＨ１１．７）、次いで３７℃の水浴に１分間入れた。

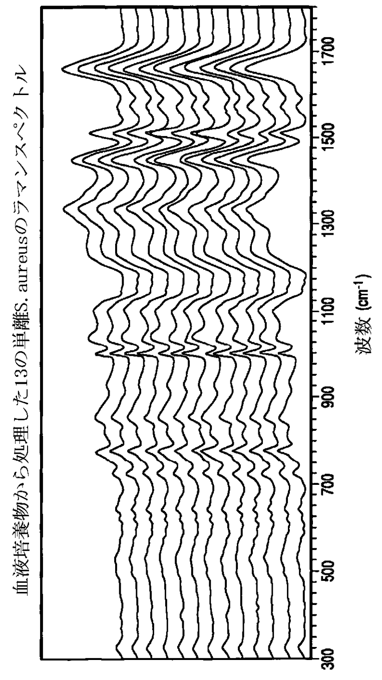
２．　溶解物の１．０ｍＬの試料を、特注の光学分離チューブに収容した０．５ｍＬの密度クッション上にオーバーレイした（１０ｍＭのＨＥＰＥＳ（ｐＨ７．４）中２４ｗ／ｖ％の塩化セシウム＋０．００５％のＰｌｕｒｏｎｉｃ　Ｆ‐１０８）。密度クッション

の表面上にポリプロピレンボールを配置することにより、これら２つの水相に外乱をもたらすことなく容易な充填を可能にした。
　３．　光学分離チューブをねじ蓋で封止し、１０，０００ｒｐｍで２分間遠心分離にかけた（Ａ－８－１１スウィングアウトローター（Ｅｐｐｅｎｄｏｒｆ社（ニューヨーク州））を装着したＥｐｐｅｎｄｏｒｆ（登録商標）５４１７Ｒマイクロ遠心分離機；図４参照）。
　４．　次いで、封止したチューブを特注のアダプタに移した。このアダプタは、ＲｘＮ１型ラマン顕微鏡（Ｋａｉｓｅｒ　Ｏｐｔｉｃａｌ　Ｓｙｓｔｅｍｓ　Ｉｎｃ．，　Ｍｉｃｈｉｇａｎ）による波長７８５ｎｍでの、チューブ基部の微生物ペレットの解析を容易にする。プラスチックの基線ラマンスペクトルを得るために、空の分離チューブについてもスペクトルを記録した。
【００９６】
　図３は、微生物ペレットを含むプラスチック分離チューブおよび含まないむプラスチック分離チューブから得られたラマンスペクトルを示す図である。このモードでは、スペクトルは、プラスチック自体由来のラマンバンドの影響を強く受けるが、微生物に特有のバンドは、波数１２２７／ｃｍ、１５８３／ｃｍ、１６６０／ｃｍ付近の微生物ペレットのスペクトルにのみ見られる。他の微生物バンドも存在するが、このスケールでは、より強いプラスチックバンドによって隠された。
【００９７】
　図４は、空のプラスチック分離チューブのスペクトルを差し引くことによってバックグラウンドを除去した後の、上述の微生物のラマンスペクトルを示す図である。バックグラウンド減算は１００％効果的ではないが、微生物のスペクトルバンドは明りょうに視認できるようになった。空間オフセットや透過などの、他の取得方法（geometry）は、バックグラウンド補償をさらに改善することができるであろう（米国特許出願公開第２００８／０１２９９９２号および第２００９／０２４４５３３号参照）。
【００９８】
　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。

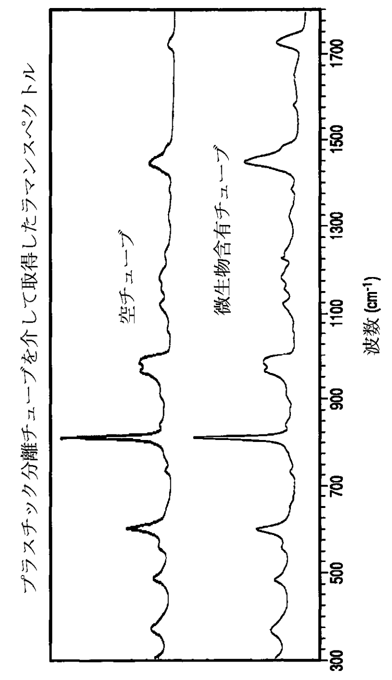
【図１】


処理済血液培養物のラマンスペクトル
C. albicans
4つの単離株の平均
P. aeruginosa
6つの単離株の平均
E. coli
13つの単離株の平均
S. aureus
13つの単離株の平均
300
500
700
900
1100
1300
1500
1700
波数 (cm-1)

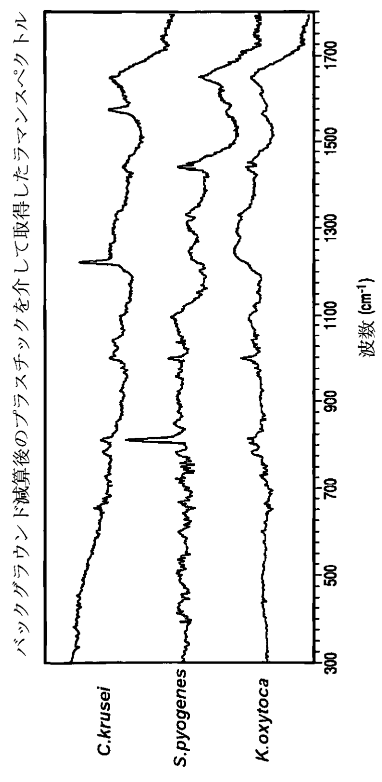
【図２】


血液培養物から処理した13の単離S. aureusのラマンスペクトル
300
500
700
900
1100
1300
1500
1700
波数 (cm-1)

【図３】


プラスチック分離チューブを介して取得したラマンスペクトル
空チューブ
微生物含有チューブ
300
500
700
900
1100
1300
1500
1700
波数 (cm-1)

【図４】


バックグラウンド減算後のプラスチックを介して取得したラマンスペクトル
C.krusei
S.pyogenes
K.oxytoca
300
500
700
900
1100
1300
1500
1700
波数 (cm-1)

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2009/005886

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. G01N21/65 C12M1/12 C12M1/34

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 C12M

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, BIOSIS, COMPENDEX, INSPEC

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2005/068647 A2 (BIO MERIEUX INC [US]; WALSH JOHN D [US]; HYMAN JONES M [US]) 28 July 2005 (2005-07-28) paragraphs [0012] - [0016] paragraphs [0020] - [0033]	1-26
X	JARVIS ROGER M ET AL: "Surface-enhanced Raman scattering for the rapid discrimination of bacteria" FARADAY DISCUSSIONS, ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY, CAMBRIDGE, GB, vol. 132, 1 January 2006 (2006-01-01), pages 281-292;DISCU, XP009100498 ISSN: 1359-6640 paragraphs [02.1] - [02.4]; figure 1	1-26

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] 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.
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
27 January 2010	15/02/2010

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Consalvo, Daniela

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2009/005886

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	POPP J ET AL: "Raman-Spectroscopy for a rapid identification of single microorganisms" PROCEEDINGS OF THE SPIE - THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR OPTICAL ENGINEERING SPIE - THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR OPTICAL ENGINEERING USA, vol. 6180, 2005, pages 618024-1, XP002565157 ISSN: 0277-786X	1,17-18
A	pages 618024-1, line 1 - pages 618024-4, last line; figure 2; table 1	2-16, 19-26
A	US 2002/086289 A1 (STRAUS DON [US]) 4 July 2002 (2002-07-04) paragraphs [0001] - [0008], [0033] - [0035] paragraphs [0198] - [0205]	1-26
A	NEUGEBAUER U ET AL: "Characterization of bacterial growth and the influence of antibiotics by means of UV resonance Raman spectroscopy" BIOPOLYMERS WILEY USA, vol. 82, no. 4, July 2006 (2006-07), pages 306-311, XP002565156 ISSN: 0006-3525 page 307, column 2, line 16 - page 309, column 1, last line; figure 1	1-26
A	BERNHARDT M ET AL: "DETECTION OF BACTERIA IN BLOOD BY CENTRIFUGATION AND FILTRATION" JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, vol. 29, no. 3, 1991, pages 422-425, XP002565155 ISSN: 0095-1137 page 423, column 1, line 7 - page 424, column 2, line 4; figure 1; tables 1-4	1-26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2009/005886

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2005068647 A2	28-07-2005	EP 1692512 A2	23-08-2006
US 2002086289 A1	04-07-2002	AU 783278 B2	06-10-2005
		AU 5740400 A	02-01-2001
		CA 2375390 A1	21-12-2000
		CN 1370242 A	18-09-2002
		EP 1190096 A1	27-03-2002
		JP 2003502059 T	21-01-2003
		NZ 515759 A	28-05-2004
		WO 0077260 A1	21-12-2000
		US 2003228599 A1	11-12-2003

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(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,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ブラッドフォード　クレイ
アメリカ合衆国　ミズーリ州　６３０１１　ワイルドウッド　ティンバー　リッジ　エステイツ　ドライブ　１７２３
(72)発明者 ジョーンズ　ヘイマン
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
(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　２７７１３　ダーラム　ウェリングハム　ドライブ　７０４
(72)発明者 サーマン　ソープ
アメリカ合衆国　ノースカロライナ州　２７７１２　ダーラム　リップスコム　ドライブ　６７１３
(72)発明者 クリストファー　ロンシック
アメリカ合衆国　ノースカロライナ州　２７７１７　ダラム　デューク　ホームステッド　ロード　２８１７

Ｆターム(参考) 2G043 AA01 AA06 BA16 BA17 CA03 EA03 JA01
4B063 QA18 QQ05 QR52 QS13 QX02