

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号  
特許第6192658号  
(P6192658)

(45) 発行日 平成29年9月6日(2017.9.6)

(24) 登録日 平成29年8月18日(2017.8.18)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 Q 1/10 (2006.01)

C 1 2 Q 1/34 (2006.01)

C 1 2 Q 1/10

C 1 2 Q 1/34

請求項の数 3 (全 25 頁)

(21) 出願番号	特願2014-550326 (P2014-550326)	(73) 特許権者	505005049
(86) (22) 出願日	平成24年12月18日 (2012.12.18)		スリーエム イノベイティブ プロパティ
(65) 公表番号	特表2015-503345 (P2015-503345A)		ズ カンパニー
(43) 公表日	平成27年2月2日 (2015.2.2)		アメリカ合衆国, ミネソタ州 55133
(86) 国際出願番号	PCT/US2012/070223		-3427, セント ポール, ポスト オ
(87) 国際公開番号	W02013/101530		フィス ボックス 33427, スリーエ
(87) 国際公開日	平成25年7月4日 (2013.7.4)		ム センター
審査請求日	平成27年12月17日 (2015.12.17)	(74) 代理人	100088155
(31) 優先権主張番号	61/580,860		弁理士 長谷川 芳樹
(32) 優先日	平成23年12月28日 (2011.12.28)	(74) 代理人	100107456
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 池田 成人
		(74) 代理人	100128381
			弁理士 清水 義憲
		(74) 代理人	100162352
			弁理士 酒巻 順一郎

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 サルモネラ微生物の検出方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

サルモネラ・ボンゴリを検出する方法であって、  
試験される試料、  
培養装置、  
グラム陰性腸内微生物の増殖を促進する栄養培地、  
グラム陽性微生物の増殖を阻害する第1の選択物質、  
サルモネラ・ボンゴリによって第1の検出可能な生成物に変換され得る第1の鑑別指示薬化合物と、pH指示薬と、を含む第1の鑑別指示薬システムであって、前記第1の鑑別指示薬化合物が、メリピオース、2-デオキシ-D-リボース、マンニトール、L-アラビノース、ズルシトール、マルトース、L-ラムノース、トレハロース、D-キシロース及びソルビトールからなる群から選択される少なくとも1つの炭水化物である、第1の鑑別指示薬システム、及び

- ガラクトシダーゼ酵素活性によって第2の検出可能な生成物に変換され得る第2の鑑別指示薬化合物を含む第2の鑑別指示薬システム、を提供することと、

前記培養装置中で、前記栄養培地、前記第1の選択物質、前記第1の鑑別指示薬システム、及び前記第2の鑑別指示薬システムを前記試料と接触させて、接種済み培養装置を形成することと、

前記接種済み培養装置を第1の時間にわたって40よりも高い温度でインキュベートすることと、

前記培養装置を観察して前記第 1 の検出可能な生成物の有無を検出することと、  
前記培養装置を観察して前記第 2 の検出可能な生成物の有無を検出することと、を含み

、  
前記第 1 の検出可能な生成物の存在を観察することが、サルモネラ・ボンゴリが前記試料中に存在する可能性を示し、

前記第 2 の検出可能な生成物と並行して前記第 1 の検出可能な生成物の存在を観察することが、サルモネラ・ボンゴリ以外の微生物が前記試料中に存在することを示す、方法。

【請求項 2】

サルモネラ・ボンゴリによって第 3 の検出可能な生成物に変換され得る第 3 の鑑別指示薬化合物を含む第 3 の鑑別指示薬システムを有する物品を提供することと、

前記物品を前記接種済み培養装置と接触させることと、

第 2 の時間にわたって前記接種済み培養装置をインキュベートすることと、

前記培養装置を観察して前記第 3 の検出可能な生成物を検出することと、を更に含み、

前記第 1 の検出可能な生成物と並行して前記第 3 の検出可能な生成物を観察することが、前記試料中のサルモネラ・ボンゴリの存在を示す、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

腸内微生物によって第 4 の検出可能な生成物に変換され得る非鑑別指示薬化合物を提供することと、

前記培養装置を観察して前記第 4 の検出可能な生成物の有無を検出することと、を更に含み、

前記培養装置中で、前記栄養培地、前記第 1 の選択物質、前記第 1 の鑑別指示薬システム、及び前記第 2 の鑑別指示薬システムを前記試料と接触させて、接種済み培養装置を形成することが、前記培養装置中で、前記栄養培地、前記第 1 の選択物質、前記第 1 の鑑別指示薬システム、前記第 2 の鑑別指示薬システム、及び前記非鑑別指示薬化合物を前記試料と接触させて、前記接種済み培養装置を形成することを更に含む、請求項 2 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願の相互参照)

本出願は、その全容を本明細書に参照によって援用するところの 2011 年 12 月 28 日出願の米国仮特許出願第 61/580,860 号に基づく利益を主張するものである。

【背景技術】

【0002】

腸内細菌科には、糖類を乳酸及び他の最終産物に発酵することが可能な多くの代謝的に多様な通性嫌気性細菌が含まれる。この科には、大腸菌、幾つかのサルモネラの亜種、ペスト菌（エルシニア・ペスティス（*Yersinia pestis*））、幾つかのクレブシエラの種、及び幾つかの赤痢菌の種などの幾つかのよく知られたヒト病原体が含まれる。

【0003】

サルモネラ属には、ヒトに病気を生じさせることが可能な亜種を含む *S. エンテリカ*（*S. enterica*）及び *S. ボンゴリ*（*S. bongori*）の 2 つの種が含まれる。一部の病原性サルモネラは、汚染された食品又は飲み物を摂取することによりヒトに伝染する場合がある。食品試料中のサルモネラ微生物の検出は、試料中に存在するサルモネラ微生物の数が比較的少ないこと、試料中に近縁の非サルモネラ腸内微生物が比較的多く存在すること、及び／又は、試料中にサルモネラ微生物の増殖又は検出と干渉し得る非微生物物質（例えば、食品粒子又は可溶性化学物質）が存在することにより困難となり得る。

【0004】

試料中のサルモネラ微生物を検出し、これを 1 以上の非サルモネラ微生物から区別する

10

20

30

40

50

ために、様々な選択的及び／又は鑑別的微生物培地が開発されている。一般的にこれらの培地は、非腸内微生物の増殖を阻害する選択物質を含んでいる。更に、これらの培地の多くは、サルモネラと非サルモネラ微生物とを区別するために１以上の鑑別指示薬システムに頼っている。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００５】

試料中のサルモネラ微生物を検出するための各種の微生物培地が存在するにも関わらず、試料中のサルモネラ微生物を検出するための改良された方法が依然求められている。

【課題を解決するための手段】

【０００６】

一般的には、本開示はサルモネラ微生物を検出する方法に関する。詳細には本方法は、陽性鑑別指示薬システム（すなわち、サルモネラ微生物によって検出可能な生成物に変換される指示薬化合物を含む指示薬システム）、及び陰性鑑別指示薬システム（すなわち、  
- ガラクトシダーゼ酵素活性によって検出可能な生成物に変換され得る、したがってサルモネラ微生物によって検出可能な生成物に変換されない指示薬化合物を含む指示薬システム）を含む選択増殖培地の使用を含む。予期せざることとして、*S. ボンゴリ* (*S. bongori*) 種のメンバーは、40 よりも高いインキュベーション温度では第２の指示薬システムと反応しない。

【０００７】

一態様では、本開示はサルモネラ微生物を検出する方法を提供する。本方法は、試験される試料、培養装置、グラム陰性腸内微生物の増殖を促進する栄養培地、グラム陽性微生物の増殖を阻害する第１の選択物質、サルモネラ・ボンゴリ (*Salmonella bongori*) 種の微生物を含むサルモネラ微生物群のメンバーによって第１の検出可能な生成物に変換され得る第１の鑑別指示薬化合物を含む第１の鑑別指示薬システム、及び  
- ガラクトシダーゼ酵素活性によって第２の検出可能な生成物に変換され得る第２の鑑別指示薬化合物を含む第２の鑑別指示薬システムを提供することを含み得る。本方法は更に、培養装置中で、栄養培地、第１の選択物質、第１の鑑別指示薬システム、及び第２の鑑別指示薬システムを試料と接触させて、接種済み培養装置を形成することと、接種済み培養装置を第１の時間にわたって40 よりも高い温度でインキュベートすることと、培養装置を観察して第１の検出可能な生成物の有無を検出することと、培養装置を観察して第２の検出可能な生成物の有無を検出することと、を含んでよく、第１の検出可能な生成物の存在を観察することが、サルモネラ微生物が試料中に存在する可能性を示し、第２の検出可能な生成物と並行して第１の検出可能な生成物の存在を観察することが、サルモネラ・ボンゴリ (*Salmonella bongori*) 種の - ガラクトシダーゼ産生メンバー以外の微生物が試料中に存在することを示す。

【０００８】

いずれの実施形態においても、培養装置は、栄養培地、第１の選択物質、第１の鑑別指示薬システム、及び第２の鑑別指示薬システムがほぼ脱水された形態でその内部に配置された薄膜培養装置として提供することができる。上記の実施形態のいずれにおいても、第１の検出可能な生成物が存在しないことを観察することは、試料中にサルモネラ微生物が存在しないことを示し得る。上記の実施形態のいずれにおいても、栄養培地を観察して第１の検出可能な生成物の存在を検出することは、培養装置を観察して第１の検出可能な色を検出することを含み得る。上記の実施形態のいずれにおいても、第１の鑑別指示薬化合物は酵素基質を含み得る。一部の実施形態では、酵素基質は、カブリレートエステラーゼ酵素活性を検出するか又は - ガラクトシダーゼ酵素活性を検出するための酵素基質を含み得る。一部の実施形態では、酵素基質は、5 - プロモ - 6 - クロロ - 3 - インドリルカブリレート、4 - ニトロフェニルカブリレート、2 - ナフチルカブリレート、5 - プロモ - 4 - クロロ - 3 - インドキシル - D - ガラクトピラノシド、レゾルフィニル - D - ガラクトピラノシド、及び4 - ニトロフェニル - D - ガラクトピラノシドからな

10

20

30

40

50

る群から選択され得る。

【 0 0 0 9 】

上記の実施形態のいずれにおいても、第 1 の鑑別指示薬システムは、pH 指示薬と、メリピオース、2 - デオキシ - D - リボース、マンニトール、L - アラビノース、ズルシトール、マルトース、L - ラムノース、トレハロース、D - キシロース、及びソルビトールからなる群から選択される少なくとも 1 つの炭水化物とを含むことができる。

【 0 0 1 0 】

上記の実施形態のいずれにおいても、第 1 の検出可能な生成物はほぼ水溶性であってよく、第 1 の検出可能な生成物を観察することは、微生物コロニーに隣接した発色領域を観察することを含み得る。

10

【 0 0 1 1 】

上記の実施形態のいずれにおいても、第 2 の検出可能な生成物を観察することは、培養装置を観察して第 2 の検出可能な色を検出することを含み得る。上記の実施形態のいずれにおいても、第 2 の鑑別指示薬化合物は、5 - ブロモ - 4 - クロロ - 3 - インドリル - D - ガラクトピラノシド、5 - ブロモ - 3 - インドリル - D - ガラクトピラノシド、5 - ブロモ - 6 - クロロ - 3 - インドリル - D - ガラクトピラノシド、2 - ニトロフェニル - D - ガラクトピラノシド、及び 4 - ニトロフェニル - D - ガラクトピラノシドなる群から選択され得る。

【 0 0 1 2 】

上記の実施形態のいずれにおいても、第 1 の検出可能な生成物がほぼ水溶性でありかつ第 2 の検出可能な生成物がほぼ非水溶性であってもよい、又は、第 1 の検出可能な生成物がほぼ非水溶性でありかつ第 2 の検出可能な生成物がほぼ水溶性であってもよい。

20

【 0 0 1 3 】

上記の実施形態のいずれにおいても、第 1 の選択物質は、抗生物質、胆汁酸塩、胆汁酸塩 No. 3、デオキシコール酸、コール酸、デオキシコール酸、クリスタルバイオレット、ノボピオシン、ナリジクス酸、ポリミキシン B、ストレプトマイシン、メチシリン、セフソルジン ( c e f s o l u d i n )、又は上記の選択物質の任意の 2 つ以上の組み合わせからなる群から選択される。上記の実施形態のいずれにおいても、培養装置は少なくとも 1 つの第 2 の選択物質を更に含んでよく、少なくとも 1 つの第 2 の選択物質は、サルモネラ属のメンバーではない少なくとも 1 つのグラム陰性腸内微生物の増殖を阻害する。一部の実施形態では、第 2 の選択物質は、ラクタム系抗生物質、アミノグリコシド系抗生物質、キノロン系抗生物質、サルファ系抗生物質、ポリミキシン系抗生物質、及び上記の抗生物質の任意の 2 つ以上の組み合わせからなる群から選択され得る。一部の実施形態では、少なくとも 1 つの第 2 の選択物質は、ナラジクス酸 ( n a l a d i x i c a c i d )、ストレプトマイシン及びポリミキシン B の組み合わせを含む。上記の実施形態のいずれにおいても、培養装置をインキュベートすることは、培養装置を、端点を含めて 4 1 ~ 4 4 の温度でインキュベートすることを含む。

30

【 0 0 1 4 】

上記の実施形態のいずれにおいても、本方法は更に、サルモネラ微生物によって第 3 の検出可能な生成物に変換され得る第 3 の鑑別指示薬化合物を含む第 3 の鑑別指示薬システムを有する物品を提供することと、物品を接種済み培養装置と接触させることと、第 2 の時間にわたって接種済み培養装置をインキュベートすることと、培養装置を観察して第 3 の検出可能な生成物を検出することと、を含み得る。第 1 の検出可能な生成物と並行して第 3 の検出可能な生成物を観察することは、試料中のサルモネラ微生物の存在を示す。

40

【 0 0 1 5 】

上記の実施形態のいずれにおいても、本方法は更に、腸内微生物によって第 4 の検出可能な生成物に変換され得る非鑑別指示薬化合物を提供することと、培養装置を観察して第 4 の検出可能な生成物の有無を検出することと、を含んでよく、培養装置中で、栄養培地、第 1 の選択物質、第 1 の鑑別指示薬システム、及び第 2 の鑑別指示薬システムを試料と接触させて、接種済み培養装置を形成することは、培養装置中で、栄養培地、第 1 の選択

50

物質、第1の鑑別指示薬システム、第2の鑑別指示薬システム、及び非鑑別指示薬化合物を試料と接触させて、接種済み培養装置を形成することを更に含む。

【0016】

上記の実施形態のいずれにおいても、培養装置を観察することは、培養装置を視覚的に観察することを含み得る。上記の実施形態のいずれにおいても、培養装置を観察することは、イメージング装置を使用して培養装置の画像を生成することを含み得る。上記の実施形態のいずれにおいても、本方法は、処理装置を使用して画像を分析することを更に含み得る。上記の実施形態のいずれにおいても、本方法は、群に属する微生物によって形成されたコロニーの数を計数することを更に含み得る。

【0017】

「好ましい」及び「好ましくは」なる語は、特定の状況下で特定の利益をもたらす得る本発明の実施形態のことを指す。しかしながら、他の実施形態もまた、同じ又は他の状況下で、好ましい場合がある。更には、1つ以上の好ましい実施形態の詳細説明は、他の実施形態が有用ではないことを示唆するものではなく、本発明の範囲から他の実施形態を排除することを意図するものではない。

【0018】

本明細書において使用するところの「サルモネラ微生物」とは、サルモネラ属に属するあらゆる微生物のことを指す。

【0019】

本明細書において使用するところの「鑑別指示薬システム」とは、鑑別指示薬化合物を検出可能な生成物に変換するそれぞれの能力に基づいて2種類の微生物を区別するために使用される1以上の化合物のことを指す。場合によっては、例えば、鑑別指示薬化合物（例えば、2-ニトロフェニル - - D - ガラクトシダーゼ）は、ある種の微生物によって、検出可能な生成物（例えば、2-ニトロフェノール）に直接変換され得る。場合によっては、例えば、鑑別指示薬化合物（例えば、5-ブロモ - 4 - クロロ - 3 - インドキシル - - D - ガラクトピラノシド）は、ある種の微生物によって、空気の下で反応して検出可能な生成物（ある種のインジゴ色素）を生成し得る中間生成物に変換され得る。場合によっては、例えば、鑑別指示薬化合物（例えば、メリピオースなどの発酵性炭水化物）は、ある種の微生物によって、鑑別指示薬システムの別の成分（例えば、クロロフェノールレッドなどのpH指示薬）と反応してその他の成分に検出可能な色の变化を生じさせることができる検出可能な生成物（例えば、乳酸）に変換され得る。

【0020】

本明細書において使用するところの「選択物質」とは、第1の微生物又は第1の微生物群の増殖を、第2の微生物又は第2の微生物群よりも大きく阻害することにより、阻害の程度の小さい微生物の増殖に有利に働く化学化合物のことを指す。

【0021】

「含む」なる語及びその変化形は、これらの語が、本説明文及び特許請求の範囲において用いられる場合、限定的な意味は有さない。

【0022】

本明細書で使用するところの「a」、「an」、「the」、「少なくとも1つの」、及び「1つ以上の」は、互換可能に使用される。したがって、例えば微生物と言う場合には、「1つ以上の」微生物を意味すると解釈することができる。

【0023】

「及び/又は」なる語は、列記される要素のうちの1つ若しくはすべて、又は列記される要素のうちの任意の2つ以上の組み合わせを意味する。

【0024】

また本明細書では、端点による数値範囲の記載は、その範囲に含まれるすべての数を含む（例えば、1～5は、1、1.5、2、2.75、3、3.80、4、5などを含む）。

【0025】

10

20

30

40

50

上記の本発明の「課題を解決するための手段」は、本発明の開示されるそれぞれの実施形態、又は本発明のすべての実施を説明することを目的としたものではない。以下の説明は、例示的な実施形態をより具体的に例示するものである。本出願の全体にわたる幾つかの箇所で、実施例の一覧によって指針が与えられるが、これらの実施例は異なる組み合わせで使用することができる。いずれの場合も、記載されるリストは、あくまで代表的な群としてのみの役割を果たすものであって排他的なリストとして解釈すべきではない。

#### 【0026】

これらの実施形態及び他の実施形態の更なる詳細を、添付の図面及び以下の説明文に記載する。他の特徴、目的、及び利点は、説明文及び図面、並びに特許請求の範囲から明らかとなる。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0027】

【図1】本開示に基づくサルモネラ微生物を検出する方法の一実施形態のブロック図を示す。

【図2】図1に示される方法の一実施形態と関連した更なる分析ステップ及び必要に応じて行われる処理ステップのブロック図を示す。

#### 【発明を実施するための形態】

#### 【0028】

サルモネラ属には、サルモネラ・エンテリカ (*Salmonella enterica*) とサルモネラ・ボンゴリ (*Salmonella bongori*) の2つの種が含まれる。これら2つの種の遺伝的関連性は、フックス (Fookes) らによって研究されている (*Salmonella bongori Provides Insights into the Evolution of the Salmonellae*, PLoS Pathogens, [www.plospathogens.org](http://www.plospathogens.org), 2011, vol. 7, article number e1002191, p 1~16、この文献の全体を本明細書に参照により援用する)。S・エンテリカ (*S. enterica*) の亜種は、ヒトに感染して病気を引き起こす能力においてS・ボンゴリ (*S. bongori*) よりもよく知られているが、S・ボンゴリ (*S. bongori*) もヒト感染症を引き起こすことが示されている。したがって、潜在的な病原性サルモネラ微生物を検出するように設計される試験は、両方の種を検出することが可能なものでなければならない。

#### 【0029】

本開示は、試料中のサルモネラ微生物を検出するための方法に一般的に関する。詳細には、本開示は、特定の - ガラクトシダーゼ産生サルモネラ微生物 (例えば、S・ボンゴリ (*S. bongori*) 種のメンバー) を - ガラクトシダーゼ産生非サルモネラ微生物 (例えば、大腸菌、及び腸内細菌科の他の - ガラクトシダーゼ産生メンバー) から区別することが可能な、増殖に基づいた検出法に関する。本発明の方法では、S・ボンゴリ (*S. bongori*) 微生物を区別するために、複数の鑑別指示試薬を含む選択増殖培地を、高いインキュベーション温度と組み合わせる。

#### 【0030】

増殖に基づいたサルモネラの検出及び識別では一般的に、非サルモネラ微生物の存在下でサルモネラ菌株を特異的に検出する生化学的反応を利用する必要がある。残念なことに、従来の検出システムの多くは、サルモネラ微生物を、試料中に存在し得る非サルモネラ腸内細菌科微生物から区別するのに適当な特異性を与えるものではない。こうした試験は、非サルモネラ微生物を、試料中に見られるサルモネラ微生物から区別するために更なる試薬及び手順 (例えば、免疫学的又は遺伝子試験) をしばしば必要とする。

#### 【0031】

残念なことに、非サルモネラ腸内微生物 (例えば、大腸菌型細菌) 群を検出するために一般的に用いられている反応には、すべてのサルモネラ菌株を陰性として区別しないものがある。例えば、lac+であり (- D - ガラクトシダーゼを産生する)、したがって

10

20

30

40

50

、 - ガラクトシダーゼ酵素の基質（例えば、5 - ブロモ - 4 - クロロ - 3 - インドリル - D - ガラクトピラノシド）を使用した試験では非サルモネラ微生物から陰性として区別されないサルモネラ菌株が存在する。本研究者らは、特定の - D - ガラクトシダーゼ陽性菌株は、高い温度でインキュベートすると - ガラクトシダーゼ酵素基質と反応しないことを発見した。更に、こうした高いインキュベーション温度は、幾つかの非サルモネラ - ガラクトシダーゼ産生微生物の増殖を阻害することができ、かつ / 又はそれらの - ガラクトシダーゼ酵素活性を検出する能力には大きく影響しない。したがって、本開示は、サルモネラ・ボンゴリ (*Salmonella bongori*) の増殖コロニーを、他の - ガラクトシダーゼ産生腸内微生物のコロニーから区別するための方法を提供する。

10

#### 【0032】

本開示は、試料中のサルモネラ微生物を検出する方法を提供する。図1は、試料中のサルモネラ微生物を検出する方法10の一実施形態を示している。

#### 【0033】

方法10は、試験手順の成分を提供するステップ45を含む。試験手順の成分を提供する手順は、試験される試料、培養装置、グラム陰性腸内微生物の増殖を促進する栄養培地、グラム陽性微生物の増殖を阻害する第1の選択物質、サルモネラ・ボンゴリ (*Salmonella bongori*) 種の微生物を含むサルモネラ微生物の群のメンバーによって第1の検出可能な生成物に変換され得る第1の鑑別指示薬化合物を含む第1の鑑別指示薬システム、及び - ガラクトシダーゼ酵素活性によって第2の検出可能な生成物に変換され得る第2の鑑別指示薬化合物を含む第2の鑑別指示薬システム、を提供することを含む。方法10は、更に、試験手順の成分を接触させて接種済み栄養培地を形成するステップ50を更に含む。試験手順の成分を接触させて接種済み栄養培地を形成するステップは、培養装置内で、栄養培地、選択物質、第1の鑑別指示薬システム、及び第2の鑑別指示薬システムを試料と接触させて接種済み栄養培地を形成することを含む。方法10は更に、接種済み培地を40よりも高い温度で第1の時間にわたってインキュベートするステップ55と、培養装置を観察して第1の検出可能な生成物の有無を検出し、培養装置を観察して第2の検出可能な生成物の有無を検出するステップ60とを含む。これらの実施形態では、第1の検出可能な生成物の存在を観察することは、サルモネラ微生物（例えば、サルモネラ・エンテリカ (*Salmonella enterica*) 及び / 又はサルモネラ・ボンゴリ (*Salmonella bongori*)）が試料中に存在する可能性を示す。第2の検出可能な生成物と並行して第1の検出可能な生成物の存在を観察することは、サルモネラ・ボンゴリ (*Salmonella bongori*) 種の - ガラクトシダーゼ産生メンバー以外の微生物が試料中に存在することを示す。

20

30

#### 【0034】

一部の実施形態では、方法10は、接種済み栄養培地を、サルモネラ微生物によって、本明細書に述べられるような第3の検出可能な生成物に変換され得る第3の鑑別指示薬化合物を含む第3の鑑別指示薬システムと接触させる、必要に応じて行われるステップ65を更に含んでもよい。

#### 【0035】

第3の鑑別指示薬システムは、第1の鑑別指示薬化合物、第2の鑑別指示薬化合物、第3の鑑別指示薬化合物、又は非鑑別指示薬化合物を、試料及び / 又は栄養培地と接触させるための、本明細書に述べられる手順を含む様々な手順を用いて、接種済み栄養培地と接触させることができる。更に、第3の鑑別指示薬システムは、第3の鑑別指示薬システムを含む物品を接種済み栄養培地と接触させることにより、第1のインキュベーション時間の後で接種済み栄養培地と接触させることができる。これは、例えば、第3の鑑別指示薬システムを含むコーティングを有する物品を使用することにより行うことができる。例えば、物品は、その全容を参照により本明細書に援用する米国特許第6,022,682号に述べられるようなコーティング及び / 又はコーティングされた基質を含み得る。

40

#### 【0036】

50

第3の鑑別指示薬化合物を含む第3の鑑別指示薬システムを接種済み栄養培地と接触させた後、本方法は、第2の時間にわたってプレートをインキュベートする、必要に応じて行われるステップ70を含んでもよい。第2のインキュベーション時間の間に、サルモネラ微生物が存在する場合、サルモネラ微生物は第3の鑑別指示薬化合物を第3の検出可能な生成物に変換することができる。

#### 【0037】

一部の実施形態では、方法10は、非鑑別指示薬化合物を与える、必要に応じて行われるステップ（図に示されていない）を更に含み得る。これらの実施形態では、培養装置内で、試料、栄養培地、第1の選択物質、第1の鑑別指示薬システム、及び第2の鑑別指示薬システムを接触させて接種済み培地を形成することは、培養装置内で、試料、栄養培地、第1の選択物質、第1の鑑別指示薬システム、第2の鑑別指示薬システムを、非鑑別指示薬化合物と接触させて接種済み培地を形成することを必要に応じて更に含み得る。非鑑別指示薬化合物は、本明細書に含まれるものを含む任意の適当な方法を用いて、接種済み培地の他の成分と接触させることができる。

#### 【0038】

適当な非鑑別指示薬化合物としては、増殖する微生物によって代謝されるか、又は他の何らかの方法でこれと反応することで、微生物コロニー又はコロニーに隣接した栄養培地を発色又は蛍光発光させて可視化、画像化、及び/又は定量化を助け得る第4の検出可能な生成物を生成する指示薬化合物が挙げられる。非鑑別指示薬及びこれから誘導される第4の検出可能な生成物は、接種済み培地中に存在する場合に第1の検出可能な生成物又は第2の検出可能な生成物及び/又は第3の検出可能な生成物の検出を大きく阻害してはならない。適当な非鑑別指示薬化合物の非限定的な例としては、トリフェニルテトラゾリウムクロライド、p-トリルテトラゾリウムレッド、テトラゾリウムバイオレット、ペラトリルテトラゾリウムブルー、及び5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル-リン酸二ナトリウム塩などの発色性酸化還元指示薬が挙げられる。非鑑別指示薬を接種済み栄養培地と接触させる実施形態では、培養装置を観察して第1及び/又は第2の検出可能な生成物の存在を検出することは、培養装置を観察して第4の検出可能な生成物の存在を検出することを更に含み得る。

#### 【0039】

本開示の方法で試験される試料としては、サルモネラ微生物を含むことが疑われ得る様々な試料が挙げられる。特に対象となる試料としては、食品加工又は飲料加工作業における原材料、処理中の材料、又は最終製品材料が挙げられる。他の適当な試料としては、例えば、水試料（例えば、表面水、処理水）、環境試料（空気試料；壁、床、配水管、食品接触表面、処理装置からの表面試料）、及び臨床試料が挙げられる。臨床試料の非限定的な例としては、消化管試料、直腸試料、及び糞便試料が挙げられる。試験試料としては、液体、及び液体媒質中に溶解又は懸濁された固体が挙げられる。

#### 【0040】

本開示の培養装置には、試料中に存在する微生物を検出する処理中に栄養培地を入れるために使用されるあらゆる培養装置が含まれる。特定の好ましい実施形態では、栄養培地は、微生物の計数を容易にするためのゲル化剤を含む。適当な培養装置の非限定的な例としては、ペトリ皿、マルチウェルプレート、チューブ、フラスコ、薄膜培養装置（例えば、いずれもその全容を本明細書に参照により援用するところの米国特許第4,565,783号、同第5,601,998号、同第5,681,712号、同第6,265,203号、及び同第6,638,755号に開示される薄膜培養装置）が挙げられる。

#### 【0041】

一部の実施形態では、培養装置を提供することは、グラム陰性腸内微生物の増殖を促進する栄養培地、グラム陽性微生物の増殖を阻害する第1の選択物質、サルモネラ・ボンゴリ (*Salmonella bongori*) 種の微生物を含むサルモネラ微生物群のメンバーによって第1の検出可能な生成物に変換され得る第1の鑑別指示薬化合物を含む第1の鑑別指示薬システム、及び/又は - ガラクトシダーゼ酵素活性によって第2の検出

10

20

30

40

50



可能な生成物に変換され得る第2の鑑別指示薬化合物を含む第2の鑑別指示薬システムが入った培養装置を提供することを含む。

【0042】

一部の実施形態では、グラム陰性腸内微生物の増殖を促進する栄養培地、グラム陽性微生物の増殖を阻害する第1の選択物質、サルモネラ・ボンゴリ (*Salmonella bongori*) 種の微生物を含むサルモネラ微生物群のメンバーによって第1の検出可能な生成物に変換され得る第1の鑑別指示薬化合物を含む第1の鑑別指示薬システム、及び/又は - ガラクトシダーゼ酵素活性によって第2の検出可能な生成物に変換され得る第2の鑑別指示薬化合物を含む第2の鑑別指示薬システムから選択される少なくとも1つの成分は、実質的に脱水された状態で提供される(必要に応じて培養装置内で)。これらの実施形態では、少なくとも1つの脱水された成分は、試料との接触の前又は間に水性の液体(例えば、水、緩衝溶液、希釈液、液体試料)によって再水和することができる。

10

【0043】

一部の実施形態では、グラム陰性腸内微生物の増殖を促進する栄養培地、グラム陽性微生物の増殖を阻害する第1の選択物質、サルモネラ・ボンゴリ (*Salmonella bongori*) 種の微生物を含むサルモネラ微生物群のメンバーによって第1の検出可能な生成物に変換され得る第1の鑑別指示薬化合物を含む第1の鑑別指示薬システム、及び/又は - ガラクトシダーゼ酵素活性によって第2の検出可能な生成物に変換され得る第2の鑑別指示薬化合物を含む第2の鑑別指示薬システムから選択される少なくとも1つの成分は、成分を培養装置に加える前に試料と混合される(例えば、液体試料中に溶解又は希釈される)。

20

【0044】

本開示の栄養培地としては、グラム陰性腸内微生物の増殖を促進するあらゆる栄養培地が挙げられる。各種の適当な栄養培地が当該技術分野において知られている。適当な栄養培地には、グラム陰性腸内微生物の増殖を促進するための炭素、窒素、及びエネルギーを与えることができるタンパク質性栄養素(例えば、動物性又は植物性タンパク質の化学的及び/又は酵素的消化物)が含まれる。栄養培地は、存在する場合に、第1の鑑別指示薬システム、第2の鑑別指示薬システム、及び/又は第3の鑑別指示薬システムを大きく阻害しないものであれば、他の栄養素(例えば、ミネラル又は他の成分)を含んでもよい。

【0045】

30

本開示の第1の鑑別指示薬システムは、サルモネラ微生物によって第1の検出可能な生成物に変換され得る第1の鑑別指示薬化合物を含む。好ましくは、第1の鑑別指示薬化合物は、サルモネラ・ボンゴリ (*Salmonella bongori*) 種の微生物を含むサルモネラ微生物群のメンバーによって第1の検出可能な生成物に変換され得る。第1の鑑別指示薬化合物もまた、*S. bongori* (S. *bongori*) 以外の種(例えば *S. enterica* (S. *enterica*)) に属するサルモネラ微生物によって第1の検出可能な生成物に変換されることがより好ましい。一部の実施形態では、第1の鑑別指示薬システムは、培養装置中で増殖することが可能な少なくとも1つの非サルモネラ腸内微生物によって第1の検出可能な生成物に変換され得る第1の鑑別指示薬化合物を含む。

【0046】

40

一部の実施形態では、第1の鑑別指示薬化合物は、サルモネラ微生物によって(例えば発酵により)第1の検出可能な生成物(例えば、乳酸などの酸性化合物及び/又は例えば二酸化炭素などの気体)に変換され得る栄養化合物(例えば炭水化物)である。好ましくは、第1の鑑別指示薬は、複数のサルモネラ種及び/又は亜種によって第1の検出可能な生成物に変換される栄養化合物を含む。より好ましくは、第1の鑑別指示薬は、サルモネラ属に属さない多くの微生物種によって第1の検出可能な生成物に変換されない栄養化合物を含む。更により好ましくは、第1の鑑別指示薬は、非サルモネラ微生物によって第1の検出可能な生成物に変換されない栄養化合物を含む。適当な第1の鑑別指示薬の非限定的な例としては、メリピオース、2 - デオキシ - D - リボース、マンニトール、L - アラビノース、ズルシトール、マルトース、L - ラムノース、トレハロース、D - キシロース

50

、及びソルビトールからなる群から選択される化合物が挙げられる。

【0047】

酸性化合物が第1の検出可能な生成物であるような一部の実施形態では、第1の鑑別指示薬システムは更にpH指示薬を含んでもよい。細菌によって産生される酸性化合物を検出するための多くのpH指示薬が当該技術分野において知られている。適当なpH指示薬の非限定的な例としては、フェノールレッド、クロロフェノールレッド、ニュートラルレッド、プロモチモールブルー、及びプロモチモールパープルが挙げられる。第1の検出可能な生成物が気体を含むような一部の実施形態では、こうした気体は、例えば気体を閉じ込めることによって検出することができる(例えば、気体をブロス培養液中でダーラム管内に閉じ込める、その全容を参照によって本明細書に援用するところの「PETRIFILM腸内細菌科カウントプレートの解説ガイド(Interpretation Guide for the PETRIFILM Enterobacteriaceae Count Plate)」に述べられるような薄膜培養装置中においてヒドロゲル中にガスを閉じ込めることにより)。

10

【0048】

一部の実施形態では、第1の指示薬化合物は、酵素基質を含み得る。適当な発色性又は蛍光発生酵素基質が、サルモネラ・ボンゴリ(*Salmonella bongori*)種の微生物を含むサルモネラ微生物群のメンバーにより第1の検出可能な生成物(例えば着色生成物又は蛍光生成物)に変換(例えば酵素により加水分解)される。好ましくは、酵素基質は、*S. bongori*以外の種(例えば、*S. enterica*(*S. enterica*))に属するサルモネラ微生物によって第1の検出可能な生成物に変換される。適当な酵素基質の非限定的な例としては、カプリレートエステラーゼ酵素活性を検出するか、又は - ガラクトシダーゼ酵素活性を検出するための酵素基質が挙げられる。適当な発色性酵素基質としては、例えば5 - ブロモ - 6 - クロロ - 3 - インドリルカプリレート、4 - ニトロフェニルカプリレート、2 - ナフチルカプリレート、5 - ブロモ - 4 - クロロ - 3 - インドキシル - - D - ガラクトピラノシド、レゾルフィニル - - D - ガラクトピラノシド、4 - ニトロフェニル - - D - ガラクトピラノシド、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される酵素基質が挙げられる。

20

【0049】

本開示の第2の鑑別指示薬システムは、 - ガラクトシダーゼ酵素活性によって第2の検出可能な生成物に変換され得る第2の鑑別指示薬化合物を含む。したがって、第2の鑑別指示薬システムは、 - ガラクトシダーゼ酵素活性を生じる微生物と、 - ガラクトシダーゼ酵素活性を生じない微生物とを区別するものである。例えば、多くのサルモネラ菌は - ガラクトシダーゼ酵素活性を生じず、A.ラムバック(*A. Rambach*)(本明細書にその全容を参照により援用するところの「New plate medium for facilitated differentiation of *Salmonella* spp. From *Proteus* spp. And other enteric bacteria」、1990, Appl. Environ. Microbiol., vol. 56, pp. 301~303)により開示されるように、 - ガラクトシダーゼ酵素活性の指示薬を使用することにより腸内細菌科のラクトースを利用するメンバーから区別することができる。

30

40

【0050】

しかしながら、一部の報告によれば、幾つかのサルモネラの種(例えば、*S. bongori*(*S. bongori*))及び亜種(例えば、*S. enterica arizonae*及び*S. enterica diarizonae*))からの単離微生物の90%以上が、 - ガラクトシダーゼ酵素活性を生じることが判明したことが示されている(例えば、本明細書にその全容を参照により援用するところのA. M. Littell、「Plating medium for differentiating *Salmonella arizonae* from other *Salmonellae*」、1977, Appl. En

50

v i r o n . M i c r o b i o l . , v o l . 3 3 , p p . 4 8 5 ~ 4 8 7 を参照)。したがって、サルモネラ微生物と非サルモネラ微生物とを - ガラクトシダーゼ酵素活性に基づいて区別するように設計された培地及び対応する手順は、試料中に - ガラクトシダーゼ産生サルモネラ菌が存在する場合、試料中のサルモネラ微生物の数を誤って過小評価する可能性がある。本研究者らは、その方法で使用される培地がサルモネラ微生物と非サルモネラ微生物とを区別するうえで - ガラクトシダーゼ酵素活性の指示薬に頼ったものである場合であっても、幾つかの - ガラクトシダーゼ産生サルモネラ微生物を区別することができる方法を期せずして発見したものである。本開示に基づく適当な第2の鑑別指示薬化合物の非限定的な例としては、5 - プロモ - 4 - クロロ - 3 - インドリル - - D - ガラクトピラノシド、5 - プロモ - 3 - インドリル - - D - ガラクトピラノシド、5 - プロモ - 6 - クロロ - 3 - インドリル - - D - ガラクトピラノシド、2 - ニトロフェニル - - D - ガラクトピラノシド、4 - ニトロフェニル - - D - ガラクトピラノシドがある。一部の実施形態では、第2の鑑別指示薬システムは、ラクトース及びpH指示薬を含む。

10

#### 【0051】

本開示の方法は、グラム陽性微生物の増殖を阻害する第1の選択物質を使用することにより、栄養素に対する競合を低減してサルモネラ属のメンバーなどのグラム陰性微生物の増殖を促進する。適当な第1の選択物質の非限定的な例としては、抗生物質、胆汁酸塩、胆汁酸塩No. 3、コール酸、デオキシコール酸、クリスタルパイオレット、ノボピオシン、又は上記の選択物質の任意の2つ以上の組み合わせからなる群から選択される選択物質が挙げられる。

20

#### 【0052】

本開示の方法では、必要に応じて、サルモネラ属のメンバーではない少なくとも1つのグラム陰性腸内微生物の増殖を阻害するための少なくとも1つの第2の選択物質を使用することもできる。一部の実施形態では、第2の選択物質は、少なくとも1つのグラム陽性微生物の増殖も阻害し得る。有利な点として、第2の選択物質は、第1の選択物質との組み合わせにより、微生物（グラム陰性及び/又はグラム陽性微生物）を更に阻害することにより、栄養素に対する競合を低減してサルモネラ微生物の増殖を促進する。更に、少なくとも1つの第2の選択物質は、それが用いられなければ第1の鑑別化合物及び/又は第3の鑑別化合物をそれぞれの検出可能な物質に変換するであろう非サルモネラグラム陰性微生物の増殖をほぼ防止することもできる。したがって第2の選択物質は、非サルモネラ微生物が潜在的なサルモネラ微生物として解釈される確率を低減することができる。適当な第2の選択物質の非限定的な例としては、- ラクタム系抗生物質、アミノグリコシド系抗生物質、キノロン系抗生物質、サルファ系抗生物質、ポリミキシン系抗生物質、及び上記の抗生物質の任意の2つ以上の組み合わせからなる群から選択される選択物質が挙げられる。一実施形態では、少なくとも1つの第2の選択物質は、ナラジクス酸 ( n a l a d i x i c a c i d ) と、ストレプトマイシンと、ポリミキシンBとの組み合わせを含む。好ましくは、栄養培地中の少なくとも1つの第2の選択物質のそれぞれの濃度は、サルモネラ微生物の増殖を許容するように選択される。より好ましくは、栄養培地中の少なくとも1つの第2の選択物質のそれぞれの濃度は、すべてのサルモネラ微生物の増殖を許容するように選択される。

30

40

#### 【0053】

本開示の方法は、培養装置中で、栄養培地、第1の選択物質、第1の鑑別指示薬システム、及び第2の鑑別指示薬システムを試料と接触させて、接種済み培地を形成することを含む。試料は、培養装置中で、栄養培地、第1の選択物質、第1の鑑別指示薬システム、及び第2の鑑別指示薬システムと様々な方法のいずれによって接触させてもよい。例えば、本方法の一実施形態では、栄養培地、第1の選択物質、第1の鑑別指示薬システム、及び第2の鑑別指示薬システムを、水和された形態（例えば、水和された寒天培地など）の混合物として培養装置中に入れることができる。この実施形態では、試料（例えば、液体試料、固体試料、フィルター上に捕捉された液体及び/又は固体試料、液体媒質中に懸濁

50

された固体試料)は、例えばピペッティング、スプレッドプレート接種法、及びストリークプレート接種法などの当該技術分野では周知の方法によって、混合物中、又は混合物上に堆積、及び必要に応じて分配することができる。

#### 【0054】

代替的な実施形態では、試料(例えば液体及び/又は固体物質を含む)を、栄養培地、第1の選択物質、第1の鑑別指示薬システム、及び第2の鑑別指示薬システムを含む液体混合物(例えば、溶融、強化された液体寒天溶液)と接触させて混合し、次いで混合物を培養装置に移す。

#### 【0055】

別の代替的な実施形態では、成分(例えば、栄養培地、第1の選択物質、第1の鑑別指示薬システム、及び第2の鑑別指示薬システム)のうちの1つ以上のものを、米国特許第4,565,783号、同第5,601,998号、同第5,681,712号、同第6,265,203号、及び同第6,638,755号に開示される培養装置と同様の薄膜培養装置におけるような脱水された形態で培養装置中に配置することができる。この実施形態では、試料(例えば、水性液体試料、又は水性懸濁媒質中に懸濁させた固体試料)を例えば培養装置中にピペットで注入することにより、試料を脱水された成分と接触させることができる。この実施形態では、成分のうちの1つ以上のものを、試料を培養装置中に堆積させる前又は後に試料中に溶解又は懸濁することができる。

#### 【0056】

更に別の代替的な実施形態では、成分(例えば、栄養培地、第1の選択物質、第1の鑑別指示薬システム、及び第2の鑑別指示薬システム)のうちの1つ以上のものを、本明細書に述べられる薄膜培養装置におけるような脱水された形態で培養装置中に配置することができる。適当な水性液体(例えば、必要に応じて成分の1つ以上を含む滅菌水、滅菌緩衝溶液)を培養装置中にピペットで注入し、培養装置中のゲル化剤(存在する場合)を再水和させる。次いで、試料を、培養装置中に成分と接触させて堆積させる(例えば、ピペット注入、ストリーキング、試料を含むメンブレンフィルターを置くことなどにより)ことができる。

#### 【0057】

各成分(例えば、栄養培地、第1の選択物質、第1の鑑別指示薬システム、及び第2の鑑別指示薬システム)を培養装置中で試料と接触させることができる様々な他の手順が当業者には認識されるであろう。

#### 【0058】

本開示の方法は、接種済み培養装置を第1の時間にわたってインキュベートすることを更に含む。接種済み培養装置をインキュベートすることは、高い温度(例えば温度調節されたインキュベーター内で)に装置を保持することを含み得る。接種済み培養装置を高い温度(例えば25よりも高い温度)でインキュベートすることにより、サルモネラ属の微生物などの腸内微生物の増殖が促進される。サルモネラ微生物を培養するための多くの方法では、培養装置を約37(概ねヒトの体温)の環境に置く。しかしながら、この温度では、サルモネラ・ボンゴリ(*Salmonella bongori*)種のメンバーは、本開示の第2の鑑別指示薬システムを使用して検出可能な-D-ガラクトシダーゼ酵素活性を生じることが可能である。しかしながら、サルモネラ・ボンゴリ(*Salmonella bongori*)の多くは、40よりも高い温度では、増殖することはできるが、本開示の第2の鑑別指示薬システムを使用して検出可能な-D-ガラクトシダーゼ酵素活性は生じない。このため、本開示の方法は、接種済み培養装置を40よりも高い温度(例えば41以上の温度)で第1の時間にわたってインキュベートすることを含む。一部の実施形態では、接種済み培養装置をインキュベートすることは、接種済み培養装置を、端点を含めて41~44の温度でインキュベートすることを含む。一部の実施形態では、接種済み培養装置をインキュベートすることは、接種済み培養装置を41の温度でインキュベートすることを含む。一部の実施形態では、接種済み培養装置をインキュベートすることは、接種済み培養装置を42の温度でインキュベートすることを含む

10

20

30

40

50

。一部の実施形態では、接種済み培養装置をインキュベートすることは、接種済み培養装置を43の温度でインキュベートすることを含む。一部の実施形態では、接種済み培養装置をインキュベートすることは、接種済み培養装置を44の温度でインキュベートすることを含む。

#### 【0059】

培養装置は、試料中に存在する腸内微生物の増殖及び分裂を可能とするうえで十分な第1の時間にわたってインキュベートされる。一般的に、培養装置は約10時間の第1の時間にわたってインキュベートされる。一部の実施形態では、培養装置は約14～約48時間の第1の時間にわたってインキュベートされる。一部の実施形態では、培養装置は約18～約48時間の第1の時間にわたってインキュベートされる。一部の実施形態では、培養装置は約24～約36時間の第1の時間にわたってインキュベートされる。好ましい実施形態では、培養装置は約24±2時間にわたってインキュベートされる。

10

#### 【0060】

本開示の方法は、培養装置を観察して第1の検出可能な生成物の有無を検出することを含む。第1の検出可能な生成物は、サルモネラ・ボンゴリ (*Salmonella bongori*) 種の微生物を含むサルモネラ微生物群のメンバーによって産生される。この群のメンバーは、第1の鑑別指示薬化合物を(例えば、発酵、代謝活性、酵素活性により)第1の検出可能な生成物に変換する。一般的には、第1のインキュベート時間の後で栄養培地を観察する。いずれの実施形態においても、栄養培地を観察して第1の検出可能な生成物の存在を検出することは、培養装置を観察して第1の検出可能な色を検出することを含み得る。一部の実施形態では、第1の検出可能な色は、蛍光(例えば、第1の鑑別指示薬化合物が4-メチルウンベリフェリル-D-ガラクトピラノシドであるような実施形態で)によって検出することができる。

20

#### 【0061】

第1の鑑別指示薬システムが発酵性炭水化物及びpH指示薬を含むような実施形態では、第1の検出可能な色は、炭水化物を1つ以上の酸性生成物に変換することが可能な微生物のコロニーに近接(すなわち隣接)したpH指示薬と関連した発色領域であってよい。したがって、酸生成物がコロニー及び/又はコロニーの周囲の栄養培地中に蓄積するにしたがって、酸性生成物とpH指示薬との相互作用によって生じる発色領域がコロニーに近接して形成され、場合によってはコロニーも着色する。前記酸領域のサイズは、米国特許第5,601,998号に述べられるような栄養培地中の緩衝溶液の使用によって調節することができる。

30

#### 【0062】

第1の鑑別指示薬化合物が発色性酵素基質を含むような実施形態では、第1の検出可能な色は、微生物コロニーに近接した発色領域であり得る。例えば、発色領域は、微生物酵素が発色性基質(例えば4-ニトロフェニル-D-ガラクトピラノシド)と反応することによって生じる水溶性生成物(例えば4-ニトロフェノール)を含み得る。また、発色領域は、微生物酵素が発色性基質(5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル-D-ガラクトピラノシド)と反応することによって生じる非水溶性生成物(例えばインジゴ)を含んでもよい。

40

#### 【0063】

本開示の方法は、培養装置を観察して第2の検出可能な生成物の有無を検出することを含む。第2の検出可能な生成物は、-ガラクトシダーゼ酵素活性を有する微生物によって産生される。-ガラクトシダーゼ酵素活性を有する微生物は、第2の鑑別指示薬化合物を第2の検出可能な生成物に変換する。一般的には、第1のインキュベート時間の後で栄養培地を観察する。いずれの実施形態においても、栄養培地を観察して第2の検出可能な生成物の存在を検出することは、培養装置を観察して第2の検出可能な色を検出することを含み得る。一部の実施形態では、第2の検出可能な色は、光の吸光度又は反射率を観察することによって検出することができる。一部の実施形態では、第2の検出可能な色は、蛍光(例えば、第1の鑑別指示薬化合物が4-メチルウンベリフェリル-D-ガラ

50

クトピラノシドであるような実施形態で)によって検出することができる。

【0064】

いずれの実施形態においても、第1の検出可能な生成物は第2の検出可能な生成物の検出を実質的に阻害してはならず(例えば、色マスキング又は蛍光消光により)、第2の検出可能な生成物は第1の検出可能な生成物の検出を実質的に阻害してはならない(例えば、色マスキング又は蛍光消光により)点は当業者であれば認識されるところであろう。第1の検出可能な色及び第2の検出可能な色が蛍光によって検出されるような実施形態では、第1の検出可能な生成物は第2の検出可能な生成物と異なるフルオロフォアを含むものでなければならない点は当業者であれば認識されるところであろう。

【0065】

本開示の方法は、培養装置を観察して第1の検出可能な生成物及び/又は第2の検出可能な生成物を検出することを含む。本方法のいずれの実施形態においても、培養装置を観察することは、栄養培地、第1の選択物質、第1の鑑別指示薬システム、第2の選択成分、存在する場合には第2の選択物質、及び存在する場合には第3の鑑別指示薬システムを含む混合物を観察することを含み得る。本方法のいずれの実施形態においても、培養装置を観察することは、培養装置を視覚的に観察する(1つ以上の肉眼により)ことを含み得る。

【0066】

これに加えるか又はこれに代えて、本方法のいずれの実施形態においても、培養装置を観察することは、培養装置を機械的に観察する(例えば、いずれもその全容を参照により本明細書に援用するところの米国特許第6,243,486号、同第7,496,225号、及び同第7,351,574号に述べられるイメージングシステムのようなイメージングシステムを使用して)ことを含み得る。この実施形態では、培養装置を観察することは、イメージング装置を使用して培養装置の画像を生成することを含み得る。培養装置の画像を生成すること以外に、本方法は、処理装置を使用して画像を分析することを必要に応じて含み得る。

【0067】

本開示の方法を使用することにより、試料中のサルモネラ微生物を検出し、必要に応じて計数することができる。例えば、培養装置中の第1の検出可能な生成物の存在を観察することにより、サルモネラ微生物(例えば、サルモネラ・ボンゴリ(*Salmonella bongori*)種のメンバー及び/又はサルモネラ・エンテリカ(*Salmonella enterica*)種のメンバー)が試料中に存在する可能性を示すことができる。しかしながら、本開示に基づく方法では、第2の検出可能な生成物と並行して第1の検出可能な生成物の存在を観察することは、サルモネラ・ボンゴリ(*Salmonella bongori*)種の - ガラクトシダーゼ産生メンバー以外の微生物が試料中に存在することを示す。

【0068】

第3の鑑別指示薬化合物は、それから誘導される第3の検出可能な生成物が、第1の鑑別指示薬システムの第1の検出可能な生成物及び第2の鑑別指示薬システムの第2の検出可能な生成物から区別可能、好ましくは光学的に区別可能、より好ましくは視覚的に区別可能であれば、サルモネラ微生物を検出するための任意の適当な指示薬化合物であってよい。したがって、一実施形態では、第3の鑑別指示薬システムは、pH指示薬を、本明細書に述べられるように、第1の検出可能な生成物(例えば、乳酸などの酸性化合物及び/又は例えば二酸化炭素などの気体)に変換され得る(例えば発酵により)栄養素(例えば炭水化物)とともに含むことができる。別の実施形態では、第3の鑑別指示薬システムは、本明細書に述べられるような発色性酵素基質を含むことができる。更に別の実施形態では、第3の鑑別指示薬システムは、本明細書に述べられるような発色性酵素基質であってよい。本明細書に述べられるいずれの第1の鑑別指示薬システムも、第1及び第2の鑑別指示薬システム並びに/又は存在する場合には第4の指示薬システムを実質的に阻害せず、かつこれらから区別可能なものであれば、第3の鑑別指示薬システムとして使用するの

10

20

30

40

50

に適当であり得る。

【0069】

有利な点として、第3の鑑別指示薬システムは、試料中のサルモネラ微生物の存在を「確認する」ための手段として用いることができる。すなわち、培養装置中で第1の検出可能な生成物の存在が観察された場合、その存在は、試料中にサルモネラ微生物が存在する可能性を指示するものと考えることができる。しかしながら、第3の検出可能な生成物の存在が、第1の検出可能な生成物の存在と並行して観察された場合（すなわち、第1及び第3の検出可能な生成物が同じ細菌コロニーにともなっている場合）、この観察結果は、試料中にサルモネラ微生物が存在する確率がより高い（例えば有意に高い確率）ことを示し得るものである。

10

【0070】

接種済み培養装置を第2の時間にわたってインキュベートすることは、装置を高い温度に保持する（例えば温度調節されたインキュベーター内で）ことを含み得る。接種済み培養装置を高い温度（例えば、25よりも高いが約44以下の温度）でインキュベートすることにより、腸内微生物（例えばサルモネラ属のメンバー）による第3の鑑別指示薬化合物の第3の検出可能な生成物への変換を促進することができる。好ましい一実施形態では、培養装置は、端点を含めて35～42の温度で第2の時間にわたってインキュベートされる。より好ましい一実施形態では、培養装置は、42±1の温度（端点を含む）で第2の時間にわたってインキュベートされる。

【0071】

20

一部の実施形態では、第3の鑑別指示薬システムは、第1のインキュベーション時間の後に接種済み栄養培地と接触させられる。有利な点として、これにより第3の検出可能な生成物の検出に要する第2のインキュベーション時間の長さを短縮することができる。すなわち、一部の実施形態では、第2のインキュベーション時間を1時間～約6時間とすることができる。一部の実施形態では、第2のインキュベーション時間を約2時間～約4時間とすることができる。好ましい一実施形態では、第2のインキュベーション時間を4時間±1時間である。

【0072】

本開示に基づいて用いられる場合、本方法は、試料中のサルモネラ微生物の有無を検出することができる。図2は、図1に示される方法と関連した幾つかの分析ステップ及び必要に応じて行われる処理ステップの一実施形態を示している。図1に示されるように、培養装置を第1の時間にわたってインキュベートした後、培養装置を観察して（ステップ60）第1の検出可能な生成物の有無を検出し（ステップ100）、更に第2の検出可能な生成物の有無を検出する（ステップ110）。第1及び/又は第2の検出可能な生成物は、本明細書に述べられるようにして検出することができる。

30

【0073】

第1の検出可能な生成物が十分なインキュベーション時間の後で検出されない場合、試験試料は、ステップ105に示されるようにサルモネラ微生物を含まないものと推定される。第1の検出可能な生成物が観察された場合、第1の検出可能な生成物と並行した第2の検出可能な生成物の存在について培養装置を更に観察する（ステップ110）。第1の検出可能な生成物が第2の検出可能な生成物と並行して観察された場合、ステップ115に示されるように、試料はサルモネラ微生物を含まないものと推定される。

40

【0074】

第1の検出可能な生成物が微生物コロニーにともなって観察され、かつ第2の検出可能な生成物が観察されない場合、又は第2の検出可能な生成物が、微生物コロニーに近接した第1の検出可能な生成物と並行して観察されない場合、ステップ118に示されるように、試験試料は少なくとも1つのサルモネラ微生物を含むものと推定される。このサルモネラ微生物は、S.ボンゴリ（S. bongori）種のメンバーであり得るか、又はS.エンテリカ（S. enterica）種の非-ガラクトシダーゼ産生メンバーであり得る。場合により、操作者は、第1の検出可能な生成物を産生している微生物がサル

50

モネラ属のメンバーであるか否かを確認したい場合がある。これは、例えば本明細書に開示されるように、接種済み栄養培地を第3の指示薬システムと接触させる（例えば、第3の指示薬システムを含む物品を提供し、接種済み栄養培地を物品と接触させることにより）、必要に応じて行われるステップ65を行うことによって実現することが可能である。この必要に応じて行われるステップ65に続いて、本明細書に述べられるように、接種済み培養装置を第2の時間にわたってインキュベートする、必要に応じて行われるステップ70が行われる。第2のインキュベーション時間の後、本明細書に述べられるように、培養装置を観察して（ステップ75）第3の検出可能な生成物の有無を検出する（ステップ120）。第3の検出可能な生成物が観察された場合、ステップ125に示されるように、第1及び第3の検出可能な生成物をともなった微生物コロニーは、サルモネラ属のメン

10

#### 【0075】

いずれの実施形態においても、本方法は、ある群（例えば、サルモネラ微生物からなる群、  
-ガラクトシダーゼ産生微生物からなる群、  
-ガラクトシダーゼ産生サルモネラからなる群、非  
-ガラクトシダーゼ産生サルモネラの群）に属する微生物によって形成されるコロニーの数を計数することを更に含み得る。計数は、指示薬システム、又は各コロニーが反応する複数の指示薬システムに基づいて、培養装置内の別々の微生物コロニー

20

#### 【0076】

##### 実施形態

実施形態1は、サルモネラ微生物を検出する方法であって、

試験される試料、

培養装置、

グラム陰性腸内微生物の増殖を促進する栄養培地、

グラム陽性微生物の増殖を阻害する第1の選択物質、

サルモネラ・ボンゴリ (*Salmonella bongori*) 種の微生物を含むサルモネラ微生物群のメンバーによって第1の検出可能な生成物に変換され得る第1の鑑別指示薬化合物を含む第1の鑑別指示薬システム、及び

30

-ガラクトシダーゼ酵素活性によって第2の検出可能な生成物に変換され得る第2の鑑別指示薬化合物を含む第2の鑑別指示薬システム、を提供することと、

培養装置中で、栄養培地、第1の選択物質、第1の鑑別指示薬システム、及び第2の鑑別指示薬システムを試料と接触させて、接種済み培養装置を形成することと、

接種済み培養装置を第1の時間にわたって40よりも高い温度でインキュベートすることと、

培養装置を観察して第1の検出可能な生成物の有無を検出することと、

培養装置を観察して第2の検出可能な生成物の有無を検出することと、を含み、

第1の検出可能な生成物の存在を観察することが、サルモネラ微生物が試料中に存在する可能性を示し、

40

第2の検出可能な生成物と並行して第1の検出可能な生成物の存在を観察することが、サルモネラ・ボンゴリ (*Salmonella bongori*) 種の  
-ガラクトシダーゼ産生メンバー以外の微生物が試料中に存在することを示す、方法である。

#### 【0077】

実施形態2は、培養装置が、栄養培地、第1の選択物質、第1の鑑別指示薬システム、及び第2の鑑別指示薬システムがほぼ脱水された形態でその内部に配置された薄膜培養装置として提供される、実施形態1に記載の方法である。

#### 【0078】

実施形態3は、第1の検出可能な生成物が存在しないことを観察することが、試料中に

50



サルモネラ微生物が存在しないことを示す、実施形態 1 又は実施形態 2 に記載の方法である。

【 0 0 7 9 】

実施形態 4 は、栄養培地を観察して第 1 の検出可能な生成物の存在を検出することが、培養装置を観察して第 1 の検出可能な色を検出することを含む、実施形態 1 ~ 3 のいずれか 1 つに記載の方法である。

【 0 0 8 0 】

実施形態 5 は、第 1 の鑑別指示薬化合物が酵素基質を含む、実施形態 1 ~ 4 のいずれか 1 つに記載の方法である。

【 0 0 8 1 】

実施形態 6 は、酵素基質が、カプリレートエステラーゼ酵素活性を検出するか又は - ガラクトシダーゼ酵素活性を検出するための酵素基質を含む、実施形態 5 に記載の方法である。

【 0 0 8 2 】

実施形態 7 は、酵素基質が、5 - ブロモ - 6 - クロロ - 3 - インドリルカプリレート、4 - ニトロフェニルカプリレート、2 - ナフチルカプリレート、5 - ブロモ - 4 - クロロ - 3 - インドキシル - D - ガラクトピラノシド、レゾルフィニル - D - ガラクトピラノシド、及び 4 - ニトロフェニル - D - ガラクトピラノシドからなる群から選択される、実施形態 6 に記載の方法である。

【 0 0 8 3 】

実施形態 8 は、第 1 の検出可能な生成物がほぼ非水溶性である、実施形態 5 ~ 7 のいずれか 1 つに記載の方法である。

【 0 0 8 4 】

実施形態 9 は、第 1 の鑑別指示薬システムが、pH 指示薬と、メリピオース、2 - デオキシ - D - リボース、マンニトール、L - アラビノース、ズルシトール、マルトース、L - ラムノース、トレハロース、D - キシロース、及びソルビトールからなる群から選択される少なくとも 1 つの炭水化物とを含む、実施形態 1 ~ 6 のいずれか 1 つに記載の方法である。

【 0 0 8 5 】

実施形態 10 は、第 1 の検出可能な生成物がほぼ水溶性であり、第 1 の検出可能な生成物を観察することが、微生物コロニーに隣接した発色領域を観察することを含む、実施形態 1 ~ 9 のいずれか 1 つに記載の方法である。

【 0 0 8 6 】

実施形態 11 は、第 2 の検出可能な生成物を観察することが、培養装置を観察して第 2 の検出可能な色を検出することを含む、実施形態 1 ~ 10 のいずれか 1 つに記載の方法である。

【 0 0 8 7 】

実施形態 12 は、第 2 の鑑別指示薬化合物が、5 - ブロモ - 4 - クロロ - 3 - インドリル - D - ガラクトピラノシド、5 - ブロモ - 3 - インドリル - D - ガラクトピラノシド、5 - ブロモ - 6 - クロロ - 3 - インドリル - D - ガラクトピラノシド、2 - ニトロフェニル - D - ガラクトピラノシド、及び 4 - ニトロフェニル - D - ガラクトピラノシドなる群から選択される、実施形態 1 ~ 11 のいずれか 1 つに記載の方法である。

【 0 0 8 8 】

実施形態 13 は、第 1 の検出可能な生成物がほぼ水溶性でありかつ第 2 の検出可能な生成物がほぼ非水溶性であるか、又は、第 1 の検出可能な生成物がほぼ非水溶性でありかつ第 2 の検出可能な生成物がほぼ水溶性である、実施形態 1 ~ 12 のいずれか 1 つに記載の方法である。

【 0 0 8 9 】

実施形態 14 は、第 1 の選択物質が、抗生物質、胆汁酸塩、胆汁酸塩 No. 3、デオキ

10

20

30

40

50

シコール酸、コール酸、デオキシコール酸、クリスタルバイオレット、ノボピオシン、ナリジクス酸、ポリミキシンB、ストレプトマイシン、メチシリン、セフソルジン(c e f s o l u d i n)、又は上記の選択物質の任意の2つ以上の組み合わせからなる群から選択される、実施形態1～13のいずれか1つに記載の方法である。

【0090】

実施形態15は、培養装置が少なくとも1つの第2の選択物質を更に含み、少なくとも1つの第2の選択物質が、サルモネラ属のメンバーではない少なくとも1つのグラム陰性腸内微生物の増殖を阻害する、実施形態1～14のいずれか1つに記載の方法である。

【0091】

実施形態16は、第2の選択物質が、  
-ラクタム系抗生物質、アミノグリコシド系抗生物質、キノロン系抗生物質、サルファ系抗生物質、ポリミキシン系抗生物質、及び上記の抗生物質の任意の2つ以上の組み合わせからなる群から選択される、実施形態15に記載の方法である。

10

【0092】

実施形態17は、少なくとも1つの第2の選択物質が、ナラジクス酸(n a l a d i x i c a c i d)、ストレプトマイシン及びポリミキシンBの組み合わせを含む、実施形態16に記載の方法である。

【0093】

実施形態18は、培養装置をインキュベートすることが、培養装置を、端点を含めて41～44の温度でインキュベートすることを含む、実施形態1～17のいずれか1つに記載の方法である。

20

【0094】

実施形態19は、

サルモネラ微生物によって第3の検出可能な生成物に変換され得る第3の鑑別指示薬化合物を含む第3の鑑別指示薬システムを有する物品を提供することと、

物品を接種済み培養装置と接触させることと、

第2の時間にわたって接種済み培養装置をインキュベートすることと、

培養装置を観察して第3の検出可能な生成物を検出することと、を更に含み、

第1の検出可能な生成物と並行して第3の検出可能な生成物を観察することが、試料中のサルモネラ微生物の存在を示す、実施形態1～18のいずれか1つに記載の方法である

30

【0095】

実施形態20は、

腸内微生物によって第4の検出可能な生成物に変換され得る非鑑別指示薬化合物を提供することと、

培養装置を観察して第4の検出可能な生成物の有無を検出することと、を更に含み、

培養装置中で、栄養培地、第1の選択物質、第1の鑑別指示薬システム、及び第2の鑑別指示薬システムを試料と接触させて、接種済み培養装置を形成することが、培養装置中で、栄養培地、第1の選択物質、第1の鑑別指示薬システム、第2の鑑別指示薬システム、及び非鑑別指示薬化合物を試料と接触させて、接種済み培養装置を形成することを更に含む、実施形態1～19のいずれか1つに記載の方法である。

40

【0096】

実施形態21は、培養装置を観察することが、培養装置を視覚的に観察することを含む、実施形態1～20のいずれか1つに記載の方法である。

【0097】

実施形態22は、培養装置を観察することが、イメージング装置を使用して培養装置の画像を生成することを含む、実施形態1～21のいずれか1つに記載の方法である。

【0098】

実施形態23は、処理装置を使用して画像を分析することを更に含む、実施形態22に記載の方法である。

50

## 【 0 0 9 9 】

実施形態 2 4 は、群に属する微生物によって形成されたコロニーの数を計数することを更に含む、実施形態 1 ~ 2 3 のいずれか 1 つに記載の方法である。

## 【実施例】

## 【 0 1 0 0 】

本発明の目的及び利点を以下の実施例によって更に説明するが、これらの実施例に記載される特定の材料及びその量、並びに他の条件及び詳細は、本発明を不要に限定するものとして解釈されてはならない。特に断らないかぎり、部及び百分率はすべて重量を基準としたものであり、水はすべて蒸留水であり、分子量はすべて重量平均分子量である。

## 【 0 1 0 1 】

材料。各実施例の調製に用いた材料を表 1 に示す。

## 【 0 1 0 2 】

## 【表 1】

表 1. 材料

成分	説明	供給元
TSA	トリブシンソイ寒天培地	
緩衝ペプトン水		イー・エム・ディー・ケミカルズ社 (EMD Chemicals, Inc.)、ニュージャージー州ギブスタウン
バターフィールド緩衝液		エッジ・バイオロジカルズ社 (Edge Biologicals, Inc.) テネシー州メンフィス
トリス	ートリス (2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-プロパン-1, 3-ジオール)	シグマ・ケミカル社 (Sigma Chemical Co.) ミズーリ州セントルイス
TSA 斜面培地	トリブシンソイ寒天斜面培地	ブイ・ダブリュー・アール・インターナショナル社 (VWR International) ペンシルベニア州ラドナー
X-gal	5-ブロモ-4-クロロ-3-インドキシル-β-D-ガラクトピラノシド	バイオシンズ社 (Biosynth AG) スイス、スタード
IPTG	イソプロビル-β-D-チオガラクトピラノシド	シグマ・アルドリッチ社 (Sigma-Aldrich) ミズーリ州セントルイス
ストレプトマイシン硫酸塩		シグマ・アルドリッチ社 (Sigma-Aldrich)
ポリミキシンB硫酸塩		シグマ・アルドリッチ社 (Sigma-Aldrich)
ナリジクス酸ナトリウム塩		シグマ・アルドリッチ社 (Sigma-Aldrich)

## 【 0 1 0 3 】

各実施例で使用した細菌株を表 2 に示す。「FSD」の後に続く数字により表記された細菌株は、食品試料又は食品加工環境から単離されたものである。S. アゴナ (S. agona) FSD 122 のアイデンティティは DNA 配列分析によって確認した。「ATCC」の後に続く数字により表記された細菌株は、アメリカ合衆国培養細胞系統保存機関 (American Type Culture Collection) (バージニア州マナサス) より入手した。

## 【 0 1 0 4 】

## 【表 2】

表 2. 細菌株一覧

株の表記	アイデンティティー
ATCC43975	サルモネラ・ボンゴリ (Salmonella bongori)
FSD122	サルモネラ・ボンゴリ (Salmonella bongori)
FSD2577	サルモネラ・ボンゴリ (Salmonella bongori)
FSD2579	サルモネラ・ボンゴリ (Salmonella bongori)
FSD140	サルモネラ・エンテリカ血清型アゴナ (Salmonella enterica serovar agona)
FSD99001	サルモネラ・エンテリカ亜種アリゾナエ (Salmonella enterica subsp. arizonae)
FSD17	サルモネラ・エンテリカ亜種アリゾナエ (Salmonella enterica subsp. arizonae)
FSD115	サルモネラ・エンテリカ亜種アリゾナエ (Salmonella enterica subsp. arizonae)
FSD43973	サルモネラ・エンテリカ亜種ジアリゾナエ (Salmonella enterica subsp. diarizonae)
FSD99002	シトロバクター・フロインディー (Citrobacter freundii)
ATCC25922	大腸菌

10

## 【 0 1 0 5 】

## 実施例 1. サルモネラ薄膜培養装置の調製

本明細書にその全容を参照により援用するところの 2011 年 5 月 20 日出願の米国特許出願第 61/488,492 号 (代理人整理番号 67673US002) に述べられる手順に従って薄膜培養装置を調製した。粉末コーティングされた紙基材の調製に使用した粉末組成物は、2 重量部の 2 - デオキシ - D - リボース (2DDR、リサーチ・プロダクツ・インターナショナル社 (Research Products International Corp) イリノイ州マウントプロスペクト) と 98 部のグアーガム (M150 グアー MEYPROGAT ガム、メイホール・ケミカル社 (Meyhall Chemical AG)) とを混合することにより調製した。粉末コーティングに先立って、TTC を含む接着剤で紙をコーティングした。

20

## 【 0 1 0 6 】

表 3 に示される材料を容器中で 1 L の脱イオン水に加えることによってブロスコーティング混合物を調製し、米国特許第 6,022,682 号の実施例 1 に述べられる方法に従って混合した。

## 【 0 1 0 7 】

30

## 【表 3】

表 3. ブロスコーティング混合物の成分

材料	量 (グラム)
プロテオース・ペプトン No. 3	50.0
ブタペプトン	14.0
酵母抽出物	6.0
塩化ナトリウム	10.0
MOPS 酸	3.2
MOPS ナトリウム塩	5.2
フェノールレッドナトリウム塩	1.0
胆汁酸塩 No. 3	2.0
5-ブロモ-4-クロロ-3-インドキシル-β-D-ガラクトピラノシド	0.8
グアー	14

40

## 【 0 1 0 8 】

0.1 g の IPTG、2.0 g の尿素、5.0 g のメリビオース (シグマ社 (Sigma

50

a) )、0.005 g のナリジクス酸ナトリウム塩、0.005 g のストレプトマイシン硫酸塩、及び0.00075 g のポリミキシンB硫酸塩を、50 mL 滅菌遠心チューブ中で30 mL の滅菌脱イオン水に加え、ボルテックスして混合することによって、選択物質混合物を調製した。ブロス混合物を約40℃に冷却し、選択物質混合物を激しく混合しながら加えた。2.9 ミル (0.073 mm) のポリエステルフィルムのコロナ処理面にブロスをコーティングすることによって、カバーフィルムを調製した。

#### 【0109】

米国特許第6,022,682号に従って、基部部材、中心から直径7.3 cmの円を切り抜くことによってウェルを形成した発泡材スパーサー、及びカバープレートに接着剤転写テープを使用して互いに接着して、培養装置を組み立てた。各プレートは、プレート10のほぼ中心の円形のウェルにおいて乾燥したブロスでコーティングされた混合物が露出した、約10.3 cm × 10.2 cmの大きさのものであった。

#### 【0110】

実施例2. 腸内細菌科の異なる株によって産生される - ガラクトシダーゼ活性に対するインキュベーション時間の影響

実施例1に従って培養装置を作製した。各培養装置中の増殖培地を、使用前に1 mLの滅菌バターフィールド緩衝液で水和した。装置に接種する前に各装置を室温で少なくとも1時間保持することによって、ヒドロゲルを膨潤させた。

#### 【0111】

表2に示された各株の個々の純粋培養物(TSA斜面培地上での)からのコロニーを、1.0 mLの緩衝ペプトン水が入った個々の滅菌バイアルに移し、37℃で24 ± 2時間インキュベートして各株の純粋な細菌懸濁液を生成した。このサルモネラ懸濁液をそれぞれ、バターフィールド緩衝液で1:100に希釈した。大腸菌の懸濁液は希釈しなかった。次いで、それぞれの希釈及び無希釈懸濁液を10 µLの滅菌プラスチックループでストリークすることによって接種した。このようにして、それぞれ異なる細菌をストリークした接種済み培養装置のセットを調製した。次いで、この培養装置のセットをプラスチックバッグに封入し、水浴中に浸漬することによってインキュベートした。各バッグをこの方法により以下の温度でインキュベートした。すなわち、39℃、40℃、41℃、42℃、43℃、44℃、及び45℃。水浴の温度は±0.1℃に調節し、各バッグを24 ± 2時間浸漬した。それぞれの細菌の2つの複成物を試験した。インキュベートした培養装置をバッグから取り出し、観察結果を表4に示した。

#### 【0112】

## 【表 4】

表 4. 観察結果

微生物	観察結果
S. ボンゴリ (S. bongori) (ATCC43975)	39℃及び40℃でインキュベートしたプレート上のコロニーに隣接して青色の沈殿物が認められた。41℃、42℃、43℃、44℃、及び45℃でインキュベートしたプレート上では、コロニーに隣接して青色の沈殿物は認められなかった。45℃ではコロニーはより小さかった。
S. ボンゴリ (S. bongori) (FSD122)	39℃及び40℃でインキュベートした場合、コロニーに隣接して青色の沈殿物が認められた。41℃、42℃、43℃、44℃、及び45℃でインキュベートした場合、コロニーに隣接して青色の沈殿物は認められなかった。45℃ではコロニーはより小さかった。
S. エンテリカ血清型アゴナ (S. enterica serovar agona) (FSD140)	39℃、40℃、41℃、42℃、43℃、44℃、又は45℃でインキュベートした場合、コロニーに隣接して青色の沈殿物は生成されなかった。
S. エンテリカ亜種アリゾナエ (S. enterica subsp. arizonae) (FSD99001)	37℃及び42℃でインキュベートした場合に、コロニーによって青色の沈殿物が生成された(コロニーに近接して)。他の温度については試験しなかった。
大腸菌 (ATCC25922)	39℃、40℃、41℃、42℃、43℃、44℃、又は45℃でインキュベートした場合、コロニーによって青色の沈殿物が生成された(コロニーに近接して)。
S. エンテリカ亜種ジアリゾナエ (S. enterica subsp. diarizonae) (FSD43973)	39℃、40℃、41℃、42℃、43℃、44℃、又は45℃でインキュベートした場合、コロニーに隣接して青色の沈殿物が生成された。
S. ボンゴリ (S. bongori) (FSD2579)	37℃でインキュベートした場合、コロニーに隣接して青色の沈殿物が生成された。42℃でインキュベートした場合、コロニーによって青色の沈殿物は生成されなかった。
S. ボンゴリ (S. bongori) (FSD2577)	37℃でインキュベートした場合、コロニーに隣接して青色の沈殿物が生成された。42℃でインキュベートした場合、コロニーによって青色の沈殿物は生成されなかった。
S. エンテリカ亜種アリゾナエ (S. enterica subsp. arizonae) (FSD115)	39℃、40℃、41℃、42℃、43℃、44℃、又は45℃でインキュベートした場合、コロニーに隣接して青色の沈殿物が生成された。
シトロバクター・フロインディー (Citrobacter freundii) (FSD99002)	39℃、40℃、41℃、42℃、43℃、44℃、又は45℃でインキュベートした場合、コロニーに隣接して青色の沈殿物が生成された。
S. エンテリカ亜種アリゾナエ (S. enterica subsp. arizonae) (FSD17)	39℃、40℃、41℃、42℃、43℃、44℃、又は45℃でインキュベートした場合、コロニーに隣接して青色の沈殿物が生成された。

10

20

30

## 【0113】

これらの結果は、サルモネラ・エンテリカ S. (血清型) アゴナ (Salmonella enterica serovar agona) は、39 ~ 45 のすべての温度で - ガラクトシダーゼ活性を生じなかったことを示している。これらの結果は、大腸菌、シトロバクター・フロインディー (Citrobacter freundii)、サルモネラ・エンテリカ亜種アリゾナエ (Salmonella enterica subsp. arizonae)、及びサルモネラ・エンテリカ亜種ジアリゾナエ (Salmonella enterica subsp. diarizonae) の試験株はいずれも、39 ~ 45 の各温度で - ガラクトシダーゼ活性を生じたことを更に示している。これらの結果は、サルモネラ・ボンゴリ (Salmonella bongori) の試験株は 40 以下の温度では - ガラクトシダーゼ活性を生じたが、40 よりも高い温度では - ガラクトシダーゼ活性を生じなかったことを更に示している。

40

## 【0114】

実施例 3. サルモネラ微生物の存在を確認するための鑑別指示薬を含む検出物品の使用  
本明細書にその全容を参照によって援用するところの国際特許出願公開第 2012/092181 号の実施例 1 に述べられるようにして検出物品 (ディスク) を調製した。

## 【0115】

推定的な陽性結果 (実施例 2 に述べたようにして培養装置に接種し、インキュベートしたサルモネラ・ティフィムリウム (Salmonella typhimurium) A

50

ATCC 14028 及びサルモネラ・ボンゴリ (Salmonella bongori) FSD 122) を有する薄膜培養装置 (実施例 1 に述べるようにして調製したもの) を開き、ディスクをゲル表面上に伸ばした (気泡を最小限に抑えるため)。プレートを閉じ、42 で 4 時間インキュベートした。ディスクをコロニーに隣接した色変化について分析して、コロニーが検出物品中に存在する指示薬 (5 - ブロモ - 4 - クロロ - 3 - インドリル - D - ガラクトピラノシド) と反応したかどうかを確認した。赤色又は茶色から青色又は濃青色へのコロニーの色の変化によって、コロニー中のサルモネラ微生物の存在が示された。試験の結果を表 5 に示す。

【0116】

【表 5】

表 5. 培養装置で観察された結果の解釈

プレート番号	細菌	サルモネラ亜種確認結果
1	サルモネラ・ティフィムリウム (Salmonella typhimurium) (ATCC 14028)	陽性: 赤色～茶色の推定的陽性コロニーであり、コロニー周囲の黄色い領域が青色～濃青色のコロニーに変化した。
2	サルモネラ・ボンゴリ (Salmonella bongori) (FSD 122)	陽性: 赤色～茶色の推定的陽性コロニーであり、コロニー周囲の黄色い領域が青色～濃青色のコロニーに変化した。

【0117】

本明細書に引用するすべての特許、特許出願及び公開公報、並びに電子的に入手可能な資料の開示内容の全体を参照により援用する。本出願の開示内容と本明細書に援用されるいずれかの文書の開示内容との間になんらかの矛盾が存在する場合には、本出願の開示内容が優先するものとする。上記の詳細な説明及び実施例はあくまで理解を助ける明確さのために示したものである。これらによって不要な限定が行われるものと理解されるべきではない。当業者にとって明らかな変形は「特許請求の範囲」によって定義される本発明の範囲内に含まれるため、本発明は図示及び記載された厳密な細部に限定されるものではない。

【0118】

見出しはいずれも、読者の便宜を図るためのものであり、特に断らないかぎりはその見出しに続く本文の意味を限定するために使用されるべきではない。

【0119】

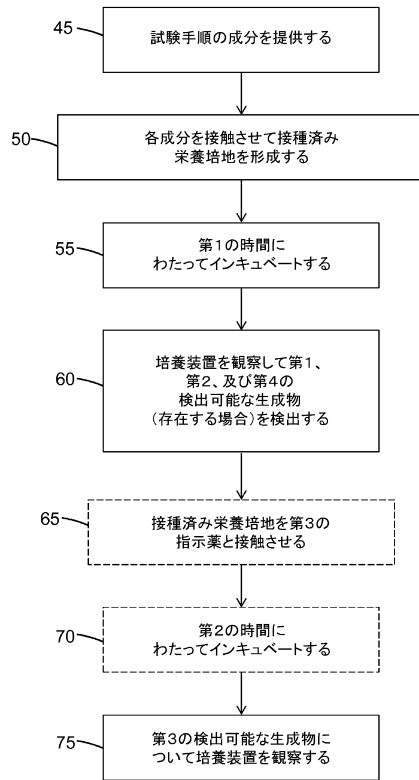
本発明の趣旨及び範囲から逸脱することなく様々な改変を行うことが可能である。これら及び他の実施形態は以下の「特許請求の範囲」に含まれる。

10

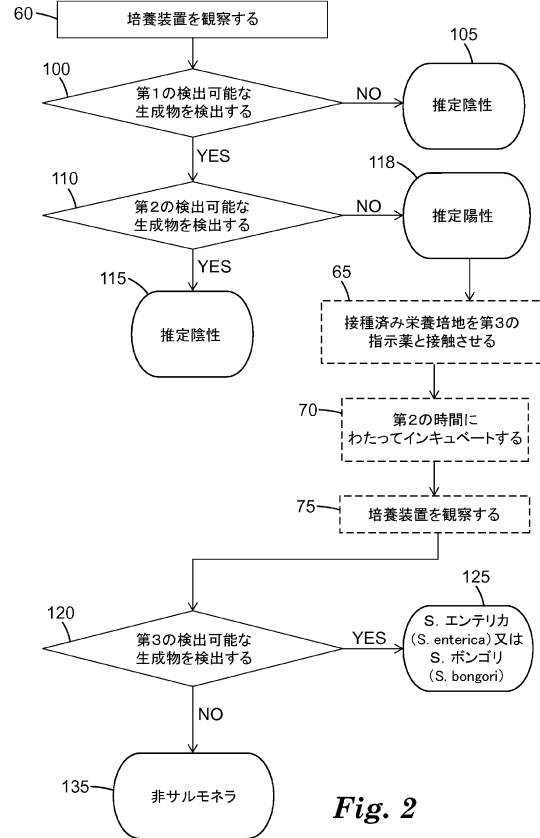
20

30

【図 1】



【図 2】





## フロントページの続き

- (72)発明者 ビンスフェルト, クリスティン エー.  
アメリカ合衆国, ミネソタ州, セント ポール, ポスト オフィス ボックス 33427  
, スリーエム センター
- (72)発明者 マッハ, パトリック エー.  
アメリカ合衆国, ミネソタ州, セント ポール, ポスト オフィス ボックス 33427  
, スリーエム センター
- (72)発明者 ケルト, マーラ エス.  
アメリカ合衆国, ミネソタ州, セント ポール, ポスト オフィス ボックス 33427  
, スリーエム センター
- (72)発明者 スタネナス, アダム ジェイ.  
アメリカ合衆国, ミネソタ州, セント ポール, ポスト オフィス ボックス 33427  
, スリーエム センター

審査官 平林 由利子

- (56)参考文献 特表2004-501654(JP,A)  
MANAFI M, NEW DEVELOPMENTS IN CHROMOGENIC AND FLUOROGENIC CULTURE MEDIA, INTERNATIONAL  
JOURNAL OF FOOD MICROBIOLOGY, NL, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, 2000年 1月 1日  
, V60 N2-3, P205-218

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q 1/00 - 3/00  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)  
CPlus/MEDLINE/WPIDS/BIOSIS(STN)