

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5902159号  
(P5902159)

(45) 発行日 平成28年4月13日 (2016. 4. 13)

(24) 登録日 平成28年3月18日 (2016. 3. 18)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 Q 1/04 (2006. 01)

C 1 2 Q 1/04 Z N A

G O 1 N 33/53 (2006. 01)

G O 1 N 33/53 Y

G O 1 N 33/569 (2006. 01)

G O 1 N 33/569

請求項の数 14 (全 26 頁)

(21) 出願番号 特願2013-517489 (P2013-517489)  
 (86) (22) 出願日 平成23年7月7日 (2011. 7. 7)  
 (65) 公表番号 特表2013-537406 (P2013-537406A)  
 (43) 公表日 平成25年10月3日 (2013. 10. 3)  
 (86) 国際出願番号 PCT/FR2011/051624  
 (87) 国際公開番号 W02012/004540  
 (87) 国際公開日 平成24年1月12日 (2012. 1. 12)  
 審査請求日 平成26年5月12日 (2014. 5. 12)  
 (31) 優先権主張番号 1055574  
 (32) 優先日 平成22年7月8日 (2010. 7. 8)  
 (33) 優先権主張国 フランス (FR)

(73) 特許権者 304043936  
 ビオメリュー  
 B I O M E R I E U X  
 フランス国 F-69280 マーシー  
 レトワール  
 (74) 代理人 100109726  
 弁理士 園田 吉隆  
 (74) 代理人 100101199  
 弁理士 小林 義教  
 (72) 発明者 アトラシュ, ヴィンセント  
 フランス国 エフ-69300 カリュイ  
 ール, クール アリスティド ブリアン  
 , 42

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 集積プロセスに希釈された生物学的サンプル中における微生物を直接的に検出し同定する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

閉容器に入れられたサンプル中に存在する少なくとも一つの微生物を検出する方法であって、次の工程：

a) 前記サンプルを、容器中で、少なくとも一つの培養培地及び検出される微生物を捕獲できる担体と接触させる工程、

b) 容器を閉じる工程、

c) 微生物の増殖を可能にする条件下に、容器を置く工程、

d) 前記閉容器内において、検出手段を使用して、捕獲担体上に固定された微生物の存在を検出する工程

を含んでなり、捕獲担体がーピースの担体である、前記方法。

【請求項 2】

検出を可能にする露呈システムを、工程 a) 中に、容器中で接触させる請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

請求項 1 ~ 2 の何れか一項に記載の方法であって、中間工程 c') 前記サンプル、培養培地、検出される微生物を捕獲できる担体及び潜在する露呈システムによって構成される混合物の全部又は一部を、この場合主容器と呼ばれる容器から、二次容器と呼ばれる少なくとも一つの第二の容器に移す工程を含む方法。

【請求項 4】

請求項 1 ~ 3 の何れか一項に記載の方法であって、補足工程 e ) 検出された微生物の検出を確認する工程を含む方法。

【請求項 5】

請求項 4 に記載の方法であって、工程 e ) が、検出工程に使用される検出手段と同一又は異なる検出手段を使用して達成される方法。

【請求項 6】

請求項 1 ~ 5 の何れか一項に記載の方法であって、検出手段が、電気的検出手段、光学的検出手段、音波検出手段、熱検出手段、機械的検出手段及び磁気検出手段を含んでなる群から選択される方法。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 6 の何れか一項に記載の方法であって、微生物を捕獲できる担体が検出手段も構成する方法。

【請求項 8】

請求項 1 ~ 7 の何れか一項に記載の方法であって、微生物の少なくとも一の特異的又は非特異的結合パートナーが、捕獲担体上に固定される方法。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 8 の何れか一項に記載の方法であって、特異的結合パートナーが、抗体、F a b 断片、F a b ' 断片、組換え又は非組換えファージタンパク質、及びファージを含んでなる群から選択される方法。

【請求項 10】

請求項 1 ~ 9 の何れか一項に記載の方法であって、微生物の検出がリアルタイムで実施される方法。

【請求項 11】

請求項 1 ~ 10 の何れか一項に記載の方法であって、微生物の検出が、前記微生物の増殖工程後に実施される方法。

【請求項 12】

請求項 1 ~ 11 の何れか一項に記載の方法であって、容器が、均質化バッグ、フラスコ、ボトル又はピルボックスである方法。

【請求項 13】

請求項 1 ~ 12 の何れか一項に記載の方法であって、検出手段がデータ分析システムに接続されている方法。

【請求項 14】

請求項 13 に記載の方法であって、捕獲担体又は検出手段と、データ分析システムとの間の接続が、有線接続又は無線接続である方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、一般に、分析、例えば生物学的分析の分野に関する。より具体的には、本発明は、閉容器内における、集積プロセスに希釈又は懸濁されたサンプル中における微生物の直接的かつリアルタイム検出のプロセスに関する。

【0002】

微生物学的分析は正確な技術を必要とし、それは結果を得る時間が可能な限り短くなければならない。

【0003】

医療分野では、感染の危険性を予想し診断することが必要であり：診断がより早くより正確であれば、患者の扱いがより効果的になり、伝染の危険性をより最小にする。アプローチは、動物の健康についても類似である。

【0004】

農業食品分野において、問題は同一である。しかしながら、次のことが異なる：

・その存在が原料、中間産物、及び市販最終産物において探される病原微生物及びそ

10

20

30

40

50

これらの毒素、

・原料から最終産物まで全連鎖に沿った生産プロセスにおいて、品質指標として使用される非病原微生物、及び

・技術的興味の細菌、例えば酵素。

【0005】

疑わしいコンタミネーションの迅速で正確な検出は、それらをモニターすることを可能にし、よって、修正措置を取ることを可能にする。

【0006】

技術的には、微生物学分析は、一又は複数のプレ集積及び/又は集積フェーズ、一又は複数の検出フェーズ、及び一又は複数の微生物計数フェーズを実施しうる。特定の応用、例えば農業食品微生物学的モニタリングでは、この分野における現行基準を満たすために確認フェーズも必要とされる。

【0007】

現在、集積工程の利用無しでは、大規模の開始サンプル量において標的微生物を検出する方法はない。

【0008】

プレ集積及び/又は集積フェーズは、選択又は非選択培養培地を使用し、これは、非標的フローラの増殖を制限する一方で、生物学的又は環境サンプルにおける標的微生物の増殖を促進することを目的とする。培地はしばしば、無菌のプラスチックバッグタイプ容器において使用され、そこでは、それらは、探している微生物を再懸濁及び再集積するために、食品又は環境サンプルとの接触に置かれる。このフェーズは、例えば、培養培地において25グラム(g)~375gを225~3375ミリリットル(mL)に希釈する場合等、非常に可変でありおそらくは非常に大量のサンプル中において、少なくとも一つの標的微生物の潜在初期存在を露呈する要件を満たすために必要である。この集積工程の最後に、標的微生物を検出する工程を実施するために、アリコート(5マイクロリットル( $\mu$ l)~5mL)のサンプルを採る。それらの系統的検出を可能にするために、このアリコート中に十分な量の標的微生物を有することが必要である。

【0009】

検出フェーズは歴史的に、探している微生物の代謝特性を実証するために、寒天培地上における微生物の培養に基づく。特定の酵素基質が一般的に使用される。これらの酵素基質は一般的に、2つの部分、標的部分とも呼ばれる、露呈される酵素活性に特異的な第一部分、及びマーカー部分と呼ばれ、一般的に発色団又はフルオロフォアによって構成される、マーカーとして作用する第二部分から成る。反応があるかないかによってこれらの基質を選択することによって、微生物の性質を特徴付けること、又は微生物の異なるグループを区別することが可能である。よって、着色又は蛍光の出現又は消失は、微生物の属又はタイプを示すだろう。この点において、発色性培地の使用は、探している微生物の同時の検出及び同定を可能にする。それはプロセスを単純化し、結果を得るための時間を実質的に低減させる。例として、我々は、出願人のChromID(登録商標)培地を挙げる。これらの発色性培地は、例えば、大腸菌のベータ-グルクロニダーゼ酵素活性等、探している微生物の特異的代謝特性の検出に基づく。

【0010】

イムノアッセイは、検出試験に使用される他の技術を構成する。それらは、探している微生物の免疫原性特性を利用する。網羅的ではないが、競合又はサンドイッチ-タイプELISA(酵素結合免疫吸着アッセイ)技術が挙げられる。

【0011】

最後に、探している微生物のゲノム特性に基づく分子生物学技術も、標的微生物を検出し同定するために用いられる。例として、一般的な増幅技術、例えばPCR(ポリメラーゼ連鎖反応)及びNASBA(核酸配列ベース増幅)が挙げられ、これは、当業者に知られているリアルタイム検出技術と組み合わせることができる。

【0012】

しかしながら、全てのこれらの技術の使用は、アリコートのホモジネートを回収するため及び検出工程を実施するために、プレ集積 / 集積フェーズの最後にバッグを開くことを必要とする。

【 0 0 1 3 】

確認フェーズは、一方で、農業食品分野における微生物学的分析とより具体的に関連がある。実際に、上記の方法の結果が陽性である場合、探している病原体の存在を確認する必要がある。これは、相補的な検査、及び第一分析中に使用されるものと異なる検出原理の使用を必要とする。上掲の技術は、確認のために任意に使用される。

【 0 0 1 4 】

従って、サンプル中における微生物の完全で正確な同定は、幾つかの工程：集積、検出及び確認の連続を必要とする。ルーチン的に使用される検査の標準化は、検出方法の自動化を可能にしたが、それらの実施は長時間のままである。実際、水準技術の不利益は、これらの工程が逐次的に実施され、多くの、時間のかかる操作を必要とすることであり、これによって、結果を得るために必要な時間に影響する。

【 0 0 1 5 】

更に、上掲の技術は、アリコートをサンプリングするために、集積バッグの一又は複数の開口を必要とする。スクリーニングの間、陰性サンプルの数が多いほど(特に農業食品産業において)、これはより有害となる。従って、扱う人が、検討中にサンプルの陽性 / 陰性結果を見るために、容器を再び開く必要がないことが有益である。

【 0 0 1 6 】

上で検討した技術水準に伴う技術的問題に関し、本発明の本質的目的の一つは、サンプル中、特に食品サンプル中に存在する微生物の検出、同定及び確認のための、単純化されたプロセスを提供することである。

【 0 0 1 7 】

本発明の他の目的は、容器に収容されているサンプルの取り扱いを限定し、それによって、サンプルを扱うスタッフ及びサンプル自体双方の、コンタミネーションの危険性を限定する、微生物の検出、同定及び確認のためのプロセスを提供することである。

【 0 0 1 8 】

本発明の他の目的は、サンプルの分析に必要な時間を低減させる、微生物の検出及び同定のためのプロセスを提供することである。

【 0 0 1 9 】

本発明の他の目的は、集積中にわたる、サンプルの全体積についての、微生物の検出、同定及び確認のためのプロセスであって、測定感度、及びその特異性さえ明瞭に増加させるプロセスを提供することである。

【 0 0 2 0 】

本発明の他の目的は、サンプル分析の速度を大幅に増加することを可能にするプロセスを提供することである。

【 0 0 2 1 】

本発明の他の目的は、複数検出を可能にするプロセスを提供することである。

【 0 0 2 2 】

本発明の他の目的は、サンプルを取り扱う工程を大幅に減らすことによって分析のトレーサビリティを改善することである。

【 0 0 2 3 】

これらの目的はとりわけ、本発明によって解消され、それはまず第一に、閉容器に入れられたサンプル中に存在する少なくとも一つの微生物を検出するプロセスに関連し、前記方法は次の工程を本質的に含んでなる：

- a) 前記サンプルを、容器内中に、少なくとも一つの培養培地及び検出される微生物を捕獲できる担体との接触において入れる工程、
- b) 容器を閉じる工程、
- c) 微生物の増殖を可能にする条件下に、容器を置く工程、

10

20

30

40

50

d)前記閉容器内において、検出手段を使用して、捕獲担体上に固定された微生物の存在を検出する工程。

【0024】

特定の実施態様によると、微生物の存在の検出を可能にする露呈システムが、工程a)中に、容器中に、接触して入れられる。

【0025】

露呈システムは、微生物又は前記微生物の結合パートナーとカップリングできる任意の分子であって、それは、それらの変換特性(特に蛍光、着色、放射活性)によって、前記微生物の存在を露呈することを可能にする分子であることが理解される。

【0026】

他の特定の実施態様によると、発明によるプロセスは、中間工程c')前記サンプル、培養培地、検出される微生物を捕獲できる担体及び潜在する露呈システムによって構成される混合物の全て又は一部を、この場合は主容器と呼ばれる容器から、二次容器と呼ばれる少なくとも一つの第二の容器に移すことから本質的になる工程であって、栄養成分及び選択剤(アドホック)を、前記二次容器に事前に加えることによって、二次集積を潜在的に実施することが可能である工程を含む。このような二次集積は、標的微生物の集団を、非標的微生物の集団と比較して増加させ、これは特異性を改善する。

【0027】

有利には、微生物の少なくとも一つの特異的又は非特異的結合パートナーが、捕獲担体に固定される。発明の好ましい実施態様によると、特異的結合パートナーは、抗体、Fab断片、Fab'断片、組換え又は非組換えファージタンパク質及びファージ又は当業者によく知られている任意の他のリガンドを含んでなる群から選択される。

【0028】

有利には、検出手段は、電気的検出手段、特に電気化学的検出手段、光学的検出手段、音波検出手段、熱検出手段、機械的検出手段及び磁氣的検出手段を含んでなる群から選択される。

【0029】

捕獲担体は、一般的な担体でありうる。特に、我々は、粒子状の、潜在的には磁性の担体又は一ピースの担体を挙げる。それは単純に、不活性担体、例えばプラスチック又はファイバークラスプレートでありうる。次いで、このような捕獲担体は、検出手段に接続される。捕獲担体は有利には、潜在的には特異的な、結合パートナーで増感されうる。

【0030】

あるいは、捕獲担体は、検出手段と一体でありうる。これは、例えば、捕獲担体が電気化学的バイオセンサー又は光ファイバーで構成されている場合である。

【0031】

特定の実施態様によると、同時又は逐次的に検出及び確認の双方を実施するために、検出手段を組み合わせることを想定することが全く可能である。例えば、電気化学的バイオセンサーによって、標的微生物の検出を実施することが可能である。標的微生物が特異的結合パートナーによって固定される場合、検出工程は、この場合、同定工程を構成する。分析領域でバイオセンサー上に特異的に固定された微生物の、光学的検出装置による光学分析は、微生物の同定の確認を可能にする。光学的検出装置がラマン分光計である場合、異なる標的微生物に対応する参照スペクトルのデータベースとの比較によるラマンスペクトルの分析は、前記微生物の同定の確認を可能にする。

【0032】

他の特定の実施態様によると、同じ技術で、検出及び確認を実施することが可能である。よって、検出手段が光学的手段、例えば自家蛍光測定手段である場合、それは、自家蛍光の出現によって標的微生物の検出を実施することが特に有益である。応答は、その場合、イエス(蛍光の存在)又はノー(蛍光の不在)である。蛍光がある場合、異なる標的微生物に対応する参照スペクトルのデータベースと比較した蛍光シグナルのスペクトル分析は、前記微生物の同定を可能にし、それによって、前記微生物の存在の検出の確認を可能にす

10

20

30

40

50

る。

【0033】

好ましくは、微生物の検出は、リアルタイムで実施される。しかしながら、あるいは、微生物の検出は、前記微生物の増殖工程後であって、最後に為されうる。

【0034】

発明によるプロセスの特定の実施態様によると、容器は均質化バッグである。剛性容器、例えばフラスコ、ボトル又はビルボックスが同様に使用されるだろう。

【0035】

発明によるプロセスの他の特定の実施態様によると、検出手段は、データ分析システムに接続される。

10

【0036】

有利には、検出手段及びデータ分析装置間の接続は、有線接続又は無線接続である。

【0037】

発明はまた、閉容器内に入れられたサンプル中に存在する少なくとも一つの微生物の検出のための電気化学的バイオセンサーに関する。前記バイオセンサーは担体を含み：

- ・少なくとも一つの検出電極であって、少なくとも一つの電気活性ポリマーで被覆され、その一末端上には少なくとも一つの一本鎖又は二本鎖オリゴヌクレオチドが固定され、前記オリゴヌクレオチドの第二の末端は、特異的又は非特異的に検出される微生物の少なくとも一つの結合パートナーに結合される検出電極；

20

- ・少なくとも一つの対電極を含む。

【0038】

有利には、電気活性ポリマーは、ポリピロール、ポリアセチレン、ポリアジン、ポリ(p-フェニレン)、ポリ(p-フェニレンビニレン)、ポリピレン、ポリチオフェン、ポリフラン、ポリセレノフェン、ポリピリダジン、ポリカルバゾール、及びポリアニリンを含んでなる群から選択される。

【0039】

特定の実施態様によると、電気活性ポリマーは、少なくとも一つの電気化学的メディエーターを含む。このような電気化学的メディエーターは、フェロセン、キノン及びこれらの誘導体又は当業者によく知られている任意の他のメディエーターを含んでなる群から選択される。

30

【0040】

他の実施態様によると、電気化学的メディエーターは、培養培地中において遊離形態である。このようなメディエーターは、例えば、フェリシアニド/フェロシアニド対 $[Fe(CN)_6]^{3-}/4^-$ 、塩化イリジウム対 $[IrCl_6]^{3-}/4^-$ 、又はルテニウムヘキサミン $[Ru(NH_3)_6]^{3+}/2^+$ でありうる。

【0041】

オリゴヌクレオチドと微生物の結合パートナーとの間の結合は、好ましくは、少なくとも一つのビオチン-ストレプトアビジン又はビオチン-アビジン結合対によって作られる。

【0042】

オリゴヌクレオチドが一本鎖の場合、ビオチンは前記ヌクレオチドの3'末端に固定され、5'末端は、後者が、電気活性ポリマー上に、特に共有結合によって、結合されることを可能にする。同様にビオチン化された結合パートナーを使用することによって、これを、ストレプトアビジン又はアビジンの分子によって、オリゴヌクレオチドの3'末端に結合することが容易である。

40

【0043】

オリゴヌクレオチドが二本鎖の場合、第一の鎖は、その5'末端によって電気活性ポリマーに、特に共有結合によって固定される。第二の鎖は一方、その5'末端でビオチン化され、これは、同様にビオチン化された結合パートナーが、ストレプトアビジン又はアビジン分子によって固定されることを可能にする。

50

## 【 0 0 4 4 】

有利には、結合パートナーは、抗体、F a b 断片、F a b ' 断片、組換え又は非組換えファージタンパク質、及びファージを含んでなる群から選択される。

## 【 0 0 4 5 】

本発明の目的及び利点は、以下の詳細な説明及び次の通りである添付の図面を踏まえて、より理解されるだろう。

## 【図面の簡単な説明】

## 【 0 0 4 6 】

【図 1】図 1 は、電気化学的バイオセンサーとの組合せにおけるプレ集積及び / 又は集積バッグを描く。

10

【図 2】図 2 は、電気化学的バイオセンサーの正面図を描く。

【図 3】図 3 A は、微生物が存在しない場合の電気化学的センサーの表面の描写である。図 3 B は、微生物が存在する場合の電気化学的センサーの表面の描写である。

【図 4】図 4 は、電気化学的バイオセンサーによりプレ集積 / 集積バッグを分析するためのシステムの略図である。

【図 5】図 5 は、食品サンプル中における大腸菌 O 1 5 7 : H 7 の検出中に得られるインピーダンス分光測定グラフである。

【図 6】図 6 は、食品サンプル中におけるリステリア・イノキュアの検出中に得られるインピーダンス分光測定グラフである。

【図 7】図 7 は、第一の実施態様による、増感捕獲担体によるプレ集積 / 集積バッグにおける光学検出による分析システムの略図である。

20

【図 8】図 8 は、増感捕獲担体を読むのを可能にするバッグ位置における、図 7 に描写の分析システムの略図である。

【図 9】図 9 は、増感捕獲担体の略図である。

【図 1 0】図 1 0 は、陽性結果を示した分析後の、図 8 に描写される、増感捕獲担体の略図である。

【図 1 1】図 1 1 は、第二の実施態様による、増感捕獲担体によるプレ集積 / 集積バッグにおける光学検出による分析システムの略図である。

## 【 0 0 4 7 】

本発明の第一の実施態様によると、微生物の検出又は同定のプロセスは本質的に、一般的にStomacher(登録商標)バッグと呼ばれる、無菌のプラスチックの均質化バッグを用いる。このようなバッグは、図 1 において 1 0 の参照番号が割り当てられている。このバッグ 1 0 は、2 つのおよそ長方形のプラスチックシート 1 2 及び 1 4 から構成され、培養培地及び分析されるサンプルを受ける内部空間を定義するために、それらのサイドの 3 によって互いに連結されている。その付属物は、片側によってシート 1 2 及び 1 4 に連結されているおよそ長方形のフィルター 1 6 を含み、内部空間を 2 つに分ける。最後に、バッグはバイオセンサー 1 8 を含む。このバイオセンサーは電気化学的バイオセンサーであり、図 2 に詳細に描かれている。バイオセンサー 1 8 は、シート 1 2 及び 1 4 の間に挟まれており、検出領域に相当する一部分 1 8 1 はバッグ 1 0 の内部空間に見られ、接続領域に相応する部分はバッグの外側であり、チップをデータ分析装置に接続させる。これを以下に説明する。

30

40

## 【 0 0 4 8 】

図 2 は、電気化学的バイオセンサー 1 8 を詳細に描く。上で説明したように、バイオセンサー 1 8 は、分析領域 1 8 1 及び接続領域 1 8 2 から構成される。分析領域は、対電極 2 2 と呼ばれる中心電極の周りに配置される 8 つの作用電極 2 0 を含む。更に、分析領域は、対電極 2 2 の周りに開口リングの形態において配置される基準電極 2 4 を有する。これらの電極の全ては、導体トラック 2 8 によって、1 0 の接続端子 2 6 に独立して連結されている。接続端子は、作用電極と同じ材料で作られている。この材料は、好ましくは金である。しかしながら、当業者によく知られている任意の他の導電性材料が使用されてもよく、例えば炭素、白金又はダイヤモンドである。電極の担体を構成する材料は、ポリイ

50

ミド等のポリマー材料である。しかしながら、当業者に良く知られている均等な特性を有する任意の他の材料を使用することが考えられ得る。

【 0 0 4 9 】

図 2 に提示する電極の構造は、数ある中での単に 1 つの構造であり、決して本特許出願によって与えられる保護の範囲を限定しないことが理解されるべきである。

【 0 0 5 0 】

図 3 A 及び 3 B は、微生物の存在又は非存在それぞれにおける、顕微鏡レベルでの作用電極の断面を描く。

【 0 0 5 1 】

作用電極では、3つの重ね合わせ層が見られる。これらの層の第一 30 は、バイオセンサー担体を構成するポリマー層である。中間層 32 は導電性材料の層であり、典型的には金である。最後に、層 34 は、電気活性共役ポリマーの層である。このようなポリマーは、例えばポリピロールである。このようなポリマーは、それらの導電性及び電気活性特性について良く知られている。ポリピロールは、特定のピロール環が位置 3 又は 4 において官能基で置換される場合、それらの導電性及びそれらの電気活性特性を維持することも知られている。このタイプの官能基を持つポリマーは、WO-A 1-95 / 29199, Garnier 等 (Synthetic Metals, 100: 89-94, 1999) Ho-Hoang 等 (Synthetic Metals, 62: 277-280, 1994)、Ho-Hoang 等 (J. Mater. Chem., 6 (7), 1107- 1112, 1996)、及び Korri-Youssoufi 等 (Materials Science and Engineering, C1 5, 265-268, 2001) に記載されている。このように、異なる分子を、ポリピロール単量体が持つ官能基にグラフトできる。このように、WO-A 1-95 / 29199 は、0.8 V / E C S 以上の電位での電氣的酸化によって得られるポリピロールの合成を記載する。電気化学的酸化によるポリピロールの合成は、電極の表面に電気活性フィルム、より正確には、導電性基質上に自立フィルムの形態の形成を導く。これは、ポリピロール中にオリゴヌクレオチドを非間接的に固定化する方法である。ピロール核の位置 3 において官能基で置換されたピロール単量体を、非置換単量体の溶液に希釈させ、これは、官能基をそれらの電氣的共重合中に、官能単位の鎖中に組み入れることによって固定化するだろう。第二の工程では、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド又はペプチド等の抗リガンドを、前駆ポリマーの官能基上に化学的にカップリングさせる。このように得られたポリマーは、その伝導性及び電気活性特性を維持する。従って、これらのポリマーは、電圧の差異又は電流における変化を測定することによって、ポリマー上にグラフトされた抗リガンドと特異的に干渉する分析物を検出するために使用できる。WO-A 1-00 / 77523 はまた、官能基を持つ前駆ポリマー上への、オリゴヌクレオチド等の抗リガンドの化学的カップリングを記載する。

【 0 0 5 2 】

これはまた、電氣的共重合によって、ポリピロール中にオリゴヌクレオチドを直接的に固定化する方法でありうる。ピロール核の位置 3 においてオリゴヌクレオチドで置換されたピロール単量体を、非置換単量体の溶液に希釈させ、これは、官能単位の鎖中に組み入れることによって、オリゴヌクレオチドを、それらの電氣的共重合中に直接的に固定化するだろう。

【 0 0 5 3 】

電気活性ポリマーのこの層上に、二本鎖の核酸 36 が、これらの鎖の一つの 5' 末端によってグラフトされ、相補鎖はその 5' 末端にピオチン分子 38 を持ち、ピオチン 42 にも結合する特異的結合パートナー 40 への結合が、ストレプトアビジン分子 44 によって可能となる。図 3 A 及び 3 B に描かれている特異的結合パートナーは、抗体である。それは、一又は複数のモノクローナル又はポリクローナル抗体でありうる。それはまた、抗体断片、例えば Fab 又は Fab' 2 断片、並びに遺伝子修飾又は組換えによって得られ、特定の微生物に特異的な任意の抗体でありうる。

【 0 0 5 4 】

あるいは、特異的結合パートナーは、標的微生物に特異的に結合するファージ又は組換えファージタンパク質でありうる。このようなタンパク質、及び細菌の捕獲のためのそれ

10

20

30

40

50



らの使用が、数ある中で特許 E P - B - 1 3 5 6 0 8 0 に記載されている。

【 0 0 5 5 】

注意すべきは、図 3 A 及び 3 B に描写されている構造は数ある中の単に一つの例であり、決して発明の限定として理解されるべきではない。実際は、バリエーションとして、抗リガンド分子を、二本鎖の核酸を使用せず電極上に直接的に固定することが考えられる。

【 0 0 5 6 】

分析を実施するために、均質化バッグに連結された電気化学的バイオセンサーは、分散サンプル、培養培地及び電気化学的メディエーター、例えばフェリシアニド-フェロシアニド対と接触して置かれる。微生物が不在の場合、電子交換は、電気活性共役ポリマーと反応培地中に存在する前記酸化還元系との間で生じる。これを図 3 A に示す。以下に説明するように、電子交換は、電流に変換され、ポテンシオスタットを使用して電気化学的分光法によって測定される。

【 0 0 5 7 】

サンプルが微生物 4 4 を含む場合、これらは抗リガンド分子 4 0 によって捕獲される。電極の近傍における微生物の存在は立体障害を引き起こし、これは、電気活性共役ポリマーによって修飾される電極と反応培地中に存在する前記酸化還元系との間の電子流を乱し低下させる。次いで、この修飾はインピーダンス測定によって測定され、負荷伝達抵抗によって特徴付けられ、細菌が捕獲された場合、その抵抗値は増加する（陽性結果）。

【 0 0 5 8 】

第一の実施態様による分析結果測定システムは、図 4 に模式的に描かれている。この図に見られるように、バッグ 1 0 は、そのバイオセンサー 1 8 を用いて、ポテンシオスタット 5 0 に接続される。この接続は、バイオセンサー 1 8 の接続領域 1 8 2 に接続されるコネクタ 5 2 を介してなされる。コネクタ 5 2 は、ポテンシオスタット 5 0 に連結されるケーブル 5 4 によって延長される。ポテンシオスタットは一方で、インピーダンス測定データを記録し分析できるコンピューターシステム 5 6 に連結される。

【 0 0 5 9 】

微生物の検出の目的のために、均質化バッグ 1 0 は好ましくは、微生物を増殖させるのに必要な期間、インキュベートされる。このインキュベーションは、25 及び 45 の間の温度で、インキュベーターにおいて通常通りに実施されうる。インキュベーション時間は、サンプル中に存在する微生物の初期量、及び検出される微生物のタイプに依存して、3 ~ 72 時間で変化しうる。

【 0 0 6 0 】

第一実施態様によると、インピーダンス測定は最後に実施されうる。実際、均質化バッグは、微生物の増殖に必要なかつ十分だと思われる時間インキュベートされ、次いで、それは、インキュベーターから外され、上記のインピーダンス測定システムに接続される。次いで、インピーダンス測定が実施され、結果が基準インピーダンス値と比較される。このようなインピーダンス測定は、一又は複数の作用電極 2 0 が、電気活性共役ポリマー及び/又は検出される微生物に対する非特異的抗リガンド分子で被覆される限り、可能である。この/これらの電極でのインピーダンス測定は、基準インピーダンス値を構成する。検出電極(標的微生物の抗リガンド分子が直接的又は間接的に固定される電極)のインピーダンス値と、基準値との間の差異が、閾値より大きい限り、微生物の検出は有効である。

【 0 0 6 1 】

第二実施態様によると、点在であり、すなわちインキュベーション中のスポットインピーダンス測定による。この場合、均質化バッグがインキュベーターから外され、測定に必要な時間、インピーダンス測定システムに接続され、次いで、再度インキュベートされる。2つの測定の間の間隔は、30秒~2分の間でありうる。この第二の実施態様は、第一の実施態様に対する主要な利点として、短いインキュベーション時間後に微生物の存在を検出する能力を有する。

【 0 0 6 2 】

最後に、好ましい実施態様である第三の実施態様では、インキュベーターの内部に、バ

10

20

30

40

50

イオセンサーをインピーダンス測定システムに接続する手段を有することが考えられる。それは、有線又は無線接続システムでありうる。このような実施態様は特に有益であり、なぜなら、測定を一定間隔で、均質化バッグ内において、後者を取り扱う必要なく実施することを可能にするからである。更に、一定間隔でのインピーダンス測定は、リアルタイムにおける微生物の検出の実施を可能にする。検出が為される時に技術者に警告するコンピュータシステムに連結される場合、技術者は、時間にわたって測定を逐次的に実施することからなるワークフローにもはや拘束されない。それらの介入は、微生物がバッグ中において検出された時のみに必要とされる。

【0063】

有線接続手段は、データ伝送を可能にするために、2つの電子装置を互いに接続することを可能にする任意の手段によって構成される。特に、有線接続手段は、シリアル接続システム(RS485、RS232標準)、USB接続システム(ユニバーサルシリアルバス)、ネットワーク接続システム(Ethernet)、パラレル接続システム(GPIB)又は任意のほかの均等な手段でありうる。

【0064】

無線接続手段は、電波送信機-受信機である。例えば、それは、Wi-Fi(802.11b標準)、Bluetooth(802.15標準)又はZigBee(802.15.4標準)システムでありうる。

【0065】

代替によると、データ取得手段は、RFID(無線周波数認識)読取り装置、Labjackカード又は当業者によく知られている任意の他の手段でありうる。

【0066】

発明によるプロセスの代替によると、これは、光学的検出手段によって実施されうる。この検出手段は、捕獲担体から独立でありうる。これは、例えば、光学的センサー、例えばカメラを用いる場合である。あるいは、光学的検出手段及び捕獲担体は一体でありうる。これは、例えば、光ファイバーであって、その末端が捕獲担体として作用する場合である。

【0067】

このような代替は、図7に描かれている。閉均質化バッグ10は、前述のように、ここではミンチステーキのサンプルによって構成される食品サンプル60でインキュベートされる。この食品サンプル60は、露呈システムで実装された培養培地62に投入される。任意の適切な手段によってバッグ内に保持された増感捕獲担体64がまた、均質化バッグ10中に配置され、培養培地62に浸漬される。増感捕獲担体64は、検出される標的微生物に特異的な少なくとも一つの結合パートナーによって機能化される。捕獲担体は、特異的結合パートナーを固定でき、当業者によく知られている任意の担体で構成されうる。非限定的な例として、適切な捕獲担体は、照射ポリスチレンから製造され得、例えば会社Nunc/Thermo Scientificによって市販されているもの(Cat. No. 472230)である。このような捕獲担体は、図9に、参照64下において模式的に描かれている。有利には、また好ましい実施態様によると、下部は2つに分けられ得る。参照641を持つゾーンは、結合パートナー(ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、Fab'又はFab'2断片、ファージタンパク質)の溶液で増感され得るが、上部642は何れかの結合パートナーを含まないままであり、よってネガティブコントロールとして作用する。

【0068】

捕獲担体は、少なくとも一つの特異的結合パートナー、例えば抗体、アプタマー、ファージ、組換えファージタンパク質、又は標的細菌の特異的捕獲を可能にする任意の均等な手段によって機能化される。

【0069】

これらの後者は、培養培地中に含まれている露呈システムによって、それらの増殖と同時に着色されうる。

【0070】

10

20

30

40

50

特定の実施例によると、露呈システムは、微生物による T T C 還元に基づく。増殖と同時に、T T C (その非還元形態では無色)は、前記微生物に取り込まれ、次いで、後者によって還元されて、トリフェニル-ホルマザン(赤)に還元され、よって、前記微生物を赤に着色し、担体上でそれらが露呈されるのを可能にする。

#### 【 0 0 7 1 】

インキュベーション期間中の、食品サンプル中における微生物の直接的なリアルタイム検出のプロセスは、増感捕獲担体の光学的読取によって、自動又は非自動に実施される。インキュベーションは、25及び44の間の温度で、6～48時間実施されうる。

#### 【 0 0 7 2 】

更に、一旦、所定量の着色された染色微生物(この場合、陽性サンプル)が効果的に捕獲されると、担体の光学的特性への変化が、それらへの赤着色の出現によって起こる(すなわち、生物学的シグナルの変換)。捕獲担体のこの着色は、眼によって検出可能であるか、又はカメラ等の読取り機械の使用によって測定可能となる。分析が陽性結果を生じた後の、捕獲担体が、図10に模式的に描かれている。示されるように、領域641は、特異的結合パートナー上への標的微生物の固定によって着色を生じる。領域642は、ネガティブコントロールとして作用し、捕獲担体の開始の色のままである。

#### 【 0 0 7 3 】

読取りを容易にするために、増感捕獲担体がもはや培養培地と接触していないことが好ましい。この目的のために、例えば、均質化バッグ10を傾けることが考えられ得、これは図8によく描かれている。上述のように、読取りは、再度にスポットベースにおいて、又はリアルタイムで実施されうる。

#### 【 0 0 7 4 】

発明によるプロセスの他の代替によると、捕獲担体は、増感粒子によって構成され、すなわち、検出される微生物に特異的又は非特異的な結合パートナーを持つ。次いで、検出は好ましくは、インキュベーション期間中の、増感粒子に結合する標的微生物による、増感粒子のリアルタイム凝集の出現によって実証される。このような実施態様は、文書WO-A-2009/122069に記載されている。

#### 【 0 0 7 5 】

特定の実施態様によると、増感粒子は磁性粒子でありうる。この実施態様は本質的には、集積中の、食品サンプル中における標的微生物(すなわち、大腸菌O157:H7)の存在を、増感磁性粒子の凝集によって、直接的に検出する。検出は、インキュベーション期間中に、特異的結合パートナー(すなわち、抗大腸菌O157:H7組換えファージタンパク質)を有する増感磁性粒子を、培養培地中に希釈された食品サンプルを有する閉容器に、浸漬することによって実施される。

#### 【 0 0 7 6 】

この代替では、増感粒子の凝集の実証を改善するために、主容器(均質化バッグ)内に、二次の管タイプ容器を使用することが有益でありうる。図11から分かるように、均質化バッグ10は、培養培地62及びサンプル60に加えて、管66を有する。この管66は、導管68によって、均質化バッグ10に含まれる培養培地62と流体連結されている。食品サンプルを有する培養培地62の一部が、次いで管66に移され、そこで検出が行われる。このような移動は特に、理想気体の状態方程式( $P V = n R T$ )に基づき、温度変化によって達成されうる。このようなプロセスは、文書WO-A-2004/092401に記載されている。

#### 【 0 0 7 7 】

磁性粒子が使用される場合、インキュベーション期間の最後での、反応培地を有する二次容器における読取りは、磁気読取装置を使用して実施される。

#### 【 0 0 7 8 】

磁気シグナルは、読取り領域の中心で凝集を濃縮する磁場(磁石による)の事前の使用によって、増幅できる。

#### 【 0 0 7 9 】

10

20

30

40

50

磁場の適用はまた、微生物を捕獲した磁性粒子の集合の後、この現象が凝集の形成のトリガとなる場合、検出限界を改善しうる。実際、微生物濃度が受身凝集のトリガに十分でない場合、磁性粒子の集合は(その幾つかは過去に微生物を捕獲しているだろう)は、凝集を強制されるだろう。更に、このシーケンス(すなわち、磁化及び再懸濁)の反復はまた、捕獲及び凝集形成の現象を増幅し、よって、分析の感度を増幅する。

【0080】

以下に示す実施例は、発明によるプロセスの異なる実施態様及び得られた結果を提示することを目的とする。それらは、決して発明を限定しない。

【0081】

実施例

10

実施例1：電気化学的バイオセンサーの分析電極の調製。

試薬：

過塩素酸リチウム( $\text{LiClO}_4$ )、塩化ナトリウム( $\text{NaCl}$ )、水酸化ナトリウム( $\text{NaOH}$ )、ヘキサシアノ鉄(III)酸カリウム( $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ )、ヘキサシアノ鉄(II)酸カリウム三水和物( $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ )、Tween 20、リン酸緩衝液(BPS)、ウシ血清アルブミン(BSA)、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン(TRIS)、マレイン酸、サケDNA及びSigma-Aldrichからの50X Denhardt。

洗浄バッファー、pH 7.2は、PBS 0.01M、NaCl 0.5M及び0.05% Tweenである。

ハイブリダイゼーションバッファーは、PBS 0.01M、NaCl 0.5M、2X Denhardt及び10 µg/mLのサケDNAである。

20

結合パートナーのグラフト化バッファーは、24.23 g/LのTRIS、23.2 g/Lのマレイン酸、6 g/Lの水酸化ナトリウム及び5 g/LのBSAから構成されるTRIS-MALEATE BSAバッファー、pH 6.2である。

3-(2-ヒドロキシエチル)ピロール又はPyOH及び3-(エタン酸フタルイミド)ピロール又はPyNHPはEZUS Lyonによって供給される。

20ヌクレオチドを有し、5'末端にアミノ基を持つ合成オリゴヌクレオチドを、NHP基の置換によって共有結合的に固定する。

官能性単量体は次の通りである：

Py-r-<sup>5'</sup>TTTTTTTTTTTGAATCCTCAGTTTTTCAACG<sup>3'</sup>。

30

相補ヌクレオチドは、5'末端にビオチン基を持つ。その配列は次の通りである：<sup>5'</sup>CGTTGA AAAA CTGAGGATTTC<sup>3'</sup>。

【0082】

バイオセンサー及び電気化学的検出機器：

電気化学的検出測定は、Sciences Instrumentsからのコンピューター制御BioLogicポテンシオスタットを使用して実施される。

【0083】

使用されるセンサーは、プリント回路板(PCB)技術から得られる。電極における金沈着は、金ベース槽からの電気分解によるガルバニ沈着である。電極は、エポキシ樹脂、銅、ニッケル及び金多層から成る。

40

【0084】

電極の調製：

電極を洗浄するために、センサーの分析領域を、超音波洗浄機において1分間、1:1希釈の蒸留水/エタノール溶液に浸す。

【0085】

洗浄後、センサーを清潔にし、電気化学的に活性化させる。これを行うために、蒸留水中における30 µL滴の0.2MのNaOHをセンサーの分析領域に沈着させ、電極の全てを濡らす。センサーをポテンシオスタットに接続し、酸化及び還元における幾つかのサイクルの電位ジャンプをクロノアンペロメトリーによって生成させる。この工程の目的は、電極との界面で酸素バブルを生成し、何れかの有機及び/又は無機混入物を除去する

50

ことである。次いで、センサーを蒸留水ですすぐ。

#### 【0086】

作用電極の表面を、コポリマー電着によって修飾させる。電極の全てをこのように、一滴の電解重合溶液、100 mMのPyOH及び25  $\mu$ MのPyODN(1/4000濃度比)及び0.5 MのLiClO<sub>4</sub>で被覆する。次いで、反応を、クロノアンペロメトリーによって生成される、0.8 V/金疑似基準の定電位の適用によって導電させる。一旦11 mC/cm<sup>2</sup>の負荷電荷に達したら、重合を中断する。コポリマーが、全ての作用電極上に同時に形成される。次いで、電極を蒸留水ですすぐ。

#### 【0087】

次の工程は本質的にはハイブリダイゼーションである。センサーを、100 nMのバイオチン化標的ODNの存在中における30  $\mu$ L滴の緩衝液で被覆する。ハイブリダイゼーションを、37℃で30分間実施する。PBSバッファーでの洗浄工程の後、センサーを、PBSバッファー中における100  $\mu$ g/mLのストレプトアビジン溶液に15分間、攪拌と共に浸す。次いで、センサーを、TRIS-マレイン酸BSAバッファー中における1  $\mu$ g/mLの抗リガンド分子の溶液との接触に置くことによって、抗リガンド分子を固定する。

#### 【0088】

次の実施例では、抗リガンド分子は、大腸菌O157の検出のための組換えファージタンパク質か、又はリステリアsppの検出のためのFab'断片である。

#### 【0089】

実施例2：食品サンプル中における大腸菌O157：H7の検出

上掲のように、大腸菌O157に特異的な組換えファージタンパク質で機能化され、均質化バッグに結合されたバイオセンサーを、食品サンプルでインキュベートする。

#### 【0090】

バイオセンサーを有する2つのバッグを、陽性集積調製物でインキュベートする。バイオセンサーを有する2つのバッグを、陰性集積調製物でインキュベートし、バイオセンサーを有する2つのバッグを、食品マトリックスのバックグラウンドノイズを測定するために、非汚染集積調製物でインキュベートする。

#### 【0091】

陽性集積調製物

最小で5%の脂質物質を有する25 gの生肉を、フィルターを有するStomacher(登録商標)に無菌的に入れ、大腸菌O157：H7 ATCC 43888と接触させる。バッグを2-8℃で24時間置き、株にストレスを与える。

次いで、41.5℃で24時間予熱された225 mLの緩衝化ペプトン水(bioMerieux ref. 42043)、及び5 mMのレドックスプローブ[Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-</sup>/4<sup>-</sup>を、サンプルに加える。

5 mMのレドックスプローブ[Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-</sup>/4<sup>-</sup>の存在下における大腸菌O157：H7細菌の増殖を、事前に検証した。このレドックスプローブの存在が、培養培地内の細菌増殖を減速しないことを確認した。

懸濁液の均質化後、機能化した捕獲担体をStomacher(登録商標)バッグに入れる。

このプロトコルを、2つの陽性懸濁液を、機能化担体を有する2つのバッグによって検査するために、反復する。

#### 【0092】

2つの陽性懸濁液からのペトリ皿上の計数は、Stomacher(登録商標)バッグにおけるインキュベーションの前に、生肉の大腸菌O157：H7 ATCC 43888の0.92 CFU/gの平均濃度の評価を可能にする。

#### 【0093】

次いで、調製物を41.5℃で3時間インキュベートする。

#### 【0094】

陰性集積の調製

10

20

30

40

50

ネガティブコントロール：同じ生肉バッチ番号から、25 gを、フィルターを有するStomacher(登録商標)バッグに無菌的に入れ、バチルスセレウスATCC 27522との接触におく。バッグを2 - 8 で24時間置き、株にストレスを与える。

次いで、41.5 で24時間予熱された225 mLの緩衝化ペプトン水(bioMerieux ref. 42043)、及び5 mMのレドックスプローブ $[Fe(CN)_6]^{3- / 4-}$ を、サンプルに加える。

懸濁液の均質化後、機能化した捕獲担体をバッグに入れる。

このプロトコルを、2つの陰性懸濁液を機能化担体を有する2つのバッグによって検査するために、反復する。

2つの懸濁液において、Stomacher(登録商標)バッグにおけるインキュベーションの前の、バチルスセレウスATCC 27522によるコンタミネーションの割合は、1.32 CFU/gの生肉と評価される(理論的測定)。

【0095】

次いで、調製物を41.5 で3時間インキュベートする。

【0096】

マトリックスによって生成されるバックグラウンドノイズの測定：同じプロトコルを細菌無しで反復する。次いで、調製物を41.5 で6時間インキュベートする。

【0097】

この検査の目的は、3時間のインキュベーション/集積後、大腸菌O157:H7を検出可能か検証することである。

【0098】

得られた結果：

各バッグについて、インピーダンス測定を、バイオセンサーの洗浄工程無しで、直接的に実施する。

【0099】

1 Hz ~ 100 kHzの間の周波数スケールにおいて、200 mVで得られるナイキストグラフを、図5に示す。

【0100】

コンタミネーション無しで、Stomacher(登録商標)バッグにおける生肉調製物の6時間のインキュベーション後に得られる、及び陰性コンタミネーションを伴う生肉調製物の3時間のインキュベーション後に得られる電気化学インピーダンススペクトルは、同じ電子伝達抵抗 $R_{ct}$ (半円の直径)を示し、値はそれぞれ116及び115 k に等しい。

【0101】

このように、電子伝達の抵抗はマトリックスのバックグラウンドノイズに起因し、これは、非標的細菌増殖中の電子伝達の抵抗と同一である。

【0102】

大腸菌O157:H7(0.92 CFU/gの生肉)による陽性コンタミネーションを伴う生肉調製物の3時間の集積後、電子伝達抵抗値は719 k であり、すなわち、陰性コンタミネーションで得られるものよりおよそ6倍大きく、大腸菌O157:H7の明瞭な検出を可能にする。

【0103】

全ての均質化バッグで得られる平均 $R_{ct}$ 値、標準偏差及び変動係数値を、下の表1に示す。示す値は、インピーダンスシグナルの半円の直径に対応する電荷抵抗のグロス値である。

10

20

30

40

	マトリックスバックグラウンドノイズ(コンタミネーション無し)	陰性 コンタミネーション B.セレウス (1.32 CFU/g)	陽性 コンタミネーション 大腸菌 (0.92 CFU/g)
平均 $R_{ct}$ (k $\Omega$ )	109	90	708
標準偏差	9	8	25
変動係数(%)	8	9	4
測定の数	16	7	16

10

表 1

## 【 0 1 0 4 】

実施例 3：食品サンプル中におけるリステリアイノキュアの検出

上掲のように、リステリアに特異的な Fab' 断片で機能化され、均質化バッグに結合されたバイオセンサーを、食品サンプルでインキュベートする。

## 【 0 1 0 5 】

バイオセンサーを有する一バッグを、陽性集積調製物でインキュベートする。バイオセンサーを有する一バッグを、陰性集積調製物でインキュベートする。

## 【 0 1 0 6 】

陽性集積の調製物

最小で 5 % の脂質物質を有する 25 g の生肉を、フィルターを有する Stomacher(登録商標)バッグに無菌的に入れ、リステリアイノキュア ATCC 33090 と接触させる。バッグを 2 - 8 °C で 22 時間置き、細菌にストレスを与える。

## 【 0 1 0 7 】

次いで、30 °C で 18 時間予熱された 225 mL のリステリア Xpress プロス(bio Merieux ref. 42626)、及び 5 mM のレドックスプローブ [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-</sup> / <sup>4-</sup> を、サンプルに加える。

## 【 0 1 0 8 】

5 mM のレドックスプローブ [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-</sup> / <sup>4-</sup> の存在下におけるリステリアイノキュア細菌の増殖を、事前に検証した。このように、このレドックスプローブの存在は、培養培地内の細菌増殖を阻害しないことを確認した。

## 【 0 1 0 9 】

懸濁液の均質化後、2 つの機能化捕獲担体を Stomacher(登録商標)バッグに入れた。

## 【 0 1 1 0 】

ペトリ皿上の計数は、Stomacher(登録商標)バッグにおけるインキュベーションの前の、リステリアイノキュア ATCC 33090 濃度を、0.48 CFU / g の生肉と評価すること可能にした。

## 【 0 1 1 1 】

次いで、調製物を 30 °C で 6 時間インキュベートする。

## 【 0 1 1 2 】

陰性集積の調製

ネガティブコントロール：同じ生肉バッチ番号から、25 g を、フィルターを有する Stomacher(登録商標)バッグに無菌的に入れ、黄色ブドウ球菌 ATCC 6538P との接触に置いた。バッグを 2 - 8 °C で 22 時間置いた。

## 【 0 1 1 3 】

次いで、30 °C で 18 時間予熱された 225 mL のリステリア Xpress プロス(bio Merieux ref. 42626)、及び 5 mM のレドックスプローブ [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-</sup> / <sup>4-</sup> を、サンプルに加える。

## 【 0 1 1 4 】

20

30

40

50

懸濁液の均質化後、2つの捕獲担体をStomacher(登録商標)バッグに入れた。黄色ブドウ球菌ATCC6538P濃度は、Stomacher(登録商標)バッグにおけるインキュベーションの前に、 $4.10^7$  CFU/gの生肉である(理論的測定)。

【0115】

次いで、調製物を30で6時間インキュベートする。

【0116】

この検査の目的は、インキュベーション/集積の6時間後に、リステリア属細菌の検出が可能であるか検証することである。

【0117】

得られた結果：

各バッグについて、インピーダンス測定を、バイオセンサーの洗浄工程無しで、直接的に実施する。

【0118】

1 Hz ~ 100 kHzの間の周波数スケールにおいて、200 mVで得られるナイキストグラフを、図6に示す。

【0119】

陰性コンタミネーション( $4.10^7$  CFU/gの黄色ブドウ球菌)を有する均質化バッグにおける生肉調製物の6時間のインキュベーション後に得られる電気化学インピーダンススペクトルは(図6破線)、電子伝達抵抗値が13 kであることを示す。

【0120】

リステリアイノキュアATCC33090(インキュベーションの前に0.48 CFU/gの生肉)による陽性コンタミネーションを有する生肉調製物の集積の6時間後、電子伝達抵抗値は45 kであり、すなわち、陰性コンタミネーションで得られるものよりおよそ3倍大きい。

【0121】

この結果は、食品サンプルに存在するリステリアイノキュア細菌の存在を、前記サンプルを有する集積培地と接触する電気化学的バイオセンサー上に固定された特異的Fab'断片により、センサーを洗浄する工程無し、シグナル増幅無しで検出することが可能であること明瞭に示す。

【0122】

全ての均質化バッグで得られる平均 $R_{ct}$ 値、標準偏差及び変動係数値を、下の表2に示す。示される値は、インピーダンスシグナルの半円の直径に対応するグロス電荷抵抗値である。

	陰性 コンタミネーション S.アウレウス ( $4.10^7$ CFU/g)	陽性 コンタミネーション L.イノキュア (0.48 CFU/g)
平均 $R_{ct}$ (k $\Omega$ )	15	45
標準偏差	1	8
変動係数(%)	5	17
測定の数	16	12

表2

【0123】

実施例4：光学的検出について標的微生物に特異的な少なくとも一つの結合パートナーで増感された捕獲担体の作成

照射ポリスチレンで作られ、会社Nunc/Thermo Scientific(Cat. No. 472230)によって



市販される、図 9 及び 10 に示す捕獲担体。

【0124】

捕獲担体の増感を、次に示すように、6 の工程において実施する：

1) ポリスチレン担体を、炭酸バッファー、pH 9.6 中における  $5 \mu\text{g/mL}$  の  
ビオチン化 BSA (ウシ血清アルブミン) 溶液中に、37 で一晩、浸す；

2) 次いで、担体を、PBS バッファーで数秒すすぐ；

3) すすいだ後、担体を、pH 7.2 のリン酸緩衝液中における  $10 \mu\text{g/mL}$  のス  
トレプトアビジン溶液に、37 で2時間、浸す；

4) 次いで、担体を、pH 9.6 の炭酸バッファーで数秒すすぐ；

5) 次いで、担体を、pH 9.6 の炭酸バッファー中における特異的結合パートナー( 10  
 $1 \mu\text{g/mL} \sim 40 \mu\text{g/mL}$ ) の溶液に、37 で2時間、浸す；

6) 最後に、担体を、pH 9.6 の炭酸バッファー中における BSA の溶液に、37  
で2時間、不動態化させる。

【0125】

このように作成された増感担体は、微生物の光学検出に使用されるか、又は後の使用の  
ために 2 - 8 に保存されうる。

【0126】

実施例 5：増感担体の使用による、食品サンプルにおける大腸菌 O157：H7 の光学的  
検出。

この実験の目的は、上掲に記載し図 8 に示すような、増感担体の使用により、集積中の 20  
、食品サンプル中における標的細菌大腸菌 O157：H7 の存在を直接的に検出すること  
である。

【0127】

以下で詳細に記載するように、検出は、インキュベーション期間中に、抗大腸菌 O15  
7：H7 組換えファージタンパク質を有する増感担体を、反応培地中に 1 / 10 に希釈さ  
れた食品サンプルを有する均質化バッグに浸すことによって実施される。

【0128】

プロトコル：

工程 1：反応培地におけるサンプルの再懸濁

4 つのサンプルを次のように調製する：

・サンプル A：均質化バッグにおいて、5 コロニー形成単位(CFU)の大腸菌 O15  
7：H7 によって汚染された 25 g のミンチステーキを、0.01 g/L のバンコマイシ  
ン(Sigma, Cat. No. 75423)及び 0.3 g/L の TTC(bioMerieux, Ref. 04568088)で補  
充された、225 mL の BPW(bioMerieux, Ref. 42043)に再懸濁させる；

・サンプル B：均質化バッグにおいて、大腸菌 O157：H7 によって汚染されてい  
ない 25 g のミンチステーキを、0.01 g/L のバンコマイシン及び 0.3 g/L の T  
TCで補充された、225 mL の BPWに再懸濁させる；

・サンプル C：均質化バッグにおいて、5 CFU の大腸菌 O157：H7 によって汚  
染された 375 g のミンチステーキを、0.01 g/L のバンコマイシン及び 0.3 g /  
L の TTCで補充された、3375 mL の BPWに再懸濁させる；

・サンプル D：均質化バッグにおいて、大腸菌 O157：H7 によって汚染されてい  
ない 375 g のミンチステーキを、0.01 g/L のバンコマイシン及び 0.3 g/L の  
TTCで補充された、3375 mL の BPWに再懸濁させる；

【0129】

分析を、各サンプルについて 3 回実施した。

【0130】

工程 2：インキュベーションの前の均質化バッグへの増感担体の浸漬

増感捕獲担体を、以下に記載のように、各 stomacher バッグ(サンプル A、B、C 及び D  
)に入れる。次いで、均質化バッグを、閉鎖ピンによって再び閉じ、インキュベーターに  
おいて 41.5 で 16 - 24 時間インキュベートする。

## 【 0 1 3 1 】

工程 3 : インキュベーション期間後の捕獲担体の読取り

インキュベーション(41.5 で 20 時間)の最後であって、サンプル中に存在する全ての細菌による TTC の非特異的還元(すなわち、付属フローラ及び標的フローラに属する)の後、反応培地は赤色である。最後に、分析したサンプルの陽性又は陰性を露呈する捕獲担体を観察できるように、均質化バッグを、反応培地から前記捕獲担体を分離するために傾ける。

## 【 0 1 3 2 】

実験計画によると、サンプル B 及び D は陽性であり、サンプル A 及び C は陰性である。出願人( r e f . 3 0 1 2 2 )によって市販されている V I D A S (登録商標) E C P T 方法によるこれらの同じサンプルの分析は、類似な結果に導き、よって、増感捕獲担体の光学読取りによって得られる結果を裏付ける。

10

## 【 0 1 3 3 】

最後に、20 時間のインキュベーション後に達せられる標的レベルは、サンプル B でおおよそ  $5.5 \log_{10} \text{CFU/mL}$  であり、サンプル D で  $3.5 \log_{10} \text{CFU/mL}$  である。

## 【 0 1 3 4 】

実施例 6 : 増感担体の使用による環境サンプル中におけるリステリア s p p の光学的検出  
この実験の目的は、増感担体の使用によって、集積中の環境サンプル中におけるリステリア属に属する細菌株の存在を、直接検出することである。

20

## 【 0 1 3 5 】

以下に詳細に記載するように、検出を、インキュベーション期間中に、3 つの抗リステリア s p p . 組換えファージタンパク質で増感された、図 10 に記載のような捕獲担体を、反応培地中に希釈されたサンプルを有する閉容器中に浸漬することによって実施する。

## 【 0 1 3 6 】

プロトコル :

工程 1 : 反応培地中におけるサンプルの再懸濁

全ての環境サンプルを、以下に詳細に記載する実施例に従い調製する ;

## 【 0 1 3 7 】

表面サンプルを採るために使用されるスポンジ(8 c m × 3 c m)を二等分に分け、次のように処理する :

30

サンプル 1 : 容器(すなわちピルボックス)において、第一の 1 / 2 スポンジをリステリア属に属する 5 C F U の株によって人工的に汚染させ、0 . 1 g / L の T T C (bioMerieux, Ref. 04568088)によって補充された 4 5 m L の L X 培地(bioMerieux, Ref. 42635)に再懸濁させる。

サンプル 2 : 第二の容器(すなわちピルボックス)において、リステリア属に属する株によって汚染されていないもう一方の半分を、0 . 1 g / L の T T C (bioMerieux, Ref. 04568088)によって補充された 4 5 m L の L X 培地(bioMerieux, Ref. 42635)に再懸濁させる。

## 【 0 1 3 8 】

サンプル及び人工的に播種された株間の関係を下の表 3 に提示する。

40

サンプル番号	播種された株
サンプル A1	L.モノサイトゲネス (monocytogenes) 4b ATCC 19115
サンプル A2	N/A
サンプル B1	L.シーリゲリ (seeligeri) NSB 22460
サンプル B2	N/A
サンプル C1	L.ウェルシメリ (welshimeri) 6a
サンプル C2	N/A

10

表 3

## 【 0 1 3 9 】

工程 2 : インキュベーション前の容器 (ピルボックス) における増感担体の浸漬

例えば図 9 及び 10 に記載のような増感担体を、各ピルボックスに入れる。これを行うために、ピルボックスの蓋に孔を作り、増感捕獲担体 64 が、分析領域 (領域 641 及び 642) が培養培地に完全に浸漬するまで、強制的に挿入できるようにする。次いで、ピルボックスをそれらのストッパーで密封し、インキュベーターにおいて 30 で 24 - 48 時間インキュベートする。

## 【 0 1 4 0 】

20

工程 3 : インキュベーション期間の最後での捕獲担体の読取り

インキュベーション (30 で 24 - 48 時間) の最後であって、サンプル中に存在する全ての細菌による TTC の非特異的還元 (すなわち、付属フローラ及び標的フローラに属する) の後、反応培地は赤色である。また、分析したサンプルの陽性又は陰性を露呈する増感捕獲担体を観察できるように、均質化バッグを、反応培地からサンプルを分離するために傾ける。各サンプルをまた、VIDAS (登録商標) LIS (Ref. 30700) 方法によって分析する。

## 【 0 1 4 1 】

得られた結果を、下の表 4 に挙げる：

サンプル番号	播種された株	光学バイオセンサ 結果	VIDAS LIS 結果
サンプル A1	L.モノサイトゲネス (monocytogenes) 4b ATCC 19115	+	+
サンプル A2	N/A	-	-
サンプル B1	L.シーリゲリ (seeligeri) NSB 22460	+	+
サンプル B2	N/A	-	-
サンプル C1	L.ウェルシメリ (welshimeri) 6a	+	+
サンプル C2	N/A	-	-

30

40

表 4

## 【 0 1 4 2 】

増感捕獲担体では、捕獲担体の領域 641 の赤着色及び領域 642 の着色無しが、サンプルの陽性を示す (図 10 を参照)。

50

## 【 0 1 4 3 】

実験計画によると、サンプル 1 は陽性であり、サンプル 2 は陰性である。V I D A S L I S 方法によるこれらの同じサンプルの分析は、類似な結果に導き、よって、増感捕獲担体の光学読取りによって得られる結果を裏付ける。

## 【 0 1 4 4 】

実施例 7：標的微生物に特異的な少なくとも一つの結合パートナーによって機能化された(コンジュゲートされた)粒子の作成

この実施例のために、2 タイプのコンジュゲートを、4 0 0 n m の直径のラテックス粒子から作成する。

・下の工程に従う、特異的結合パートナー(抗大腸菌 O 1 5 7 : H 7 組換えファージタンパク質)の吸着による調製：

1．遠心分離による、V E R S O L 水におけるラテックス粒子(Plain Hidey blue, Polymer lab)の洗浄；

2．ホイール攪拌(wheel agitation)を伴う、周囲温度で3時間の、0．5 %の固形分のラテックス粒子の存在下における、p H 7 リン酸緩衝液中における1 5 0 μ g / m L の特異的結合パートナーの吸着。

吸着収率は8 0 % より大きく、従って、吸着後にラテックス粒子を洗浄する必要はない。

## 【 0 1 4 5 】

・下の工程に従う、特異的結合パートナー(抗 O 1 5 7 組換えファージタンパク質)のカップリングによる調製：

1．遠心分離による、v e r s o l 水におけるラテックス粒子(Carboxylic Hidey, Polymer lab)の洗浄；

2．サーモミキサーにおける、3 7 及び7 0 0 r p m で3時間の攪拌による、0．5 %の固形分のラテックス粒子の存在下における、エチル-(N ' , N ' -ジメチルアミノ)プロピルカルボジイミドハイドロクロライド(EDC)への、p H 7 の2 0 m M のリン酸緩衝液中における1 2 5 μ g / m L のストレプトアビジンのカップリング。

3．非カップリング化ストレプトアビジンを、5 0 0 0 g での2 0 分の遠心分離によって除去し、残りを、p H 7 の2 0 m M のT r i s バッファーに採る；

4．1 5 0 μ g / m L のビオチン化特異的結合パートナー(抗大腸菌 O 1 5 7 : H 7 ビオチン化組換えファージタンパク質)の添加、及びホイール攪拌を伴う周囲温度での3時間のインキュベーション；

5．7 0 0 0 g で1 0 分間の遠心分離によって過剰結合パートナーを除去し、p H 7 の2 0 m M のT r i s バッファーに採る。

## 【 0 1 4 6 】

実施例 8：液体培地における増感ラテックス粒子の凝集による、食品サンプル中における大腸菌 O 1 5 7 : H 7 の検出。

この実験の目的は、先の実施例に記載のような増感ブルーラテックス粒子によって、集積中の食品サンプル中における標的細菌大腸菌 O 1 5 7 : H 7 の存在を、直接的に検出することである。

## 【 0 1 4 7 】

以下で詳細に記載するように、検出は、インキュベーション期間中に、抗大腸菌 O 1 5 7 : H 7 組換えファージタンパク質を有する増感ブルーラテックス粒子を、集積培地中に希釈された食品サンプルを収容する閉容器中に浸すことによって実施される。

## 【 0 1 4 8 】

プロトコル：

工程 1：集積培地中におけるサンプルの再懸濁 / 希釈

6 つのサンプルを次のように調製する：

サンプル A 1：均質化バッグにおいて、5 C F U の大腸菌 O 1 5 7 : H 7 によって汚染された2 5 m L の低温殺菌(パスチャライゼーション)ミルクを、2 2 5 m L のB P W (b

10

20

30

40

50

ioMerieux, ref. 42043)に希釈する；

サンプルA 2：均質化バッグにおいて、大腸菌O 1 5 7：H 7によって汚染されていない2 5 m Lの低温殺菌ミルクを、2 2 5 m LのB P Wに希釈する；

サンプルB 1：均質化バッグにおいて、5 C F Uの大腸菌O 1 5 7：H 7によって汚染された2 5 gのサケを、2 2 5 m LのB P Wに再懸濁させる；

サンプルB 2：均質化バッグにおいて、大腸菌O 1 5 7：H 7によって汚染されていない2 5 gのサケを、2 2 5 m LのB P Wに再懸濁させる；

サンプルC 1：均質化バッグにおいて、5 C F Uの大腸菌O 1 5 7：H 7によって汚染された2 5 gのサラダを、2 2 5 m LのB P Wに再懸濁させる；

サンプルC 2：均質化バッグにおいて、大腸菌O 1 5 7：H 7によって汚染されていない2 5 gのサラダを、2 2 5 m LのB P Wに再懸濁させる；

3回の反復を、各サンプルについて実施した。

#### 【0 1 4 9】

工程2：インキュベーションより前の、均質化バッグへの反応培地を有する管の挿入

図1 1によると、次いで、反応培地を有する管を均質化バッグに加える。反応培地は、1 0 0  $\mu$  lの増感ブルーラテックス粒子、及び1 0 m g / Lのバンコマイシンで補充された1 . 4 m LのB P Wから成る。

#### 【0 1 5 0】

次いで、均質化バッグを閉鎖ピンによって再び閉じ、3 -フェーズインキュベーションのために、プログラム可能なインキュベーターに置く。実際は、均質化バッグから、反応培地を有する管へのアリコートのサンプル(0 . 5 m L)の移動は、理想気体の状態方程式( $p V = n R T$ )に基づき、文書WO - A - 2 0 0 4 / 0 9 2 4 0 1に記載されるプロセスに従って実施される。

#### 【0 1 5 1】

インキュベーション期間は、次の通りに分けられる：

フェーズ1：4 1 . 5 で1 6時間；B P Wに希釈された2 5 gのサンプルの集積、

フェーズ2：3 0 で1時間；反応培地を有する管への0 . 5 m Lのサンプルの移動、

フェーズ3：1 . 5 で8時間；0 . 5 m Lのアリコートを有する反応培地の集積、

#### 【0 1 5 2】

実験計画によると、サンプル番号1のサンプルを陽性として、サンプル番号2のサンプルを陰性として決定した。V I D A S E C P T方法によるこれらの同じサンプルの分析は、類似な結果に導き、よって、液体培地における増感ラテックス粒子の凝集によって得られる結果を裏付ける。

10

20

30

【図 1】

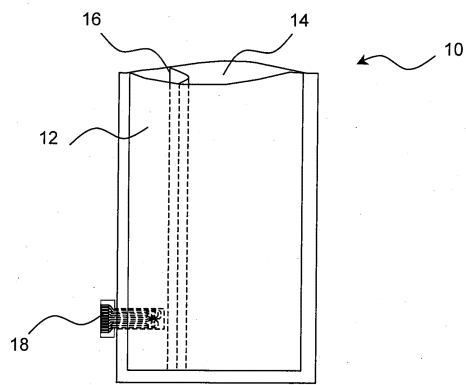


Fig. 1

【図 2】

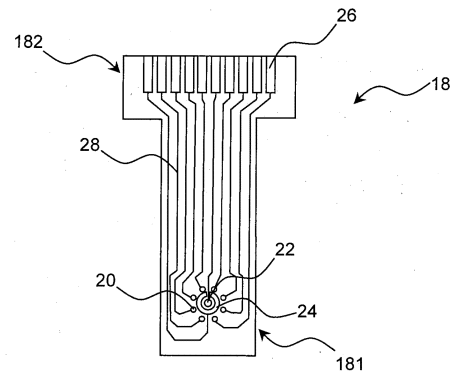


Fig. 2

【図 3】

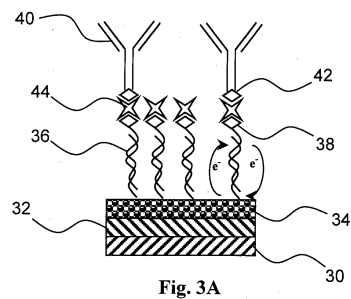


Fig. 3A

【図 4】

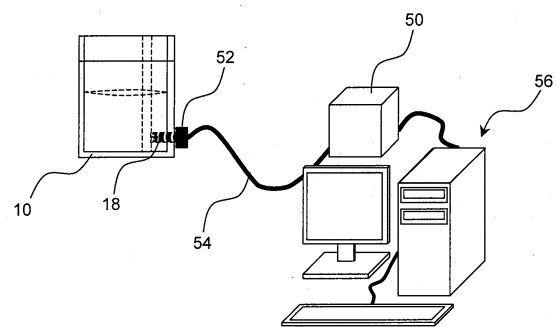


Fig. 4

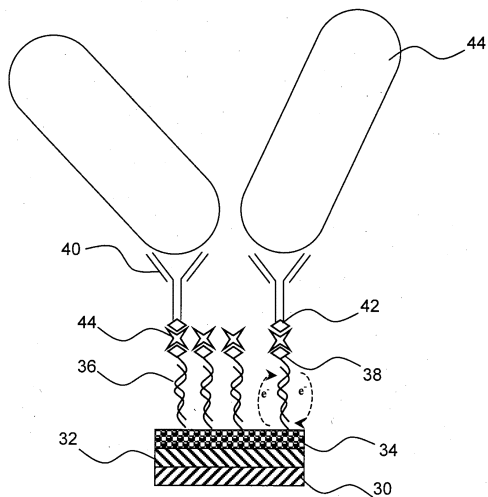


Fig. 3B

【図 5】

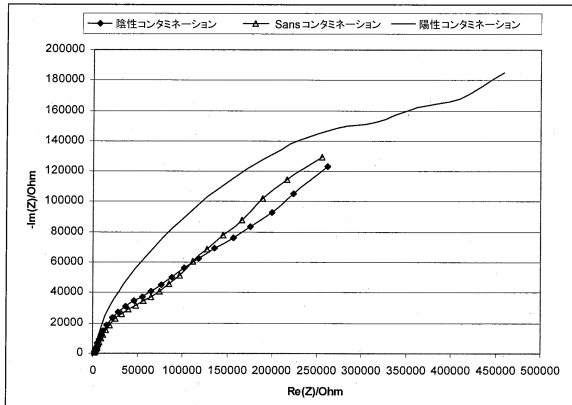


Fig. 5

【図 6】

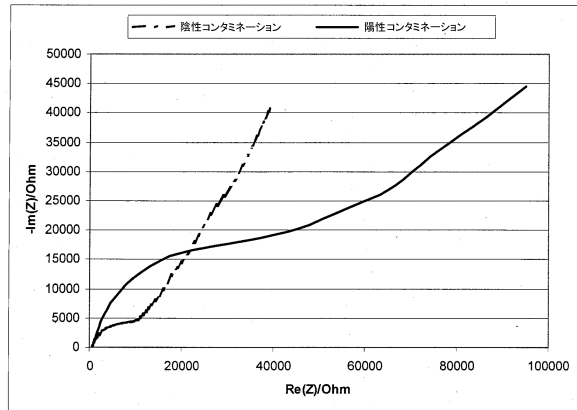


Fig. 6

【図 7】

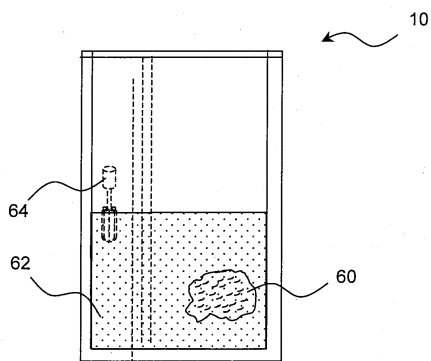


Fig. 7

【図 8】

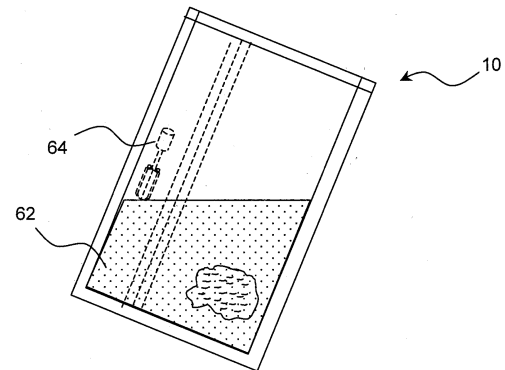


Fig. 8

【図 9】

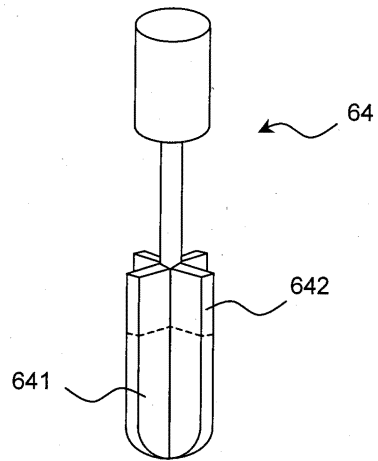


Fig. 9

【図 10】

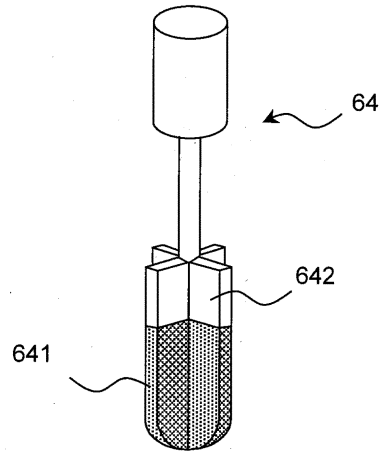


Fig. 10

【図 11】

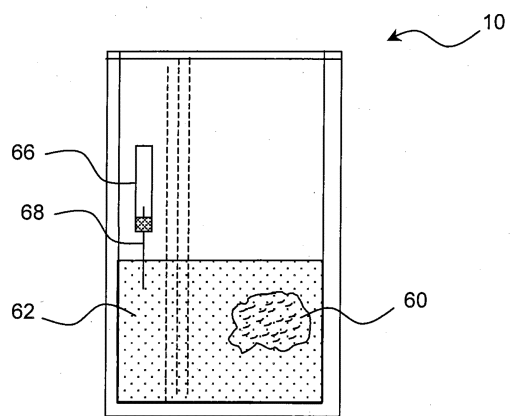


Fig. 11



【配列表】

0005902159000001.app

## フロントページの続き

- (72)発明者 コラン, ブリュノ  
フランス国 エフ - 6 9 2 8 0 マルシー レトワール, シュマン デ ガレンヌ 2 3
- (72)発明者 ラファイ, オレリー  
フランス国 エフ - 6 9 6 7 0 サン ローラン ド ヴォー, シュマン ドゥ ラ グラン  
セールヴ, 3 7
- (72)発明者 マクルフ, ブシュラ  
フランス国 エフ - 6 9 0 0 9 リヨン, リュ ロジェ サロングロ, 1 8
- (72)発明者 モンテス, パスカル  
フランス国 エフ - 6 9 2 8 0 サント コンソルス, アンパース デュ グラン セリジエ,  
1 1
- (72)発明者 モスティコン, ダヴィッド  
フランス国 エフ - 6 9 2 8 0 サント コンソルス, リュ マルセル メリュー, 1 1 5
- (72)発明者 レイモン, ジャン クロード  
フランス国 エフ - 6 9 6 9 0 ベスネ, アレ デュ クロ デュ サントル 2 0
- (72)発明者 ソフィア, ティエリー  
フランス国 エフ - 6 9 4 8 0 マルシー, ルートゥ ドゥ シャルネ, 2 5 6
- (72)発明者 ヴィモン, アントワーン  
フランス国 エフ - 6 9 0 0 5 リヨン, リュ ドゥ ラ ファヴォリット, 5 6

審査官 柴原 直司

- (56)参考文献 国際公開第 2 0 0 9 / 1 2 2 0 6 9 ( W O , A 1 )  
特開平 0 7 - 0 0 8 2 9 4 ( J P , A )  
特表 2 0 0 8 - 5 0 4 5 4 7 ( J P , A )  
特開 2 0 0 0 - 2 6 6 7 1 6 ( J P , A )  
特開 2 0 0 6 - 2 9 2 7 2 1 ( J P , A )

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
C 1 2 Q 1 / 0 4  
C 1 2 M 1 / 3 4  
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )