(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2005-519623
(P2005-519623A)

(43) 公表日 平成17年7月7日(2005.7.7)

(51) Int.Cl.⁷	F I	テーマコード (参考)
C12Q 1/18	C12Q 1/18	4B063

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 19 頁)

(21) 出願番号 特願2003-576646 (P2003-576646)
(86) (22) 出願日 平成15年3月13日 (2003.3.13)
(85) 翻訳文提出日 平成16年11月8日 (2004.11.8)
(86) 国際出願番号 PCT/US2003/007890
(87) 国際公開番号 WO2003/078654
(87) 国際公開日 平成15年9月25日 (2003.9.25)
(31) 優先権主張番号 60/364,232
(32) 優先日 平成14年3月13日 (2002.3.13)
(33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 504347348
クレイトン ユニヴァーシティー
アメリカ合衆国 ネブラスカ州 68178 オマハ ノース サーティース ストリート 601 スイート 1609

(74) 代理人 100082005
弁理士 熊倉 禎男

(74) 代理人 100084009
弁理士 小川 信夫

(74) 代理人 100084663
弁理士 箱田 篤

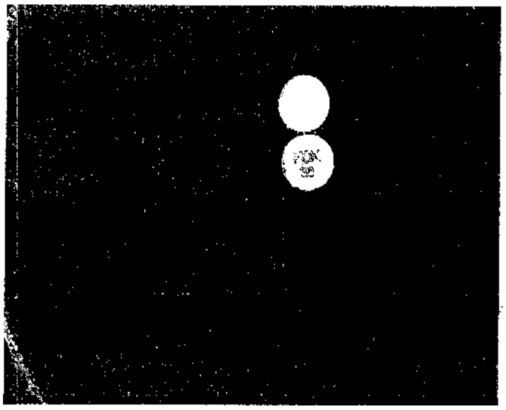
(74) 代理人 100093300
弁理士 浅井 賢治

(74) 代理人 100114007
弁理士 平山 孝二

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】抗生物質不活性化酵素を検出するための装置及び方法

(57) 【要約】
本発明は、以下の工程を含む微生物の抗生物質感受性の決定方法を提供する。まず、その感受性を決定すべき微生物の培養を、感受性を検定すべき抗生物質と、微生物の成長を阻害せずに微生物透過に有効な量で存在する前記微生物の透過剤と混合して検定培養を調製する。次に、この検定培養を、適切な培養条件下、かつ抗生物質に対する微生物の感受性を決定するのに十分な時間インキュベートする。別の局面では、本発明は、培養中の微生物の抗生物質感受性試験方法であって、感受性を検定すべき抗生物質と培養を混合する工程、及び抗生物質に対する微生物の感受性を決定するのに十分な時間培養をインキュベートする工程による抗生物質感受性試験方法において、前記培養を、微生物の成長を阻害せずに微生物透過に有効な量で存在する前記微生物の透過剤と混合する工程を含むことを特徴とする方法を提供する。



【特許請求の範囲】
【請求項１】
微生物の抗生物質感受性の決定方法であって、以下の工程：
ａ）その感受性を決定すべき微生物の培養を、感受性を検定すべき抗生物質と、微生物の成長を阻害せずに微生物透過に有効な量で存在する前記微生物の透過剤と混合して検定培養を調製する工程；及び
ｂ）前記検定培養を、適切な培養条件下、かつ前記抗生物質に対する前記微生物の感受性を決定するのに十分な時間インキュベートする工程；
を含む方法。
【請求項２】
前記透過剤がキャリヤー中に溶解又は分散している、請求項１記載の方法。
【請求項３】
前記透過剤が緩衝溶液である、請求項１記載の方法。
【請求項４】
前記緩衝溶液がトリス／ＥＤＴＡである、請求項３記載の方法。
【請求項５】
前記キャリヤーが固体キャリヤーである、請求項２記載の方法。
【請求項６】
前記固体キャリヤーが紙円盤である、請求項５記載の方法。
【請求項７】
前記キャリヤーが液体キャリヤーである、請求項２記載の方法。
【請求項８】
前記培養が固体増殖培地上で供給される、請求項１記載の方法。
【請求項９】
前記培養が液体増殖培地内で供給される、請求項１記載の方法。
【請求項１０】
前記培養が固体増殖培地上で供給される、請求項５記載の方法。
【請求項１１】
前記キャリヤーが固体キャリヤーであり、前記培養が固体増殖培地上で供給され、前記抗生物質が固体支持体上で供給され、かつ前記混合工程が、前記培養を、前記固体キャリヤーと、固体支持体上で供給された前記抗生物質と接触させることによる、請求項２記載の方法。
【請求項１２】
培養中の微生物の抗生物質感受性試験方法であって、感受性を検定すべき抗生物質と前記培養を混合する工程、及び前記抗生物質に対する前記微生物の感受性を決定するのに十分な時間前記培養をインキュベートする工程による抗生物質感受性試験方法において、前記培養を、微生物の成長を阻害せずに微生物透過に有効な量で存在する前記微生物の透過剤と混合する工程を含むことを特徴とする方法。
【請求項１３】
前記透過剤が緩衝溶液である、請求項１２記載の方法。
【請求項１４】
前記緩衝溶液がトリス／ＥＤＴＡである、請求項１３記載の方法。
【請求項１５】
前記透過剤がキャリヤー中に溶解又は分散している、請求項１２記載の方法。
【請求項１６】
前記キャリヤーが固体キャリヤーである、請求項１５記載の方法。
【請求項１７】
前記固体キャリヤーが紙円盤である、請求項１６記載の方法。
【請求項１８】
前記キャリヤーが液体キャリヤーである、請求項１５記載の方法。

【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
（関連出願に対するクロスレファレンス）
本出願は、2002年3月13日提出の米国仮出願番号60/364,232の優先権を主張する。
（連邦後援研究又は開発に関する陳述）
適用なし。
【背景技術】
【０００２】
（発明の背景）
臨床医及び獣医は、検査室の試験結果に基づいて感染の抗生物質治療を選択することが多い。抗菌物質又は抗生物質感受性試験として知られる検査室の試験は、感染を引き起こす微生物に対する抗生物質の阻害活性を決定する。ある抗生物質について抗生物質感受性試験が感染の治療に十分効力があることを示す場合、感染を引き起こす微生物はその抗生物質に“感受性である”と報告される。試験が治療の成功に十分な抗菌効力を欠いていることを示す場合、その微生物はその抗生物質に対して“耐性である”と報告される。他のカテゴリーの感受性、例えば“適度な感受性”又は“中間の感受性”が報告される試験もある。
【０００３】
現在利用可能な抗菌感受性試験の問題は治療の結果を確実に予測できないことである。時には、その微生物が検査室試験で抗生物質に感受性であるにもかかわらず、その抗生物質では感染の治療に失敗することもある。すなわち、現在の日常的な検査室試験は誤りを導くことがあり、抗生物質の治療可能性について楽観的すぎる印象を与える。従って、これら試験は患者に効果のない治療を与えうる。重症な感染では、この現在の検査室試験の不十分さが致命的な結果をもたらしかねない。
【０００４】
抗生物質感受性試験に基づいて開始される抗生物質治療の失敗には多くの理由がある。そのいくつかは患者関連要因を含む。いくつは病原関連要因を含む。しかし、１つの説明は、抗生物質感受性試験自体の欠陥から生じる誤りである。当該欠陥は、現在の日常的な抗生物質感受性試験が、いくつかの微生物の抗生物質不活性化の可能性を検出しないことである。いくつかの微生物は抗生物質を不活性化する酵素を産生する。このタイプの最もよく知られている酵素はβ-ラクタマーゼであり、特定の細菌が産生してβ-ラクタム抗生物質を不活性化する。このような酵素は、日常的な抗生物質感受性試験で確実には検出されず、患者の感染部位で抗生物質を十分に不活性化して治療を失敗させうる。
【０００５】
プラスミド媒介AmpCβ-ラクタマーゼは、最初1980年代に報告された。Bauernfeind, A., Y. Chong及びS. Schweighart 1989。セファマイシンに対する耐性を含むクレブシエラ-ニューモニエ(Klebsiella pneumoniae)内の拡張された広いスペクトルβ-ラクタマーゼ. Infection. 17:316-321。それらは、プラスミド上への誘導性AmpCβ-ラクタマーゼ用染色体遺伝子の伝達の結果として生じた。これら酵素は、大腸菌、K. ニューモニエ、K. oxytoca、サルモネラ spp.、Citrobacter freundii、Enterbacter aerogenes、及びProteus mirabilisの分離培養(isolates)内で報告されている。この遺伝子は典型的には耐性遺伝子をコードする他の抗生物質を含有する大きいプラスミド上でコードされ、ほとんど治療選択の自由を残さない。プラスミド媒介AmpCβ-ラクタマーゼが発見されてから10年以上経つが、多くの臨床検査室や医師はその臨床的な重要さに気づかないままである。結果として、プラスミド媒介AmpCβ-ラクタマーゼが検出されないことが多い。検出せずには感染患者の正しい治療は与えられない。
【０００６】
現在、プラスミド媒介AmpCβ-ラクタマーゼの検出のNCCLS推薦はない。三次元試験を用いてこれら酵素を検出している。しかし、この試験は技術的に要求されており、これはそ

の広範な採用を除外している。現在、多重PCRもプラスミド媒介AmpCβ-ラクタマーゼの検出の調査手段として利用可能であるが、臨床検査室の日常的な試験としてはまだ利用できない。Perez-Perez FJ, Hanson ND 2002. 多重PCRを用いた臨床的分離培養におけるプラスミド媒介AmpCβ-ラクタマーゼ遺伝子の検出. J Clin Microbiol. 40(6):2153-62。

【０００７】

現在使用されている抗生物質感受性試験は、抗生物質の抗菌活性を測定するだけで、抗生物質を不活性化させる微生物の能力は測定しないので、この治療結果の非常に重要な決定因子を考慮し損なっている。試験におけるこの欠陥が臨床医を感染患者の最適な抗生物質の選択で不利にさせている。

要約すると、抗生物質の抗菌活性に加え、抗生物質を不活性化する微生物の能力の両方についての情報を臨床医に提供する抗生物質感受性試験が要望されている。このような試験は、感染患者の抗生物質治療を選択するとき、臨床医による治療的意思決定の質を向上させるだろう。

【０００８】

抗生物質感受性は、円盤拡散又は抗生物質希釈法、或いはこれら２つの方法から誘導される方法によって日常的に決定される。円盤拡散法では[例えば、Bauer,A.W.ら, American Journal of Clinical Pathology. 45:493-496(1966)；Bell, S. M., Pathology. 7:Suppl 1-48(1975)；Stokes, E. J.ら, Association of Clinical Pathologists Broadsheet, No. 55(改訂)(1972)参照]、標準的な量の原因微生物を適切な培養基（以後寒天と称する）の表面上に均一に広げる。そして、指定量の選択した抗生物質を含浸させた数枚のろ紙円盤を寒天表面上に置く。寒天を適切な時間適切な温度でインキュベートする。インキュベーションの間、抗生物質は円盤から寒天中に拡散し、抗生物質が微生物の成長を阻害する領域内を除いて微生物が寒天の表面上で成長する。成長の阻害は、抗生物質円盤周囲の寒天上の成長しないクリアゾーン（阻害ゾーン）として検出される。阻害ゾーンの大きさを測定かつ確立した解釈上の基準と比較して抗生物質に対する微生物の感受性又は耐性を決定する。

【０００９】

希釈法は、固体寒天上又は液体ブロス内の抗生物質感受性を試験する。[National Committee for Clinical Laboratory Standards 1997. 好気的に成長する細菌の希釈抗菌感受性試験の方法. 承認規格M7-A4. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, PA.]希釈法では、一定量の微生物接種材料を種々の濃度の抗生物質を含有する一連のブロスの管又はウェル中に（又は１種以上の寒天プレート上に）導入する。適切な時間インキュベーション後、ブロス（又は寒天）試料を調べ、微生物の成長を検出できる程度に妨げる抗生物質の最低濃度を記録する。この濃度が該抗生物質の最小阻害濃度（MIC）である。

【００１０】

円盤拡散法も希釈法も一般に抗生物質を不活性化する微生物の能力についての情報を与えないという点で不十分である。

細菌の抗生物質不活性化酵素を検出する種々の技術が科学文献に報告されている。いくつかの技術は、特異的な抗生物質不活性化酵素（例えば、β-ラクタマーゼ）の活性を検出するために使用されているが、他の技術は特異的でなく、２分類以上の抗生物質を不活性化する酵素を検出する。以下は、細菌の抗生物質不活性化酵素を検出するために使用される典型的な試験である。

【００１１】

クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ検出用の特定試験は、Chauchereau, A.ら, Analytical Biochemistry. 188:310-316(1990)でレビューされている。これらはクロラムフェニコールの酵素的不活性化を検出するための複雑な試験であり、特定波長における光の吸収を測定するか、又は放射能を測定できる特別な計器を必要とする。このような試験は、抗生物質感受性試験ではなく、その複雑さのため日常的な臨床微生物検査室には適さない。

【００１２】
黄色ブドウ球菌(Staphylococcus aureus)によるβ-ラクタマーゼの産生は、ペニシリン抗生物質円盤周囲の阻害ゾーンの独特な盛り上がり縁の生成によって推測される。Gill, V. J.ら, Clin. Microbiol. 14:437-40(1981)。多タイプの細菌によるβ-ラクタマーゼ産生もニトロセフィン(nitrocefin)のような指標物質で細菌を化学的に試験することで検出することができる。Oberhofer, T. R.ら, J. Clin. Microbiol. 15:196-9(1982)；O'Callaghan, C. H.ら, A.A.C. 1:283-288(1972)。これら試験は、黄色ブドウ球菌、表皮ブドウ球菌(Staphylococcus epidermidis)、モラクセラカタラーリス(Moraxella cartarrhalis)、ナイセリア(Neisseria)及びヘモフィリス(Haemophilus)種の特定タイプのペニシリン抗生物質に対する唯一の信頼できる指標である。それらは、他のいずれの細菌のこれらペニシリンに抵抗する可能性も予測せず、かつセファロスポリン、セファマイシン、モノバクタム、モノカルバム(monocarbams)、ペネム(penems)又はカルバペネム(carbapenems)のような他分類のβ-ラクタム抗生物質のいずれかに耐性のいずれの細菌の可能性も予測しない。要するに、これらは、限定した範囲の有用な試験である。β-ラクタム抗生物質の試験では、すべてのβ-ラクタマーゼのすべてのβ-ラクタム抗生物質に対する活性を検出するためにはさらに包括的な試験が必要である。

【００１３】
円盤拡散試験は、プレインキュベーション手順によって変更して、黄色ブドウ球菌由来のβ-ラクタマーゼのβ-ラクタム抗生物質を不活性化する能力を決定することができる。Lacey, R. W.及びA. Stokes, J Clin Pathol. 30:35-9(1977)。この手順では、該試験の解釈上の基準を較正した場合より小さい阻害ゾーンとなる。その結果、プレインキュベーション手順は抗生物質の感受性又は耐性の決定に必要な解釈上の表を無効にする。これは、有効な解釈上の基準を欠くこの手順に基づく基本療法に反するので重大な欠陥である。

【００１４】
クローバーの葉試験[Andremont, A.ら, Proceedings Reunion Interdisciplinaire de Chimiotherapie Antiinfectieus. Societe francaise de Microbiologica, Paris:50(1982)；Kjellander, J.ら, Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica. 61:494(1964)]はβ-ラクタマーゼの検出に用いる特有の方法であり、２つの他タイプの抗生物質不活性化酵素、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼとエリスロマイシンエステラーゼを検出することも主張されている。この試験は、抗生物質感受性試験ではなく、追加手順として設定しなければならない。これは不便であり、それゆえ不利である。さらに、この手順で得られる結果の妥当性について疑いがある。Jorgensen, P. E., Chemotherapy. 31:95-101(1985)；Reig, M.ら, European journal of Clinical Microbiology. 3:561-562(1984)。

【００１５】
セフォキシチン誘導試験[Sanders, C. C.及びW. E. Sanders, Jr., A.A.C. 15:792-797(1979)]は、特定タイプの細菌性β-ラクタマーゼ、ブッシュ(Bush)群１の誘導性AmpCβ-ラクタマーゼを検出するための特有の手順である。Bush, K.ら, A.A.C. 39:1211-1233(1995)。この試験は全タイプのβ-ラクタマーゼを検出せず、かつクローバーの葉試験と同様に補助的な抗生物質感受性試験に使用できる特別な手順である。それ自体、抗生物質感受性試験でない。

【００１６】
二重円盤相乗試験（及びその誘導試験）は、セフォタキシム、セフトリアキソン、セフロキシム、セフタジジム、セフェパイム(cefepime)又はアズトレオナム(aztreonam)を含有する円盤から20～30㎜にアモキシシリン／クラブラネート(clavulanate)又はチカルシリン／クラブラネート円盤を寒天プレート上に戦略的に置くことを含む。従って、腸内細菌科の株が拡張スペクトルβ-ラクタマーゼとして知られる特定タイプのβ-ラクタマーゼを産生するかを決定できる。Brun-Buisson, C.ら, Lancet. ii:302-306(1987)。この試験は、β-ラクタマーゼインヒビター、クラブラネートの拡張スペクトルβ-ラクタマーゼを阻害し、かつそれが試験でセファロスポリン又はアズトレオナム抗生物質を不活性化する

のを妨げる能力に基づく。これは日常的な抗生物質感受性試験ではない特別な手順であり、特定タイプのβ-ラクタマーゼのみを検出する。従って、不便かつ範囲が限定される。

【００１７】

種々の円盤及び希釈試験は、二重円盤試験の原理から誘導された。Brown, D. F.ら, J. Antimicrob. Chemother. 46:327-8(2000)；Cormican, M. G.ら, JCM. 34:1880-1884(1996)；Ho, P. L.ら, JAC. 42:49-94(1998)；Moland, E. S.ら, JCM. 36:2575-9(1998)；Sanders, C. C.ら, JCM. 34:2997-3001(1996)；Schooneveldt, J. M.ら, Pathilogy. 30:164-8(1998)；Thomson, K. S.ら, Antimicrob. Agents Chemother. 43:1393-400(1999)。すなわち、それらはβ-ラクタマーゼインヒビターの拡張スペクトルβ-ラクタマーゼを阻害する能力を利用して、このタイプのβ-ラクタマーゼを検出する。

【００１８】

３次元試験[Thomson, K. S.ら, J. Antimicrob. Chemother. 13:45-54(1984)；Thomson, K. S.及びC. C. Sanders, A.A.C. 36:1877-1882(1992)；米国特許第5,466,583号]は、改良型抗生物質感受性試験の要求を部分的に満たす。

３次元試験の直接型の実施では、円盤拡散試験の実施で通常の様式で寒天プレートの表面上に標準的な量の原因微生物を均一に広げる。しかし、抗生物質円盤を寒天の表面上に置く前に、３次元接種を行う。これは、無菌メスを用いて、抗生物質円盤を置く予定の一面に寒天中に３mmのスリットを刻むことによって行われる。試験微生物の濃密な液体接種材料をスリット中に分配し、抗生物質円盤をスリットから３mmの寒天上に置き、試料をインキュベートする。

インキュベーション後、阻害ゾーンを標準的な手順で測定して円盤拡散試験の解釈上の基準に従って試験抗生物質に対する該微生物の感受性又は耐性を決定する。しかし、これに加え、３次元接種材料の阻害ゾーンの縁との交差を調べることで抗生物質の酵素的不活性化を検出することができる。抗生物質不活性化の結果、通常円形の阻害ゾーンが歪み或いは不連続になる。（以後、これら歪み又は不連続性を“３次元効果”と称する。）

【００１９】

従って、３次元試験は微生物の抗生物質に対する感受性又は耐性のみならず、微生物の抗生物質を不活性化する能力をも検査室が臨床医に報告することを可能にする。仮想の例として、従来の抗生物質感受性試験は微生物が２つの抗生物質、セファクロルとセフォキシチンに感受性であることを示しうるが、３次元試験は、微生物がセファクロルは不活性化できるがセフォキシチンは活性化できない酵素を産生することを示すためのさらなる情報を提供しうる。従って、従来の試験は両抗生物質が同等に効き目があるようだと示すが、３次元試験によって提供されるさらなる情報からは、患者内ではセフォキシチンだけが不活性化されないので、セファクロルよりも有効な治療を構成すると思われる。この例では、３次元試験で提供される情報は、臨床医が治療のより良い選択をするのを助けることができる。

【００２０】

３次元試験の直接形態に加え、阻害ゾーンが小さいか又は存在しない場合、或いは調査又は診断法として微生物を試験するためには間接形態を使用する。間接試験は、大腸菌ATCC 25922のような完全に感受性の検定株を寒天の表面に接種することで行う。この後、３次元スリットを寒天中に刻み、試験微生物の懸濁液を接種する。間接試験は抗生物質感受性の同時測定を除外するが、それは試験の直接形態で試験を行う場合、３次元結果を生成するには阻害ゾーンが小さすぎる微生物の抗生物質不活性化酵素の調査を可能にする。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【００２１】

３次元試験にはいくつかの問題がある。この問題としては、以下のものが挙げられる。

ａ．３次元試験のために寒天中にスリットを作る手順は不便であり、かつ正確に行うことは技術的に難しい。

ｂ．病原菌で汚染されたメス刃は感染要因なので、スリットを作ることは検査室職員を

危険にさらす可能性がある。

ｃ．また、液体３次元接種材料をスリットに入れすぎて試験を無効にすることなく、正確にスリット内に供給することは技術的に困難である。

【００２２】

微生物の膜を破壊又は透過し、それによってその透過性を高めかつ細胞の中身を損失させるための種々の化学薬品が報告されている。これらとしては、特定の抗生物質、洗浄剤、キレート剤、ポリカチオン、疎水性染料、及び酵素が挙げられる。Nikaido, H.及びM. Vaara, Microbiol Rev. 49:1-32(1985)；Piers, K. L.ら，Antimicrob. Agents Chemother. 38:2311-2316(1994)。これら化学薬品は、普通の用途では静菌性及び／又は殺菌性であることが多い。

【課題を解決するための手段】

【００２３】

（発明の簡単な概要）

一局面では、本発明は、以下の工程を含む微生物の抗生物質感受性の決定方法を提供する。まず、その感受性を決定すべき微生物の培養を、感受性を検定すべき抗生物質と、微生物の成長を阻害せずに微生物透過に有効な量で存在する該微生物用の透過剤とを混合して検定培養を調製する。次に、この検定培養を適切な培養条件下、かつ前記抗生物質に対する前記微生物の感受性を決定するのに十分な時間インキュベートする。

【００２４】

好ましくは、透過剤はキャリヤーに溶解又は分散している。キャリヤーは固体キャリヤーでよい。好ましい固体キャリヤーは紙円盤である。代わりに、キャリヤーは液体キャリヤーでよい。

一実施形態では、透過剤は緩衝溶液である。好ましい緩衝溶液はトリス/EDTAである。

別の実施形態では、培養は固体増殖培地上で供給される。代わりに、培養は液体増殖培地内で供給される。

さらなる実施形態では、キャリヤーが固体キャリヤーであり、培養が固体増殖培地上で供給され、抗生物質が固体支持体上で供給され、かつ混合工程が、培養を固体キャリヤーと、固体支持体上で供給された抗生物質と接触させることによって行われる。

【００２５】

別の局面では、本発明は、培養中の微生物の抗生物質感受性試験方法であって、感受性を検定すべき抗生物質と前記培養を混合する工程、及び前記抗生物質に対する前記微生物の感受性を決定するのに十分な時間前記培養をインキュベートする工程による抗生物質感受性試験方法において、前記培養を、微生物の成長を阻害せずに微生物透過に有効な量で存在する前記微生物の透過剤と混合する工程を含むことを特徴とする方法を提供する。

好ましくは、透過剤は緩衝溶液である。好ましい緩衝溶液はトリス/EDTAである。

一実施形態では、透過剤はキャリヤー中に溶解又は分散している。キャリヤーは固体キャリヤーでよい。好ましい固体キャリヤーは紙円盤である。代わりに、キャリヤーは液体キャリヤーでよい。

【発明を実施するための最良の形態】

【００２６】

図１は、セフォキシチン円盤周囲の歪みゾーンのクローズアップを示す。

図２は、本発明の一実施形態を示す。ここで、本発明の方法の間接形態が示され、５種の試験微生物と負対照の生物を試験する。この検定法では、完全に感受性の株大腸菌ATTC 25922を芝生培養として用い、試験微生物と対照微生物によって産生される不活性化因子について検定した。３種の商業的に製造されたセフォキシチン円盤（標識化FOX 30）を試薬試験円盤で一括して扱う。試験又は対照生物を各試薬円盤に塗布後、セフォキシチン円盤の近位に置いた。阻害ゾーン縁の強いへこみは、円盤内で透過剤に遭遇して起こる試験微生物から放出された不活性化因子によるセフォキシチンの不活性化を示している。負対照は歪みがない（上部セットの３円盤の最下部円盤は12時の方向を向いている）。弱い正試験は９時に最も近い円盤で起こった（阻害ゾーン縁のわずかな扁平化又は鈍化として示

される）。この結果は、以前にセフォキシチン不活性化β-ラクタマーゼの低レベル産生株であると決定されたクレブシエラニューーモニエ(Klebsiella pneumoniae)の株で得られた。（この株は、この特定の抗生物質不活性化因子用試料の検出感受性の許容限界と関連する品質管理株として有力な候補である。）

図３は、クレブシエラのペニシリン耐性株によるセフォキシチンの酵素的不活性化を実証する３次元試験を示す。

図４は、図２について上述したとおりの本発明の実施形態を示すが、１つのセフォキシチン円盤だけを示す。図４の“ポジティブ”と記される部分は、本発明の透過剤の歪んだ阻害ゾーンを示す。図４の“ネガティブ”と記される部分は、透過剤を持たない対照試薬円盤が抗生物質円盤の近位に置かれる場合に歪みがないことを示す。

【００２７】

（発明の詳細な説明）

本発明は、透過剤の存在下で微生物をインキュベートすることによって、微生物の細胞壁及び／又は細胞膜の透過性を高めることに基づく微生物の抗生物質感受性を決定する新規な方法を提供する。この透過剤は、好ましくは該微生物を殺しもせず、その複製能力を有意には阻害しないが、それにもかかわらず該微生物を透過する。理論に束縛されたくないが、適切な濃度の透過剤の存在は、該微生物からの抗生物質不活性化因子（例えば、酵素）の遊離又は放出を高めることができると考えられる。このような抗生物質不活性化因子の遊離又は放出は、微生物がその放出された因子で不活性化される抗菌剤の存在下で成長することを可能にする。

【００２８】

別の局面では、本発明は、抗生物質不活性化酵素のような抗生物質不活性化因子の存在を決定する新規な方法であって、以下の工程を含む方法を提供する。まず、抗生物質不活性化因子を産生し又は遊離させると推測される微生物の培養を、該抗生物質不活性化因子が不活性化できる抗生物質と、微生物の成長を阻害せずに微生物透過に有効な量で存在する該微生物の透過剤と混合して検定培養を調製する。次に、この検定培養を適切な培養条件下、かつ該抗生物質を不活性化できる微生物によって産生され又は遊離させられた抗生物質不活性化因子の存在を決定するために十分な時間インキュベートする。

【００２９】

透過剤を使用し、抗生物質不活性化因子の遊離又は放出を促すことによって、そうでなければ誤って試験抗生物質に対して感受性であると記録したであろう抗生物質耐性微生物を検出できることが分かった。驚くべきことに、該微生物は、微生物にとって普通は致死的であるか、或いは微生物の成長を阻害する透過剤の存在下で成長することができる。

【００３０】

一局面では、本発明は、微生物の成長を阻害せずに微生物透過に有効な量の透過剤の使用を含む。本明細書の他の箇所でさらに詳述するように、透過剤の成長を阻害しない量を決定することは、その有意に微生物の成長を阻害する能力についての該透過剤の滴定を含む日常的実験事項である。同様に、透過剤の微生物透過に有効な量の決定は、試験微生物の既知の抗生物質耐性株からの抗生物質不活性化因子の遊離によってのような、微生物を透過するその能力についての該透過剤の滴定を含む日常的実験事項である。

【００３１】

本明細書で述べる量の透過剤を、抗生物質に対するその感受性を決定すべき微生物の培養と混合する。代わりに、混合を行って１種以上の抗生物質不活性化因子を生成又は遊離させる該微生物の能力を決定する。培養は、技術的に周知の方法、例えば、該微生物の接種材料（臨床試料由来のような）を適切な増殖培地中に導入することによって調製する。増殖培地は、Luria又はMeuller-Hintonブロスのような液体増殖培地でよく、或いは必要な栄養物で補充した寒天プレート、例えばMuller-Hinton寒天プレートのような固体増殖培地でよい。

【００３２】

培養を調製したら、検定すべき１種以上の抗生物質（抗菌剤）と微生物を混合する。抗

生物質不活性化因子を作り又は排出するその能力について微生物を検定する場合、検定用の対照を与えるためと、不活性化因子自体の産生又は遊離を促すための両方で抗生物質の存在が必要である。抗生物質は、微生物による抗生物質不活性化因子の産生を惹起又は促進するために必要とされうる。抗生物質の非存在下では、微生物は必ずしも抗生物質不活性化因子を作り、維持し、隔離し、又は遊離させる必要がない。

【００３３】

抗生物質感受性検定法については本明細書の別の箇所で述べるが、本発明用に適合できるような検定法について限定することを意図しない。培養は、透過剤とも混ぜる。

必要な場合、抗生物質又は透過剤のどちらかがないか、或いは両方ない対照培養を同様の条件下で調製することができる。本明細書の他の箇所で述べるように、液体増殖培地及び液体キャリヤー中の透過剤と混合する場合、検定すべき抗生物質の段階希釈は液体増殖培地内で調製される。対応する試料を液体キャリヤー中で透過剤と共に或いは透過剤なしで混合する。透過剤の非存在下、特定の抗生物質希釈で抗菌活性を示すが、透過剤の存在下、当該希釈で効力がない抗生物質は、該微生物が当該抗生物質を不活性化する因子を遊離させることに基づき、その検定微生物に対して無効とみなされる。

【００３４】

このようにして調製した培養を適切な培養条件下かつ問題の抗生物質（１つ又は複数）に対する該微生物の感受性を決定するのに十分な時間インキュベートする。例えば、寒天プレートを環境的に制御したインキュベーター内で12～18時間、摂氏35度でインキュベートすることができる。液体培地内の培養は、作業台上、振とう水浴内で12～18時間、摂氏35度でインキュベートすることができる。適切な培養条件と十分な時間は、当業者には周知である。

【００３５】

述べたように、透過剤は、液体又は固体キャリヤー内で供給され、その中に分散又は溶解しうる。例えば、緩衝溶液のような液体透過剤の場合、緩衝溶液はそれ自体液体キャリヤー内にある。代わりに、本発明の方法で使用するため、洗浄剤を水性媒体、又は増殖ブロス内に分散させることができる。

【００３６】

別の局面では、透過剤が固体支持体上で供給される。例えば、緩衝溶液を１枚のろ紙のような固体支持体上に含浸させることができる。ろ紙を放置して乾燥させ、透過剤を固体キャリヤー上に分散させる。

一実施形態では、含浸円盤を抗生物質感受性検定で用い、その抗生物質感受性を測定する微生物を、該微生物を殺さず、或いは有意にはその成長を阻害せずに透過させる。これら含浸円盤の調製で使用する透過剤の適切な量（濃度）を決定して、微生物を殺さず或いはその成長を阻害せずに、微生物からの抗生物質不活性化因子の遊離を達成することができる。

【００３７】

本発明は、円盤拡散法又は他の抗生物質感受性決定法によって抗菌剤（本明細書では抗生物質と呼ぶこともある）に対する微生物の感受性を評価する検査室試験で提供される情報量を増やすように設計される。この発明は、微生物の抗生物質を不活性化する能力を日常的に検出するための手段を提供する。この情報は、感染症の治療用の適切な抗感染療法の選択、微生物についての疫学的情報の提供、抗生物質の研究、及び遺伝学及び酵素学のような他の分野の生物学的研究で役に立ちうる。

【００３８】

好ましい実施形態では、本発明は、細菌又は他の微生物からの抗生物質不活性化酵素の放出を促す化学薬品のような薬剤を含浸させたろ紙円盤を供給することを含む。この化学薬品を含浸させたろ紙円盤は、本明細書では試薬円盤と呼ぶことがある。典型的に、試薬円盤中の薬剤は、細菌のような微生物の外膜、又は外膜と細胞質膜の両方を破壊して該微生物内から抗生物質不活性化酵素を放出する透過剤である。本発明の好ましい方法では、透過剤を含浸させた円盤を供給する。

【００３９】
　好適な増殖培地含有寒天プレートに試験微生物（例えば、臨床試料、又は抗生物質感受性を決定すべき細菌株）の芝生を接種する。抗生物質含浸円盤を微生物の芝生上に置く。供給された試薬円盤上にさらに試験微生物を接種し、問題の抗生物質円盤に隣接するが接触しない寒天上に当該試薬円盤を置く。寒天プレートを技術的に周知の方法に従ってインキュベートする。インキュベーション後、結果を以下のように解釈する。抗生物質の酵素的不活性化は、試薬円盤近傍の阻害ゾーンの縁を調べることによって検出できる。抗生物質不活性化の結果、通常は円形の阻害ゾーンに歪みが生じる。この歪みの存在は、試験微生物が抗生物質不活性化因子を産生できることを示す。臨床的な見方から、ゾーンの歪みを示す抗生物質の使用は、試験微生物による感染の治療には禁忌を示されるだろう。
【００４０】
　本発明の好ましい実施形態は上述したとおりであるが、本発明は当該実施形態に限定されないことを理解すべきである。ろ紙ストリップ、ニトロセルロース片、又は他のキャリヤーのようなろ紙円盤以外の他の固体キャリヤーを媒体として用いて微生物と試薬との間の接触を達成することができる。Ｅ試験[Brown, D. F. J.及びL. Brown, J. Antimicrob. Chemother. 27:185-190(1991)]、又は希釈法のような、円盤拡散試験以外の試験方法論も、本発明の精神と範囲から逸脱することなく、抗生物質不活性化酵素の検出用に変更することができる。
【００４１】
　別の局面では、本発明は、本明細書の他の箇所で論じた抗生物質感受性試験法によって例示されるように、培養中微生物の抗生物質試験の改良方法を提供する。改良点は、培養の成長を有意には阻害しないが、該微生物の透過には有効な量の本発明の透過剤と培養を混合する工程を含む。
【００４２】
　さらなる実施形態では、本発明は、阻害ゾーンが小さいか又は無い場合、或いは研究又は診断法として微生物を試験するための間接形態を含む。間接形態の試験は、寒天の表面に、大腸菌ATCC 25922のような完全に抗生物質感受性の検定株を接種して行う。この後、この供給された試薬円盤に試験微生物（例えば、臨床用分離培養）の懸濁液を接種し、原因生物の代わりに寒天の表面上で検体株が成長することを除き、上述したように試験を行う。本発明の方法の間接形態は、抗生物質の感受性の同時決定は除外するが、該試験を直接形態の試験で行った場合、阻害ゾーンが小さすぎて結果が得られない微生物の抗生物質不活性化酵素の調査を可能にしうる。
【００４３】
　本発明で有用な典型的な透過剤としては、微生物の細胞壁及び／又は細胞膜の透過性を高めるが、検定微生物の成長又は再生を有意には阻害しない量又は濃度で存在する当該薬剤が挙げられる。当業者には周知なように、すべての微生物が細胞壁と細胞膜を両方とも持っているわけではなく、さらに、細胞壁と細胞膜を両方とも有する当該微生物は構造的に同一の壁又は膜を持っていない。例えば、細菌はその細胞壁／細胞膜構造に基づいてグラム陽性又はグラム陰性と広く分類されている。本発明で有用な透過剤は、好ましくは抗生物質不活性化因子が細胞から遊離されるように細胞表面構造（細胞壁又は細胞膜、或いは両方）を透過する。しかし、透過剤は微生物を殺さず、或いはその成長を有意には阻害しないことも好ましい。
【００４４】
　特有の典型的な透過剤としては、以下のものが挙げられる。
　塩化ナトリウム(NaCl)、塩化マグネシウム(Mg_2Cl)、塩化カリウム(KCl)等のような無機塩；
　塩化ベンザルコニウム(BAC)、塩化セチルピリジウム、塩化3-(トリメトキシシリル)プロピルジメチルオクタデシルアンモニウム等のような四級アンモニウム化合物；
　トリス/EDTA(TE)緩衝液、NaCl/トリス/EDTA(STE)緩衝液、グルコース/トリス/EDTA(GTE)緩衝液等のような緩衝溶液；

グルコース、デキストロース、スクロース、フルクトース、ラクトース等を含む糖溶液のような低浸透圧性又は高浸透圧性薬剤；

ピペラシリン、アズトレオナム、アムジノシリン、セフタジジム、ポリミキシンB、ポリミキシンBノナペプチド、又はゲンタマイシン等のような抗生物質；

Blind Brite™、Maxaquin™、HyVee Glass Cleaner™、Life Tree™、Rave™、Dawn™等のような商業的に入手可能な洗浄剤又は界面活性剤含有薬剤；

Isoclean™濃縮物、Sight Savers™レンズクリーナー、Wash™(グリーンハンドウォッシュ)、Micro Lab Cleaning Solution™、Jet Clean™試験管クリーナー、Limonene™等のような他の商業的に入手可能な物質；

TritonX-100™、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、アセトンと混合したSDS(5%)、Sarcosyl™、アセトンと混合したSarcosyl™、Tween™(ポリソルベート)80、アセトンと混合したTween™80、Tween™85、Brij™56、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ダンシルポリミキシン等のような他の界面活性剤及び／又は洗浄剤；

他の典型的な透過剤としては、CHAPS(3-[(3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパンスルホネート)電気泳動試薬、≦10mM(Sigma cat # C-9426)、乳酸、及びヘキサメタリン酸ナトリウム(ポリリン酸ナトリウム)(キレート剤)が挙げられる。

セクロピン(cecropins)(カチオン性ペプチド)、メリチン(melittin)(カチオン性ペプチド)、バクテネシン(bactenecin)、マガイニン(magainins)(カエル宿主防衛ペプチド)、タクプレシン(tachyplesins)(カチオン性ペプチド)、ポリフェムシン(polyphemusins)(カチオン性ペプチド)のような天然ペプチド、及び合成ペプチド等も好ましい透過剤として使用できる。

【００４５】

好ましい透過剤は、Sigma-Aldrichから商業的に入手可能なトリス/EDTA(TE)緩衝液（カタログ番号T-9285）である。供給時、TE緩衝液は100倍濃度で、1.0モルのトリス-HCl（pH約8.0）と0.1モルのEDTAから構成される。好ましくはTE緩衝液を100ミリモル、200ミリモル、0.5モル、１モル又は10モル濃度で円盤上に置く。さらに好ましくは、TE緩衝液を100倍、50倍、25倍及び10倍濃度で円盤上に置く。特定透過剤の最適濃度の決定方法は、本明細書の他の箇所で与えられる。

【００４６】

本明細書の他の箇所で記述されるように、透過剤は、好ましくは微生物内から当該微生物の成長を有意に阻害せずに抗生物質不活性化因子を放出させ、或いは放出を促進する。透過剤の微生物から抗生物質不活性化因子を遊離又は放出させる能力は、例えば、酵素のような放出される抗生物質不活性化因子の量の定量化によって決定できる。このような定量化は、例えば、基質としてニトロセフィン又はセファクロルを用いる分光光度的加水分解検定法で決定することができる。微生物から抗生物質不活性化因子を遊離又は放出させる透過剤の能力は、例えば、本発明の方法を用いて、或いは本明細書の他の箇所で述べた３次元試験のような他の抗生物質感受性試験を用いて決定することもできる。微生物から抗生物質不活性化因子を遊離又は放出させる透過剤の能力の典型的な決定法は、本明細書の他の箇所で述べる実施例で記載される。

【００４７】

また、好ましい透過剤は、微生物の成長を有意には阻害しない。好ましい透過剤のこの特性は、例えば、特定透過剤の濃度を変えて種々の微生物の芝生培養に適用して、該芝生培養の成長の阻害が生じたかを測定することによって決定できる。代わりに、可変濃度の透過剤の存在下における種々の微生物の成長速度を技術的に周知の方法で決定することもできる。透過剤の微生物の成長を許容する能力の典型的な決定法は、本明細書の他の箇所で述べる実施例で記載される。

【００４８】

別の実施形態では、本発明は、抗生物質不活性化因子を遊離させる微生物を検出する抗生物質感受性試験を行うための透過剤含浸円盤と使用説明書を含むキットを含む。好ましい実施形態では、透過剤は、トリス/EDTA緩衝液である。

【００４９】
容易に分かるように、本発明は、他の抗生物質感受性試験法を超える新規な利益と利点を提供する。本発明は、例えば、寒天内のスリット中に細菌接種材料を挿入するする必要がある他の方法の技術的に挑戦する局面ではなく、寒天の表面上で抗生物質感受性試験を実施することを可能にする。さらに、本発明は、当該微生物の成長を有意には阻害せずに、微生物からの抗生物質不活性化因子の放出を促進する透過剤の使用を開示する。現在の抗生物質感受性試験法は、このような因子の放出を促すことができず、誤った正の結果をもたらす可能性がある。従って、現在の抗生物質感受性試験法は、臨床医に特定の微生物がこれらの生体外結果に基づいて抗生物質に感受性であると信じさせ、経験的に該抗生物質が生体内で無効であることが分かるだけである。本発明は、生体内で特定の抗生物質に耐性であると思われる微生物を検出できる、より頑強な生体外情報を提供する。

【実施例１】
【００５０】
実施例１．抗生物質不活性化因子の放出の決定

この実施例では、大腸菌MISC 208(拡張スペクトルβ-ラクタマーゼSHV-2を産生する)を試験生物として用い、ニトロセフィンが分光光度的加水分解検定法の基質だった。大腸菌株を直接100μlのMuller Hintonブロス中に収集し、100μlの透過剤と混合した。

この加水分解検定法では、活性の単位は以下のように計算する。

$$\text{単位} = \frac{\text{光学密度(OD)の変化／分} \times 10}{\text{吸光係数}}$$

【００５１】
加水分解検定法は、基本的にO'Callaghan, C. H.ら, A.A.C. 1:283-288(1972)に記載されているとおりに行った。簡単には、ニトロセフィンの100μM溶液を基質として用いた。ニトロセフィンを37℃に予備加熱した。加水分解検定法は、37℃で、-0.024の吸光係数の389.5の波長で行った。適切なキュベットを0.9mlの予備加熱したニトロセフィン基質で満たし、100ulの透過細菌緩衝液を添加した。即座にキュベットを逆さにして中身を混ぜ、キュベットを分光光度計内に置いた。キュベットブロックを温める循環水浴で37℃に温度を維持しながら、５秒間隔で５分まで吸光度を検定した。検定完了時、活性を上式により計算した。

【００５２】

透過剤	β-ラクタマーゼ活性の単位 （基質としてニトロセフィン）
ＴＥ/室温	47
ＴＥ/０℃	102
トリス/０℃	41
水（対照）	0

【００５３】
実施例２．抗生物質不活性化因子の放出の決定

実施例１の実験を大腸菌MISC 208及び加水分解検定法の基質としてセファクロルを用いて繰り返した。

透過剤調製試料	β-ラクタマーゼ活性の単位 （基質としてセファクロル）
塩化ベンザルコニウム 200μg/ml	16
Polymixin B 10μg/ml	3.8
Polymixin B 30μg/ml	15
ＴＥ	79

【００５４】
実施例３．抗生物質不活性化因子の放出の決定

大腸菌V1104を用いて実施例１の実験を繰り返して種々の透過剤を評価した。ニトロセファンが加水分解基質だった。

透過剤調製試料	β-ラクタマーゼ活性の単位（基質としてニトロセフィン）
アズトレオナム	210
試薬なし/０℃	214
試薬なし/45℃	0
セフタジジム	196
ピペラシリン	202

【００５５】
抗生物質不活性化因子の放出の決定で使用可能な他の典型的な微生物としては、下表の微生物が挙げられる。

株	酵素	単位（対ビトロセフィン）
大腸菌V1104		202
大腸菌165*	pI 5.95 TEM MSBL	43
MG32	TEM-1＋TEM-12	349
K. pneumoniae V1102		227

【００５６】
実施例４．有意な成長阻害の欠如の決定
種々の試験株を直接100μlのMueller Hintonブロス中に収集し、問題の各透過剤100μlと混合した。次に、これら各混合物20μlをブランクろ紙円盤に適用し、円盤を種々の試験微生物の新しく接種した寒天芝生培養に移し、プレートを37℃で一晩中インキュベートした。終夜のインキュベーション後、培養を円盤周囲の阻害ゾーンの存在又は非存在について調べた。阻害ゾーンから試験で用いた濃度の該透過剤が不適切であると推論した。
【００５７】
この方法の変形は、試薬を前もって微生物と混合しないで直接試薬を円盤に適用して上述したように評価することである。
（試薬円盤の調製）
１．同割合の生理食塩水とトリスEDTA（Sigma Chemicals）の溶液を調製する。
２．20μl分量の透過剤溶液をろ紙円盤上に置き、乾燥させる。
（試験の実施と解釈）
１．透過剤で含浸させたろ紙円盤を20μlの無菌生理食塩水で再水和させた。
２．綿棒又はループを用いて試験生物を再水和円盤上にこすりつけた。
３．Muller Hinton寒天プレートに0.5 McFarlandの大腸菌ATCC 25922を接種した。
４．寒天プレートの表面上にセフォキシチン円盤を置いた。次に試験生物を接種した再水和円盤をセフォキシチン円盤の隣に約0.5～1.0mm離して置いた。
５．寒天プレートを37℃で約16時間、又は一晩中インキュベートした。
６．セフォキシチンゾーンの歪みは、正の結果として解釈し（すなわち、抗生物質不活性化因子の存在が検出された）、セフォキシチンゾーンの歪みの欠如は、負の結果として解釈した。図１及び２を参照せよ。
【００５８】
実施例５．抗生物質耐性微生物の検出
この研究は、pAmpCsを内部にもつと推測されるクレブシエラ(Klebsiella)分離培養の調査のためのその有用性について報告する。
方法：セフォキシチンMICs≧16μg/mlを有するKlebsiella spp.の30個の分離培養を本発明の方法で調査した。本明細書の他の箇所で述べた３次元試験ですべての負の結果を確認し、かつ等電点電気泳動(IEF)とインヒビター研究で正の結果を確認した。等量の生理食塩水で希釈した100倍TEをろ紙円盤に含浸させた。この円盤を20μlの食塩水で再水和させ、試験分離培養の数コロニーを円盤上に接種した。接種円盤を、大腸菌 ATCC 25922の芝生を接種したMuller-Hinton寒天プレート上のセフォキシチン円盤の近傍に（ほとんど触れる）置いた。終夜のインキュベーション後、正の試験は、試験円盤近傍のセフォキシチン阻害ゾーンの扁平化又はへこみとして現れた。負の試験は、歪んでいないゾーンを有

した。

結果：試験した30個の分離培養のうち、10個は正で、20個は負だった（３次元試験でも負）。正の分離培養のIEF及び阻害研究は、10個の分離培養のうち９個が、7.2、7.7又は≧9.0のpIsを有する、クロキサシリンによって阻害されるβ-ラクタマーゼを産生することを示し、AmpC産生と一致することが分かった。クレブシエラは染色体AmpCを欠いているので、これら酵素はプラスミド媒介されると解釈した。他の正の分離培養は、高いイミペネムMICを有し、セフォキシチンも加水分解するカルバペネム加水分解酵素を産生した。

【００５９】

（材料と方法）

分離培養

Klebsiella spp.の30個の新しい分離培養を米国の病院内の患者から収集した。

感受性

抗菌感受性は、調査用 Microscan脱水パネルを用いるNCCLS微量希釈方法論で決定した。

３次元試験

セフォキシチンの酵素不活性化は、３次元法で調査した。Muller-Hinton寒天プレートの表面に大腸菌 ATCC 25922の標準化接種材料の芝生を接種した。無菌メス刃でプレート内にスリットを刻んだ。このスリット中に、試験生物の重接種材料（10^9CFU/ml）を含有する懸濁液をマクロピペット先端からの毛管作用によって分配した。セフォキシチン円盤をスリットから３mmの寒天上に置いた。35℃で一晩中インキュベーション後、プレートを阻害ゾーン縁の特徴的な歪みで示されるようなセフォキシチン不活性化の証拠について検査した。この特徴の非存在がセフォキシチンの有意な不活性化がないことを示した（図３）。

【００６０】

AmpC円盤試験

セフォキシチンの酵素不活性化は、本明細書の他の箇所で述べたように、本発明の透過剤、TEを含浸させたろ紙円盤を使用する円盤試験によっても調査した。円盤を20μlの無菌食塩水で再水和させてから試験生物の数コロニーを接種した。Muller-Hinton寒天プレートの表面に大腸菌 ATCC 25922の標準化接種材料の芝生を接種した。接種円盤を接種プレート上のセフォキシチン円盤の近傍に（ほとんど触れる）置いた。摂氏35度で終夜インキュベーション後、正の試験は試験円盤の近傍のセフォキシチン阻害ゾーンの扁平化又はへこみとして現れた。負の試験は歪みのないゾーンを有した（図４）。

等電点電気泳動

粗製超音波処理物を平台装置（Multiphor LKB）上の両性ポリアクリルアミドゲル（pH範囲3.5～9.5）上での分析的等電点電気泳動（IEF）に供した。IEFゲルのインヒビターオーバレイを1000μMのクラブラン酸とクロキサシリンで行った。

【００６１】

結果

セフォキシチンMICs≧16μg/mlを有する30個のKlebsiella spp.分離培養をAmpC円盤試験で検定した。これらのうち20個は負で10個が正だった。負の分離培養は３次元試験で負として確認した。IEF及びインヒビター研究は、10個の正の分離培養のうち９個が7.2、7.7又は≧9.0のpIsを有するβ-ラクタマーゼを産生し、クロキサシリンによって阻害されることを明らかにした。この知見はAmpC産生と一致した。これら酵素は、Klebsiella spp.は染色体AmpCを欠いているので、プラスミド媒介されると解釈した。他の正の分離培養は、高いイミペネムMIC（64μg/ml）を有し、セフォキシチンも加水分解できるカルバペネム加水分解酵素を産生した。

【００６２】

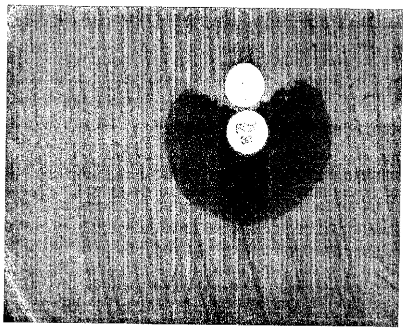
上記説明及び実施例は、例証として意図したものであり、限定と解釈すべきでない。この発明の精神及び範囲内でさらに他の変形が可能であり、本技術の当業者には容易に思い浮かぶだろう。

【図面の簡単な説明】

【００６３】
【図１】セフォキシチン円盤周囲の歪みゾーンのクローズアップを示す。
【図２】本発明の一実施形態を示す。
【図３】クレブシエラのペニシリン耐性株によるセフォキシチンの酵素的不活性化を実証する３次元試験を示す。
【図４】図２について上述した本発明の実施形態を示すが、１つのセフォキシチン円盤だけを示す。

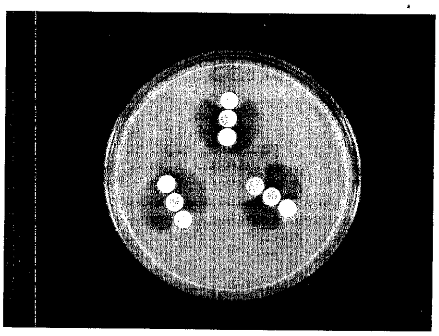
【図１】

Fig. 1



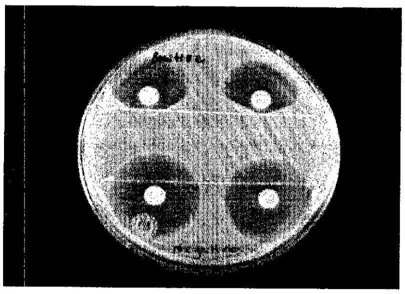
【図２】

Fig. 2



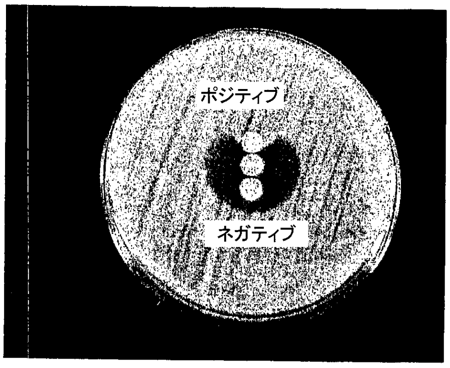
【図３】

Fig. 3



【図４】

Fig.4



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US03/07890

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(7) : C12Q 1/18
US CL : 435/32
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)
U.S. : 435/32

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 practicable, search terms used)
Please See Continuation Sheet

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5,501,959 A (LANCASTER et al) 26 March 1996 (26.03.1996), abstract, columns 1 - 2, 4 and 6.	1 - 18
A	US 5,747,276 A (HOCH et al) 05 May 1998 (05.05.1998), entire document.	1 - 18
A	US 5,998,159 A (WATSON et al) 07 December 1999 (07.12.1999).	1 - 18
A	US 5,338,664 A (TUCKMAN et al.) 16 August 1994 (16.08.1994).	1 - 18

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ 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 application or patent 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
03 June 2003 (03.06.2003)	14 AUG 2003

Name and mailing address of the ISA/US	Authorized officer
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230	Ruth A. Davis Telephone No. 703-308-0196

PCT/US03/07890

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
WEST, CAS-STN, PubMed
Search terms: assay, microorganism, buffer, edta, tris, antibiotic, susceptibility, viability, permeabilizing agent

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,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,HU,IE,IT,LU,MC,NL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NI,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ブラック　ジェニファー　エイ
アメリカ合衆国　ネブラスカ州　６８１６４　オマハ　サラトガ　サークル　１１７２９
(72)発明者 モランド　エレン　エス
アメリカ合衆国　アイオワ州　５１５８６　クレセント　ハイウェイ　１８３　２２１８６
(72)発明者 トムソン　ケニス　エイ
アメリカ合衆国　ネブラスカ州　６８１３０　オマハ　サウス　ワンハンドレッドアンドシックスティフォース　ストリート　１２８２

Ｆターム(参考) 4B063 QA06 QQ06 QQ98 QR54 QR90