

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成30年7月19日(2018.7.19)

【公表番号】特表2017-518768(P2017-518768A)

【公表日】平成29年7月13日(2017.7.13)

【年通号数】公開・登録公報2017-026

【出願番号】特願2017-517415(P2017-517415)

【国際特許分類】

C 12 Q 1/68 (2018.01)

C 12 M 1/34 (2006.01)

G 01 N 33/53 (2006.01)

【F I】

C 12 Q 1/68 A

C 12 M 1/34 B

G 01 N 33/53 M

【手続補正書】

【提出日】平成30年6月11日(2018.6.11)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

臨床サンプル中の微生物を検出し特徴付けるための方法であって、

a) 臨床サンプルを培地を含む第1培養容器に導入する工程と、

b(i) 任意で、前記第1培養容器中の前記臨床サンプルを前培養する工程と、

b(ii) 任意で、前記臨床サンプル／前記培地の混合物の一部分、又は前培養を行った場合は前記臨床サンプルの培養物の一部分、を前記第1培養容器から取り出し、前記一部分を培地を含む第2培養容器に導入し、任意で前記第2培養容器中の前記一部分を前培養する工程と、

c) テストアリコートを前記第1培養容器及び／又は前記第2培養容器から取り出し、前記第1培養容器及び／又は前記第2培養容器中の前記臨床サンプル及び／又は前記一部分を培養する又は引き続き培養する工程と、

d) 前記テストアリコートからDNAを分離する工程と、

e) 微生物を同定し、前記微生物における一つ以上の遺伝的薬剤耐性マーカーの有無を検出するために、前記DNAに対して核酸検査を行う工程であって、

前記核酸検査は、

i) 一つ以上の微生物同定用核酸プローブ及び／又はプライマーであって、特定の微生物の同定に関する(identificatory)ヌクレオチド配列に特異的にハイブリダイズ可能なプローブ若しくはプライマー、又は、特定の微生物の同定に関するヌクレオチド配列を選択的に增幅可能なプライマーと、

ii) 一つ以上の薬剤耐性マーカー検出用核酸プローブ及び／又はプライマーであって、遺伝的薬剤耐性マーカーを示すヌクレオチド配列に特異的にハイブリダイズ可能なプローブ若しくはプライマー、又は、遺伝的薬剤耐性マーカーを示すヌクレオチド配列を選択的に増幅可能なプライマーと、

を用いて行われ、

前記プローブ及び／又はプライマーが前記DNAにハイブリダイズしたか否か、及び／

又は、前記プライマーが伸長したか（例えば増幅反応が起こったか）否かを検出する工程と、

f) 工程(e)において微生物が同定された場合、工程(c)からの前記培養臨床サンプル及び／又は前記一部分に対して薬剤感受性検査を行う工程であって、増殖又は増殖マーカーを評価することによって前記薬剤感受性検査における微生物増殖を観察し、工程(e)で検出された前記微生物及び剤耐性マーカーの同一性によって前記薬剤感受性検査で用いる抗菌剤の種類と濃度を判定し、任意で前記第1培養容器及び／又は前記第2培養容器中の前記臨床サンプル及び／又は前記一部分を引き続き培養する工程と、

g) 工程(e)において微生物菌株が同定されなかった場合、微生物を同定し、その薬剤耐性プロファイルを判定するための更なる微生物同定と薬剤感受性検査の実施を可能するために、前記臨床サンプル及び／又は前記一部分を更に培養する工程と、を含む方法。

【請求項2】

請求項1に記載の方法であって、

前記方法は、

- a) 臨床サンプルを培地を含む培養容器に導入する工程と、
- b) 任意で、前記培養容器中の前記臨床サンプルを前培養する工程と、
- c) テストアリコートを前記培養容器から取り出し、前記培養容器中の前記臨床サンプルを培養する又は引き続き培養する工程と、
- d) 前記テストアリコートからDNAを分離する工程と、
- e) 微生物を同定しあつ前記微生物における一つ以上の遺伝的薬剤耐性マーカーの有無を検出するために、前記DNAに対して核酸検査を行う工程であって、

前記核酸検査は、

i) 一つ以上の微生物同定用核酸プローブ及び／又はプライマーであって、特定の微生物の同定に関するヌクレオチド配列に特異的にハイブリダイズ可能なプローブ若しくはプライマー、又は、特定の微生物の同定に関するヌクレオチド配列を選択的に増幅可能なプライマーと、

ii) 一つ以上の薬剤耐性マーカー検出用核酸プローブ及び／又はプライマーであって、遺伝的薬剤耐性マーカーを示すヌクレオチド配列に特異的にハイブリダイズ可能なプローブ若しくはプライマー、又は、遺伝的薬剤耐性マーカーを示すヌクレオチド配列を選択的に増幅可能なプライマーと、

を用いて行われ、

前記プローブ及び／又はプライマーが前記DNAにハイブリダイズしたか否か、及び／又は、前記プライマーが伸長したか（例えば増幅反応が起こったか）否かを検出する工程と、

f) 工程(e)において微生物が同定された場合、工程(c)からの前記培養臨床サンプルに対して薬剤感受性検査を行う工程であって、増殖又は増殖マーカーを評価することによって前記薬剤感受性検査における微生物増殖を観察し、工程(e)で検出された前記微生物及び薬剤耐性マーカーの同一性によって前記薬剤感受性検査で用いる抗菌剤の種類と濃度を判定し、任意で前記培養容器中の前記臨床サンプルを引き続き培養する工程と、

g) 工程(e)において微生物菌株が同定されなかった場合、微生物を同定し、その薬剤耐性プロファイルを判定するための更なる微生物同定と薬剤感受性検査の実施を可能するために、前記臨床サンプルを更に培養する工程と、を含む請求項1に記載の方法。

【請求項3】

請求項1に記載の方法であって、

前記方法は、

- a) 臨床サンプルを培地を含む第1培養容器に導入する工程と、
- b(i) 任意で、前記第1培養容器中の前記臨床サンプルを前培養する工程と、
- b(ii) 前記臨床サンプル／前記培地の混合物の一部分、又は前培養を行った場合は前記臨床サンプルの培養物の一部分、を前記第1培養容器から取り出し、前記一部分を培地を含む第2培養容器に導入し、任意で前記第2培養容器中の前記一部分を前培養する

工程と、

c) テストアリコートを前記第2培養容器から取り出し、前記第2培養容器中の前記一部分を培養する又は引き続き培養する工程と、

d) 前記テストアリコートからDNAを分離する工程と、

e) 微生物を同定しあつ前記微生物における一つ以上の遺伝的薬剤耐性マーカーの有無を検出するために、前記DNAに対して核酸検査を行う工程であって、

前記核酸検査は、

i) 一つ以上の微生物同定用核酸プローブ及び／又はプライマーであって、特定の微生物の同定に関するヌクレオチド配列に特異的にハイブリダイズ可能なプローブ若しくはプライマー、又は、特定の微生物の同定に関するヌクレオチド配列を選択的に増幅可能なプライマーと、

ii) 一つ以上の薬剤耐性マーカー検出用核酸プローブ及び／又はプライマーであって、遺伝的薬剤耐性マーカーを示すヌクレオチド配列に特異的にハイブリダイズ可能なプローブ若しくはプライマー、又は、遺伝的薬剤耐性マーカーを示すヌクレオチド配列を選択的に増幅可能なプライマーと、

を用いて行われ、

前記プローブ及び／又はプライマーが前記DNAにハイブリダイズしたか否か、及び／又は、前記プライマーが伸長したか（例えば増幅反応が起こったか）否かを検出する工程と、

f) 工程(e)において微生物が同定された場合、工程(c)からの前記培養された一部分に対して薬剤感受性検査を行う工程であって、増殖又は増殖マーカーを評価することによって前記薬剤感受性検査における微生物増殖を観察し、工程(e)で検出された前記微生物及び薬剤耐性マーカーの同一性によって前記薬剤感受性検査で用いる抗菌剤の種類と濃度を判定し、任意で前記第2培養容器中の前記一部分を引き続き培養する工程と、

g) 工程(e)において微生物菌株が同定されなかった場合、微生物を同定し、その薬剤耐性プロファイルを判定するための更なる微生物同定と薬剤感受性検査の実施を可能するために、前記臨床サンプル及び／又は前記一部分を更に培養する工程と、を含む請求項1に記載の方法。

【請求項4】

微生物増殖を、サンプル中に存在する微生物細胞物質の量を判定することにより評価する、請求項1～3のいずれかに記載の方法。

【請求項5】

サンプル中に存在する微生物細胞物質の量を、微生物及び／又は微生物コロニー若しくは凝集体の量及び／又は数及び／又は大きさを判定することにより判定する、請求項4に記載の方法。

【請求項6】

サンプル中に存在する微生物細胞物質の量を、画像化により判定する、請求項4又は5に記載の方法。

【請求項7】

サンプル中に存在する微生物細胞物質の量を、画像化によって微生物バイオマスのエリアを測定することにより判定する、請求項4～6のいずれかに記載の方法。

【請求項8】

前記臨床サンプルは、敗血症の被検体、又は敗血症の疑いがある被検体、又は敗血症のリスクがある被検体から得られたものである、請求項1～7のいずれかに記載の方法。

【請求項9】

前記臨床サンプルは、血液又は血液フラクションである、請求項1～8のいずれかに記載の方法。

【請求項10】

前記培養容器は血液培養フラスコである、請求項1～9のいずれかに記載の方法。

【請求項11】

前記培地は、前記臨床サンプルに存在する任意の抗菌剤の存在を中和する作用剤を含む、請求項 1 ~ 10 のいずれかに記載の方法。

【請求項 12】

微生物 DNA を、前記テストアリコートから選択的に分離する又は濃縮する、請求項 1 ~ 11 のいずれかに記載の方法。

【請求項 13】

工程 (d) 前又は工程 (d) と同時に、前記テストアリコートからの又は前記テストアリコート中の微生物を分離又は濃縮する工程を更に含む、請求項 1 ~ 12 のいずれかに記載の方法。

【請求項 14】

工程 (c) ~ (e) を一回以上繰り返す、請求項 1 ~ 13 のいずれかに記載の方法。

【請求項 15】

工程 (c) ~ (e) を初期前培養工程なしで実施し、工程 (e) において微生物が同定されなかった場合、工程 (c) ~ (e) を前培養工程 (b) 後に繰り返す、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

工程 (e) (i) の前記プローブ又はプライマーは、敗血症原因微生物パネルの微生物を同定するよう設計又は選択されている、請求項 1 ~ 15 のいずれかに記載の方法。

【請求項 17】

工程 (e) (i) 及び / 又は (ii) において、PCR プライマーが用いられる、請求項 1 ~ 16 のいずれかに記載の方法。

【請求項 18】

工程 (e) (i) 及び / 又は (ii) において、ハイブリダイゼーションプローブが用いられる、請求項 1 ~ 17 のいずれかに記載の方法。

【請求項 19】

前記ハイブリダイゼーションプローブは、同定に関するヌクレオチド配列又は薬剤耐性マーカーヌクレオチド配列にハイブリダイズ可能な 5' 末端及び 3' 末端を含むパドロックプローブである、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

環状化パドロックプローブが、ローリングサークル増幅 (RCA) によって検出される、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

前記 RCA は、RCA 産物をモノマーに切断し、前記モノマーを環状化して更なる RCA 反応のテンプレートとして使用するサークル - サークル増幅 (C2CA) である又はサークル - サークル増幅 (C2CA) を含む、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

RCA 産物は、前記 RCA 産物をモノマーに切断し、前記モノマーをアレイ上にハイブリダイズし、前記アレイ上の前記モノマーを検出することによって検出される、請求項 20 又は 21 に記載の方法。

【請求項 23】

RCA 産物は、顕微鏡又は画像化又はフローサイトメトリー的な方法によって検出される、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 24】

工程 (f) において、微生物増殖を、微生物を直接的に検出することによって判定する、請求項 1 ~ 23 のいずれかに記載の方法。

【請求項 25】

前記微生物を、染料で標識化して検出する、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

工程 (f) において、微生物増殖を、微生物を間接的に検出することによって判定する、請求項 1 ~ 23 のいずれかに記載の方法。

【請求項 27】

前記間接的検出は、前記微生物のゲノム中のヌクレオチド配列にハイブリダイズするパドロックプローブを用い、環状化プローブを R C A によって増幅し、鎖状(concatemeric) R C A 産物を検出してカウンティトすることにより行われる、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

工程(e)の前記核酸検査について、分離された D N A を、前記 D N A にハイブリダイズ可能な捕捉プローブを用いて固定する、請求項 1~27 のいずれかに記載の方法。

【請求項 29】

工程(e)において単一の微生物が同定された場合、工程(f)を行う、請求項 1~28 のいずれかに記載の方法。

【請求項 30】

工程(e)において二以上の微生物が同定された場合、工程(g)を行う、請求項 1~29 のいずれかに記載の方法。

【請求項 31】

臨床サンプル中の微生物を検出し特徴付けるための微生物検出装置であって、
培地を含み、前記臨床サンプルを保持するよう構成された第 1 培養容器であって、前記
臨床サンプルを培養するための第 1 培養容器と、

任意で、培地を含む第 2 培養容器、及び前記第 1 培養容器の中身の一部分を取り出し、
前記一部分を前記第 2 培養容器に移すポーションリムーバル装置と、ここで、第 2 培養容
器は、臨床サンプル / 培地の混合物又は臨床サンプルの培養物を前記第 1 培養容器の中身
の一部分として収容するよう構成され、且つ、前記一部分を培養するよう構成され、

テストアリコートとして前記第 1 培養容器及び / 又は前記第 2 培養容器の中身の一部分
を取り出すテストアリコート抽出装置と、

下記 i . 及び i i . を備える D N A 検査装置と、

i . 一つ以上の微生物同定用核酸プローブ又はプライマーであって、特定の微生物の
同定に関するヌクレオチド配列に特異的にハイブリダイズ可能なプローブ若しくはプラ
イマー、又は、特定の微生物の同定に関するヌクレオチド配列を選択的に増幅可能なプ
ライマー、

i i . 一つ以上の薬剤耐性マーカー検出用核酸プローブ又はプライマーであって、遺
伝的薬剤耐性マーカーを示すヌクレオチド配列にハイブリダイズ可能なプローブ若しくは
プライマー、又は、遺伝的薬剤耐性マーカーを示すヌクレオチド配列を選択的に増幅可能
なプライマー、

ここで、前記 D N A 検査装置は、前記テストアリコートから D N A を分離し、前記核
酸プローブ又はプライマーを用いて、前記 D N A に対して、微生物を同定しきつ前記微
生物における一つ以上の遺伝的薬剤耐性マーカーの有無を検出するためには核酸検査を行
い、且つ、前記核酸プローブ又はプライマーが前記 D N A にハイブリダイズしたか否か、及び
/ 又は、前記プライマーが増幅反応に関与したか否かを検出するよう構成され、

微生物を培養する手段及び微生物増殖を観察する手段を薬剤感受性検査装置と、を備え
、

前記微生物検出装置は、前記特定の微生物が前記 D N A 検査装置により同定された場合
、前記テストアリコートの抽出後に培養により前記第 1 培養容器及び / 又は前記第 2 培養
容器に生成された前記培養臨床サンプル及び / 又は培養された一部分を前記薬剤感受性検
査装置に渡し、前記薬剤感受性検査装置は、前記培養臨床サンプル及び / 又は前記培養
された一部分に対し、増殖又は増殖マーカーを評価することによって微生物増殖を観察する
薬剤感受性検査を行い、

前記薬剤感受性検査で用いられる抗菌剤の種類と濃度は、前記 D N A 検査装置により検
出された前記微生物及び薬剤耐性マーカーの同一性によって判定され、

前記特定の微生物が前記 D N A 検査装置により同定されなかった場合、前記微生物検出
装置は、前記第 1 培養容器及び / 又は前記第 2 培養容器中の前記臨床サンプル及び / 又は

前記培養された一部分を更に培養して追加的な培養後に更なる微生物同定と薬剤感受性検査を行うことを可能にし、それにより前記微生物を同定し、その薬剤耐性プロファイルを判定するよう構成されている微生物検出装置。

【請求項 3 2】

臨床サンプル中の微生物を検出し特徴付けるための微生物検出装置であって、

培地を含み、前記臨床サンプルを保持するよう構成された培養容器であって、前記テストアリコートの抽出後及び任意で前記テストアリコートの抽出前に、前記臨床サンプルを培養するための培養容器と、

前記培養容器の中身の一部分をテストアリコートとして取り出すテストアリコート抽出装置と、

下記 i . 及び i i . を備える DNA 検査装置と、

i . 一つ以上の微生物同定用核酸プローブ又はプライマーであって、特定の微生物の同定に関するヌクレオチド配列に特異的にハイブリダイズ可能なプローブ若しくはプライマー、又は、特定の微生物の同定に関するヌクレオチド配列を選択的に増幅可能なプライマー、

i i . 一つ以上の薬剤耐性マーカー検出用核酸プローブ又はプライマーであって、遺伝的薬剤耐性マーカーを示すヌクレオチド配列にハイブリダイズ可能なプローブ若しくはプライマー、又は、遺伝的薬剤耐性マーカーを示すヌクレオチド配列を選択的に増幅可能なプライマー、

ここで、前記 DNA 検査装置は、前記テストアリコートから DNA を分離し、前記核酸プローブ又はプライマーを用いて、前記 DNA に対して、微生物を同定しあつ前記微生物における一つ以上の遺伝的薬剤耐性マーカーの有無を検出するために核酸検査を行い、且つ、前記核酸プローブ又はプライマーが前記 DNA にハイブリダイズしたか否か、及び / 又は、前記プライマーが増幅反応に関与したか否かを検出するように構成され、

微生物を培養する手段及び微生物増殖を観察する手段を薬剤感受性検査装置と、を備え、

前記微生物検出装置は、前記特定の微生物が前記 DNA 検査装置により同定された場合、前記テストアリコートの抽出後に培養により前記培養容器に生成された前記培養臨床サンプルを前記薬剤感受性検査装置に渡し、前記薬剤感受性検査装置は、前記培養臨床サンプルに対し、増殖又は増殖マーカーを評価することによって微生物増殖を観察する薬剤感受性検査を行い、

前記薬剤感受性検査で用いられる抗菌剤の種類と濃度は、前記 DNA 検査装置により検出された前記微生物及び薬剤耐性マーカーの同一性によって判定され、

前記特定の微生物が前記 DNA 検査装置により同定されなかった場合、前記微生物検出装置は、前記培養容器中の前記臨床サンプルを更に培養して追加的な培養後に更なる微生物同定と薬剤感受性検査を行うことを可能にし、それにより前記微生物を同定し、その薬剤耐性プロファイルを判定するよう構成されている微生物検出装置。

【請求項 3 3】

臨床サンプル中の微生物を検出し特徴付けるための微生物検出装置であって、

培地を含み、前記臨床サンプルを保持するよう構成された第 1 培養容器であって、前記臨床サンプルを培養するための第 1 培養容器と、

培地を含む第 2 培養容器であって、臨床サンプル / 培地の混合物又は臨床サンプルの培養物を前記第 1 培養容器の中身の一部分として収容するよう構成され、且つ、前記一部分を培養するよう構成された第 2 培養容器と、

前記第 1 培養容器の中身の一部分を取り出し、前記一部分を前記第 2 培養容器に移すポンショナリムーバル装置と、

テストアリコートとして前記第 2 培養容器の中身の一部分を取り出すテストアリコート抽出装置と、

下記 i . 及び i i . を備える DNA 検査装置と、

i . 一つ以上の微生物同定用核酸プローブ又はプライマーであって、特定の微生物の

同定に関するスクレオチド配列に特異的にハイブリダイズ可能なプローブ若しくはプライマー、又は、特定の微生物の同定に関するスクレオチド配列を選択的に増幅可能なプライマー、

i i . 一つ以上の薬剤耐性マーカー検出用核酸プローブ又はプライマーであって、遺伝的薬剤耐性マーカーを示すスクレオチド配列にハイブリダイズ可能なプローブ若しくはプライマー、又は、遺伝的薬剤耐性マーカーを示すスクレオチド配列を選択的に増幅可能なプライマー、

を用いて前記核酸検査を行うよう構成され、

ここで、前記DNA検査装置は、前記テストアリコートからDNAを分離し、前記核酸プローブ又はプライマーを用いて、前記DNAに対して、微生物を同定しつつ前記微生物における一つ以上の遺伝的薬剤耐性マーカーの有無を検出するため核酸検査を行い、且つ、前記核酸プローブ又はプライマーが前記DNAにハイブリダイズしたか否か、及び／又は、前記プライマーが増幅反応に関与したか否かを検出するように構成され、

微生物を培養する手段及び微生物増殖を観察する手段を薬剤感受性検査装置と、を備え、

前記微生物検出装置は、前記特定の微生物が前記DNA検査装置により同定された場合、前記テストアリコートの抽出後に培養により前記第2培養容器に生成された前記培養された一部分を前記薬剤感受性検査装置に渡し、前記薬剤感受性検査装置は、前記培養された一部分に対し、増殖又は増殖マーカーを評価することによって微生物増殖を観察する薬剤感受性検査を行い、

前記薬剤感受性検査で用いられる抗菌剤の種類と濃度は、前記DNA検査装置により検出された前記微生物及び薬剤耐性マーカーの同一性によって判定され、

前記特定の微生物が前記DNA検査装置により同定されなかった場合、前記微生物検出装置は、前記第1培養容器及び／又は前記第2培養容器中の前記臨床サンプル及び／又は前記培養された一部分を更に培養して追加的な培養後に更なる微生物同定と薬剤感受性検査を行うことを可能にし、それにより前記微生物を同定し、その薬剤耐性プロファイルを判定するよう構成されている微生物検出装置。

【請求項34】

請求項1～30のいずれかに記載の方法を実施するよう構成されている、請求項31、32又は33のいずれかに記載の微生物検出装置。

【請求項35】

前記培養容器は血液培養フラスコである、請求項31～34のいずれかに記載の微生物検出装置。

【請求項36】

前記培地は、前記臨床サンプルに存在する任意の抗菌剤の存在を中和する作用剤を含む、請求項31～35のいずれかに記載の微生物検出装置。

【請求項37】

前記DNA検査装置は、ハイブリダイゼーションプローブを用いるよう構成されている、請求項31～36のいずれかに記載の微生物検出装置。

【請求項38】

前記ハイブリダイゼーションプローブは、同定に関するスクレオチド配列又は薬剤耐性マーカー又はスクレオチド配列にハイブリダイズ可能な5'末端及び3'末端を含むパドロックプローブであり、前記DNA検査装置は、ローリングサークル増幅(RCA)によって環状化パドロックプローブを検出するよう構成されている、請求項37に記載の微生物検出装置。