

(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2014-502510

(P2014-502510A)

(43) 公表日 平成26年2月3日(2014. 2.3)

(51) Int.Cl.

C 12 Q 1/68 (2006.01)
C 12 Q 1/02 (2006.01)

F 1

C 12 Q 1/68
C 12 Q 1/02

A

テーマコード (参考)

4 B 0 6 3

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 18 頁)

(21) 出願番号 特願2013-547602 (P2013-547602)
(86) (22) 出願日 平成23年12月27日 (2011.12.27)
(85) 翻訳文提出日 平成25年8月23日 (2013.8.23)
(86) 國際出願番号 PCT/US2011/067329
(87) 國際公開番号 WO2012/092238
(87) 國際公開日 平成24年7月5日 (2012.7.5)
(31) 優先権主張番号 61/428,892
(32) 優先日 平成22年12月31日 (2010.12.31)
(33) 優先権主張国 米国(US)

(71) 出願人 513162907
ゼウス サイエンティフィック、インク。
アメリカ合衆国、08869 ニュージャ
ージー州、ラリタン、ピー、オー、ボック
ス 38
(74) 代理人 100104411
弁理士 矢口 太郎
(72) 発明者 オ'ハラ、シャウン マーク
アメリカ合衆国、18954 ペンシルバ
ニア州、リッチボロ、9 コブルストーン
コート
F ターム(参考) 4B063 QA01 QA18 QQ02 QQ03 QQ06
QQ07 QQ08 QQ42 QR08 QR32

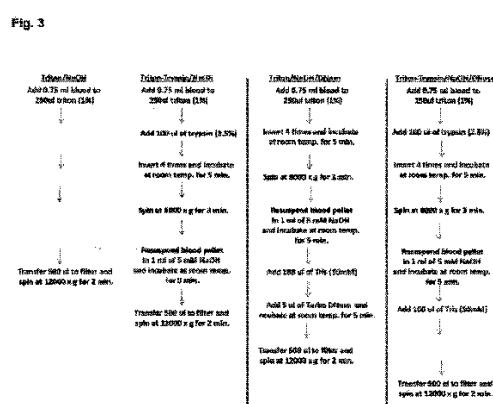
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】分子核酸ベースの技術を使用している細胞生存度を決定する改良された方法

(57) 【要約】

【解決手段】 本発明は、選択された運転中の電池の次の質問が微生物生存度の存在のインジケーターであるところを新規な方法および、選択的に死細胞を有効なおおよび死細胞を含有している混合薬から除外するために、臨床サンプル、血液製剤、健康診断 / 生物工学製品および食品の微生物細胞のようなキットと関連づける。特に、*Bacteremia* および *Fungemia* サンプルから微生物細胞生存度を有する相関のために、本発明は、*Polymerase Chain Reaction* (PCR) のようなダイレクト核酸増幅技術を実行する改良された方法および血液および他の体液の等温技術に関する。本発明によって設けられている改良された方法は特に敗血症の診断のために有利である、そして、全部で病的状態を決定するために、通常無菌のもう一方は流体を具体化する。

【選択図】 図3



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

選択的に、分子検出から、死細胞のDNAを有効なおよび死細胞（方法がこのことにより生細胞があることを示していて、生存可能な微生物の存在の徴候として増幅分析から微生物に特有の信号増加の2つ以上の時点を測定していて、化学変性剤の追加によって混合から増幅分析抑制因子を除去していて、混合に存在する死んだ微生物に運転中のものの比率を決定している核酸増幅分析から陽非汚染された結果を得る前に死微生物細胞DNAを除去して含む）を含有している混合薬から除外する方法。

【請求項 2】

比率の中で判定のライブである死んだ微生物に混合物が治療または処理の有効性の効果の程度として中で用いられることができる、請求項1に記載の方法。 10

【請求項 3】

化学変性剤が一つ以上の化学薬品の混成を具える、請求項1に記載の方法。

【請求項 4】

増幅アッセイはPCRアッセイである、請求項1に記載の方法。

【請求項 5】

混合物は血液および他の体液を有するものである、請求項1に記載の方法。

【請求項 6】

PCRアッセイの実行は、敗血症の診断における菌血症および真菌血症試料からの生存細菌との相関を提供するものである、請求項4に記載の方法。 20

【請求項 7】

混合の殺された細胞からの信号は抑制される、そして、混合の膜を危うくされた細胞は分析から除外される、請求項1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**

本出願は仮出願ではなく、2010年12月31日に提出された米国仮出願第61/428,892は参照により本明細書に組み込まれ、該仮出願に対して優先権を主張するものである。 30

【0002】

本発明は、分子検出によって、生細胞および死細胞を含む混合物から死細胞のDNAを選択的に除去するための方法に関するものであり、特に、菌血症、真菌血症、ウイルス血症および試料を含む寄生生物の他のタイプからの生存細菌と相関関係にある血液および体液において直接的ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）技術を実行するための改善された方法に関するものである。本発明によって提供される改善された方法は、敗血症の診断において特に役立つものである。

【背景技術】**【0003】**

敗血症を診断することにおいて、結果としてなる（TTT）時間は、患者生存で最も重要な判定である。現在では、血液培養は金本位であるが、比較的遅い。そして、正になるために15時間（3時間～5日の一般的な範囲において）の近似の時間の中央値との同一視のための生存可能な微生物を生成する。そして、その後、微生物識別は概して分析のためのさらに1～2日を加えることができる。PCRのような分子学的手法は、非常に改良型のTTTを微生物識別に対して提供するが、サンプル準備の間、生き残れる微生物細胞の不十分な選択性のため、主に特性の欠如が欠点である。従来は、血液の従来の敗血症PCR法は高コストのDNA隔離がPCR抑制剤を取り出すことを必要とする、しかし、主に死微生物細胞からのDNAおよびDNA隔離手順の間、従属する損失を処理しているサンプルの包含のため、隔離も血液培養の金本位と比較して偽陽性および感度の低下を与える。 40

【0004】

伝統的に、敗血症血液サンプルPCR準備は血液から常に単離されたDNAを有する、そして、長いおよび周知の血液を取り出す血液製剤はTaqポリメラーゼ(Kloucheおよびシユローダー物品が下記を引用したということを知る)のPCR Inhibitorsを引き出した。最近、この抑制を克服する試みで、一部のグループはこれらのポリメラーゼ上の血液製剤の抑制影響を減らすために設計される熱安定ポリメラーゼ(例えば周知の「omni taq」および「Phusion」技術)を修正したのと同様に、PCRを強化している混合物を開発した(JMD(2010)を参照; 12(2)(pp. 152 161))。しかしながら、これらの方の制約は、まだ、最低による敏感性の欠如が許容したどちらでも受ける血液量、そして、高いコスト、そして、隔離システムと関係しているサンプルおよび高い複雑さの損失。さらに、DNA Isolationシステムは死細胞からしばしば細胞遊離DNAを含む。そして、それは偽陽性を混乱させることを引き起こす効果を有することができる。

10

【0005】

Klouche、M. およびシユローダー(「血流感染症の診断のための急速方法」という題名の物品のU.)は、クランにおいて公表した。化学労働党。med. 2008; 46(7)(pp. 888 908)は、患者からの血液の微生物病原体の直接の核酸ベースの検出および識別が血流感染症の迅速な診断のための有望な道具でありえることを示す。本論文によると、血流感染症の日常的な精密検査のための幅広い範囲分子法による循環細菌であるか菌類の核酸の検出の重要性は、しかしながら、現在明白でない。品質の改良および分子ものの再現性のための奨励の問題微生物安全分析からの経験に示すように、血流感染症の診断用アプリケーションは、細菌核酸、プロッキングまたは過剰なヒトDNAの除去方法のための選択的な強化手順および臨床的に関連した所見を識別する生存度標識の使用を含む。現在高価なおよび技術的に厳しい技術(疾患を指向する多重PCR)にもかかわらず病原マイクロアレイ、そして、プロテオ・マイク側面図を作る伝染病診断のための重要な急速なおよび高いスループット診断手段として進化する可能性を有する。現時点では、3つの主考慮すべき问题是、血流感染症の日常的な診断の分子技術のユニークなアプリケーションを排除する: 1によるNAT結果の解釈において問題点)外部の汚染の高い危険、感染の後の核酸のうち拡張した持続、そして、一時的な菌血(2)臨床的に関連した低い細菌負荷のために、そして、特定のバクテリアおよび菌類の検出および3のために限られた分析的な感度)同じく分子もののプロテオ・マイク・テストによる日常的な抗菌性の感受性テストの不足。

20

【0006】

運転中および死電池の分化は、微生物診断法の重要なチャレンジである。代謝および再生活性および、病原性微生物の場合、潜在的健康リスクは、混合微生物人口の有効な部分に限られている。蛍光汚れを使用している流れ血球計算で、4つの生理的状態が、区別するために、従来の技術で使われる:繁殖的に現実的な、代謝的に作動中の、完全なおよび、透過する電池。状況に応じて、透過する細胞以外のすべてのステージには、復活に回復の可能性があることができて、このようにライブで潜在的に考慮されなければならない。3週(DNA)までの日間の範囲の細胞死の後のDNAの比較的長い持続に対する与えられるべきものベースの診断法は、運転中の電池の数を過大評価する傾向がある。試料から抽出されるDNAは、そうすることができる死透過する細胞を含んでいる4つの言及された生理的状態のいずれかの細胞から生じる。後者の検出は、しかしながら、要求されない。現実的なおよび不可逆的に傷害性電池をと区別するための最も重要な基準は、膜完全性である。膜を危うくされた細胞に由来するノイズをソートすることは、代謝動作および健康リスクを細菌共同体の完全なおよび生き残れる部分に割り当てるのを助ける。完全な膜を有する運転中の電池は、DNAを除外するそれらの能力によって特徴づけられた 容易に死者または膜を透過する結合染料 危うくされた細胞。

30

【0007】

近年では、EMA PCRは、運転中および死電池をと区別する顕微鏡であるか流れ

40

50

血球計算分析の使いやすい変形例であることが報告された。この診断DNAベースの方法は、運転中の死識別染料の使用を速度およびリアルタイムPCRの感受性と結合する。エチジウム・モノ・アジ化物(EMA)。DNA明るい可視光(460ナノメートルの最大吸収度)への暴露のDNAに化学ものの共有結合締め具がこの点に関しては用いられたと認めているアジ化物グループを有する染料をさし込むこと。細胞は、染料が危うくされた細胞壁/膜を有する死細胞を透過して、それらのDNAと結合することができて、5分間のEMAにさらされる。明るい可視光を使用しているEMAの光分解は、DNAおよび他の分子への共有結合リンクを形成することができるnitreneを生じる。

【0008】

光誘導性架橋結合は、DNAのPCR增幅の死細胞を妨げることが報告された。実際にDNAにEMA crosslinkingすることがゲノムDNA抽出の間、細胞片と共に損失に不溶性DNAおよび導線を与えることが最近示された。解放されたEMA(溶液において自由なままである)は、同時に、水分子と反応することによって不活発にされることができる。結果として生じるヒドロキシルアミンは、共有結合してDNAと結合するがもはやできない。生細胞(完全な細胞によって露光量の前に反応EMAから保護されている)からのDNA膜/細胞壁は、従って、細胞溶解の後、不活性EMAに影響を受けない。従って、このように現実的なおよび死電池の混成から成る細菌培養組織のEMA処理は、死細胞からDNAの選択的な除去につながる。テストされる種は、大腸菌O157であった:H7、サルモネラ属typhimurium、リステリア菌およびカンピロバクター属Jejuni。これらの研究は、しかしながら、死細胞からDNAの選択的な損失を調べなかった。

10

20

30

40

【0009】

この技術が有望であるにもかかわらず、DNA抽出より前のEMAの使用が大きな欠点が欠点であるとわかった。場合によっては、処理も、ログ位相において収集される生細胞のゲノムDNAのほぼ60%の損失に結果としてなった。EMAも直ちに、部分的なDNA損失に結果としてなっている他の細菌種の生細胞を透過すると述べられた。選択性の、そして、全体の適用性のこの不足は、新しく発達した代わりの化学製品のテストにつながった:Propidiumモノ・アジ化物(PMA)。公開された特許出願、ネッカーに対するWO/2007/100762、その他において、2007年9月7日に発表されて、選択的に運転中および死電池の定義済みの部分を有する細菌培養組織から死細胞のゲノムDNAの検出を取り除くPMAの適合性は、開示される。PMAはヨウ化(PI)propidiumと同一である。但し、次の場合は除く-アジ化物グループの更なる存在は露光量にDNAにクロス結合を許容する。PIは、混合集団の死細胞を確認するために広範囲に用いた。PMA分子(EMAの場合1つだけと比較した2つの正電荷)およびPIを有する生きられない細胞の選択的な染色が多種多様な細胞タイプにうまく実行されたという理由のより高い負担は、分野の人々にPMAの使用がEMAによって観察される欠点を緩和するかもしれないと思わせた。この発表された特許において、PMA集中およびインキュベーション時間は、これらのパラメータを異なる細菌種の幅広い範囲の研究に適用する前に、グラム陰性1つおよび1つのグラム陽性の有機体によって最適化された。開示された方法が、意図的に分子診断法を微生物共同体の部分に制限する完全な細胞膜。これは、完全なおよび膜妥協された細胞の混成をphenanthridium誘導剤にさらすことによって達成される。開示された好ましい実施例において、PCRは、テンプレートとして混合からゲノムDNAを使用して実行される。

50

【0010】

また、Published米国特許出願番号第2008/0160528号は、ローレンツに、2008年7月3日に発表されて、1またはいくつかのカオトロピック剤の存在および/または1の核酸またはいくつかの界面活性剤を分解させるためのヌクレアーゼ(特にDNA品位を下げるヌクレアーゼ)の使用を開示する。更なるこの特許出願にはDNAとこの種の方法を実施するためのキットと同様にRNAの混合物からRNAを精製する方法が開示されている。開示もする微生物細胞からの特に単離核酸のための方法が、加え

50

て、この種の方法を実施するためのキットと同様により高い真核生物細胞から成る混合サンプルにおいて提供する。

【0011】

もう一方は、特許出願、ルーディに対するWO / 2001 / 077379、その他を発行した。そして、2001年10月18日に発表される、サンプルの、そして、サンプルの中で細胞集団に関する定量的情報を得るために細胞を検出する方法を開示する。特に、方法は、サンプルの生活および死細胞をと区別するために開示される。方法は、サンプルの中で死細胞の核酸を修正する生存度プローブを有するサンプルを接触させることを有し、サンプルの細胞からの検出用核酸を備えている。記載されてもいるサンプル（成り立っている方法）の細胞を検出する方法である：サンプルの中で死細胞の核酸にラベルをつける生存度プローブを有するサンプルを接触させている（a）；ラベルをつけられたおよび非のラベルが付いた分数に、核酸を細胞から分離する；（b）そして、分数の一方または両方の核酸を検出している（c）。

10

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0012】

前述の背景技術からみて、方法シフトがライブで効果的に識別する方法対分子核酸ベースの分析技術（例えば、発生するPCRの前に）より前の死微生物細胞DNAを開発することであることが分かる、そして、それも、例えば、PCR抑制剤を取り出して、目標DNAに集中するように設計された従来の隔離の高コストの負の効果を迂回する。驚くべきことに、本発明の実施例の実行によれば、PCRが血液に由来する生き残れる微生物細胞と関連することが示された。そして、選択的な血球溶解の組合せを使用した。そして、次の微生物溶解およびPCRとともに（そして、または）デオキシリボヌクレアーゼを洗った。

20

【0013】

このように、上記の従来の方法とは対照的に、本発明は、分子核酸ベースの技術の、PCRを含む、劇的に高コストのDNA隔離およびサンプル準備を単純化することによる、そして、DNAを分離しなくて、むしろ死微生物DNAおよび細胞の迅速な分離の後、天然微生物溶解物上の迅速なおよび単純な直接解析を実行することによって、生き残れる微生物細胞の選択的な濃縮に結果としてなることによる潜在的TTT優位性を実現しようとする。これは、敗血症の診断において特に、そして、予想外に有利で、本発明の好ましい実施例に一致することを達成される：

30

I . すなわち、陽非汚染されたPCR結果より前の混乱させている死微生物細胞DNAの除去がその生細胞がそうであることを示すは、生存可能な敗血症微生物（s）の存在を提示して、この種のPCR結果意志として、示す現実的な血液微生物PCR = 敗血症微生物。

【0014】

II . 血液からの周知の、死微生物細胞が血液培養において成長することができなくされているように、このように、重要な微生物に特有のPCRを測定しているいかなる2つ以上の時点も单一の血液培養ピンからの増加が生存可能な微生物を測定していなければならないと合図する。

40

【0015】

III . 血液からのPCR抑制因子は、化学変性剤の単純な組合せを介して除去されることができる（chaotropes：洗剤、pH、塩類、アルコール類およびアミンを含んでいる合成物のような双極子瞬間を経た有機化学ベースの差動の救済及び酵素（例えばヌクレアーゼ、プロテイナーゼその他））そして、洗うこと。（このことによりDNA隔離を迂回して、微生物溶解物 Direct PCR を可能にする）

IV . 血液および血液培養に存在する生きている／死んだ微生物の比率が、それから、治療の、そして、処理の有効性を試験する効果の程度として使われることができる。

【0016】

50

したがって、分子検出から、改良された方法を選択的に死細胞のDNAを有効なおよび死細胞を含有している混合薬から除外するために提供することは、本発明の目的である。

【0017】

それは更なる目的である、効果的に識別する改良された方法が生きると定める本発明対分子核酸ベースの分析法より前の死微生物細胞DNAまたはPCRは事業を始めて、そして、それもPCR抑制剤を取り出して、目標DNAに集中するように設計されたそれらのような従来の隔離の高コストの負の効果を迂回する。

【0018】

例えば、次の微生物細胞溶解およびPCRとともに（そして、または）デオキシリボヌクレアーゼを洗って、選択的な血球溶解の組合せを使用することによって、PCRおよび他の分子分析技術の結果を血液に由来する生き残れる微生物細胞の存在に関連させることを提供することは、本発明の他の目的である。

10

【0019】

改良された方法をBacteremiaおよびFungemiaサンプルから血液のダイレクトPCR技術および生き残れる微生物細胞を有する相関のための他の体液を実行するために提供することは本発明の更に別の目的である。そして、この種の改良された方法が特に敗血症の診断のために有利な本発明によって設けられている。

【0020】

更なる目的および本発明の効果は、その好ましい実施例の以下の説明から明らかである。

20

【図面の簡単な説明】

【0021】

【図1】図1は、表形式で、DNA Polymerase (PolMA)を介してフィルタビードmill in situ微生物溶解および分析物分析を比較するために実行される実験および量的遺伝子に特有のPCRを経たゲノムDNAの結果を示す。

30

【図2】図2は、本発明による溶解物の微生物の検出に対する戦略の線図形の具体例を示す。

【図3】図3は、トリプシンおよびデオキシリボヌクレアーゼの追加が本発明の2つの「困難な」臨床サンプルの処理の間、観察されて詰まる重要な減少を可能にすることを示している工程系統図を示す。

30

【発明を実施するための形態】

【0022】

本発明が記載されていたにもかかわらず、以下の実施例も本発明の実施例の特定の具体例として、そして、理解の明快さのために設けられている。前へ本願明細書においてセットとしての本発明の教示を考慮して、特定の変更及び改造がこのように元気または本発明の範囲から逸脱することなく、記載されているこれらの実施例になされることができるることは、当業者にとって直ちに明らかである。

【0023】

カオトロピック剤（別名カオトロピック試薬およびchaotrope）は、高分子（例えばタンパク質、DNAまたはRNA）の三次元構造を崩壊させる物質であって、それらを変性させる。カオトロピック剤は、非共有結合力（例えば水素結合、ファンデルワールス力および恐水症の効果）によって伝達されるinter分子相互作用を安定させることを妨げる。円偏光二色性がchaotrope濃度依存的なファッショングにおいて滴定ができるにつれて手段によってそのようなものを検出したので、しばしば構造特徴。例えば、カオトロピック試薬は、含む：

40

尿素 6 - 8 つの mol / 1

グアニジウム塩化物 6 mol / 1

リチウム過塩素酸塩 4 . 5 mol / 1

変性（生化学）

加えて、負担を保護して、塩橋の安定化を防止することによって、高い一般的な塩類は

50

、カオトロピック特性を有することができる。水素結合は無極性メディアでより強いので、塩類（溶媒の双極子瞬間を増加させる）は水素結合を不安定にすることもできる。

【0024】

円偏光二色性がchaotrope濃度依存的なファッショントリニティにおいて滴定されることができるようにつれて手段によってそのようなものを検出したので、しばしば構造特徴。生化学および分子生物学の歴史的に役立つカオトロピック試薬の若干の例は、以下から成る：尿素6-8つのmol/1、グアニジウム塩化物6mol/1、リチウム過塩素酸塩4.5mol/1、alcohols、アミン（特に4原子のアミン）洗剤（特に非イオン物質）pH変化、ベタイン、プロリン、カルニチン、トレハロース、NP40など、本発明とのBSA.In一致と同様に、実験（DoE）プロセスの設計が、有効な製剤範囲の最適化およびさまざまなchaotropes（混合物または試薬または「カクテル」）の範囲の組合せのために使われた：それらがそれらのサイズ（濾過）および密度（遠心分離）に基づいて運転中の電池から容易に切り離されるように、a）は死セル構造を変性させる；そして、b）吹きさらしの有効なセルが切り離した結果として生じるchaotropeカクテルを作成する下流の分析增幅分析（例えばPCRおよび有効な細胞派生内在性タンパク質）と直接互換性を持つ、そして、それらのかなりの生化学動作を維持する溶液。事実上、カオトロピック・カクテルはその差動の膜完全性に基づいて死細胞からライブで分化するために最適化される。そして、生存度相関分析のための有効な細胞内在性タンパク質動作を維持する。

10

20

【0025】

サンプル準備：

優先血球溶解状況は、例えば、敗血症血液培養サンプルで見つかって、血液微生物混合物から血球の優先均質化を產生する。均質化は、効果的にこれらの2つの人口を切り離している濾過水側によるFeed側（所望の微生物細胞を保持する）から不必要な血球流体のフィルタの移動を可能にする充分なレベル（流体をつくる）で発生することを必要とする。これらの溶解状況は、微生物細胞が完全なままで、このように、微生物細胞を保持することによって均質化血球の迅速な／感受性が高いフィルタ・ベースの分離を可能にすることを可能にする。

30

【0026】

本発明によれば、それらの結果として生じる細胞片の差動の血球Lyssisおよび充分な均質化はフィルタがFeed側上の微生物を保持する差動の濾過性を可能にしている流体レベルまで減らされた血球に使用される。このように、次の不毛な流体分析のために、完全な微生物を切り離す。直径0.45um(0.22um)との間に0.煙突を測定しているポアサイズが充分でなければならないので、従来技術において人々に知られているポアサイズをフィルターに通す。しかしながら、これらの有効なポアサイズは、0.1より小さくありえたおよび微生物および差動の細胞片サイズ濾過性による0.45より大きくありえた。状況としては、所望の効果を成し遂げる洗剤、プロテイナーゼ、chaotrops、変性剤およびヌクレアーゼの最適化された組合せが挙げられるがこれらに限られない。

40

【0027】

微生物に特有のfilter in situは微生物がフィルタのFeed側に捕えられると共に物理的なおよび生化学細胞壁溶解方法を使用するとして本願明細書において定められる、そして、/、または、次の微生物に特有の分析物分析は元の位置にあてはまつた。「元の位置に」さらにまた、本願明細書において溶解を意味する、そして、または、所望の微生物細胞がフィルタのFeed側にまだ保持されると共に、次の分析は望まれていない干渉する細胞（すなわちB100d細胞）の差動の分離の後、発生する。このように、捕えられた微生物がフィルタをロードして、洗うために用いる残留するFeed Filter溶液においてたぶんつるされることを思われる。これらのここで、分離された、完全なおよび、フィルタを含まれた微生物を溶解させるために使用される体力は、酵素の細胞壁消化を含むがこれに限らずこの技術に熟練した人々に共通のそれらである。さ

50

らに、分離された微生物を含んでいるフィルタ側上の表面張力によって保持される残留する液体を接触させている直接の調査によるすべての微生物の本発明 filter in situ 超音波処理によれば、あるいは、微生物からフィルタの反対側と接触していて、固体による孔を経て、その溶解エネルギーを移していない音のプローブによって、材料を濾過する。加えて、血球が差別的に溶解して、濾過される血液において針で打ちつけられる微生物を捕えることが分かれたあとそれがフィルタ Feed 面に直接するにつれて、バクテリアおよびイーストの微生物溶解のための situ のフィルタ ビード 工場の効率が閉 microfuge 管において同様に発生することを驚くほど分かった。このように、filter in situ は、本明細書で定義されるように、より少ない操作（汚染へのより少ない可能性）を有するより効果的な処理を可能にしている敗血症サンプル準備の簡潔な簡略化したものである両方とも手動でより可撓性のフォーマット、そして、オートメーション化した装置デザインが。

10

【0028】

以下の実施例では使われるよう、用語が技術（すなわち流体だけが通過することができる媒体を配置することによって流体（液体またはガス）から固体の分離のために使われる機械であるか物理的な動作）で共通して使うにつれて、濾過は使用される。典型的単純な濾過において、濾過されている液体の特大の粒子はフィルタが、流体の構造および小さい粒子が通過する格子を通過することができない。そして、濾過水になる。

20

（実施例）

【実施例1】

【0029】

実験は、DNA Polymerase (PolMA) および量的遺伝子に特有の PCR を経たゲノム DNA を経てフィルタ ビード mill in situ 微生物溶解および分析物分析を比較するために行われた。結果は、図面の図 1 において例示される表に示される。

【0030】

相対的な qPCR 値を比較することがここでされるときに、Ct 値の解釈は有意差と考えられるために 2 より大きくなければならない。

30

【0031】

結果および結論：

qPCR 差が始まっている入力微生物スパイクおよび対応するフィルタ捕獲されたサンプルとの間に評価する親類は一般に、血液に針で打ちつけられて、それからフィルタの Feed 側に捕えられるさまざまな微生物の非常に高い%回復を示す、そうすると、ビード工場は「situ のフィルタ 工場」とここで称されるフィルタの供給側に溶解した。PCR によって測定可能だった 14 の異なる微生物のうち、わずか 4 (すべてのカンディダ・イースト) (28%) は、いかなる有意な PCR 回復違いも示した。それでも、これらのイーストのために、かなりの DNA ポリメラーゼ活性の増加が、これらの同じサンプルからあった。全体として、これは、優れた回復および高効率が高い DNA ポリメラーゼ活性および増幅可能なゲノム DNA を產生している situ の工場をフィルターに通すことを示した。予想外に、本発明に従う元の位置の従属する PolMA を濾過する太い赤いショーンの有意な負の値は、マイクロ fuge 管の重要な改良標準ミリングでありえる。

40

【0032】

本発明による溶解物の微生物の検出に対する戦略は、図 2 として本願明細書に追加される線図にまとめられることができる。

【実施例2】

【0033】

本発明の実施例のこの実施例は、従来の DNA 隔離技術のための、そして、微生物 lysate direct probe based PCR 技術が実行されることを可能にするための必要を迂回するための本発明の適合性を示す。

50

【0034】

a . 黄色ブドウ球菌 (S A) 標準血液培養 ((カンディダ・コンセンサス分析、 E . C o l i 、 E f a e c i u m) W B C 洗剤 + ベース溶解、小球形にすることおよび、洗うことによって続かれる) に封じられた。

【 0 0 3 5 】

b . 本発明に従う直接のプローブ手順がいずれの場合においても P C R の % 溶解物のより高い許容度に関して優れていたことは T a q M a n の調査および S Y B R を使用している直接的な溶解物 P C R の後、それを見つけられた (3 0 u l P C R で、 5 u l の少なくとも 5 0 0 0 の微生物から検出される抑制のない最高 1 7 % は、溶解物を機械加工する。血液培養陽性の瓶には 4 0 0 0 の微生物が入っている / m l 培養組織の、下調べの 2 m l を配置することは 8 0 0 0 の微生物 / 5 0 u l 溶解物を產生する P C R (上部 B C レベルは、分析許容度を必要とした) の 3 0 u l P C R 反応 = 1 6 0 微生物の 5 u l いずれ。現在、推定する 5 0 0 の m i c r o b e s / である B C の検出の制限が、瓶詰めにする、または、 1 0 の微生物 / m l 、従って、 5 u l = 2 。 1 0 の微生物 / 瓶 (一般的な) そしてそれから、 = 6 4 0 / b o t t l e (検出可能でありえる) に 6 2 倍になっている世代を必要としている 5 u l = 0 . 2 の微生物である。 10

【 0 0 3 6 】

c . したがって、それは、本発明に従ってそれを示された S A (c h a o t r o p e + 洗剤) M o l Y s i s バッファおよびデオキシリボヌクレアーゼ処理の中を走って、 1 人の T E によって、ペレット及び洗浄が工場 直接的なプローブ P C R と互換性を持つことになった。本発明の新規な改良された方法は、示された変性剤 (B e c t o n D i c k i n s o n S t a p h S / R キット (B e c t o n ディキンソンから市販されている)) (サンプルの 1 / I 0 e 6 t h だけが P C R においてある) のない血液培養ビード機械システムを変性剤を有する本発明の改良によって設けられているシステムと比較することによって、従来の技術の上の % 血液の感受性および許容度に関して、血液の改良は、利用されるダイレクト・システムを機械加工する (D o E : グアニジン / トウイーン、第三イオン / N a O H 、トウイーン / 第三イオンその他) 20

【 実施例 3 】

【 0 0 3 7 】

更に本発明の開発の間の実験で、本願明細書に追加される図 3 に示される工程系統図に示されるについて、トリプシンおよびデオキシリボヌクレアーゼの追加が本発明の 2 つの「困難な」臨床サンプルの処理の間、観察されて詰まる重要な減少を可能にすることが証明された。 30

【 0 0 3 8 】

本発明の大まかな基本的な原理および教示が変性剤対応天然溶解物 (ビード工場及び超音波学) のすべてのバリエーションを最適化するために適用ができる当業者によって認められるさまざまな生物学的組織サンプル (血液、体液および軟部組織を含むがこれに限らず) の d i r e c t p r o b e / S Y B R P C R 分析、だけでなく S A 上で特に記載されているが、また、さまざまな病原体 (例えはいかなるバクテリア、菌類、ウイルス、寄生虫、その他も) 間に。 40

【 0 0 3 9 】

上記例も、本発明によって設けられている方法の実行が定義済みの混合物の、または、運転中および殺された電池の定義済みの混合物によってスパイクをつけられる環境サンプルの殺された細胞から信号を能率的に抑制することができることを示す。本発明に従うサンプルの処理が膜を危うくされた細胞を分析から除外する良好な方法であるかもしれない点に注意することも、価値がある。

【 0 0 4 0 】

上の説明を要約すると、本発明は、更に下流の分析の前に細菌個体群の速いおよび e a s y t o p e r f o r m p r e 治療を可能にしている新規な方法を提供する。本発明の潜在的多数の使用が当業者によって認められるにもかかわらず、本発明によって設けられている方法は D N A に大きな影響を及ぼすことができる 病原診断法、バイオテロ

10

20

30

40

50

リズムおよび微生物生態学を含むさまざまな分野のベースの診断法。

【0041】

本発明の好ましい実施例の実行において、細胞が成長しないので、微生物ターゲット信号の重要な増加を示す単一の血液培養から分離平等政策の約数を使用している少なくとも2つの別々の時点のいかなるPCR測定も微生物成長によりなければならぬことは明らかである。それによって、生存可能な微生物（汚染効果を無視する）の存在を示す。生き残れる微生物溶解およびPCR準備の前に、すべての死細胞DNAが除去されるときに、血液の非成長ベースの単一ポイント陽性のPCR分析が生存可能な微生物の存在を示すと認められる - 誘導されるいかなるPCRプロセスも露出する汚染。これは、DnasingおよびWashing離れて死細胞DNAによってデモをされることがある。

10

【0042】

特定の参照がPCRに本願明細書においてなされるにもかかわらず、本発明の改良がPCRまたは類似の方法論に限られないItは更に認められることになっている。本発明用に考察される增幅分析としては、限定はされないが、他の周知の核酸ベースの技術（例えばDNA增幅分析、サーモ安定ポリメラーゼを組み込んでいるPCR分析および等温詳しい説明方法）が挙げられる。

【0043】

当業者が本発明の実施において、役立つさまざまな適切な增幅方法を思いつくことができる、そして、従って、本発明がこのことにより制限されることを目的としないと認められる。本発明がいずれでもおよびすべての方法のアプリケーションを有すると認められる。そして、手順および方法がDNA診断法を含む。かかるアプリケーションの例は限定されるものではないが、食品、水安全性、バイオテロリズム、健康診断／薬剤および／または病原検出を含んでいる何でも含んでいるそれらを包含する。食品業界において、本発明は、防腐剤の有効性をモニタするために用いることができる。本発明の方法には、すべての細胞に適用される可能性がある。細菌細胞が実施例において例証されるにもかかわらず、当業者は本発明の方法が多く他の細胞タイプに適用されることがあるということを従来技術において容易に知ることができる。本発明が、膜を崩壊させることができておよび／または細胞（例えば細菌細胞）を殺すことができる物質の識別のために用いられることもできる。多種薬剤の抵抗有機体が全盛で、保健機関および患者において広がった時から、新しい消毒薬の識別および／または抗生物質は現在優先権である。

20

【0044】

本発明の方法が、ツールとしての定量的PCRと結合して、細胞を培養して、成長を待つことに時間を費やさなければならないことのない消毒薬および／または抗生物質の衝撃を急速に、そして、うまく確認することができると更に認められる。ある場合には、有機体は培養組織に週まで何日もかかることができる、そして、このように、候補実質が細胞（微生物のような）を殺すことが可能だったかどうか見る重要な時間かかることができる。他の例において、特定の有機体は細胞培養で成長しない。そして、従って、物質が効果的だったかどうかについて決定することを困難にする。このように、本発明の新規な方法を適用することは、新しい消毒薬および／または抗生物質の識別のために、時間および資源を確保することができる。

30

【0045】

本発明による新規な方法の更なる効果は、使いやすさである。例えばこれらの方法を用いて、大量のサンプルは、生細胞（例えばバクテリア）の存在を、容易に見つけるため検査ができる。例えば、サンプルは、存在を見つけるため検査されることがある潜在的に完全な細胞膜を有する生きているバクテリア。他の実施形態では、環境サンプルは、生細胞（例えばバクテリア）の存在を見つけるため検査ができる。これらのサンプルは、例えば、土壤から集められることができるかまたは、プランツの部分であることができる。

40

【0046】

本発明による方法が、解放の前に、そして、その後、処理された廃水のテストのために、

50

更に用いられることができる。本発明による方法が、医薬のサンプル（例えば気道、インプラントおよびカテーテル面からスツール・サンプル、血液培養、痰、組織サンプル（また、切る）損傷材料、尿およびサンプル）をテストするために、更に用いられることができる。

【0047】

本発明による方法のアプリケーションの他の分野は、食品の制御でありえる。他の実施態様において、食品サンプルは、牛乳または乳製品（ヨーグルト、チーズ、甘いチーズ、バターおよびバターミルク）飲料水、飲料（レモネード、ビールおよび液）ベーカリ製品または肉製品から得られる。本発明の方法は、食品の防腐剤か食品（例えば低温殺菌）の抗菌性の処置が細胞増殖を防止したかどうか決定することができる。本発明による方法のアプリケーションの更なる分野は、製薬および美顔用製品（例えば軟膏、クリーム、チンキ、液、溶液、低下、など）の分析である。

10

【0048】

本発明の方法は、以前の方法をタイムリな警告および予防動きに不適当にしている長いインキュベーション時間（日の範囲で）の課題を解決する。加えて、最新のPCRベースの方法は、偽陽性結果（有機体が現実的でないにもかかわらず、有機体の陽性反応を示す）を与えることができる。さらに、調査は、それらがまだ現実的であるにもかかわらず、若干の有機体が、特定の状況の下で、複製する能力を失うことができるということを最近発見した。より適当な環境へ移される場合、これらの『現実的であるが、c u l t u r a b l e でない』（V B N C）バクテリアは従来の培養を使用して検出されることができなくて、成長するそれらの能力を回復するかもしれない。これらの欠点は、本発明の方法と組み合わせてこれらの有機体の遺伝物質 / D N A の検出に基づいて分子方法を適用することによって解決される。このように、例えば、サンプルの生存可能な有機体に注意している速いおよび正確な結果汚染された水（汚水、食品、医薬および／または化粧品）は、汚染された製品が市民にリリースされるのを防止することができる。現在の時間がかかる方法と比較して、サンプルの偽陽性（病原体が現実的でないにもかかわらず、病原体の陽性反応を示す）および迅速なテストを最小化することによって、本発明の方法は、資源を保存することができる。

20

【0049】

加えて、本発明の方法は、生態学的な研究（農業および／または生態学的なシステムのための特定の土壤の健康）のための微生物共同体の潜在的に生き残れるメンバーを確認することができる。伝統的に、細菌共同体を確認することは、培養ベースの方法またはプレート数を使用して実行された。コロニーがより非常に計数されるほど、バクテリアは、より、オリジナルでサンプル r o b l e m s であると推定される、しかしながら、時々この方法をタイムリなおよび正確な結果に不適当にしている長いインキュベーション時間（日の範囲で）から立つ。これらの欠点は、本発明の方法を利用している。

30

【0050】

本発明の方法を使用している分析を受けることができるバクテリアの中で非限定的な実施例、または、本発明の方法を使用しているサンプルの潜在的生存度を検出することは、成り立つ、に加えて S A 前述したように：B . 百日咳、Lepto spir a p o m o n a 、S . paratyphi A および B 、C . d i p h t h e r i a e 、C . t e t a n i 、C . botidinum 、C . perfringens 、C . f e s e r i およびその他ガス壊疽バクテリア、B . a n t h r a c i s 、P . p e s t i s 、パストウラ・ムルトシダ、髄膜炎菌、N . g o n o r r h e a e 、ヘモフィルス属 i n f l u e n z a e 、アクチノミセス属 { N o r c a r d i a で例えばある} アシネットバクター属（バシラス科）{ 例えば、バチルス属 a n t h r a s i s } バクテロイデス属 { バクテロイデス・フラジリスで例えばある} B l a s t o m y c o s i s 、B o r d e t e l l a 、ボレリア属 { B o r r e l i a b u r g d o r f e r i で例えばある} B r u c e l l a 、カンピロバクター属、クラミジア、C o c c i d i o i d e s 、コリネバクテリウム属 { コリネバクテリウム属 d i p t h e r i a e で例えばある} 大腸菌 { E n t e r o t o

40

50

xigenic 大腸菌および Enterohemorrhagic 大腸菌で例えはある) エンテロバクター属(例えばエンターobacter エアロ遺伝子)(Enterobacteriaceae)(クレブシエラ属、サルモネラ属(例えばチフス菌、腸炎菌、セラチア属、エルシニア属、赤痢菌)エリジペロスリックス属、ヘモフィルス属(例えばヘモフィルス属インフルエンザ・タイプB)ヘリコバクター属、レジオネラ(例えばレジオネラ・ニューモフィラ菌)Leptospira、リステリア属(例えばリステリア菌)Mycoplasma、マイコバクテリウム(例えらい菌およびヒト型結核菌)ビブリオ属(例えコレラ菌)Pasteurellacea、プロテウス、シュードモナス(例え緑膿菌)Rickettsiaceae、Spirochete(例え、Treponema spp. Leptospira spp. ボレリア属種。)赤痢菌 spp. Meningiococcus、Pneumococcus およびすべての連鎖球菌(例え肺炎連鎖球菌およびGroups A3 B およびC Streptococci)(ウレアプラズマ属)。トレポネーマ pallidum、黄色ブドウ球菌、Pasteurella haemolytica、コリネバクテリウム属 diphteriae トキソイド、髄膜炎菌多糖類、Bordetella pertussis、肺炎連鎖球菌、破傷風菌トキソイドおよびマイコバクテリウム ポビス。上記リストは、単に図示するだけのことを目的として、決してそれらの特定の細菌有機体に本発明を検出に制限するはずでない。

【0051】

本発明の特に好適な実施例は、PCRを利用する。PCRのための一般的な手順は、米国特許第4,683,195号(マリス、その他)および米国特許第4,683,202号(マリス、その他)において教示される。しかしながら、増幅反応ごとに使用する最適PCR状況は、通常、分野の職人によって共通に使用されるコンピュータ・ソフトウェアによって、経験的に決定されるかまたは推定される。多くのパラメータは、反応の成功に影響する。焼なまし温度および時間(拡張時間、Mg²⁺、pH およびプライマ、テンプレートおよびデオキシリボヌクレオチドの相対的な濃度)は、それらの一つである。通常、テンプレート核酸は、ポリメラーゼ反応の前に1~10分間の少なくとも約95°Cまで加熱することによって、変性する。ほぼ20~99サイクルの増幅は、90°C~0.05~1分間の96°Cの範囲の変性、48°Cから0.05~2分間の72°Cにわたっている温度の焼鈍および68°C~最適最後のサイクルを有する少なくとも0.1分間の75°Cの拡張を使用して実行される。実施例において、PCR反応は、各種類の0.5mmのdNTP および市販の熱安定DNAポリメラーゼの0.5~5台の装置に約100ngのテンプレート核酸、20uMの上流および下流のプライマおよび0.05を含むことができる。

【0052】

従来のPCRのバリエーションは、逆転写PCR反応(RT PCR)である、シングルに対する分子が立ち往生させた逆転写酵素第1の茂みRNA cDNA分子(それからポリメラーゼ連鎖反応の次の増幅のテンプレートとして使用される)。RNAの隔離は、公知技術である。RT PCRを実施することにおいて、目標核酸が変性する熱であったあと、逆転写酵素は通常、反応サンプルに加えられる。増幅の予定のサイクルが起こる前に、反応はそれから、cDNAテンプレートを生成するために充分な時間量(10~60分)のための適切な温度(例え30~45°C)に維持される。当業者は、定量的結果が要求される場合、注意がそれが維持するかまたは増幅された核酸の相対的なコピーのために制御する方法を使用するためにされなければならないと従来技術において認める。「定量的」増幅の方法は、当業者にとって周知である。例え、定量的PCRは、同時に同じプライマを使用している制御シーケンスの既知量を共同増幅することが必要でありえる。これは、PCR反応を調整するために用いることができる内部標準を提供する。

【0053】

PCRの他の二者択一は定量的PCR(qPCR)である。qPCRは小さい挿入または削除によって大きさにおいて目標と異なる内部相応する制御を使用している競争的技術

10

20

30

40

50

に通されることがある。しかしながら、非競争的および動力学的定量的 P C R が、使われることもできる。同時に標的配列と一緒に検出されることがある内部相応する制御とリアルタイム、動力学的 P C R 検出の組合せは、有利でありえる。

【0054】

P C R、R T P C R および / または q P C R のためのプライマは、その特定の有機体のために選択される D N A 領域を増幅するだけである地方または特定のバクテリアの範囲内で選択される。あるいは、すべての有機体のために一般的である D N A の部分の雑種を作って、増幅するプライマは、選択される。選択および構造が従来技術において公知で一般にあるプライマ。一般に、1つのプライマは、増幅されるシーケンスの各先端にある。この種のプライマが、通常長さの 10 ~ 35 のヌクレオチドの間にあって、18 ~ 22 のヌクレオチドの間から、好適な長さを有する。増幅されることができる最も小さいシーケンスは、長さ（前方及び後方のプライマ、長さの 20 のヌクレオチドの両方ともで例えばある、シーケンスの場所が、少なくとも 10 のヌクレオチドによって切り離される）のほぼ 50 のヌクレオチドである。非常に長いシーケンスは、増幅されることができる。1つのプライマは、「前方のプライマ」と呼ばれていて、増幅される領域の左端にある。前方のプライマは、順番に、D N A（倍足止めされる D N A が、一番上の索が 5 フィート ~ 3 フィート方向の両極性によって示される慣例を使用して描かれる）の一番上の要素の領域と同一である。前方のプライマの配列は、それが D N A の一番上の要素と相補的である D N A の要素に交雑するようなものである。他のプライマは、「復帰プライマ」と呼ばれていて、増幅される領域の右端にある。すなわち、それが順番にそれと相補的であるように、プライマがそうである後退のシーケンスは、シーケンスを逆補うものである、D N A の一番上の要素の領域。復帰プライマは、D N A の頂端部に交雫する。P C R プライマは、多くの他の状況を前提としても選択されなければならない。P C R プライマは、テンプレートの 1 つを超える領域に雑種形成を最小化するのに長く十分でなければならない（長さの好ましくは 10 ~ 30 のヌクレオチド）。可能ならば、一塩基のロングランをするプライマは、回避されなければならない。プライマは、40 および 60 % 間の 1 パーセントの G + C 内容を好ましくは有しなければならない。可能ならば、プライマの 3' 末端のパーセント G + C 内容は、プライマの 5' 末端のパーセント G + C 内容より高くなければならない。プライマは、プライマ（すなわちパリンドローム）の範囲内で他のシーケンスに交雫することができるシーケンスを含んではならない。同じ P C R 反応において使用する 2 つのプライマは、互いに交雫することが可能であってはならない。P C R プライマが上記の勧告に対する好ましくは選ばれた主題であるにもかかわらず、プライマがこれらの状況にかなうことは必要でない。他の下塗りには、動くことができるが、良い結果を得る下の可能性があることができる。

【0055】

所与のシーケンスの中で D N A を増幅するために用いることができる P C R プライマは、利用できる多くのコンピュータプログラムのうちの 1 つを使用して選択されることがある。この種のプログラムは、所与のシーケンス（すなわち、P C R プライマの機能を最大にすることができる他の状況に加えて、この種のプログラムは、上で述べられる状況を前提として、プライマを選択する）の増幅のために至適であるプライマを選択する。1つのコンピュータプログラムは、P C R プライマの選択のためのルーチンがある G e n e t i c s C o m p u t e r G r o u p (G C G は、最近 A c c e l r y s になった) 分析一括法案である。

【0056】

下で開示されるオリゴヌクレオチドプライマおよび調査は、多くの方法でなされることができる。これらのオリゴヌクレオチドを作る 1 つの方法は、購入可能な核酸シンセサイザを使用してそれらを総合することである。この種のシンセサイザのバラエティが、存在して、当業者に周知である。

【0057】

本発明と関連して役立つ P C R の他の二者择一は、特定の D N A または R N A 目標の検

10

20

30

40

50

出の等温核酸增幅検査法である。非 核酸の等温增幅のための制限する実施例は、均一なリアルタイム索置換増幅（圧延円増幅の基礎を形成される Ph 29 DNA ポリメラーゼ）である。DNA 塩基配列決定のテンプレート、PNA オープナによって援助される二重DNA配列の圧延円増幅またはDNA分析物のループによって媒介される等温増幅。

【0058】

核酸は、雑種形成方法によって検出されることもできる。

これらの方法では、ラベルをつけられた核酸は、ラベルをつけられたかラベルのない核酸の調査を含んでいる基板に加えられることがある。あるいは、ラベルのないかラベルのない核酸は、ラベルをつけられた核酸の調査を含んでいる基板に加えられることがある。¹⁰ 実施例、Micro Array Analysis、マーク Schena、ジョン・ワイリー社、ホーボーケ N.J. 2003のために、雑種形成方法は、中で開示される。

【0059】

核酸を検出する方法は、ラベルの使用を含み得る。例えば、識別用放射性同位元素は、写真フィルムまたは磷酸映像器（放射性リン酸塩編入を検出して、定量化するために）を使用して検出されることがある。蛍光マーカは、発された光（典型的な装置のために、米国特許第5,143,854号を参照）を検出するために光検出器を使用して検出されることができて、定量化されることがある。酵素標識は、酵素に基板を提供して、酵素の基板に及ぼす作用によってできる反応製品を測定することによって、典型的に検出される。比色ラベルは、単に着色したラベルを視覚化することによって検出される。実施例において、増幅された核酸分子は、直接増幅生成物を核酸をさし込んでいる染料で染色することによって視覚化される。当業者にとって明らかであるように、典型的な染料は、含む²⁰、しかし、SYBR 緑、SYBR 青、D API、propidium ヨウ素、Hoechst、SYBR 金および臭化エチジウムに制限する。増幅されたDNA分子にさし込まれる発光の染料の量は増幅産物の量に正比例する。そして、それは製造業者の指示に従って Fluorolager (分子 Dynamics) または他の等価な装置を使用して便利に定量化されることができる。この種の方法のバリエーションは、選択されたものの染色および視覚化が続く増幅産物のゲル電気泳動である染料をさし込むこと。あるいは、標識化オリゴヌクレオチド・ハイブリッド形成プローブ（例えば蛍光プローブ（例えば蛍光反響エネルギー転送 (FRET) の調査および比色プローブ））は、増幅を検出するために用いることができる。要求される所で、テストされている生物学的実体のゲノム配列典型的の特定の増幅は塩基配列決定によって検査されることができるかまたは増幅産物が予測されたサイズを有することを証明していることができて、予測された規制消化パターンを呈することができるか、または、正しいクローンをつくられたヌクレオチド配列に交雑することができる。

【0060】

本発明には、キットが具備されている。例えば、キットは、特に、または、一般に有機体に対応する核酸分子を増幅することに役立つプライマ、バッファおよびDNAを分離するための試薬およびPCRのための試薬を含むことができる。キットは検出可能的に標識化オリゴヌクレオチドを含むこともできる。そして、それは興味がある有機体に対応するポリペプチドをコード化している核酸配列に交雑する。キットは、試験サンプルと比較して検定することができて、含まれることができる制御サンプルまたは一連の制御サンプルを含むこともできる。キットの各構成要素は個々の容器の範囲内で囲まれることができ、そして、キットを使用して実行される分析の結果を解釈するための指示とともに、さまざまな容器の全てが單一のパッケージの範囲内であることができる。⁴⁰

【0061】

あたかも個々の刊行、特許または特許出願が引用したものとすることが特に、そして、個々に示されるかのように、すべての参考文献の内容は、同じ範囲に本願明細書に引用したものとすると、特許および公開された特許出願がこの用途の全体にわたって引用した。

【0062】

前述の詳細な説明は理解だけの明るさのために与えられた、そして、変更態様が当業者

10

20

30

40

50

にとって明らかであるにつれて、不必要な限界はそこから理解されてはならない。それは本願明細書において設けられている情報のいずれも従来技術であるか関連するという承認でないために現在請求する発明またはそれ、いかなる刊行も特に、または、暗に、参考されて従来技術である。

【0063】

さもなくば定められない限り、本願明細書において用いられるすべての専門的なおよび科学的な用語は共通に、本発明が帰属する当業者によって従来技術において理解するのと同じ意味を有する。本発明が本発明の特定の実施例と関連して記載されると共に、それが更なる変更態様ができる、そして、この用途が続いている本発明のいかなるバリエーションも、使用法または改作をカバーすることを目的とすることが理解されよう、一般に、本発明が関係する技術の範囲内で周知であるか慣習的な実行の範囲内で来る、本発明の中で、そして、現在の開示からのこの種の離脱を含む原理、そして、そのことは先に記載される基本的特徴に適用されることができる、そして、中で以下の通りに、添付のものの範囲は請求する。

【0064】

また、本発明の好ましい実施例の中で確かな記載されていて、上で特に例証する、本発明がこの種の実施例に限られていることが意図されない、そして、いずれの種類の限界は以下の請求項だけに含まれる。

10

【図1】

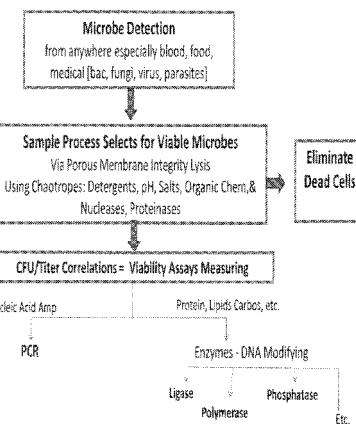
Fig. 1
Recovery Comparison of Microbe Analyses: Standard Bead Mill Vs. Novel Fiber Mill In Situ measuring DNA Polymerase [fDNA] and dG.

Beads	Microbe	After 0.5 min		After 10 min		After 20 min		After 30 min		After 40 min	
		Standard Bead Mill	Novel Fiber Mill								
Y.E.	S. aureus	98	96	91	93	85	85	75	72	70	70
Y.E.	E.Coli	98	95	91	90	85	84	75	73	70	70
Y.E.	S. Enteritidis	98	95	91	90	85	85	75	73	70	70
Y.E.	S. Typhimurium	95	94	90	91	85	85	75	73	70	70
Y.E.	E.Coli	98	92	91	90	85	85	75	73	70	70
Y.E.	S. Enteritidis	98	95	91	90	85	85	75	73	70	70
Y.E.	S. Typhimurium	95	92	90	90	85	85	75	73	70	70
Y.E.	C. Enterobacter	98	94	91	90	85	85	75	73	70	70
Y.E.	C. freundii	98	92	90	90	85	85	75	73	70	70
Y.E.	S. Agona	98	95	91	90	85	85	75	73	70	70
Y.E.	M. morgani	94	96	91	90	85	85	75	73	70	70

【図2】

Fig. 2

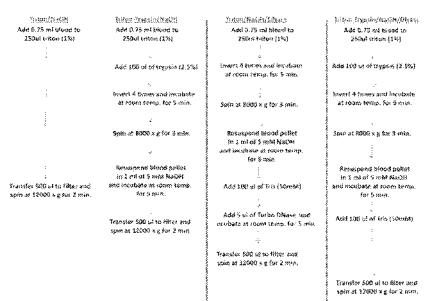
Microbe Crude Lysate Detection Strategy



Beads	Microbe	After 0.5 min		After 10 min		After 20 min		After 30 min		After 40 min	
		Standard Bead Mill	Novel Fiber Mill								
D.L.	S. enteritidis	98	91	87	85	75	74	70	68	65	65
D.L.	E. coli	98	94	93	92	85	85	75	73	70	70
D.L.	S. typhimurium	94	91	89	88	75	75	70	68	65	65
D.L.	C. freundii	98	92	88	87	80	79	75	73	70	70
D.L.	C. enterobacter	98	94	91	90	85	85	75	73	70	70
D.L.	M. morganii	98	95	92	91	85	85	75	73	70	70
D.L.	C. freundii	98	92	90	89	85	85	75	73	70	70
D.L.	C. freundii	98	94	91	90	85	85	75	73	70	70
D.L.	M. morganii	94	96	91	90	85	85	75	73	70	70

【図3】

Fig. 3



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US2011/067329 31-05-2012

International application No.

PCT/US 11/67329

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - C12Q 1/68; G01N 33/48 (2012.01)
USPC - 435/6.12; 435/91.2

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)
IPC(8): C12Q 1/68; G01N 33/48 (2012.01)
USPC: 435/6.12; 435/91.2Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
USPC: 435/6.1
Journal of Clinical Microbiology, January 2010; Vol 48Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WEST (PGPB, USPT, EPAB, IPAB); Google Scholar; esp@cenet: viability, cell, live, dead, ratio, blood, body fluid, denaturant, PCR, Bacteremia, Fungemia, septicemia, pcr inhibitors, Zeus Scientific, viability, enzyme

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2007/100762 A2 (NOCKER et al.) 7 September 2007 (07.09.2007), pg 2, ln 3-6; pg 3, ln 9-11; pg 3, ln 25-30; pg 4, ln 13-16; pg 20, ln 12-16; pg 27, ln 11-25; pg 27, ln 28-30; pg 43, ln 6-10; Fig 8.	1-7
Y	US 6,210,881 B1 (LITTLE et al.) 3 April 2001 (03.04.2001), abstract; col 5, ln 20-26; col 5, ln 37-60.	1-7
Y	TSALIK et al. Multiplex PCR To Diagnose Bloodstream Infections in Patients Admitted from the Emergency Department with Sepsis. Journal of Clinical Microbiology, January 2010; Vol 48, Pages 26-33; especially abstract; pg 29, col 2, para 2; pg 32, col 1, para 2.	6

 Further documents are listed in the continuation of Box C.

* 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 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
3 May 2012 (03.05.2012)	31 MAY 2012
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,R0,RS,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,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,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,QA,RO,RS,RW,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN