

(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2017-527288

(P2017-527288A)

(43) 公表日 平成29年9月21日(2017.9.21)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12M 1/00 (2006.01)	C12M 1/00 A	4B029
C12Q 1/68 (2006.01)	C12Q 1/68 A	4B063
C12Q 1/04 (2006.01)	C12Q 1/04	
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53 M	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 51 頁)

(21) 出願番号 特願2017-512696 (P2017-512696)
 (86) (22) 出願日 平成27年9月4日 (2015.9.4)
 (85) 翻訳文提出日 平成29年4月25日 (2017.4.25)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2015/048533
 (87) 国際公開番号 W02016/037051
 (87) 国際公開日 平成28年3月10日 (2016.3.10)
 (31) 優先権主張番号 62/046,135
 (32) 優先日 平成26年9月4日 (2014.9.4)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 62/061,093
 (32) 優先日 平成26年10月7日 (2014.10.7)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 510089007
 セラノス, インコーポレイテッド
 THERANOS, INC.
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94304,
 パロアルト, ページミルロード 1701
 1701 Page Mill Road
 Palo Alto, CA 94304
 United States of America
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 病原体及び抗菌薬耐性試験

(57) 【要約】

サンプル中の病原体及び病原体の抗菌薬耐性を決定するシステム及び方法が提供される。実施形態においては、本明細書において提供されるものは、以下を含むサンプルの分析のためのカートリッジである：抗菌薬；微生物成長培地；及び代謝指標から選ばれる少なくとも1つの試薬、核酸増幅反応のための試薬、及び核酸プローブに基づく反応のための試薬。随意的に、前記カートリッジは、更にサンプルを含み、このサンプルは病原体を含み得るか、含むことが疑われ得る。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

サンプルの分析のためのカートリッジであって：抗菌薬；微生物成長培地；及び代謝指標から選択された少なくとも1つの試薬、核酸増幅反応のための試薬、及び核酸プローブに基づく反応のための試薬を含むカートリッジ。

【請求項 2】

前記カートリッジが更にサンプルを含む、請求項 1 のカートリッジ。

【請求項 3】

前記サンプルが病原体を含む、請求項 1、又は 2 のカートリッジ。

【請求項 4】

前記サンプルは被験者から得られた血液サンプルである、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 つに記載のカートリッジ。

【請求項 5】

被験者から得られた前記血液サンプルが約 500 μ l 以下である請求項 4 のカートリッジ。

【請求項 6】

前記抗菌薬、微生物成長培地、及び前記少なくとも1つの試薬が、前記カートリッジ中で、別々の流体的に分離された容器内にある、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 つのカートリッジ。

【請求項 7】

前記抗菌薬及び微生物成長培地が前記カートリッジ中の同じ容器内にある、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 つのカートリッジ。

【請求項 8】

前記抗菌薬、微生物成長培地、及び少なくとも1つの試薬が、前記カートリッジ中の同じ容器内にある、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 つのカートリッジ。

【請求項 9】

前記抗菌薬が、抗生物質、抗ウイルス薬、抗真菌薬、及び抗寄生虫薬から選ばれる、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 つのカートリッジ。

【請求項 10】

前記抗菌薬が抗生物質である、請求項 9 のカートリッジ。

【請求項 11】

前記少なくとも1つの試薬が、代謝指標である、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 つのカートリッジ。

【請求項 12】

前記少なくとも1つの試薬は、代謝指標及び核酸増幅反応のための試薬である、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 つのカートリッジ。

【請求項 13】

前記少なくとも1つの試薬は、代謝指標及び核酸プローブに基づく反応のための試薬である、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 つのカートリッジ。

【請求項 14】

前記少なくとも1つの試薬は、代謝指標、核酸増幅反応のための試薬、及び核酸プローブに基づく反応のための試薬である、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 つのカートリッジ。

【請求項 15】

前記代謝指標が、レザズリン、5 - シアノ - 2 , 3 - ジトリルテトラゾリウムクロリド (CTC)、カルボキシフルオレセインジアセテートサクシンイミドイルエステル (CFDA - SE)、及びルシフェリンから選ばれる請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 つのカートリッジ。

【請求項 16】

前記代謝指標がレザズリンである、請求項 15 のカートリッジ。

【請求項 17】

10

20

30

40

50

前記核酸増幅のための試薬が、核酸ポリメラーゼである、請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 つのカートリッジ。

【請求項 18】

前記核酸増幅反応のための試薬がプライマー対である、請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 つのカートリッジ。

【請求項 19】

前記プライマー対が、微生物マーカーの核酸、又はその相補体に特異的にハイブリダイズする能力を有する、請求項 18 のカートリッジ。

【請求項 20】

前記微生物マーカーが、16S rRNA、16S rDNA、23 rRNA、rpoB、gyrB、dnaK、amoA、及びmipから選ばれる請求項 19 のカートリッジ。

10

【請求項 21】

前記微生物マーカーが、16S rRNAである、請求項 20 のカートリッジ。

【請求項 22】

前記プライマー対が、抗菌薬耐性マーカーの核酸、又はその相補体に、特異的にハイブリダイズする能力を有する、請求項 18 のカートリッジ。

【請求項 23】

前記核酸プローブに基づく反応のための試薬が、核酸プローブである、請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 つのカートリッジ。

【請求項 24】

前記核酸プローブが、微生物マーカーの核酸、又はその相補体に特異的にハイブリダイズする能力を有する、請求項 20 のカートリッジ。

20

【請求項 25】

前記微生物マーカーが、16S rRNA、16S rDNA、23 rRNA、rpoB、gyrB、dnaK、amoA、及びmipから選ばれる請求項 24 のカートリッジ。

【請求項 26】

前記微生物マーカーが、16S rRNAである、請求項 25 のカートリッジ。

【請求項 27】

前記核酸プローブが、抗菌薬耐性マーカーの核酸、又はその相補体に特異的にハイブリダイズする能力を有する、請求項 25 のカートリッジ。

30

【請求項 28】

前記カートリッジが、更に病原体の抗原に結合する抗体を含む、請求項 1 ~ 27 のいずれか 1 つのカートリッジ。

【請求項 29】

前記カートリッジが核酸染料を更に含む、請求項 1 ~ 28 のいずれか 1 つのカートリッジ。

【請求項 30】

サンプル分析のための方法であって、以下を含む方法：反応混合物を生成するために、病原体を含むか、又は含むことが疑われるサンプルの少なくとも第一の部分を、抗菌薬及び代謝指標を含む微生物成長培地で培養することであって、前記代謝指標は、代謝産物を産生するために代謝される能力を有し；及び前記代謝産物を検出すること。

40

【請求項 31】

前記サンプルは被験者から得られた血液サンプルである、請求項 30 の方法。

【請求項 32】

被験者から得られた前記血液サンプルが、約 500 μ l 以下である、請求項 31 の方法。

【請求項 33】

前記代謝産物が検出可能な信号を生成する、請求項 30 ~ 32 のいずれか 1 つの方法。

【請求項 34】

前記検出可能な信号が、蛍光、色、及び発光から選ばれる、請求項 33 の方法。

【請求項 35】

50

前記代謝指標が、レザズリン、5 - シアノ - 2 , 3 - ジトリルテトラゾリウムクロリド (C T C)、カルボキシフルオレセインジアセテートサクシンイミドイルエステル (C F D A - S E)、及びルシフェリンから選ばれる請求項 3 0 ~ 3 4 のいずれか 1 つの方法。

【請求項 3 6】

前記代謝指標がレザズリンであり、及び前記代謝産物がレゾルフィンである、請求項 3 0 ~ 3 5 のいずれか 1 つの方法。

【請求項 3 7】

前記抗菌薬が、抗生物質、抗ウイルス薬、抗真菌薬、及び抗寄生虫薬から選ばれる、請求項 3 0 ~ 3 6 のいずれか 1 つの方法。

【請求項 3 8】

前記抗菌薬が抗生物質である、請求項 3 7 の方法。

【請求項 3 9】

前記サンプルが、前記微生物成長培地中で、抗菌薬、及び代謝指標と約 1 時間 ~ 約 8 時間培養される、請求項 3 0 ~ 3 8 のいずれか 1 つの方法。

【請求項 4 0】

前記サンプルが、前記抗菌薬及び代謝指標の不在で前記微生物成長培地で前培養されることを更に含む、請求項 3 0 ~ 3 9 のいずれか 1 つの方法。

【請求項 4 1】

前記サンプルを培養する前に前記サンプルを希釈することを、更に含む、請求項 3 0 ~ 4 0 のいずれか 1 つの方法。

【請求項 4 2】

前記サンプルが、約 $1 \sim 10^8$ 病原体 / 反応混合物に希釈される、請求項 4 1 の方法。

【請求項 4 3】

前記病原体を含むか、又は含むことが疑われる前記サンプルの少なくとも第二の部分又は第二のサンプルを、核酸増幅反応のための試薬及び核酸プローブに基づく反応のための試薬から選択された、少なくとも 1 つの試薬とインキュベートすることを更に含む、請求項 3 0 ~ 4 2 のいずれか 1 つの方法。

【請求項 4 4】

前記少なくとも 1 つの試薬が、核酸増幅反応のための試薬であり、及び前記方法が前記サンプル中の病原体の核酸を増幅すること、及び前記核酸の増幅を検出することを含む、請求項 4 3 の方法。

【請求項 4 5】

前記少なくとも 1 つの試薬が、核酸プローブに基づく反応のための試薬であり、及び前記方法が、核酸プローブを特異的に前記サンプル中の病原体の核酸にハイブリダイズすること、及び前記病原体の核酸を検出することを含む、請求項 4 3 の方法。

【請求項 4 6】

前記病原体の核酸が、微生物マーカー核酸、又はその相補体である、請求項 4 4 又は 4 5 の方法。

【請求項 4 7】

前記微生物マーカーが、16 S r R N A、16 S r D N A、23 r R N A、r p o B、g y r B、d n a K、a m o A、及び m i p から選ばれる、請求項 4 6 の方法。

【請求項 4 8】

前記微生物マーカーが 16 S r R N A である、請求項 4 7 の方法。

【請求項 4 9】

前記病原体の核酸が、抗菌薬耐性マーカー核酸、又はその相補体である、請求項 4 4 又は 4 5 の方法。

【請求項 5 0】

請求項 3 0 ~ 5 9 のいずれか 1 つの方法であって、以下を更に含む方法：サンプル処理機器中にカートリッジを受け取ることであって、前記サンプル処理機器が、流体取扱いシステムを含み、及び前記カートリッジが：前記サンプル；前記微生物成長培地；前記抗菌薬

10

20

30

40

50

；及び前記代謝指標を含み；

並びに少なくとも前記サンプルの第一の部分に、前記微生物成長培地、前記抗菌薬、及び前記代謝指標との流体的連結をもたらすために、前記流体取扱いシステムにより輸送すること。

【請求項 5 1】

サンプル分析のための方法であって以下を含む方法：

サンプル処理機器中にカートリッジを受け取ることであって、前記サンプル処理機器は流体取扱いシステムを含み、及び前記カートリッジは：病原体を含むか、又は含むことが疑われるサンプル、抗菌薬、微生物成長培地；及び核酸増幅反応のための試薬を含み；

前記サンプルの第一の部分を含む、第一の混合物を生成するために、前記サンプルの第一の部分、前記核酸増幅反応のための試薬、及び前記核酸増幅反応のための試薬との流体連結をもたらすために、前記流体取扱いシステムにより輸送すること；

前記サンプルの第二の部分、前記抗菌薬、及び前記微生物成長培地を含む、第二の混合物を生成するために、前記サンプルの第二の部分、前記抗菌薬及び前記微生物成長培地との流体連結をもたらすために、前記流体取扱いシステムにより輸送すること；

前記第一の混合物を、前記サンプル中の病原体の核酸の増幅を支持するために十分な条件下でインキュベートすること；

前記第二の混合物を、前記第二の混合物中の前記病原体の成長を支持するために十分な条件下で培養すること；

前記サンプル中の病原体から前記核酸の増幅を検出すること；及び

前記サンプル中の病原体の成長を検出すること。

【請求項 5 2】

前記サンプル中の病原体から前記核酸の増幅を検出することが、前記第一の混合物中の染料からの蛍光を検出することを含む、請求項 5 1 の方法。

【請求項 5 3】

前記サンプル中の病原体から前記核酸の増幅を検出すること、及び前記サンプル中の病原体の成長を検出することの両方が、前記カートリッジが前記サンプル処理機器に受け取られてから、24時間以内に生じる、請求項 5 1 又は 5 2 の方法。

【請求項 5 4】

サンプル分析のための方法であって以下を含む方法：

サンプル処理機器中にカートリッジを受け取ることであって、前記サンプル処理機器は流体取扱いシステムを含み、前記カートリッジは：病原体を含むか、又は含むことが疑われるサンプル、抗菌薬、微生物成長培地；及び前記病原体の核酸、又はその相補体に特異的にハイブリダイズする能力を有する核酸プローブを含み；

前記サンプルの第一の部分及び前記核酸プローブを含む、第一の混合物を生成するために、前記サンプルの第一の部分、前記核酸プローブとの流体連結をもたらすために、前記流体取扱いシステムにより輸送すること；

前記サンプルの第二の部分、前記抗菌薬、及び前記微生物成長培地を含む、第二の混合物を生成するために、前記サンプルの第二の部分、前記抗菌薬及び前記微生物成長培地との流体連結をもたらすために、前記流体取扱いシステムにより輸送すること；

前記第一の混合物を、前記サンプル中の病原体の核酸、又はその相補体に特異的にハイブリダイズすることを支持するために十分な条件下でインキュベートすること；

前記第二の混合物を、前記第二の混合物中の前記病原体の成長を支持するために十分な条件下で培養すること；

前記サンプル中の病原体の核酸を検出すること；及び

前記サンプル中の病原体の成長を検出すること。

【請求項 5 5】

前記サンプルが、被験者から得られた血液サンプルである、請求項 5 1 ~ 5 4 のいずれか 1 つの方法。

【請求項 5 6】

前記サンプルが、被験者から得られた血液サンプルである、請求項 5 1 ~ 5 4 のいずれか 1 つの方法。

10

20

30

40

50

被験者から得られた前記血液サンプルが約 500 μ l 以下である、請求項 55 の方法。

【請求項 57】

前記病原体の種が検出される、請求項 51 ~ 56 のいずれか 1 つの方法。

【請求項 58】

抗菌薬耐性遺伝子が検出される、請求項 51 ~ 57 のいずれか 1 つの方法。

【請求項 59】

前記カートリッジが病原体中の抗原に結合する抗体を更に含む、請求項 51 ~ 58 のいずれか 1 つの方法。

【請求項 60】

前記サンプル中の病原体の検出することが、前記第二の混合物を血球計算器により試験することを含む、請求項 51 ~ 59 のいずれか 1 つの方法。

10

【請求項 61】

試験することが病原体細胞の数を数えることを含む、請求項 61 の方法。

【請求項 62】

試験することが、前記病原体の抗原を検出することを含む、請求項 60 の方法。

【請求項 63】

試験することが、細胞分裂をしている病原体細胞の比率又は数を決定することを含む、請求項 60 の方法。

【請求項 64】

前記サンプル中の病原体の成長を検出することが、前記第二の混合物を分光光度計により試験することを含む、請求項 51 ~ 59 のいずれか 1 つの方法。

20

【請求項 65】

試験することが、第二の混合物の光学密度を決定することを含む、請求項 64 の方法。

【請求項 66】

前記カートリッジが更に代謝指標を含み、前記代謝指標は代謝産物を産生するために代謝される能力を有し、及び前記方法は、前記サンプルの第二の部分、前記抗菌薬、前記微生物成長培地、及び前記代謝指標を含む、第二の混合物を生成するために、前記サンプルの第二の部分を、前記抗菌薬、前記微生物成長培地、及び前記代謝指標との流体連結にもたすために、前記流体取扱いシステムにより移動することを含む、請求項 51 ~ 65 のいずれか 1 つの方法。

30

【請求項 67】

前記病原体の成長が、前記代謝産物を検出することで検出される、請求項 66 の方法。

【請求項 68】

前記代謝産物が、検出可能な信号を生成する、請求項 66 又は 67 の方法。

【請求項 69】

前記検出可能な信号が、蛍光、色、及び発光から選ばれる、請求項 68 の方法。

【請求項 70】

前記代謝指標が、レザズリン、5 - シアノ - 2 , 3 - ジトリルテトラゾリウムクロリド (CTC)、カルボキシフルオレセインジアセテートサクシンイミドイルエステル (CFDA - SE)、及びルシフェリンから選ばれる、請求項 66 ~ 69 のいずれか 1 つの方法。

40

【請求項 71】

前記代謝指標がレザズリンである、請求項 70 の方法。

【請求項 72】

サンプルの分析のためのシステムであって、以下を含むシステム：

抗菌薬；微生物成長培地；代謝指標、核酸増幅反応のための試薬、及び核酸プローブに基づく反応のための試薬から選択された少なくとも 1 つの試薬；及び

サンプル処理機器であって、前記サンプル処理機器は流体取扱いシステム及び少なくとも 1 つの検出器を含む。

【請求項 73】

カートリッジを更に含み、前記カートリッジは、前記抗菌薬、微生物成長培地、及び前記

50

少なくとも1つの試薬を含む、請求項72のシステム。

【請求項74】

前記抗菌薬、微生物成長培地、及び前記少なくとも1つの試薬が前記カートリッジ中の別々の流体的に分離された容器中にある、請求項73のシステム。

【請求項75】

前記抗菌薬及び微生物成長培地が、前記カートリッジ中の同じ容器内にある、請求項73のシステム。

【請求項76】

前記抗菌薬、微生物成長培地、及び前記少なくとも1つの試薬が、前記カートリッジ中の同じ容器内にある請求項73のシステム。

10

【請求項77】

前記カートリッジが、病原体を含むか、又は含むことを疑われるサンプルを更に含む、請求項72～76のいずれか1つのシステム。

【請求項78】

前記サンプルは被験者から得られた血液サンプルである、請求項72～77のいずれか1つのシステム。

【請求項79】

被験者から得られた前記血液サンプルが約500 µl以下である、請求項78のシステム。

【請求項80】

前記少なくとも1つの試薬が、代謝指標である、請求項72～79のいずれか1つのシステム。

20

【請求項81】

前記少なくとも1つの試薬が、代謝指標及び核酸増幅反応のための試薬である、請求項72～79のいずれか1つのシステム。

【請求項82】

前記少なくとも1つの試薬が、代謝指標及び核酸プローブに基づく反応のための試薬である、請求項72～79のいずれか1つのシステム。

【請求項83】

前記少なくとも1つの試薬が、代謝指標、核酸増幅反応のための試薬、及び核酸プローブに基づく反応のための試薬である、請求項72～79のいずれか1つのシステム。

30

【請求項84】

前記代謝指標が、レザズリン、5-シアノ-2,3-ジトリルテトラゾリウムクロリド(CTC)、カルボキシフルオレセインジアセテートサクシンイミドイルエステル(CFDA-SE)、及びルシフェリンから選ばれる請求項72～83のいずれか1つのシステム。

【請求項85】

前記代謝指標がレザズリンである、請求項84のシステム。

【請求項86】

前記核酸増幅のための試薬が、核酸ポリメラーゼである、請求項72～85のいずれか1つのシステム。

40

【請求項87】

前記核酸増幅反応のための試薬がプライマー対である、請求項72～85のいずれか1つのシステム。

【請求項88】

前記プライマー対が、微生物マーカーの核酸、又はその相補体に特異的にハイブリダイズする能力を有する、請求項87のシステム。

【請求項89】

前記微生物マーカーが、16SrRNA、16SrDNA、23rRNA、rpoB、gyrB、dnaK、amoA、及びmipから選ばれる、請求項88のシステム。

50

【請求項 90】

前記微生物マーカーが、16S rRNAである、請求項 89 のシステム。

【請求項 91】

前記プライマー対が、抗菌薬耐性マーカーの核酸、又はその相補体に、特異的にハイブリダイズする能力を有する、請求項 87 のシステム。

【請求項 92】

前記核酸プローブに基づく反応のための試薬が、核酸プローブである、請求項 72 ~ 85 のいずれか 1 つのシステム。

【請求項 93】

前記核酸プローブが、微生物マーカーの核酸、又はその相補体に特異的にハイブリダイズする能力を有する、請求項 92 のシステム。

10

【請求項 94】

前記微生物マーカーが、16S rRNA、16S rDNA、23 rRNA、rpoB、gyrB、dnaK、amoA、及び mip から選ばれる請求項 93 のシステム。

【請求項 95】

前記微生物マーカーが 16S rRNA である、請求項 94 のシステム。

【請求項 96】

前記核酸プローブが、抗菌薬耐性マーカーの核酸、又はその相補体に特異的にハイブリダイズする能力を有する、請求項 92 のシステム。

【請求項 97】

前記カートリッジが病原体の抗原に結合する抗体を更に含む、請求項 72 ~ 96 のいずれか 1 つのシステム。

20

【請求項 98】

前記カートリッジ核酸染料を更に含む、請求項 72 ~ 97 のいずれか 1 つのシステム。

【請求項 99】

前記少なくとも 1 つの検出器が、分光光度計、光電子増倍管、光ダイオード、カメラ、及び血球計算器から選ばれる、請求項 72 ~ 98 のいずれか 1 つのシステム。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

30

[関連出願]

本出願は、米国特許法第 119 条 (e) により、2014 年 9 月 4 日に提出された米国特許仮出願第 62/046,135 号、及び 2014 年 10 月 7 日に提出された米国特許仮出願第 62/061,093 号による優先権を主張し、この両方とも、その全体が参照により本出願に組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

[発明の背景]

多くのヒト及び動物疾患が、病原体による感染により引き起こされる。多くの病原体の成長は、抗菌薬により遅延されるか、停止される一方で、特定の病原体 1 つ以上の抗菌薬に対して耐性を有する。病原体及び病原体の抗菌薬耐性の検出のためのシステム及び方法において、改善が必要である。

40

[参照による組み込み]

【0003】

本明細書において言及される、全ての刊行物、特許及び特許出願は、個々の刊行物、特許及び特許出願のそれぞれが、参照により組み込まれるために、あたかも明確に、及び個々に参照により示されるのと同程度に、参照により本明細書に組み込まれる。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0004】

50

[発明の要旨]

本明細書において提供されるものは病原体及び病原体抗菌薬耐性試験のための実施形態である。

【 0 0 0 5 】

実施形態においては、本明細書において提供されるものは、以下を含むサンプルの分析のためのカートリッジである：抗菌薬；微生物成長培地；及び代謝指標から選ばれる少なくとも1つの試薬、核酸増幅反応のための試薬、及び核酸プローブに基づく反応のための試薬。随意的に、前記カートリッジは、更にサンプルを含み、このサンプルは病原体を含み得るか、含むことが疑われ得る。随意的に、前記サンプルは被験者から得られた血液サンプルであり、及び被験者から得られた前記血液サンプルは、約500 μ l以下であり得る。随意的に、前記少なくとも1つの試薬、前記抗菌薬、及び前記微生物成長培地は、前記カートリッジ中の別々の流体的に分離された容器中にある。随意的に、前記抗菌薬及び前記微生物成長培地は、前記カートリッジ中の同じ容器内にある。随意的に、前記抗菌薬、前記微生物成長培地、及び前記少なくとも1つの試薬は、前記カートリッジ中の同じ容器内にある。随意的に、前記抗菌薬は、抗生物質、抗ウイルス薬、抗真菌薬、及び抗寄生虫薬から選ばれる。随意的に、前記抗菌薬は抗生物質である。随意的に、前記少なくとも1つの試薬は代謝指標である。随意的に、前記少なくとも1つの試薬は、代謝指標及び核酸増幅反応のための試薬である。随意的に、前記少なくとも1つの試薬は、代謝指標及び核酸プローブに基づく反応のための試薬である。随意的に、前記少なくとも1つの試薬は、代謝指標、核酸増幅反応のための試薬、及び核酸プローブに基づく反応のための試薬である。随意的に、前記代謝指標は、レザズリン、5 - シアノ - 2 , 3 - ジトリルテトラゾリウムクロリド (C T C)、カルボキシフルオレセインジアセテートサクシンイミドイルエステル (C F D A - S E)、及びルシフェリンから選ばれる。随意的に、前記代謝指標はレザズリンである。随意的に、前記核酸増幅反応のための試薬は、核酸ポリメラーゼである。随意的に、前記核酸増幅反応のための試薬はプライマー対である。随意的に、前記プライマー対は、微生物マーカー (バクテリアのマーカー) の核酸、又はその相補体に特異的にハイブリダイズする能力を有する。随意的に、前記微生物マーカーは、16 S r R N A、16 s r D N A、23 r R N A、r p o B、g y r B、d n a K、a m o A、及びm i pから選ばれる。随意的に、前記微生物マーカーは、16 S r R N Aである。随意的に、前記プライマー対は、抗菌薬耐性マーカーの核酸、又はその相補体に、特異的にハイブリダイズする能力を有する。随意的に、前記核酸プローブに基づく反応のための試薬は、核酸プローブである。随意的に、前記核酸プローブは、微生物マーカーの核酸又はその相補体に特異的にアニーリングする能力を有する。随意的に、前記微生物マーカーは、16 S r R N A、16 s r D N A、23 r R N A、r p o B、g y r B、d n a K、a m o A、及びm i pから選ばれる。随意的に、前記微生物マーカーは16 S r R N Aである。随意的に、前記核酸プローブは、抗菌薬耐性マーカーの核酸、又はその相補体特異的にハイブリダイズする能力を有する。随意的に、前記カートリッジは、病原体の抗原に結合する抗体を更に含む得る。随意的に、前記カートリッジは、核酸染料を更に含む。

【 0 0 0 6 】

実施形態においては、本明細書において提供されるものは、以下を含むサンプルの分析のための方法である：少なくとも病原体を含むか、又は含むことが疑われるサンプルの、少なくとも第一の部分を、反応混合物を生成するために、微生物成長培地、抗菌薬、及び代謝指標とともにインキュベートすることであって、前記代謝指標は、代謝産物を産生するために代謝される能力を有し；及び代謝産物を検出すること。随意的に、前記サンプルは被験者から得られた血液サンプルである。随意的に、被験者から得られた前記血液サンプルは約500 μ l以下である。随意的に、前記代謝産物は、検出可能な信号を生成する。随意的に、前記検出可能な信号は、蛍光、色、及び発光から選ばれる。随意的に、前記代謝指標は、レザズリン、5 - シアノ - 2 , 3 - ジトリルテトラゾリウムクロリド (C T C)、カルボキシフルオレセインジアセテートサクシンイミドイルエステル (C F D A - S E)、及びルシフェリンから選ばれる。随意的に、前記代謝指標はレザズリンであり、及

び前記代謝産物はレゾルフィンである。随意的に、前記抗菌薬は、抗生物質、抗ウイルス薬、抗真菌薬、及び抗寄生虫薬から選ばれる。随意的に、前記抗菌薬は抗生物質である。随意的に、前記サンプルは、前記微生物成長培地、抗菌薬、及び代謝指標とともに約1時間～約8時間インキュベートされる。随意的に、前記方法は、前記サンプルを、前記抗菌薬及び代謝指標の不在下に前記微生物成長培地中で前培養することを更に含む。随意的に、前記方法は、前記サンプルをインキュベートする前に希釈することを更に含む。随意的に、前記サンプルは約1～約 10^8 病原体/反応混合物に希釈される。随意的に、前記方法は、病原体を含むか、又は含むことが疑われる前記サンプルの少なくとも第二の部分、又は第二のサンプルを、核酸増幅反応のための試薬、及び核酸プローブに基づく反応のための試薬から選ばれる少なくとも1つの試薬とインキュベートすることを更に含む。随意的に、前記少なくとも1つの試薬は核酸増幅反応のための試薬であり、及び前記方法は少なくとも第二の部分又は第二のサンプルを、前記サンプル中の病原体の核酸の増幅を支持するために、十分な条件の下でインキュベートすること、及び前記核酸の増幅を検出することを含む。随意的に、前記少なくとも1つの試薬は核酸プローブに基づく反応のための試薬であり、及び前記方法は、少なくとも第二の部分又は第二のサンプルを、核酸プローブが、前記サンプル中の病原体の核酸とハイブリダイズすることを、支持するために十分な条件の下でインキュベートすること、及び前記病原体の核酸を検出することを含む。随意的に、前記病原体の核酸は微生物マーカーの核酸、又はその相補体である。随意的に、前記微生物マーカーは、16S rRNA、16s rDNA、23 rRNA、rpoB、gyrB、dnaK、amoA、及びmipから選ばれる。随意的に、前記微生物マーカーは16S rRNAである。随意的に、前記病原体の核酸は、抗菌薬耐性マーカーの核酸、又はその相補体である。随意的に、前記方法は、サンプル処理機器中にカートリッジを受け取ることを含み、前記サンプル処理機器は、流体取扱いシステムを含み、及び前記カートリッジは、前記サンプル、前記微生物成長培地、前記抗菌薬、及び前記代謝指標を含み、及び前記流体取扱いシステムにより、前記サンプルの少なくとも第一の部分を、前記微生物成長培地、前記抗菌薬、及び前記代謝指標と流体連結になるように輸送する。

10

20

30

40

50

【0007】

実施形態においては、本明細書において提供されるものは、以下を含むサンプル分析のための方法である：サンプル処理機器中にカートリッジを受け取ることであって、前記サンプル処理機器は流体取扱いシステムを含み、及び前記カートリッジは以下を含む：病原体を含むか、又は含むことが疑われるサンプル、核酸増幅反応のための試薬、抗菌薬、及び微生物成長培地を含み；前記サンプルの第一の部分及び前記核酸増幅反応のための試薬を含む第一の混合物を生成するために、流体取扱いシステムにより、前記サンプルの第一の部分を、前記核酸増幅反応のための試薬と流体連結するように輸送すること；前記サンプルの第二の部分、前記抗菌薬、及び前記微生物成長培地を含む第二の混合物を生成するために、流体取扱いシステムにより、前記サンプルの第二の部分を、前記抗菌薬及び前記微生物成長培地と流体連結するように輸送すること；前記サンプル中の病原体の核酸の増幅を支持するために十分な条件の下で前記第一の混合物をインキュベートすること；前記第二の混合物を、前記第二の混合物中の病原体の成長を支持するために十分な条件の下で培養すること；前記サンプル中の病原体から前記核酸の増幅を検出すること；及び前記サンプル中の病原体の成長を検出すること。随意的に、前記サンプル中の病原体から前記核酸の増幅を検出することは、前記第一の混合物中の染料からの蛍光を検出することを含む。随意的に、前記サンプル中の病原体から前記核酸の増幅を検出すること、及び前記サンプル中の病原体の成長を検出することの両方とも、前記カートリッジが前記サンプル処理機器に受け取られてから24時間未満の後に生じる。

【0008】

実施形態においては、本明細書において提供される方法は以下を含む：サンプル処理機器にカートリッジを受け取ることであって、前記サンプル処理機器は流体取扱いシステムを含み、及び前記カートリッジは、病原体を含むか、又は含むことが疑われるサンプル、抗菌薬、微生物成長培地、及び前記病原体の核酸、又はその相補体に特異的にハイブリダイ

ズする能力を有する核酸プローブを含み；前記サンプルの第一の部分及び前記核酸プローブを含む第一の混合物を生成するために、前記流体取扱いシステムにより前記サンプルの第一の部分を前記核酸プローブと流体連結するように輸送すること；前記サンプルの第二の部分、前記抗菌薬、及び前記微生物成長培地を含む第二の混合物を生成するために、前記流体取扱いシステムにより前記サンプルの第二の部分を、前記抗菌薬及び前記微生物成長培地と流体連結するように輸送すること；前記サンプル中の病原体の核酸、又はその相補体に特異的にハイブリダイズするために十分な条件の下に前記第一の混合物をインキュベートすること；前記第二の混合物を、病原体の成長を支持するために十分な条件の下で培養すること；前記サンプル中の病原体の核酸を検出すること；及び前記サンプル中の病原体の成長を検出すること。

10

【0009】

任意の実施形態においては、前記サンプルは被験者から得られた血液サンプルである。任意の実施形態においては、被験者から得られた前記血液サンプルは約500 µl以下である。任意の実施形態においては、前記病原体の種が検出される。任意の実施形態においては、抗菌薬耐性遺伝子が検出される。任意の実施形態においては、前記カートリッジは、病原体中の抗原に結合する抗体を更に含む。任意の実施形態においては、前記サンプル中の病原体の成長を検出することは、血球計算器により前記第二の混合物を試験することを含む。任意の実施形態においては、試験することは、病原体細胞の数を数えることを含む。任意の実施形態においては、試験することは、前記病原体の抗原を検出することを含む。任意の実施形態においては、試験することは、細胞分裂をする病原体細胞の比率又は数を決定することを含む。任意の実施形態においては、前記サンプル中の病原体の成長を検出することは、前記第二の混合物を、分光光度計で試験することを含む。任意の実施形態においては、試験することは、第二の混合物の光学密度を決定することを含む。任意の実施形態においては、前記カートリッジは代謝指標を更に含み、前記代謝指標は、代謝産物を産生するために代謝される能力を有し、及び前記方法は、前記流体取扱いシステムにより、前記サンプルの第二の部分を、前記抗菌薬、前記微生物成長培地、及び前記代謝指標と流体連結するように輸送することを含む。任意の実施形態においては、前記病原体の成長は、前記代謝産物の検出により検出される。任意の実施形態においては、前記代謝産物検出可能な信号を生成する。任意の実施形態においては、前記検出可能な信号は、蛍光、色、及び発光から選ばれる。任意の実施形態においては、前記代謝指標は、レザズリン、5 - シアノ - 2 , 3 - ジトリルテトラゾリウムクロリド (CTC)、カルボキシフルオレセインジアセテートサクシンイミドイルエステル (CFDA-SE)、及びルシフェリンから選ばれる。任意の実施形態においては、前記代謝指標はレザズリンである。

20

30

【0010】

実施形態においては、本明細書において提供されるものは以下を含むシステムである：抗菌薬；微生物成長培地；代謝指標、核酸増幅反応のための試薬から選ばれる少なくとも一つの試薬、及び核酸プローブに基づく反応のための試薬；及びサンプル処理機器であって、前記サンプル処理機器は、流体取扱いシステム及び少なくとも一つの検出器を含む。随意的に、前記システムは、カートリッジを更に含み、前記カートリッジは、前記抗菌薬、微生物成長培地、及び前記少なくとも一つの試薬を含む。随意的に、前記抗菌薬、微生物成長培地、及び前記少なくとも一つの試薬は、前記カートリッジ内の、別々の流体的に分離された容器内にある。随意的に、前記抗菌薬及び微生物成長培地は、前記カートリッジ中の同じ容器内にある。随意的に、前記抗菌薬、微生物成長培地、及び前記少なくとも一つの試薬は、前記カートリッジ中の同じ容器内にある。随意的に、前記カートリッジは、病原体を含むか、又は含むことを疑われるサンプルを更に含む。随意的に、前記サンプルは被験者から得られた血液サンプル。随意的に、被験者から得られた前記血液サンプルは約500 µl以下である。随意的に、前記少なくとも一つの試薬は、代謝指標である。随意的に、前記少なくとも一つの試薬は、代謝指標及び核酸増幅反応のための試薬である。随意的に、前記少なくとも一つの試薬は、代謝指標及び核酸プローブに基づく反応のための試薬である。随意的に、前記少なくとも一つの試薬は、代謝指標、核酸増幅反応のため

40

50

の試薬、及び核酸プローブに基づく反応のための試薬である。随意的に、前記代謝指標は、レザズリン、5 - シアノ - 2 , 3 - ジトリルテトラゾリウムクロリド (C T C)、カルボキシフルオレセインジアセテートサクシンイミドイルエステル (C F D A - S E)、及びルシフェリンから選ばれる。随意的に、前記代謝指標はレザズリンである。随意的に、前記核酸増幅のための試薬は核酸ポリメラーゼである。随意的に、前記核酸増幅反応のための試薬はプライマー対である。随意的に、前記プライマー対は、微生物マーカーの核酸、又はその相補体に特異的にハイブリダイズする能力を有する。随意的に、前記微生物マーカーは、16 S r R N A、16 S r D N A、23 r R N A、r p o B、g y r B、d n a K、a m o A、及びm i pから選ばれる。随意的に、前記微生物マーカーは16 S r R N Aである。随意的に、前記プライマー対は、抗菌薬耐性マーカーの核酸又はその相補体に特異的にハイブリダイズする能力を有する。随意的に、前記核酸プローブに基づく反応のための試薬は核酸プローブである。随意的に、前記核酸プローブは、微生物マーカーの核酸、又はその相補体に特異的にハイブリダイズする能力を有する。随意的に、前記微生物マーカーは、16 S r R N A、16 S r D N A、23 r R N A、r p o B、g y r B、d n a K、a m o A、及びm i pから選ばれる。随意的に、前記微生物マーカーは16 S r R N Aである。随意的に、前記核酸プローブは、抗菌薬耐性マーカーの核酸又はその相補体に特異的にハイブリダイズする能力を有する。随意的に、前記カートリッジは、病原体の抗原に結合する抗体を更に含む。随意的に、前記カートリッジは、核酸染料を更に含む。随意的に、前記少なくとも1つの検出器分光光度計、光電子増倍管、光ダイオード、カメラ、及び血球計算器から選ばれる。

10

20

【0011】

実施形態においては、本明細書において提供される方法は、サンプル中の病原体の種、亜種、又は菌株を決定することを含む。

【0012】

実施形態においては、本明細書において提供される方法は、病原体又はサンプルにおける、抗菌薬耐性遺伝子又は変異を同定することを含む。

【0013】

実施形態においては、本明細書において提供される方法は病原体の成長を検出することを含み、この成長を検出することは、培養物を血球計算器で試験することを含む。

【0014】

実施形態においては、血球計算器により培養物を成長について試験することは病原体細胞の数を数えること、病原体細胞中の抗原を検出すること、病原体細胞の内容物のD N Aを検出すること、又は細胞分裂をしている病原体細胞の測定を得ることを含む。

30

【0015】

実施形態においては、本明細書において提供される方法は病原体の成長を検出することを含み、成長を検出することは、試験することは分光光度計により培養物を試験することを含む。随意的に、前記培養物の光学密度が決定される。

【0016】

実施形態においては、サンプル中の病原体の核酸の増幅を検出するため、及びサンプル中の病原体の成長を検出するための、本明細書において提供される方法においては、その両方は、病原体を含むサンプルを含むカートリッジが、前記サンプル処理機器中に受け取られてから、24、16、12、10、8、6、5、4、3、2、又は1時間未満に生じる。

40

【0017】

本明細書における“サンプル”への言及又は記載は、文脈が他のことを明確に指示しない限り、サンプルの一部にも適用される。

【0018】

実施形態においては、本明細書において記載される全てのプロセスは、サンプル処理機器内の1つ以上の構成要素（例えば、流体取扱いシステム、血球計算器等）により遂行される自動化されたステップにより遂行され得る。前記構成要素は、サンプル処理プロトコル

50

を実行し得る制御装置により制御され得る。

【0019】

本発明の他の目的及び利点は、以下の説明及びそれらに伴う図面との関連において考慮した時に、更に評価され、及び理解されよう。以下の記載は、本発明の特定の実施形態を説明する特定の詳細を含み得るが、これらは本発明の範囲の制限と解釈されるべきではなく、可能な実施形態の例示と解釈されるべきである。本発明のそれぞれの態様については、本発明の精神を逸脱することなく、その範囲内で多くの変更及び修正を行い得る。

【図面の簡単な説明】

【0020】

【図1】図1は、本発明において提供されるサンプル及びサンプル処理機器の例示的な概略図を示す。 10

【0021】

【図2】図2及び3は、本明細書において記載されるカートリッジの少なくともいくつかの実施形態を示す。

【図3】図2及び3は、本明細書において記載されるカートリッジの少なくともいくつかの実施形態を示す。

【0022】

【図4A】図4A、4B、及び4Cは、拭い取りを保持するための例示的なカートリッジ及び容器を示す。

【図4B】図4A、4B、及び4Cは、拭い取りを保持するための例示的なカートリッジ及び容器を示す。 20

【図4C】図4A、4B、及び4Cは、拭い取りを保持するための例示的なカートリッジ及び容器を示す。

【0023】

【図5-1】図5A～5Fは、100 μ lの合計反応容積中で、20 μ M（図5A及び5D）、40 μ M（図5B及び5E）、又は80 μ M（図5C及び5F）の最終濃度の、カナマイシン（図5A～5C）又はカルベニシリン（図5D～5F）、及びレザズリン中での、前記抗生物質及びレザズリンとの培養を開始してから、0、1、2、3、4、5、及び6時間の時点で、590nmにおける蛍光を検出することにより測定された、カナマイシン耐性E.coli（大腸菌）K12MG1655菌株の成長特性を示す。5 \times 10²細胞/合計反応容積（a）、5 \times 10³細胞/合計反応容積（b）、5 \times 10⁴細胞/合計反応容積（c）、及び5 \times 10⁵細胞/合計反応容積（d）の微生物細胞濃度において開始された培養物の成長特性が示されている。 30

【図5-2】図5A～5Fは、100 μ lの合計反応容積中で、20 μ M（図5A及び5D）、40 μ M（図5B及び5E）、又は80 μ M（図5C及び5F）の最終濃度の、カナマイシン（図5A～5C）又はカルベニシリン（図5D～5F）、及びレザズリン中での、前記抗生物質及びレザズリンとの培養を開始してから、0、1、2、3、4、5、及び6時間の時点で、590nmにおける蛍光を検出することにより測定された、カナマイシン耐性E.coli（大腸菌）K12MG1655菌株の成長特性を示す。5 \times 10²細胞/合計反応容積（a）、5 \times 10³細胞/合計反応容積（b）、5 \times 10⁴細胞/合計反応容積（c）、及び5 \times 10⁵細胞/合計反応容積（d）の微生物細胞濃度において開始された培養物の成長特性が示されている。 40

【0024】

【図6-1】図6A～6Fは、100 μ lの合計反応容積中で、20 μ M（図6A及び6D）、40 μ M（図6B及び6E）、又は80 μ M（図6C及び6F）の最終濃度の、カルベニシリン（図6A～6C）又はカナマイシン（図6D～6F）及びレザズリン中での、前記抗生物質及びレザズリンとの培養を開始してから、0、1、2、3、4、5、及び6時間の時点で、590nmにおける蛍光を検出することにより測定された、カルベニシリン耐性大腸菌K12MG1655菌株の成長特性を示す。5 \times 10²細胞/合計反応容積（a）、5 \times 10³細胞/合計反応容積（b）、5 \times 10⁴細胞/合計反応容積（c） 50

、及び 5×10^5 細胞 / 合計反応容積 (d) の微生物細胞濃度において開始された培養物の成長特性が示されている。

【図 6 - 2】図 6 A ~ 6 F は、 $100 \mu\text{l}$ の合計反応容積中で、 $20 \mu\text{M}$ (図 6 A 及び 6 D)、 $40 \mu\text{M}$ (図 6 B 及び 6 E)、又は $80 \mu\text{M}$ (図 6 C 及び 6 F) の最終濃度の、カルベニシリン (図 6 A ~ 6 C) 又はカナマイシン (図 6 D ~ 6 F) 及びレザズリン中での、前記抗生物質及びレザズリンとの培養を開始してから、0、1、2、3、4、5、及び 6 時間の時点で、 590nm における蛍光を検出することにより測定された、カルベニシリン耐性大腸菌 K12 MG1655 菌株の成長特性を示す。 5×10^2 細胞 / 合計反応容積 (a)、 5×10^3 細胞 / 合計反応容積 (b)、 5×10^4 細胞 / 合計反応容積 (c)、及び 5×10^5 細胞 / 合計反応容積 (d) の微生物細胞濃度において開始された培養物の成長特性が示されている。

10

【0025】

【図 7 - 1】図 7 A - 7 F は、 $100 \mu\text{l}$ の合計反応容積中で、 $20 \mu\text{M}$ (図 7 A 及び 7 D)、 $40 \mu\text{M}$ (図 7 B 及び 7 E)、又は $80 \mu\text{M}$ (図 7 C 及び 7 F) の最終濃度の、カナマイシン (図 7 A - 7 C) 又はカルベニシリン (図 7 D - 7 F)、及びレザズリン中での、前記抗生物質及びレザズリンとの培養を開始してから、0、1、2、3、4、5、6 及び 7 時間の時点で、 590nm における蛍光を検出することにより測定された、カナマイシン耐性大腸菌 K12 MG1655 菌株の成長特性を示す。 5×10^2 細胞 / 合計反応容積 (a)、 5×10^3 細胞 / 合計反応容積 (b)、 5×10^4 細胞 / 合計反応容積 (c)、及び 5×10^5 細胞 / 合計反応容積 (d) の微生物細胞濃度において開始された培養物の成長特性が示されている。

20

【図 7 - 2】図 7 A - 7 F は、 $100 \mu\text{l}$ の合計反応容積中で、 $20 \mu\text{M}$ (図 7 A 及び 7 D)、 $40 \mu\text{M}$ (図 7 B 及び 7 E)、又は $80 \mu\text{M}$ (図 7 C 及び 7 F) の最終濃度の、カナマイシン (図 7 A - 7 C) 又はカルベニシリン (図 7 D - 7 F)、及びレザズリン中での、前記抗生物質及びレザズリンとの培養を開始してから、0、1、2、3、4、5、6 及び 7 時間の時点で、 590nm における蛍光を検出することにより測定された、カナマイシン耐性大腸菌 K12 MG1655 菌株の成長特性を示す。 5×10^2 細胞 / 合計反応容積 (a)、 5×10^3 細胞 / 合計反応容積 (b)、 5×10^4 細胞 / 合計反応容積 (c)、及び 5×10^5 細胞 / 合計反応容積 (d) の微生物細胞濃度において開始された培養物の成長特性が示されている。

30

【発明を実施するための形態】

【0026】

本明細書中の図面及び要素は、必ずしもその形状および尺度を描いたものではないことに注意されたい。例えば、前記図面中の形状又は要素の尺度は、説明の容易さ又は明瞭さのために、単純化又は修正され得る本明細書中の図面及び要素は、例示的な説明的な目的のためのものであり、いかなる方法においても制限するものであると解釈されるべきではないことも、更に理解されたい。

[発明の詳細な説明]

【0027】

本明細書において提供されるものは、病原体の同定及び病原体の抗菌薬耐性の同定の実施形態である。本明細書において記載された様々な特徴は、以下に説明される全ての特定の実施形態に適用されることができ、又は病原体若しくは病原体の抗菌薬耐性の同定のための、若しくはそれらを含む、他のいかなる種類の実施形態のためにも適用され得る。本明細書において記載されたシステム及び方法は、スタンドアロンのシステム又は方法として、又は統合されたシステム又は方法の一部として応用され得る。開示されたシステム及び方法の、異なる態様は、個別に、集合的に又は互いの組み合わせにおいて評価され得ることを理解されるであろう。

40

サンプル

【0028】

本明細書において用いられるサンプルは、1つ以上の病原体を含み得るか、又は含むこと

50

が疑われる物質である。サンプルは、例えば、体液、分泌物、又は組織サンプルであってよい。サンプルの例としては、限定はしないが、血液、血清、尿、消化液、涙液、汗、糞便、精液、腔液、腫瘍組織から導出された間質液、眼液、汗、粘液、耳垢、脂、線分泌物、呼気、髄液、毛髪、指の爪、皮膚細胞、血漿、鼻の拭い取り又は鼻咽頭の洗液、脊髄液、脳脊髄液、組織、咽頭の拭い取り、生検、胎盤液、羊水、臍帯血、強調体液、体腔液、膿、微生物相、胎便、母乳又は他の排出物が挙げられる。サンプルは、例えば、ヒト、動物、植物、微生物、環境、食物、又は他のソースから提供され得る。実施形態においては、サンプルは、被験者の拭い取り（例えば、鼻の拭い取り）から得られた物質を含み得る。本明細書において用いられる、サンプルは、オリジナルの全体のサンプル又はその任意の部分を目指す。

10

【0029】

実施形態においては、サンプルは被験者上の様々な部位（例えば、腕、耳、手、足等）から取得され得る。実施形態においては、サンプルは、被験者の指又はつま先から取得され得る。本明細書において用いられる、被験者は、脊椎動物を指し、及び動物及びヒトを含む。哺乳類としては、それらには限定はされないが、ネズミ科の動物、サル、ヒト、家畜、スポーツ動物（*sport animal*）、及び愛玩動物が挙げられる。

【0030】

本明細書において提供される方法は、被験者から得られた小容積又は少量のサンプルから病原体を検出する能力を有する。実施形態においては、被験者から収集されたサンプルは、約1000、900、800、700、600、500、400、300、200、100、90、80、70、60、50、40、30、25、20、15、10、又は5マイクロリットル以下の容積を有し得る。一実施形態では、被験者から得られた前記体液サンプルは全血サンプルである。特定の実施形態では、前記全血サンプルは、指先穿刺から得られ、及び約1000、900、800、700、600、500、400、300、200、100、90、80、70、60、50、40、30、25、20、15、10、又は5マイクロリットル以下の容積を有する。例えば、実施形態においては、被験者から収集されたサンプルは、被験者の指から収集されたサンプルであることができ、及び約500マイクロリットル以下の容積を有する。別の実施形態では、サンプルは、拭い取り（例えば鼻の拭い取り）、又は糞便などの固体サンプル若しくは組織サンプルに、約1000、900、800、700、600、500、400、300、200、100、90、80、70、60、50、40、30、25、20、15、10、又は5マイクロリットル以下の容積の緩衝液又は他の液体を接触させることにより取得できる。

20

30

【0031】

感染の初期ステージなどのように、病原体が低いコピー数で存在し得る時には、サンプルの大きな容積又は量及び/又はコピー数を検出レベルまで増加させるために、典型的には長期の培養期間が必要である。対照的に、本明細書において提供される方法は、病原体の低いコピー数を含むサンプルであっても、サンプルの小さな容積/量の中の病原体を、短い時間で検出することを可能にする。

病原体及び抗菌薬

【0032】

前記サンプルは、特定の病原体が前記サンプル中に存在するかを決定するため、及び/又は前記サンプル中の病原体はが、限定はされないが、抗生物質、抗ウイルス薬、抗真菌薬、及び抗寄生虫薬を含む抗菌薬に耐性を持つか、又は感受性であるかを決定するために、試験されることができる。本明細書において用いられる、病原体は、ヒト、動物、又は植物等の多細胞生物に疾患を引き起こす微生物を指し、及び例えば、バクテリア、真菌、原生生物、寄生虫、及びウイルスを含み得る。

40

【0033】

バクテリアとしては、ジフテリア（例えば、ジフテリア菌：*Coryne*細菌 ジフテリア）、百日咳（例えば、百日咳菌：*Bordetella pertussis*）、炭疽病（例えば、炭疽菌：*Bacillus anthracis*）、チフス、腺ペスト、細

50

菌性赤痢（例えば、志賀赤痢菌：*Shigella dysenteriae*）、ボツリヌス中毒症（例えば、ボツリヌス菌：*Clostridium botulinum*）、破傷風（例えば、破傷風菌：*Clostridium tetani*）結核（例えば、ヒト型結核菌 *Mycobacterium tuberculosis*）、細菌性肺炎（例えば、インフルエンザ菌：*Haemophilus influenzae*）、コレラ（例えば、コレラ菌：*Vibrio cholerae*）、サルモネラ中毒（例えば、チフス菌：*Salmonella typhi*）、消化性潰瘍（例えば、ヘリコバクター・ピロリ）、レジオネラ症（例えば、レジオネラ菌属：*Legionella spp.*）、及びライム疾患（例えば、コーカサス回帰熱ボレリア：*Borrelia burgdorferi*）を引き起こすものなどが挙げられる。他の病原性バクテリアとしては：大腸菌（*Escherichia coli*）、ウェルシュ菌（*Clostridium perfringens*）、クロストリジウム・ディフィシレ（*Clostridium difficile*）、緑膿菌（*Pseudomonas aeruginosa*）、ブドウ球菌（*Staphylococcus aureus*）、及び化膿連鎖球菌（*Streptococcus pyogenes*）が挙げられる。バクテリアの更なる例としては、表皮ブドウ球菌（*Staphylococcus epidermidis*）、ブドウ球菌属（*Staphylococcus sp.*）、肺炎連鎖球菌（*Streptococcus pneumoniae*）、ストレプトコッカス・アガラクチア（*Streptococcus agalactiae*）、連鎖球菌属（*Enterococcus sp.*）、セレウス菌（*Bacillus cereus*）、ピフィズス菌（*Bifido*細菌 *bifidum*）、乳酸菌属（*Lactobacillus sp.*）、リステリア・モノサイトゲネス（*Listeria monocytogenes*）、ノカルジア菌属（*Nocardia sp.*）、ロドコッカス・エキイ（*Rhodococcus equi*）、ブタ丹毒菌（*Erysipelothrix rhusiopathiae*）、アクネ菌（*Propioni*細菌 *acnes*）、アクチノミセス菌属（*Actinomyces sp.*）、モビルンカス属（*Mobiluncus sp.*）、ペプトストレプトコッカス菌属（*Peptostreptococcus sp.*）、淋菌（*Neisseria gonorrhoeae*）、髄膜炎菌（*Neisseria meningitidis*）、カタラリス菌（*Moraxella catarrhalis*）、ベイヨネラ属（*Veillonella sp.*）、アクチノパチルス・アクチノミセタムコミタンス（*Actinobacillus actinomycetemcomitans*）、アシネトバクター・バウマニ（*Acinetobacter baumannii*）、ブルセラ属（*Brucella sp.*）、カンピロバクター属（*Campylobacter sp.*）、カプノサイトファーガ属（*Capnocytophaga sp.*）、カルジオバクテリウム・ホミニス（*Cardiobacterium hominis*）、エイケネラ・コローデンス（*Eikenella corrodens*）、野兔病菌（*Francisella tularensis*）、軟性下疳菌（*Haemophilus ducreyi*）、ヘリコバクター・ピロリ菌（ヘリコバクター・ピロリ）、キングセラ・キング（*Kingella kingae*）、レジオネラ・ニューモフィラ（*Legionella pneumophila*）、パストレラ・マルトシダ（*Pasteurella multocida*）、クレブシエラ・グラヌロマトイス（*Klebsiella granulomatis*）、腸内細菌（*Enterobacteriaceae*）、シトロバクター属（*Citrobacter sp.*）、腸内細菌属（*Enterobacter sp.*）、肺炎桿菌（*Klebsiella pneumoniae*）、プロテウス属（*Proteus sp.*）、サルモネラ腸炎菌（*Salmonella enteritidis*）、赤痢菌属（*Shigella sp.*）、セラチア・マルセッセンズ（*Serratia marcescens*）、腸炎エルシニア（*Yersinia enterocolitica*）、ペスト菌（*Yersinia pestis*）、アエロモナス属（*Aeromonas sp.*）、プレジオモナス・シゲロイデス（*Plesiomonas shigelloides*）、コレラ菌（*Vibrio ch*

10

20

30

40

50

olerae)、腸炎ビブリオ(*Vibrio parahaemolyticus*)、
 ビブリオ・バルニフィカス(*Vibrio vulnificus*)、アシネトバクテ
 属(*Acinetobacter* sp.)、フラボバクテリウム属(*Flavobac
 terium* sp.)、パークホルデリア・セパシア(*Burkholderia c
 epacia*)、類鼻疽菌(*Burkholderia pseudomallei*)、
 ザントモナス・マルトフィリア(*Xanthomonas maltophilia*)、
 ステノトロフォモナス・マルトフィリア(*Stenotrophomonas malt
 ophila*)、バクテロイデス・フラジリス(*Bacteroides fragil
 is*)、バクテロイデス属(*Bacteroides* sp.)、プレボテラ属(*Pre
 votella* sp.)、フゾバクテリウム属(*Fusobacterium* sp. 10
)、及び鼠咬症スピリルム(*Spirillum minus*)が挙げられる。抗生物質
 は、バクテリア又は他の微生物を殺すか、阻害するか、又はそれらの成長を遅延するた
 めに用いられる薬剤であり、及び限定はされないが、アミノグリコシド抗生物質(アミカシ
 ン、ゲンタマイシン、カナマイシン、ネオマイシン、ネチルミシン、トブラマイシン、パ
 ロモマイシン、ストレプトマイシン、及びスペクチノマイシン等)、アンサマイシン類(
 ゲルダナマイシン、ハービマイシン、及びリファキシミン等)、カルバセフェム(ロラカ
 ルベフ)、カルバペネム(エルタペネム、ドリペネム、イミペネム/シラスタチン、及び
 メロペネム等)、セファロスポリン(セファドロキシム、セファキソリン(*cefaxo
 lin*)、セファロチン、セファレキシン、セファクロル、セファマンドール、セフォキ
 シチン、セフプロジル(*cefprozil*)、セフロキシム(*cefuroxime*) 20
)、セフィキシム、セフジニール、セフジトレン、セフォペラゾン、セフォタキシム、セフ
 ポドキシム、セフトジジム、セフトチブテン(*ceftibuten*)、セフトゾキシム、
 セフトリアキソ、セフェピム、セフトアロリン・フォサミル(*ceftaroline f
 osamil*)及びセフトビプロール(*ceftobiprole*)等)、グリコペプチ
 ド(テイコプラニン、バンコマイシン、テラバンシン、ダルババンシン(*dalbava
 ncin*)、及びオリタバンシン(*oritavancin*)等)、リンコマイシン系抗
 生物質(クリンダマイシン及びリンコマイシン等)、リポペプチド(ダプトマイシン等)
 、マクロライド(アジスロマイシン、クラリスロマイシン、ジリスロマイシン(*dir
 ithromycin*)、エリスロマイシン、ロキシスロマイシン(*roxithromy
 cin*)、トロレアンドマイシン、テリスロマイシン、及びスピラマイシン等)、モノバ 30
 クタム(アズトレオナム等)、ニトロフラン(フラゾリドン、及びニトロフラントイン等
)、オキサゾリジノン(リネゾリド、ポシゾリド(*posizolid*)、ラデゾリド(
radezolid)、及びトレゾリド(*torezolid*)等)、ペニシリン(アモ
 キシシリン、アンピシリン、アズロシリン、カルベニシリン、クロキサシリン、ジクロキ
 サシリン、フルクロキサシリン、メズロシリン(*mezlocillin*)、メチシリン
 、ナフシリン、オキサシリン、ペニシリンG、ペニシリンV、ピペラシリン、テモシリン
 、及びチカルシリン等)、ポリペプチド(バシトラシン、コリスチン、及びポリミキシン
 B等)、キノロン/フルオロキノロン(シプロフロキサシン、エノキサシン、ガチフロキ
 サシン、ジェミフロキサシン、レボフロキサシン、ロメフロキサシン、モキシフロキサシ
 ン、ナリジクス酸、ノルフロキサシン、オフロキサシン、トロバフロキサシン、グレバフ 40
 ロキサシン、スパルフロキサシン、及びテマフロキサシン)、スルホンアミド(マフェナ
 イド、スルファセタミド、スルファジアジン、スルファジアジン銀塩、スルファジメトキ
 シン、スルファメチゾール、スルファメトキサゾール、スルファニルアミド、スルファサ
 ラジン、スルフィソキサゾール、トリメトプリム-スルファメトキサゾール、及びスルフ
 オンアミドクリソイジン等)、テトラサイクリン(デメクロサイクリン、ドキシサイクリ
 ン、ミノサイクリン、オキシテトラサイクリン、及びテトラサイクリン等)、抗抗酸菌薬
 (クロファジミン(*clofazimine*)、ダブソーン、カプレオマイシン、サイク
 ロセリン、エタンブトール、エチオナミド、イソニアジド、ピラジニアミド、リファンピ
 シン、リファブチン、リファペンチン、ストレプトマイシン等)、アルスフェナミン、ク
 ロラムフェニコール、ホスホマイシン、フシジン酸、メトロニダゾール、ムピロシン、プ 50

ラテンシマイシン (*platenSIMycin*)、キヌプリスチン・ダルフォプリスチン (*quinupristin/dalfopristin*)、チアンフェニコール、チゲサイクリン (*tigecycline*)、チニダゾール、トリメトプリム、及びテキソバクチン (*teixobactin*) が挙げられる。

【0034】

ウイルスとしては、限定はされないが、麻疹、おたふく風邪、風疹、ポリオウイルス感染症、肝炎（例えば、A、B、C、D、及びE型肝炎ウイルス）、インフルエンザ、アデノウイルス、狂犬病、黄熱病、Epstein-Barrウイルス、ヘルペスウイルス、乳頭腫ウイルス、エボラウイルス、インフルエンザウイルス、日本脳炎、デングウイルス、ハンタウイルス、センダイウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、オルトミクソウイルス、水疱性口内炎ウイルス、ピスナウイルス、サイトメガロウイルス、及びヒト免疫不全ウイルス (HIV) が挙げられる。抗ウイルス薬は、ウイルスを殺すか、阻害するか、又はその成長を遅延させるために用いられる薬剤であり、及びそれらに限定はされないが、抗HIV薬（アバカビル、ディダノシン、エムトリシタビン (*emtricitabine*)）、ラミブジン、スタブジン、フマル酸テノホビルジソプロキシル、ジドブジン、デラビルジン、エファビレンツ、エトラビリン (*etravirine*)、ネビラピン (*nevirapine*)、リルピピリン、アタザナビル、ダルナビル、フォサプレナビル (*fosamprenavir*)、インジナビル、ネルフィナビル、リトナビル、サキナビル、チプラナビル (*tipranavir*)、エンフュービルタイド (*enfuvirtide*)、マラビロク (*maraviroc*)、ドルテグラビル (*dolutegravir*)、エルビテグラビル、ラルテグラビル (*raltegravir*)、コビシスタット (*obicistat*)、及びそれらの組み合わせ等）、抗インフルエンザウイルス薬（ザナミビル、リン酸オセルタミビル、ペラミビル、アマンタジン、及びリマンタジン等）、抗ヘルペスウイルス薬（アシクロビル、バラシクロビル、ペンシクロビル (*penciclovir*)、イドクスウリジン、ピダラビン、トリフルリジン (*trifluridine*)、フォスカネット及びファミシクロビル (*famciclovir*) 等）、抗肝炎ウイルス薬（アデフォビル (*adefovir*)、ラミブジン、テルビブジン (*telbivudine*)、テノホビル、ファミシクロビル、エンテカビル、リバビリン、テラプレビル (*telaprevir*)、シメプレビル (*simeprevir*)、ソホスブビル (*sofosbuvir*)、レジパスビル (*ledipasvir*)、オムビタスビル (*ombitasvir*)、パリタプレビル (*paritaprevir*)、リトナビル、ダサブビル (*dasabuvir*、及び *boceprevir* 等）、抗サイトメガロウイルス (CMV) 薬（ガンスシクロビル (*ganciclovir*)、シドフォビル (*cidofovir*)、バルガンシクロビル、フォスカネット、マリバビル (*maribavir*)、及びレフルノミド等）、抗呼吸器合胞体ウイルス (RSV) 薬（リバビリン及びパリビズマブ (*palivizumab*) 等）、及び抗水痘帯状疱疹ウイルス (VSV) 薬（アシクロビル、バラシクロビル、ペンシクロビル、ファミシクロビル、ブリブジン (*brivudin*)、フォスカネット、及びピダラビン等）が挙げられる。

【0035】

真菌としては、それらには限定されないが、アクレモニウム属、アスペルギルス属、エピデルモフィトン (*Epidermophytoni*) 属、エキソフィアラ・ジェンセルメイ (*Exophiala jeanselmei*)、エキセロヒラム (*Exserohilum*) 属、フォンセカ・コンパクト (*Fonsecaea compacta*)、フォンセカ・ペドロソイ (*Fonsecaea pedrosoi*)、フザリウム・オキシスポラム (*Fusarium oxysporum*)、バシディオボールス属、バイポラリス (*Bipolaris*) 属、プラストマイセス・デルマチディス (*Blastomyces dermatidis*)、カンジダ属、クラドフィアロフォラ・カリオニ (*Cladophialophora carrionii*)、コクシジオイデス・イミチス (*Coccidioides immitis*)、コニディオボラス (*Conidiobolus*) 属、クリプトコッカス属、クルブラリア (*Curvularia*) 属、フザリウ

10

20

30

40

50

ム・ソラニ (*Fusarium solani*)、ゲオトリクム・カンジドゥム (*Geotrichum candidum*)、ヒストプラズマ・カプスラーツム変種カプスラーツム (*Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*)、ヒストプラズマ・カプスラーツム変種デュボイシイ (*Histoplasma capsulatum* var. *duboisii*)、ホルタエ・ウエルネッキ (*Hortaea werneckii*)、ラカジア・ロボイ (*Lacazia loboi*)、ラシオディプロデア・テオブロマエ (*Lasiodiplodia theobromae*)、レプトスフェリア・セネガレニシス (*Leptosphaeria senegalensis*)、ピエドラ・イアホルタエ (*Piedra ia hortae*)、でん風 (*Pityriasis versicolor*)、シューダレシェリア・ボイディイ (*Pseudallesheria boydii*)、ピレノカエタ・ロメロイ (*Pyrenochaeta romeroi*)、リゾプス・アリザス (*Rhizopus arrhizus*)、スコブラリオプシス・ブレビカウリス (*Scopulariopsis brevicaulis*)、スキタリジウム・ディミディアタム (*Scytalidium dimidiatum*)、スポロトリックス シェンキイ (*Sporothrix schenckii*)、白癬菌 (*Trichophyton*) 属、トリコスポロン (*Trichosporon*) 属、接合菌 (*Zygomycete fungi*)、マズレラ・グリセア (*Madurella grisea*)、マズレラ・マイセトマチス (*Madurella mycetomatis*)、マラセジア・フルフル (*Malassezia furfur*)、小孢子菌 (*Microsporum*) 属、ネオテスツディナ・ロサティイ (*Neotestudina rosatii*)、オニココラ・カナデンシス (*Onychocola canadensis*)、南アメリカ分芽菌 (*Paracoccidioides brasiliensis*)、膀胱性ファアロフォラ (*Phialophora verrucosa*)、ピエドライア・ホルタエ (*Piedraia hortae*)、アブシジア コリムピフェラ (*Absidia corymbifera*)、リゾムコール・プシラス (*Rhizomucor pusillus*)、及びリゾプス・アリズス (*Rhizopus arrhizus*) が挙げられる。抗真菌薬は、真菌を殺すか、阻害するか、又はその成長を遅延させるために用いられる薬剤であり、及びそれらに限定はされないが、ポリエン抗真菌薬 (アムホテリシンB、キャンディシン (*candicin*)、フィリピン、ハマイシン (*hamycin*)、ナタマイシン、ナイスタチン、及びリモシジン (*rimocidin*) 等)、アゾール抗真菌薬 (アバファンギン (*abafungin*)、ピフォナゾール、プトコナゾール、クロトリマゾール、エコナゾール、フェンチコナゾール、イソコナゾール、ケトコナゾール、ルリコナゾール、ミコナゾール、オモコナゾール、オキシコナゾール、セルタコナゾール、スルコナゾール、チオコナゾール、アルパコナゾール、エフィナコナゾール、エポキシコナゾール、フルコナゾール、イサブコナゾール、イトラコナゾール、ボサコナゾール、プロピコナゾール、ラブコナゾール、及びテルコナゾール、ポリコナゾール等)、及びエキノカンジン (アニデュラファンギン (*anidulafungin*)、カスポファンギン、及びミコファンジン (*micofungin*) 等) が挙げられる。

【0036】

寄生虫としては、それらに限定はされないが、原虫、線虫、条虫、吸虫、及び他の寄生虫であって、マラリア (例えば、熱帯熱マラリア原虫)、鉤虫症、サナダムシ、寄生蠕虫、鞭虫、白癬、回虫、蟯虫、回虫、フィラリズ (*filariids*)、オンコセルカ症 (例えば、回旋糸状虫)、住血吸虫症 (例えば、住血吸虫属)、トキソプラズマ症 (例えば、トキソプラズマ属)、トリパノソーマ症 (例えば、トリパノソーマ属)、リーシュマニア症 (リーシュマニア属)、ランブル鞭毛虫症 (例えば、ランブル鞭毛虫)、アメーバ症 (例えば、赤痢アメーバ)、フィラリア症 (例えば、マレー糸状虫)、及び旋毛虫病 (例えば、旋毛虫) を含むが、それらには限定されない疾患の原因となるものが挙げられる。抗寄生虫薬は、寄生虫を殺すか、阻害するか、又はその成長を遅延させるために用いられる薬剤であり、及びそれらには限定はされないが、抗線虫薬 (メベンダゾール、パモ酸ピラン

テル、チアベンダゾール、ジエチルカルバマジン、及びイベルメクチン等)、抗条虫薬(ニクロサミド、プラジカンテル、及びアルベンダゾール等)、抗吸虫薬(プラジカンテル等)、抗アメーバ薬(リファンピシン及びアムホテリシンB等)、及び抗原虫薬(メラルソプロール、エフロルニチン、メトロニダゾール、チニダゾール、及びミルテホシン等)が挙げられる。

サンプル調製

【0037】

サンプルが収集された後に、それが検定される前に1つ以上のサンプル調製ステップを受けることができる。代替的に、サンプルが収集された後に、それは直接検定され得る。一実施形態では、複数のサンプルが被験者から取得されることができ、及びそれぞれのサンプルが、別々に病原体について試験される。例えば、第一のサンプル、又は少なくとも前記第一のサンプルの一部が、前記サンプル中に病原体が存在するかについて決定するために試験されることができ、及び第二のサンプル、又は少なくとも前記第二のサンプルの一部が、前記サンプル中の病原体が、抗菌薬に対して耐性を有するか、又は感受性であるかを決定するために試験されることができ、別の実施形態では、単一のサンプルが、少なくとも2つの流体的に分離された部分(例えば、少なくとも第一の部分及び第二の部分)に分割され得る。特定の実施形態では、サンプルのそれぞれの部分は、直接病原体の試験の他に用いられ得る。前記第一の部分は、少なくとも第一の臨床検査、又はその一部のために用いられることができ、及び第二の部分は、少なくとも第二の臨床検査又はその一部のために用いられることができる。実施形態においては、サンプルの第一の部分は、興味ある特定の病原体が前記サンプル中に存在するかどうかを決定するための第一の臨床検査に用いられることができ、及び前記サンプルの第二の部分は、前記サンプル中の病原体が、抗菌薬に対して耐性を有するか、又は感受性であるかを決定するための第二の臨床検査に用いられることができる。

10

20

【0038】

他の実施形態では、サンプル中の病原体は、最初に富化又は濃縮され得る(例えば、病原体のための抗体に基づく捕捉表面使用、病原体の培養、病原体を、その病原体の液体懸濁物を含むチューブの底に向かって移動するための遠心分離、又は病原体の液体懸濁物からその病原体を捕捉するためのろ過等の物理的な方法により)。前記富化されたか、又は濃縮されたサンプルは、直接病原体の試験のために用いられ得る。代替的に、前記富化されたか、又は濃縮されたサンプルは、少なくとも2つの流体的に分離された部分に分割されることができ、及びそれぞれの部分が、前記病原体について試験される。上述したように、前記第一の部分は、少なくとも第一の臨床検査又はその一部のために用いられることができ、及び第二の部分は、少なくとも第二の臨床検査又はその一部のために用いられることができる。実施形態においては、サンプルの第一の部分は、興味ある特定の病原体が前記サンプル中に存在するかどうかを決定するための第一の臨床検査に用いられることができ、及び前記サンプルの第二の部分は、前記サンプル中の病原体が、抗菌薬に対して耐性を有するか、又は感受性であるかを決定するための第二の臨床検査に用いられることができる。

30

【0039】

特定の実施形態では、病原体の試験に先立ち、前記サンプルは微生物成長培地中で前培養され得る。“微生物成長培地”又は“成長培地”は、相互に交換可能に用いられることができ、及び興味ある病原体の成長を支持するために十分な、任意の適切な栄養ベースであってよい。微生物成長培地は、液体、半固体、又は固体であってよい。前記サンプルは、約15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1時間以下の間、前培養され得る。一実施形態では、前記サンプルは約1~約8時間前培養される。別の実施形態では、前記サンプルは約2~約7時間。更に別の実施形態においては、前記サンプルは約3~約6時間、約3~約5時間、又は約3~約4時間の間、前培養される。更なる実施形態においては、前記サンプルは、約2~3時間、約2~約4時間、約2~約5時間、又は約2~約6時間の間、前培養される。別の実施形態では、前記サンプル

40

50

は、約 1 ~ 約 2 時間、約 1 ~ 約 3 時間、約 1 ~ 約 4 時間、約 1 ~ 約 5 時間、又は約 1 ~ 約 6 時間の間、前培養される。

【 0 0 4 0 】

一実施形態では、前記サンプル、病原体が対数期中期に成長するまで前培養される。別の実施形態では、前記サンプルは病原体が、約 10^{10} 病原体 / ml、約 10^9 病原体 / ml、約 10^8 病原体 / ml、約 10^7 病原体 / ml、約 10^6 病原体 / ml、約 10^5 病原体 / ml、約 10^4 病原体 / ml、約 10^3 病原体 / ml、又は約 10^2 病原体 / ml 以上の濃度に成長するまで、前培養される。一実施形態では、前記サンプルは、病原体が、約 10^9 ~ 約 10^6 病原体 / ml、約 10^9 ~ 約 10^7 病原体 / ml、又は約 10^9 ~ 約 10^8 病原体 / ml の濃度に成長するまで前培養される。更に別の実施形態においては、病原体は、約 10^8 ~ 約 10^6 病原体 / ml、又は約 10^8 ~ 約 10^7 病原体 / ml の濃度まで成長させられる。

10

【 0 0 4 1 】

前記前培養されたサンプルは、次いで病原体のために試験されることができ、又は前記病原体を試験するために、少なくとも 2 つの流体的に分離された部分に分割され得る。

【 0 0 4 2 】

別の実施形態では、前記前培養されたサンプル又は前培養なしのサンプルは、病原体についての試験に先立ち、約 1 ~ 約 10^8 病原体 / 反応、 10^1 ~ 約 10^8 病原体 / 反応、約 10^2 ~ 約 10^8 病原体 / 反応、約 10^3 ~ 約 10^8 病原体 / 反応、約 10^4 ~ 約 10^8 病原体 / 反応、約 10^5 ~ 約 10^8 病原体 / 反応、約 10^6 ~ 約 10^8 病原体 / 反応、又は約 10^7 ~ 約 10^8 病原体 / 反応の濃度を有する 1 つ以上の試験反応混合物を得るために、希釈され得る。別の実施形態では、前記サンプルは、約 10^1 ~ 約 10^7 病原体 / 反応、約 10^1 ~ 約 10^6 病原体 / 反応、約 10^1 ~ 約 10^5 病原体 / 反応、約 10^1 ~ 約 10^4 病原体 / 反応、約 10^1 ~ 約 10^3 病原体 / 反応、又は約 10^1 ~ 約 10^2 病原体 / 反応の濃度まで希釈され得る。一実施形態では、前記サンプルは、約 1、 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、又は 10^8 病原体 / 反応、又はその間の任意の範囲まで希釈され得る。

20

【 0 0 4 3 】

他のサンプル調製ステップは、遂行される検定に応じて、以下の 1 つ以上を含み得る：薄切りすること、細かく刻むこと、又は組織サンプルを 2 つ以上の片に分割すること；混合すること、攪拌すること、溶解すること、超音波を当てること、均一化すること、固定すること、又はサンプル又は前記サンプルの部分の任意の処理を遂行すること；サンプル又はその一部を遠心分離すること；ろ過すること（例えば、前記サンプル又はその一部を、フィルター又は膜を通過させること）；血液サンプルを凝固させるか、又は凝固を引き起こすこと；ペレット及び上澄み液を提供するために、前記サンプル、又は前記サンプルの一部分を濃縮すること（例えば、血液サンプル又は組織サンプルからの組織のホモジネートを含む溶液の沈降若しくは遠心分離により、又は電磁ビーズにより）；前記サンプル又は前記サンプルの一部分を染料により染色すること；前記サンプルにマーカー又は試薬を添加すること；又はさもなければ、前記サンプル、サンプルの一部、サンプルの構成成分、又は細胞の一部又はサンプル内の構造の検出、可視化、又は定量的のために調製すること。

30

40

病原体検出のための方法

【 0 0 4 4 】

様々な方法が、特定の病原体がサンプル中に存在するかを決定するために用いられ得る。例えば、サンプルは、興味ある病原体内にある抗原（典型的にはポリペプチド）の検出のために、免疫学的検定に用いられ得る。代替的に、免疫学的検定は、前記サンプル中の病原体に対して生成された抗体の存在を検出するために抗原の使用を含むことができる。免疫学的検定としては、例えば、ELISA、免疫プロット法、及び抗体に基づく顕微鏡のために細胞染色法が挙げられる。

【 0 0 4 5 】

50

例えば、E L I S A は、一般的には、興味ある抗原（例えば、インフルエンザウイルス感染を示す抗原）に特異的に結合する能力を有する少なくとも1つの抗体を含む。興味ある抗原を含むか、又は含むことが疑われるサンプルが、支持体の（例えば、マイクロアレー、マイクロビーズ、チップ、サンプル輸送機器、キュベット、毛細管又は他のチューブ、反応槽、又は固定化のための表面を有する他の任意の適切な支持体）の上に、非特異的に（例えば、表面への吸着を介して）か、又は特異的に（例えば、“サンドイッチ” E L I S A では、同じ抗原に特異的な別の抗体への捕捉を介して）固定化される。抗原が固定化された後に、検出抗体が加えられ、抗原への複合体が形成される。前記検出抗体は、酵素に結合されることができ、又はそれ自身がその次に酵素に結合される二次抗体により検出され得る。結合された酵素のための基質を加えると、前記サンプル中の抗原の存在及び/又は量を示す検出可能な信号が生成される。基質の選択は、結合する酵素に依存する。適切な基質としては、蛍光性及び発色性基質が挙げられる。

10

【0046】

いくつかのE L I S A では、固相捕捉表面は、そこにサンプルが加えられることができる、付着された第一の抗体（例えば、希釈された血液、血漿、又は他のサンプル）を含み得る。存在する場合には、前記サンプル中の抗原は、前記第一の抗体と結合でき、及び固定化されることができる。例えば、検出可能な生成物を形成できるか、又は他の方法で検出され得る、酵素に連結されたか、又は結合された抗体（例えば、アルカリ性ホスファターゼ又は西洋ワサビペルオキシダーゼ）を含む酵素試薬が添加され得る。前記酵素試薬の抗体部分が抗原に結合できる場合、次いで前記酵素試薬も前記捕捉表面に固定化される。前記酵素に対する基質の添加は、効果を生み出す生成物をもたらすことができ、例えば、光が測定され及びプロットされる。この様式において、サンプル中に存在する抗原の量が測定され得る。

20

【0047】

別の例においては、サンプルは、興味ある病原体中に存在する核酸配列を検定するために、核酸増幅に基づく試験に用いられることができる。用いることのできる核酸増幅反応としては、熱サイクリング（例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（P C R ））及び等温増幅方法（例えば、鎖置換増幅（S D A ）、ローリング・サークル増幅（R C A ）、ループ媒介等温増幅（L A M P ）、ヘリカーゼ依存性増幅（H D A ）、及び参照によりその全体が、本明細書に全ての目的で組み込まれるW O 2 0 1 4 / 1 4 5 2 9 1、W O 2 0 1 4 / 1 4 5 2 9 6、及びW O 2 0 1 4 / 1 4 5 2 9 8に記載された増幅方法）を含む増幅方法が挙げられる。R N A 増幅のための例示的な方法としては、インビトロ転写が挙げられる。逆転写P C R（R T - P C R）においては、R N A は、最初に逆転写され、続いて、P C R 反応における、その指数的増幅が行われる。2つの最も普通に用いられる逆転写酵素は、ニワトリ骨髄芽球症ウイルス逆転写酵素（A M V - R T ）及びモロニー（M o l o n e y ）マウス白血病ウイルス逆転写酵素（M M L V - R T ）である。逆転写のステップは、典型的には、特異的なプライマー、ランダム六量体（r a n d o m h e x a m e r ）、又はオリゴ-d T プライマーを用いて開始される。誘導されたc D N A は、次いで、後続するP C R 反応において、テンプレートとして用いられ得る。

30

【0048】

典型的には、興味ある病原体の検定のための核酸増幅反応は、少なくとも1つの、及び普通には、より多くの、興味ある病原体の核酸又はその相補体に特異的にハイブリダイズでき、それぞれの核酸のコピーの生成のための開始点として機能できる、少なくとも2つのポリヌクレオチド・プライマー（即ち、プライマー対）を用いる。核酸増幅を支持するために十分な条件は、当技術分野で周知であり、及び例えば、W O 2 0 1 4 / 1 4 5 2 9 1、W O 2 0 1 4 / 1 4 5 2 9 6、及びW O 2 0 1 4 / 1 4 5 2 9 8に記載されている。例えば、P C R のための条件は、典型的には、1) その間に、標的D N A、プライマー対、T a q ポリメラーゼ、及びデオキシヌクレオチド三リン酸（d N T P ）を含むサンプルを含む反応混合物を、二本鎖D N A を単鎖D N A に変性させるために約1～10分間、94～96℃に加熱する変性ステップ；2) その間に、前記単鎖D N A テンプレートにプラ

40

50

イマーをアニールすることを可能にするために、約20～40秒間、反応温度を約50～65°Cに低下するアニリング・ステップ；及び3)その間に、5'から3'への方向においてテンプレートに相補的なdNTPを加えることにより、前記DNA鎖テンプレートに相補的な新しいDNA鎖の合成を可能にするために反応温度が調整される、拡張/伸長ステップを含む。拡張/伸長の温度は、使用される前記DNAポリメラーゼに依存して変化し得る。例えば、Taqポリメラーゼを使用する場合、拡張/伸長温度は、典型的には72°Cである。上記の3つのステップは、前記核酸が十分に増幅されるまで典型的には20～40回繰り返されることができ、サイクルと呼ばれる。

【0049】

核酸増幅検定は、反応の蛍光における増加（例えば、二本鎖DNAにインターカレートする蛍光染料が用いられる検定において）をモニターすることにより測定できるか、又は反応の吸光度又は濁度における増加（例えば、ピロリン酸が、DNA合成の間のヌクレオチドの取り込みの結果として生成される検定においては、それはMg⁺⁺と反応して、不溶性のマグネシウムピロリン酸を生成する）をモニターすることにより測定できる。核酸増幅検定は、例えば、蛍光、吸光度、又は濁度の値を経時的に測定し、及びサンプル中の興味ある核酸の存在又は量を示す、屈曲点を特定するために、データを分析することにより更に分析できる。この分析は、例えば、データを指数曲線に適合させ、及びベースライン上の閾値に基づき屈曲点を選択することにより遂行され得る。

【0050】

更に別の例では、病原体は、核酸プローブに基づく反応において検出され得る。これらの核酸プローブに基づく反応は、病原体の核酸、又はその相補体と、特異的にハイブリダイズする1つ以上の核酸プローブを含み得る。この標的核酸は、例えば、DNA、RNA、mRNA、miRNA、rRNA、又はtRNAであることができる。本発明の核酸プローブは、DNA、RNA、修飾ヌクレオチド（例えば、メチル化されたか又は標識されたヌクレオチド）、ヌクレオチド・アナログ、又はこれらの2つ以上の組み合わせを含み得る。前記プローブは、完全な遺伝子又は遺伝子断片の、コーディング又は相補的な鎖であることができるか、又はそれらの発現産物であることができる。前記プローブのヌクレオチド配列は、所望のハイブリダイゼーション条件下で、前記サンプル中の標的核酸に対する前記プローブのハイブリダイゼーションを可能にするために、サンプル中の核酸配列に対して十分な相補性を有する任意の配列であることができる。理想的には、このプローブは、前記サンプル中の興味ある標的核酸にのみハイブリダイズし、及び非特異的に前記サンプル中の他の非相補的な核酸又は前記サンプル中の標的核酸の他の領域にはハイブリダイズしない。実施形態においては、その増幅された核酸を検出するために前記核酸プローブが用いられることができるように、この標的核酸は、例えば、PCRにより増幅された核酸であることができる。

【0051】

前記ハイブリダイゼーション条件は、前記ハイブリダイゼーション反応において望まれる厳密さに従って変化することができる。例えば、もし前記ハイブリダイゼーション条件が、高い厳密性のためのものである場合、そのプローブは、それが非常に高い程度の相補性を持つ、前記サンプル中の前記核酸配列にのみ結合する。低い厳密性のハイブリダイゼーション条件は、前記プローブが、サンプル中の高度な厳密性においてハイブリダイゼーションが生じるために要求されるほどは、前記プローブ配列に対して高度に相補的ではない、いくつかの相補性を有する核酸配列へのハイブリダイゼーションを可能にする。このハイブリダイゼーション条件は、生物学的サンプル、プローブのタイプ及び標的に応じて変化する。当業者は、本発明の方法の特定の適用のために、ハイブリダイゼーション条件を最適化する方法を知っているか、又は代替的に、特定の条件の組み合わせの下で、核酸プローブの最適な使用のための設計方法を知っている。核酸増幅反応において用いられるプライマーのためのハイブリダイゼーション条件も、同様に最適化され得る。

【0052】

前記核酸プローブは、例えば、ハプテン、ビオチン、ジゴキシゲニン、フルオレセインイ

10

20

30

40

50

ソチオシアネート (FITC)、ジニトロフェニル、アミノメチルクマリン酢酸、アセチルアミノフルオレン及び水銀 - スルフヒドリル配位子複合体 (mercury - sulfhydryl - ligand complex)、発色性染料、蛍光染料、及び標的核酸の検出のために適切な任意のラベル等のラベルに連結され得る。いくつかの実施形態では、約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 以上の異なるプローブ等の複数のプローブであって、それぞれが、異なる標的核酸及び異なるラベルを持つものが、同時に単一のサンプルにハイブリダイズされる。

【0053】

いくつかの実施形態では、核酸テンプレート鎖の部分（又は同様又は同一の配列を有する鎖）に相補的なヌクレオチド配列部分を含み、並びに蛍光レポーター（蛍光色素分子）及び消光剤の 1 つ又は両方を含む核酸プローブが、本発明において提供される反応に含まれる。一例においては、核酸プローブは、蛍光レポーターをその 5' 又は 3' 末端に、及び消光剤を他の末端に含み得る。別の例においては、核酸プローブは、蛍光レポーターをその 5' 又は 3' 末端に含むことができ、及びそれは、消光剤を含む核酸プライマーとアニールされることができる。消光剤を含む核酸プライマーは、この消光剤を、プライマーの中の核酸プローブが、プライマーにアニールされるときに、前記蛍光レポーターが消光され得る位置に含むことができる。蛍光レポーター及び消光剤のペアを含むプローブにおいて、この蛍光レポーター及び消光剤は、消光剤がレポーターを効果的に消光できるように選択できる。いくつかの実施形態では、蛍光レポーターは、蛍光レポーターの発光極大が、消光剤の吸収極大と同様であるような消光剤に組み合わされる。

【0054】

蛍光レポーターとして用いることができる蛍光色素分子としては、例えば、CAL Fluor Gold、CAL Fluor Orange、Quasar 570、CAL Fluor Red 590、CAL Fluor Red 610、CAL Fluor Red 610、CAL Fluor Red 635、Quasar 670 (Biosearch Technologies)、VIC、NED (Life Technologies)、Cy3、Cy5、Cy5.5 (GE Healthcare Life Sciences)、Oyster 556、Oyster 645 (Integrated DNA Technologies)、LC red 610、LC red 610、LC red 640、LC red 670、LC red 705 (Roche Applies Science)、Texas red、FAM、TET、HEX、JOE、TMR、及び ROX が挙げられる。用いることができる消光剤としては、例えば、DDQ - I、DDQ - II (Eurogentee)、Eclipse (Epoch Biosciences)、Iowa Black FQ、Iowa Black RQ (Integrated DNA Technologies)、BHQ - 1、BHQ - 2、BHQ - 3 (Biosearch Technologies)、QSY - 7、QSY - 21 (Molecular Probe)、及び Dabcyl が挙げられる。

【0055】

一実施形態では、核酸プローブは、共有結合的に、又は非共有結合的に基質に結合される。非核酸プローブに対して連結する基質の非制限的な例としては、マイクロアレー、マイクロビーズ、ピペット・チップ、サンプル輸送機器、キュベット、毛細管又は他のチューブ、反応槽、又は適切な任意の構成を挙げ得る。例えば、核酸プローブに連結するために有用なマイクロビーズは当技術分野で周知であり、並びに磁性及び非磁性ビーズを含む。ビーズのコーディング及びそこに結合した核酸プローブの同定を促進するために、マイクロビーズは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 以上の染料で標識できる。マイクロビーズのコーディングは、単一の検定において、それぞれのビーズが、異なる標的核酸に対する特異性を持つ、異なる核酸プローブに対応する、少なくとも 10、50、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1

10

20

30

40

50

500、2000、5000以上の異なるマイクロビーズを区別するために用いられ得る。別の例においては、核酸プローブは、チップなどの反応槽の表面に結合される。例えば、チップの内表面は、単一の標的核酸に対して特異的である核酸プローブにより被覆される。代替的に、チップの内表面は、異なる標的核酸に特異的である、2つ以上の異なる核酸プローブにより被覆され得る。2つ以上の異なる核酸プローブが同じチップの内表面に被覆される場合、異なる核酸プローブのそれぞれは、明白に順序付けられたリングを形成するか、又はチップの軸に沿った異なる位置におけるバンド等の異なる周知の場所に結合され得る。この場合、同じサンプル中の複数の異なる核酸を、サンプルをチップ内に引き抜いて、及び前記サンプル中に含まれる核酸を、前記チップに沿った連続的な位置に被覆された前記核酸プローブと結合することを可能にすることにより分析できる。次いで、本明細書において記載されるように、結合の事象が、特定の周知の核酸に対応する、バンドのパターンの中の、それぞれのバンドの位置で可視化されることができる。

10

20

30

40

50

【0056】

一実施形態では、サンプルは、16Sリボソーム(小サブユニット)RNA(16SrRNA)又はその遺伝子(16SrDNA)等の微生物マーカーについて、例えば、上記の核酸増幅又はプローブに基づく検定により、検定することができる。16SrRNA又は16SrDNAに対してサンプルが陽性であると決定された場合、それは前記サンプルがバクテリアを含むことのインジケータであり、及び従って、前記サンプルを提供した被験者は、バクテリアに感染している可能性がある。使用できる他の微生物マーカーとしては、例えば、23SrRNA、rpoB、gyrB、dnaK、amoA、及びmip遺伝子、又はそれらの遺伝子産物が挙げられる。別の例においては、サンプルは、リボソームのシストロンの内部転写スペーサー(internal transcribed spacer: ITS)領域(例えば、Schochら、Proc Natl Acad Sci USA, 2012年4月17日; 109(16): 6241~6246に記載される)等の真菌マーカーについて検定され得る。そのような生物のクラスに基づくマーカーは被験者が、有する可能性のある全体の種類の感染(例えば、バクテリア、ウイルス、又は真菌感染)又はサンプル中の生物の種類についての情報を提供できる。

【0057】

病原体の検出に有用な病原体の他の例示的な抗原及び核酸は、限定はされないが、本明細書に記載される病原体の抗原及び核酸を含む。例えば、レトロウイルスの核酸及び抗原は、HIV gag、pol、及びenv遺伝子、及びそれらの遺伝子産物、Nefタンパク質、逆転写酵素、及び他のHIV構成要素を含む。単純ヘルペスのウイルスの核酸及び抗原の説明的な例は、それらに限定はされないが、前初期タンパク質、糖タンパク質D、及びそれらの遺伝子産物をエンコードする遺伝子、及び他の単純ヘルペス構成要素を含む。水痘帯状ヘルペスウイルスの核酸及び抗原の非限定的な例は、9PI、gpII、及びそれらの遺伝子産物をエンコードする遺伝子、及び他の水痘帯状ヘルペスウイルスの構成要素を含む。日本脳炎ウイルスの核酸及び抗原の非限定的な例は、E、M-E、M-E-NS1、NS1、及びNS1-NS2Aタンパク質、及びそれらの遺伝子産物をエンコードする遺伝子、及び他の日本脳炎ウイルスの構成要素を含む。肝炎ウイルスの核酸及び抗原の説明的な例は、それらには限定されないが、B型肝炎ウイルスのS、M、及びLタンパク質、B型肝炎ウイルスのpre-S抗原、及びそれらの遺伝子産物をエンコードする遺伝子、及び他の肝炎(例えば、A、B、及びC型肝炎)ウイルスの構成要素を含む。インフルエンザウイルスの核酸及び抗原の説明的な例は、それらには限定されないが、ヘマグルチニン及びノイラミニダーゼ、及びそれらの遺伝子産物をエンコードする遺伝子、及び他のインフルエンザウイルスの構成要素を含む。麻疹ウイルスの核酸及び抗原の説明的な例は、それらには限定されないが、麻疹ウイルス融合タンパク質及びその遺伝子産物をエンコードする遺伝子、及び他の麻疹ウイルス構成要素を含む。風疹ウイルスの核酸及び抗原の説明的な例は、それらには限定されないが、タンパク質E1及びE2、及びそれらの遺伝子産物をエンコードする遺伝子、及び他の風疹ウイルス構成要素を含む。ロタウイルスの核酸及び抗原は、VP7s c及びその遺伝子産物をエンコードする遺伝子、及び他の

ロタウイルスの構成要素を含む。サイトメガロウイルスの核酸及び抗原の説明的な例は、それらには限定されないが、エンベロープ糖タンパク質 B、及びその遺伝子産物をエンコードする遺伝子、及び他のサイトメガロウイルスの構成要素を含む。呼吸器抱合体ウイルスの核酸及び抗原の非限定的な例は、RSV 融合タンパク質、M2 タンパク質、及びそれらの遺伝子産物をエンコードする遺伝子、及び他の呼吸器抱合体ウイルスの構成要素を含む。狂犬病ウイルスの核酸及び抗原の代表的な例は、それらには限定されないが、狂犬病糖タンパク質、狂犬病核タンパク質、及びそれらの遺伝子産物をエンコードする遺伝子、及び他の狂犬病ウイルスの構成要素を含む。乳頭腫ウイルス核酸及び抗原の説明的な例は、それらには限定されないが、L1 及び L2 カプシドタンパク質、子宮頸がん付随する E6/E7 抗原、及びそれらの遺伝子産物をエンコードする遺伝子を含む。ウイルスの抗原及び核酸の追加的な例については、例えば、“Fundamental Virology、第二版、Fields, B. N. 及び Knipe, D. M. 編集、1991年、Raven Press, New York”を参照されたい。

10

20

30

40

50

【0058】

本発明の組成物及び方法において、用い得る真菌の核酸及び抗原の説明的な例としては、それらには限定されないが、カンジダ真菌の抗原構成要素；荚膜多糖等のクリプトコッカス真菌の抗原、及び他のクリプトコッカス真菌の抗原構成要素；熱ショックタンパク質 60 (HSP 60) 等のヒストプラズマ真菌の抗原、及び他のヒストプラズマ真菌の抗原構成要素；小球 (spherule) 抗原等のコクシジオイデス真菌の抗原、及び他のコクシジオイデス真菌の抗原構成要素；及びトリコフィチン等の白癬真菌の抗原、及び他のコクシジオイデス真菌の抗原構成要素、及び前記抗原をエンコードする任意の DNA 又は RNA が挙げられる。

【0059】

本発明の組成物及び方法において、用い得るバクテリアの核酸及び抗原としては、それらには限定されないが：百日咳毒素、繊維状ヘマグルチニン、パータクチン、FM2、FIM3、アデニル酸シクラゼ等の百日咳菌の抗原、及び他の百日咳菌の抗原構成要素；ジフテリア毒素又は類毒素等のジフテリア菌の抗原、及び他のジフテリア菌の抗原構成要素；破傷風毒素又は類毒素等の破傷風菌の抗原、及び他の破傷風菌の抗原構成要素、M タンパク質等の連鎖球菌の抗原及び他の連鎖球菌の抗原構成要素；リポ多糖類等の、グラム陰性桿菌の抗原及び他のグラム陰性桿菌の抗原構成要素；ミコール酸、熱ショックタンパク質 65 (HSP 65)、30 kDa 主要分泌 (major secreted) タンパク質、抗原 85 A 等の結核菌の抗原、及び他の結核菌の抗原構成要素；ヘリコバクター・ピロリ菌の抗原構成要素、肺炎球菌溶血素、肺炎球菌荚膜多糖類等の肺炎球菌の抗原、及び他の肺炎球菌の抗原構成要素；荚膜多糖類等のインフルエンザ菌の抗原及び他のインフルエンザ菌の抗原構成要素；炭疽毒素 (anthrax protective antigen) 等の炭疽菌の抗原、及び他の炭疽菌の抗原構成要素；rOmp A 等のリケッチア菌の抗原、及び他のリケッチア菌の抗原構成要素、及び前記抗原をエンコードする任意の DNA 又は RNA が挙げられる。本明細書において記載されたバクテリアの核酸及び抗原には、任意の他のバクテリアの、ミコバクテリアの、ミコプラズマの、リケッチアの、又はクラミジアの、核酸及び抗原が含まれる。

【0060】

本発明の組成物及び方法において、用い得る他の寄生虫の核酸及び抗原としては、それらには限定されないが、：メロゾイト表面抗原、種虫 (sporozoite) 表面抗原、スポロゾイト周囲抗原、生殖母細胞 (gametocyte) / 配偶子 (gamete) 表面抗原、血液段階抗原 pf155 / RESA 等の熱帯熱マラリア原虫抗原、及び他の熱帯マラリア原虫の抗原構成要素；gp63、リポホスホグリカン及びその関連タンパク質等の大型リーシュマニア抗原及び他のリーシュマニア抗原、及び他のリーシュマニア抗原構成要素；SAG-1、p30 等のトキソプラズマ抗原、及び他のトキソプラズマ抗原構成要素；グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、パラミオシン等の住血吸虫抗原、及び他の住血吸虫抗原構成要素；及び 75 ~ 77 kDa 抗原、56 kDa 抗原等のトリパノゾ

ーマ・クルージ抗原、及び他のトリパノゾーマ抗原構成要素、及び前記抗原をエンコードする任意のDNA又はRNAが挙げられる。

【0061】

サンプル中の病原体からの抗原又は核酸の存在は、病原体が前記サンプル中に存在することを示し、及び従って、ヒト又は動物からのサンプルの場合には、そのヒト又は動物が、前記病原体により引き起こされる疾患に罹患している可能性がある。サンプルの一部を、免疫学的検定、核酸増幅反応、核酸プローブに基づく反応、又は前記サンプル中に存在し得る病原体に対する他の任意の適切な検定に供することにより、この検定結果は、前記サンプル中に特定の病原体が存在するかどうかの情報を、及び特定の実施形態では、前記サンプル中の病原体の量の定量的な測定を提供できる。

抗菌薬に対する感受性又は耐性を決定するための方法

【0062】

サンプル中の病原体の同定が価値のある情報を提供する一方で、病原体に感染した被験者の可能な治療計画を導くために、又は他の病原体管理の目的のために、前記病原体が、1つ以上の抗生物質等の抗菌薬に対して感受性があるか、又は耐性を持っているかを決定することも望ましい。抗菌薬耐性は、バクテリア等の微生物の集団（又は亜集団）が、1つ以上の抗菌薬に対する耐性を獲得するか、又は示す場合に見いだされる。複数の抗菌薬による処置に対して耐性を持つ微生物は、“多剤耐性”と称され、及びそれらの微生物は、“多剤耐性”を有するか、又は示すと称され；どちらの用語も“MDR”と略される。抗菌薬の存在にも関わらず、又は（MDRの場合には）複数の抗菌薬の存在にも関わらず、微生物の集団が生き残る（及び典型的には成長を続け及び数において増幅する）場合に、1つ以上の抗菌薬に対する耐性が観察されるか、又は示される。例えば、多くの抗生物質化合物は、 β -ラクタム環（4員環のアミド）を含み；ペニシリンは β -ラクタム環を有する抗生物質の例である。多くのバクテリアは、 β -ラクタム環を開裂する β -ラクタマーゼを有し、及び従って細菌をそのような抗生物質から保護する。しばしばグラム陰性菌に見いだされ、及び抗生物質耐性を与える、 β -ラクタム環を開裂できる酵素は、TEM及びROB β -ラクタマーゼ酵素を含む。別の例においては、薬剤耐性インフルエンザ菌は、blaTEM又はblaROB耐性遺伝子（典型的にはblaTEM-1であるが、blaTEM-2及びblaROB-1及び他のものも見いだされる）を有し得る。疾患を引き起こす生物に見いだされる抗菌薬耐性マーカーの他の例としては、KPC耐性遺伝子（カルバペネム耐性肺炎杆菌（*Klebsiella pneumoniae carbapenemas*：KPCに見いだされる）、mecA及びmecC耐性遺伝子（メチシリン等の β -ラクタム含有抗生物質に対する耐性の原因となる）、及びバンコマイシン耐性遺伝子A及びB（vanA及びvanB）（例えば、バンコマイシン耐性腸球菌に見いだされる）が挙げられる。抗菌薬耐性生物の他の例としては、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）、バンコマイシン低度耐性黄色ブドウ球菌（VISA）、バンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌（VRSA）、拡張されたスペクトラムの β -ラクタマーゼ（ESBL）を有するバクテリア（例えば、腸内細菌）、及び多剤耐性アシネトバクター・バウマンニ（*A. baumannii*）（MRAB）が挙げられる。MDR標的生物を含む、薬剤耐性標的生物は、抗菌薬耐性を与える核酸マーカー、タンパク質マーカー、他のマーカー、又はそれらの組み合わせを検出することにより同定され得る。

【0063】

様々な方法が、1つ以上の抗菌薬に対する病原体の反応を試験するために用いられ得る。例えば、病原体による感染を有することが疑われる被験者から得られたサンプルは、抗菌薬耐性を与える遺伝子の存在について、抗菌薬耐性をもたらす遺伝子の欠損について、又は抗菌薬耐性を与える変異（例えば、点変異、単一ヌクレオチド多型（SNP）、又は多重ヌクレオチド変異）について、前記サンプルを検定するために、核酸に基づく試験に供されることができる。そのような核酸に基づく試験としては、例えば、上述した核酸増幅反応及び核酸プローブに基づく反応を挙げることができる。一例においては、変異についての核酸に基づく試験は、参照によりその全体が全ての目的で本明細書に組み込まれる、

10

20

30

40

50

WO 2015 / 076919 に記載されているように試験することができる。

【0064】

例えば、標的核酸中の、興味のある特定のヌクレオチド（例えば、変異又はSNPの場合において）の有無を検出するためには、興味のあるヌクレオチドを含むか、又はそれに隣接する標的核酸中の領域に選択的に結合する第一の又は第二のプライマーが選択され得る。これらのプライマーは、それらが：i）その領域が興味あるヌクレオチドを含む場合にその領域に選択的に結合するか、又はii）その領域が興味あるヌクレオチドを含む場合に、その領域には選択的に結合しないかの、いずれかのために設計され得る。本明細書において記載される方法は、選択されたプライマーにより遂行されることができ、及び増幅反応の結果は、標的核酸中の興味あるヌクレオチドの有無に関する情報を提供し得る。例えば、第一のプライマーのテンプレート結合領域が、特定の興味あるヌクレオチドを含む（例えば、変異）標的核酸中の配列に相補的なヌクレオチド配列を持つようにデザインされている場合には、サンプルから選択されたプライマーによる標的核酸増幅の成功は、前記サンプルが、特定の興味あるヌクレオチドを有する標的核酸を含み得ることを示す。いくつかの実施形態では、標的核酸中の興味あるヌクレオチドの分析に用いられるプライマーは、プライマーの3'末端における極めて重要なヌクレオチド（即ち、標的核酸中の興味あるヌクレオチドと同じ位置に対応するヌクレオチド）を含み得る。そのような場合には、前記プライマーの3'末端ヌクレオチドへのハイブリダイゼーションは、標的核酸中の興味あるヌクレオチドの存在に依存することができる。もしプライマーの3'末端ヌクレオチドが標的核酸中のヌクレオチドにハイブリダイズしない場合（例えば、ヌクレオチド間のミスマッチに起因して）、そのミスマッチは、核酸ポリメラーゼが、そのプライマーから伸長産物を合成することを大幅に損ない得る。従って、いくつかの実施形態では、興味あるヌクレオチドに対応する3'末端ヌクレオチドを有するプライマーは、標的核酸中の特定のヌクレオチドの有無を決定するために有用であり得る。そのような実施形態では、いくつかの状況において、前記プライマーの3'末端における極めて重要なヌクレオチドは、標的核酸中の興味あるヌクレオチドに相補的であるように選択されることができ、及びいくつかの他の状況においては、前記プライマーの3'末端における極めて重要なヌクレオチドは、標的核酸中の興味あるヌクレオチドに非相補的であるように選択されることができる。前記興味あるヌクレオチドは、例えば、標的核酸の野生型、変異型、又は多型を表現し得る。

10

20

30

【0065】

他の実施形態では、特定の標的核酸中の興味あるヌクレオチド（例えば、変異又はSNP）は、第一の又は第二のプライマーのテンプレート結合領域に相補的ではない領域における、標的核酸中に興味あるヌクレオチドが存在することができるようにプライマーを選択することにより検出できる。例えば、前記興味あるヌクレオチドは、標的核酸配列のほぼ中央にあり得る。実施形態においては、前記興味あるヌクレオチドは、本明細書において提供される、標的核酸を増幅するための、プライマー対のプライマーのテール領域が、それに対して相補的である、標的核酸鎖の一部であり、及び前記プライマー対の他のプライマーのテール領域と、同一又は同様のヌクレオチド配列である“内部モチーフ（内部モチーフ）”中にあり得る。興味あるヌクレオチドが、内部モチーフ内にある場合、実施形態においては、プライマー対は、内部モチーフ又はその相補体に相補的である、プライマーのテール領域中のヌクレオチド配列を含むように調製されることができ、及びそれは、標的配列中の内部モチーフ中の興味あるヌクレオチドの有無を検定するために用い得る。プライマーのテール領域のヌクレオチド配列の、そのプライマーの伸長生成物中の内部モチーフへの一時的なハイブリダイゼーションは、本発明において提供される反応の速度を増加し得る。いくつかの状況においては、プライマーのテール領域におけるヌクレオチド配列の、そのプライマーの伸長生成物中の内部モチーフへの親和性が大きいほど、より速い反応が生じ得る。更に、典型的には、そのプライマーの伸長生成物中の、内部モチーフ中のヌクレオチドに結合できる、プライマーのテール領域におけるヌクレオチド配列のヌクレオチドの数が多いほど、伸長生成物のテール領域のヌクレオチド配列の

40

50

伸長生成物の内部モチーフに対する親和性は高い。従って、実施形態においては、標的配列中の興味あるヌクレオチドの有無は、標的配列又はその相補体中の内部モチーフに結合でき、及びテール領域内では、内部モチーフ又はその相補体の中の、特定の興味あるヌクレオチドに対して特異的に結合するヌクレオチドを持つ場合も持たない場合もある、そのプライマーのテール領域におけるヌクレオチド配列を有するプライマーでの使用により決定され得る。典型的には、前記反応は、プライマーのテール領域におけるヌクレオチド配列が、そのプライマーの伸長生成物中のヌクレオチドに相補的なヌクレオチドであって、標的中の興味あるヌクレオチドに対応するヌクレオチドを含む場合に、そのプライマーのテール領域における関連性のあるヌクレオチドが、標的中の興味あるヌクレオチドに対応する、そのプライマーの伸長生成物中のヌクレオチドに相補的ではない場合よりも、速く生じる。

10

【0066】

病原体の1つ以上の抗菌薬に対する反応を試験するために用い得る方法の別の例においては、被験者から得られたサンプルに含まれる病原体は、抗菌薬が存在する微生物成長培地において生育する機会を与えられることができ、及び前記抗菌薬存在下での前記病原体の成長が評価され得る。そのような例においては、典型的には、前記病原体は細菌である。しかしながら、この方法は、真菌、原生生物、寄生虫、又はウイルス等の他の病原体にも適用され得る。本明細書において用いられる、抗菌薬存在下での病原体の成長は、“抗菌薬存在下での成長”と称され得る。病原体が抗菌薬に感受性である状況においては、典型的には前記病原体は、前記抗菌薬の存在下の成長条件下で培養される場合に、前記抗菌薬が無いだけで、同じ条件下で培養された場合に比較して、実質的により少ない成長（無成長を含む）を示す。従って、病原体が耐性を有する抗菌薬の存在する微生物成長培地中で、その病原体が培養される場合、前記病原体は、それでも抗菌薬存在下での成長の高いレベルを有する。対照的に、病原体がその病原体が感受性である抗菌薬が存在する微生物成長培地中で培養される場合、前記病原体は、低いレベル（又は無の）抗菌薬存在下での成長を示す。

20

【0067】

本明細書において用いられる“培養”とは、微生物の成長を支持するために十分な条件中に、微生物を維持することを指す。更に、本明細書における微生物成長培地等（例えば、“成長条件”）中での病原体の成長を支持するために十分な条件への言及は、抗菌薬が混合物中に存在しないか、又は抗菌薬が培地中に存在するが、前記病原体が、前記抗菌薬に耐性を持つ場合には、培地中での前記病原体の成長を支持するために一般的に十分な条件を指す。例えば、もし病原体が、37°Cの温度で、直ちにチョコレート寒天上で成長する場合、チョコレート寒天及び37°Cの条件は、前記病原体の成長を支持するために十分な条件である。しかしながら、もし抗菌薬が微生物成長培地中に存在し、及び前記病原体が、前記抗菌薬に耐性を持たない場合、前記病原体は、成長することができないか、又は前記病原体の成長を支持するために十分ではない条件下で、低減された成長をし得る。従って、本明細書における病原体の成長を支持するために十分な条件への言及は、混合物中の抗菌薬の存在の可能性、又は前記病原体の抗菌薬に対する耐性の可能性を反映しない。もし病原体が、病原体の成長を支持するために十分な条件下で培養されるが、抗菌薬が培地に存在する場合、及び前記病原体が、前記抗菌薬に耐性を持たない場合、前記病原体は成長できないか、又は低減された成長をし得る。逆に言えば、もし病原体が、病原体の成長を支持するために十分な条件下で培養され、抗菌薬が培地中に存在してさえも、前記病原体が、前記抗菌薬に耐性を持つ場合、前記抗菌薬の培地中の存在にも関わらず、前記病原体は、それでも正常に成長することが可能であるか、又は単にわずかに障害を受けた成長ができる。

30

40

【0068】

抗菌薬の存在下での病原体の成長を評価するための従来の方法は、典型的には、抗菌薬への反応としての病原体の抗菌薬存在下での成長の正確な測定が得られる前に、非常に長い培養時間（例えば、少なくとも48、72、又は96時間の培養時間）を含む。本発明に

50

において提供される実施形態では、抗菌薬への反応としての、病原体の抗菌薬存在下の成長は、抗菌薬存在下の成長を支援するために十分な条件下（即ち、病原体成長に適正な成長培地及び適切な温度において）での抗菌薬の存在下での病原体の培養の開始から24、22、20、18、16、14、12、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1時間等で、従来の方法よりも、より迅速に得られることができる。

【0069】

本発明において提供される実施形態では、抗菌薬の存在下での病原体の抗菌薬存在下の成長を迅速に評価するために様々な異なる方法を用い得る。例えば、病原体を興味ある抗菌薬を含む液体成長培地中で培養でき、及び培養の開始後の1つ以上の時点において液体成長培地の光学密度を測定できる。光学密度は、例えば、分光光度計を用いて、600nm又はその近くの波長において測定できる。液体成長培地中で病原体の数が増加すると、前記サンプルの光学密度は増大する。別の例においては、抗菌薬を含む成長培地中の病原体は、成長培地中の抗菌薬と共に前記病原体の培養を開始してから1つ以上の時点で、分裂している病原体細胞の測定（例えば、パーセンテージ、比率、絶対数等）により評価できる。血球計算を用いて細胞の形態学を測定する（例えば、細胞核の分裂又は分裂に先立つ増大したサイズを観察するために）か、又は細胞分裂を示す1つ以上のマーカーについて細胞を評価する（例えば、細胞分裂の間に選択的に発現されるタンパク質（例えば、チューブリン・ホモログFtsZ）に対する抗体により病原体細胞を標識することにより；細胞のそのような標識は例えば、血球計算によりモニターできる）等の様々な方法により、病原体細胞の細胞分裂は評価できる。別の例においては、抗菌薬を含む成長培地中の病原体は、成長培地中の抗菌薬と共に前記病原体の培養を開始してから1つ以上の時点で、複製している病原体細胞又は複製されたDNAを有する病原体細胞を測定（例えば、パーセンテージ、比率、絶対数等）することにより評価できる。前記細胞のDNA内容物は、例えば、核酸染料（例えば、Hoechst染料、DAPI、臭化エチジウム、SYBR染料等）により細胞を染色することにより測定できる。

10

20

【0070】

別の例においては、抗菌薬を含む成長培地中の病原体は、成長培地中の抗菌薬と共に、前記病原体の培養を開始してから1つ以上の時点で、1つ以上の生化学的特性（例えば、1つ以上のタンパク質のレベル、低分子、又は脂質、又は細胞呼吸若しくは代謝活性のレベル）を測定することにより評価できる。そのような生化学的特性は、前記病原体の抗菌薬に対する反応に関する情報を提供できる。一実施形態では、病原体の代謝活性は、前記病原体の抗菌薬に対する感受性又は耐性を決定するためにその抗菌の存在下で検定され得る。例えば、病原体の代謝活性は、抗菌薬及び代謝指標の存在下に微生物成長培地中で前記病原体を培養し、及び代謝産物を検出することにより検定できる。本明細書において用いられる、“代謝指標”は、代謝的に活性な病原体、又は病原体（例えばウイルス）に感染された細胞により、代謝産物を産生するために代謝される能力を有する物質を称する。本明細書において用いられる“代謝産物”は、前記代謝指標の代謝の結果として産生される任意の中間又は生成物を指す。前記代謝産物の検出は、前記病原体が抗菌薬に耐性であることを示す。特定の実施形態では、前記代謝産物は、色、蛍光、又は発光等の検出可能な信号を生成する、代謝指標の例としては、それらには限定されないが、レザズリン、5-シアノ-2,3-ジトリルテトラゾリウムクロリド（CTC）、カルボキシフルオレセインジアセテートサクシニミドイルエステル（CFDA-SE）、及びルシフェリンが挙げられる。各々の代謝指標も例としては、それらには限定されないが、レゾルフィン、CTCフォルマザン、カルボキシフルオレセインサクシニミドイルエステル（carboxyfluorescein succinimidyl ester）（CFSE）、及びオキシルシフェリンが挙げられる。

30

40

【0071】

レザズリン（7-ヒドロキシ-3H-フェノキサジン-3-オン10-オキシド）は非可逆的に還元されピンク色になり、及び高度に赤い蛍光を発するレゾルフィンになるまで、弱い蛍光を発する、青い染料である。代謝的に活性な生きている細胞は、レザズリンをレ

50

ゾルフィンに還元することができ、レゾルフィン、比色分析的に又は約590nmにおける蛍光を測定することにより検出できる。この蛍光出力は生存能力のある細胞数に比例し、及び分光光度計により測定できる。従って、抗菌薬耐性は、検定の蛍光又は色の変化により検出でき、及び抗菌薬感受性は、検定での低いか若しくは無蛍光又は色の無変化により検出できる。CTCは、モノテトラゾリウムのレドックス染色剤であり、青色光(波長480nmにおいて)により励起されたときに検出可能である赤い蛍光を発するCTCフォルマザンに、化学的又は生化学的に還元される。CFDA-SEは、細胞透過性の、非蛍光染料であり、細胞内エステラーゼ酵素により開裂されて蛍光性のCFSEを生成する。ルシフェリンは、ATP及びルシフェラーゼ酵素の存在下で発光性のオキシルシフェリンに変換される低分子である。

10

【0072】

一実施形態では、被験者から得られたサンプルは、前記サンプル中の病原体濃度を増加させるために、上述したように前記抗菌薬及び代謝指標の不在下で前培養されることができ、代替的に、前記サンプルは、もし前記サンプルが前記病原体十分な量を含む場合には、前培養されなくてよい。前記サンプルは、希釈されることができ、次いで抗菌薬及び代謝指標を含む適切な微生物成長培地中で培養される。一実施形態では、前記サンプルは、前記抗菌薬及び前記代謝指標が存在する微生物成長培地中で、約1時間~約8時間培養され得る。別の実施形態では、前記サンプル約2時間~約6時間培養され得る。更なる実施形態においては、前記サンプルは、約10、20、又は30分間以上~約1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10時間以下の間、培養され得る。前記サンプル約37°C

20

【0073】

本発明において提供される方法では、合計反応容積は、約1 μ l~約200 μ lであり得る。特定の実施形態では、合計反応容積は、約10 μ l~約100 μ lであり得る。レザズリン等の代謝指標の全反応中での濃度は、約10、20、30、40、50、60、70、80、90、又は100 μ Mであり得る。別の実施形態では、前記代謝指標濃度は約10~約100 μ Mであり得る。特定の実施形態では、前記代謝指標濃度は約20~約80 μ Mであり得る。一実施形態では、本明細書において記載される方法は、約1、10¹、10²、10³、10⁴、10⁵、10⁶、10⁷、又は10⁸病原体/反応を検出できる。別の実施形態では、この方法は、約10¹~約10⁵病原体/反応を検出できる。

30

【0074】

特定の実施形態では、サンプルは抗菌薬により接触されることができ、及び前記病原体は、細胞死の1つ以上のマーカーについて、前記サンプルへの前記抗菌薬の導入後に、1つ以上の時間間隔で評価され得る。細胞死のマーカーは、例えば、細胞中での1つ以上の生化学的マーカーの発現、染色体構造における変化、又は特定の細胞形態の発展であり得る。細胞死に関する生化学的マーカーは、例えば、タンパク質(例えば、カスパーゼ等のプロテアーゼ)、核酸(例えば、断片化DNA)、又は低分子(例えば、反応性酸素種(ROS))であり得る。実施形態においては、特定の生化学的マーカーのレベルは、細胞が死ぬにつれて増大、又は減少でき(即ち、いくつかのマーカーのレベルは細胞が死ぬにつれ/死んだときに増大でき、及びいくつかのマーカーレベルは、細胞が死ぬにつれ/死んだときに減少できる)。実施形態においては、細胞死に付随する1つ以上の変化について、前記病原体の抗菌薬への曝露の後の1つ以上の時点において評価され得る。この情報は、前記病原体が、抗菌薬に対して耐性であるか、又は感受性であるかを決定するために用い得る。実施形態においては、特定の抗菌薬に暴露された病原体は、1つ以上の染料により染色されることができ、及び染色された病原体の画像が得られることができる。パターン認識方法を介して、試験病原体サンプルの画像からの情報は、試験される前記抗菌薬に対して耐性であるか、又は感受性であることが周知の病原体の画像からの情報と比較され得る。この分析に基づき、前記病原体の興味ある抗菌薬に対する感受性又は耐性が、非常に迅速に決定され得る。

40

【0075】

50

実施形態においては、抗菌薬に対する反応としての病原体抗菌薬存在下の成長の上記の測定のいずれもが、抗菌薬存在下での成長を支持するために十分な条件下での抗菌薬存在下における病原体の培養の開始から、24、22、20、18、16、14、12、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1時間以内に遂行され得る。同様に、実施形態においては、本発明において提供されるシステム及び方法により、前記病原体の抗菌薬耐性の状況は、病原体を含むサンプルを、病原体の抗菌薬耐性について処理を開始してから24、22、20、18、16、14、12、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1時間以内に決定できる。

病原体の存在の検出及び前記病原体の抗菌薬耐性/感受性の検出

【0076】

本明細書に記載されるいずれの方法においても、被験者から得られた第一のサンプルは、病原体の存在についての検定のために用いられることができ、及び被験者から得られた第二のサンプルは、前記病原体の抗菌薬耐性又は感受性の検定のために用いられ得る。代替的に、本明細書に記載されるいずれの方法においても、サンプルの第一の部分は、病原体の存在についての検定のために用いられることができ、及びサンプルの第二の部分は、前記病原体の抗菌薬耐性又は感受性の検定のために用いられ得る。

【0077】

一実施形態では、サンプルの第一の部分又は第一のサンプルは、このサンプルを、PCR、RT-PCR等の、又はWO2014/145291、WO2014/145296、又はWO2014/145298に提供される方法に従って、核酸増幅検定に付すことにより、前記サンプル中の病原体の核酸の存在について検定するために用いることができ、及び前記サンプルの第二の部分又は第二のサンプルは、PCR、RT-PCR、又はWO2014/145291、WO2014/145296、WO2014/145298、又はWO2015/076919に従って提供される方法に従って、前記病原体中の抗菌薬耐性遺伝子又は変異の存在について検定するために用い得る。

【0078】

別の実施形態では、サンプルの第一の部分又は第一のサンプルは、このサンプルを、PCR、RT-PCR等の、又はWO2014/145291、WO2014/145296、又はWO2014/145298に提供される方法に従って、核酸増幅検定に付すことにより、前記サンプル中の病原体の核酸の存在について検定するために用いることができ、及び前記サンプルの第二の部分又は第二のサンプルは、前記病原体の抗菌薬耐性又は感受性について前記抗菌薬中でのサンプル中の病原体の代謝活性についての検定のために用い得る。特定の実施形態では、前記病原体の核酸は微生物マーカー（例えば16SrRNA）であり、及び病原体の代謝活性は、代謝指標（レザズリン）を用いて検定される。

【0079】

一実施形態では、サンプルの第一の部分又は第一のサンプルは、前記サンプルを核酸プローブに基づく反応に付すことにより、前記サンプル中の病原体の核酸の存在について検定するために用いることができ、及び前記サンプルの第二の部分又は第二のサンプルは、前記病原体中の抗菌薬耐性遺伝子又は変異の存在についてPCR、RT-PCR等の、又はWO2014/145291、WO2014/145296、WO2014/145298又はWO2015/076919に提供される方法に従って検定するために用い得る。

【0080】

一実施形態では、サンプルの第一の部分又は第一のサンプルは、前記サンプルを核酸プローブに基づく反応に付すことにより、前記サンプル中の病原体の核酸の存在について検定するために用いることができ、及び前記サンプルの第二の部分又は第二のサンプルは、前記病原体の抗菌薬耐性又は感受性について、前記抗菌薬の存在下での前記サンプル中の病原体の代謝活性を検定するために用い得る。特定の実施形態では、前記病原体の核酸は微生物マーカー（例えば16SrRNA）であり、及び病原体の代謝活性は、代謝指標（レザズリン）を用いて検定される。

【0081】

10

20

30

40

50

本明細書において開示される検定の他のいかなる組み合わせも、病原体の検定を検出し、及び前記病原体の抗菌薬耐性又は感受性を決定するために用い得る。実施形態においては、病原体の存在を検出するための検定、及び前記病原体の抗菌薬耐性又は感受性を決定するための検定は、並行して、又は代替的に、順次に遂行され得る。例えば、病原体の存在を検出するための検定は、最初に行うことができ、及び結果に応じて、前記病原体の抗菌薬耐性又は感受性を決定する検定を、次いで遂行できる。他の実施形態では、病原体の存在を検出するための検定のいかなる部分も、前記病原体の抗菌薬耐性又は感受性を決定するための、いかなる部分とも同時に遂行し得る。

サンプル処理システム及び機器

【0082】

実施形態においては、本発明の方法は、サンプル処理機器において遂行され得る。本明細書において提供されるサンプル処理のサンプル、カートリッジ、システム、又は方法は、参照によりその全体が全ての目的で本明細書に組み込まれる、米国特許第088,593号、WO2014/127379、米国特許公開2015/0072362号、又はWO2015/035260に記載される任意の特性を有し得る。

【0083】

本明細書において提供される実施形態は、図1を参照して記載できる。サンプル110が、サンプル処理機器100内に導入され得る。

【0084】

前記サンプル処理機器100は、サンプル取扱いシステム等のサンプルを処理するための筐体内の1つ以上のハードウェア構成要素を含む装置であることができ、その中に、流体取扱いシステム、加熱要素、遠心分離機、それらには限定はされないが、光ダイオード、光電子増倍管チューブ(PMT)、分光光度計、光学センサー(例えば、発光、蛍光、吸光度、又は比色のための)、カメラを含む検出器、及び血球計算器、ピペット、熱的制御装置、及び制御装置を含む。本明細書において用いられる用語“サンプル取扱いシステム”は、サンプルの画像化、検出、位置決め、再位置決め、保持、取り込み、及び預入を支援するために構成された機器又はシステムを指す。一例においては、ピペッティング能力を持つロボットがサンプル取扱いシステムである。別の例においては、(他の)ロボット能力を、持って、又は持たなくてもよいピペットが、サンプル取扱いシステムである。サンプル取扱いシステムは、それらに限定はされないが、体液、分泌物、又は組織サンプルを含む、サンプルのいかなる種類をも運送することができる。サンプル取扱いシステムは、流体、固体、又は半固体を取り扱う能力を有する。サンプル取扱いシステムは、サンプル並びに/又は前記機器内のサンプル処理に有用であり及び/若しくは必要である前記機器内の任意の他の物質を受け入れること、預け入れること、及び/又は移動することのための能力を有することができる。サンプル取扱いシステムは、サンプル及び/又は機器内の他の任意の物質を含み得る、コンテナ若しくは容器(例えば、検定ユニット、試薬ユニット)を、受け入れること、預け入れること、及び/又は移動するための能力を有し得る。いくつかの状況においては、サンプル取扱いシステムは流体取扱いシステムである。本明細書における任意の流体取扱いシステムの記載は、他のサンプル取扱いシステムに適用されることができ、およびその逆も成立つ。前記流体取扱いシステムは、ポンプ及び様々な種類のバルブ又は限定はされないが、容積式ピペット、空気置換式ピペット及び吸引式ピペットを含み得るピペットを含み得る。流体取扱いシステムはチップを含み得る。例えば、ピペット・チップは、取外し可能にピペットに結合され得る。前記チップは、ピペット・ノズルと連結できる。サンプル処理機器100は、例えば、そのすべてが、参照によりその全体が全ての目的で本明細書に組み込まれる、WO2014/127379、米国特許第088,593号、又は米国特許第435,738号に記載される任意の特徴を有し得る。

【0085】

前記サンプル110は、前記サンプル処理機器100に、任意の適切な構造又は方法により導入され得る。実施形態においては、サンプル110は、前記サンプル処理機器100

10

20

30

40

50

に直接導入され得る。他の実施形態では、サンプル 110 は、最初にカートリッジ内に導入されることができ、及び前記カートリッジが次いで前記サンプル処理機器内に導入され得る。カートリッジはサンプル処理に用いられる試薬、他のサンプル、又は他の構成要素を含み得る。実施形態においては、カートリッジは、WO 2014 / 127379、米国特許第 088,593 号、又は米国特許第 435,738 号に記載されるカートリッジの任意の特徴を有することができるか、又はサンプルは、サンプル処理機器に、これらの文書に記載される任意の方法により導入され得る。

【0086】

図 2 を参照し、カートリッジ 9900 の 1 つの非限定的な実施例について記載する。この実施形態は、異なる種類の機器、チップ、試薬、反応位置等を提供するために前記カートリッジ 9900 上に複数の異なる領域 9920 ~ 9940 があり得ることを示している。1 つの非限定的な実施例では、前記カートリッジ 9900 上のこれらの領域の 1 つは、これらの領域の 1 つの中に少なくとも 1 つの本明細書において記載される 1 つ以上の抗菌薬又は他の薬剤を収容できる容器又はコンテナを含むことができる。これらの構成要素の混合は、前記カートリッジ 9900 を用いて遂行されるべき検定の種類に依存する。非制限的な実施例として、前記カートリッジ 9900 は、1 つ以上のサンプル・コンテナ、ピペット・チップ、顕微鏡キュベット、大容積ピペット・チップ、大容積試薬ウエル、大容積ストリップ、反応容器の線形アレイを持つキュベット、丸底容器、キャップ取り外しチップ、遠心分離容器、光学的測定のために構成された遠心分離容器、及び / 又は核酸増幅容器を受け入れるための領域を有し得る。上記の任意の一つは異なる領域 9920 ~ 9940 の中にあり得る。ある場合にはチップ及び容器を、それぞれの全体が、参照により本出願に全ての目的で組み込まれる、同一出願人による WO 2014 / 127379、米国特許第 088,593 号又は米国特許第 435,738 号、において示される前記カートリッジのものと同様のアレー中に配列できる。

10

20

【0087】

非制限的な実施例として、前記試薬も、前記カートリッジ中で変更することができ、及び限定はされないが、可能性のある病原体についてのパネル、脂質パネル又は Chem 14 パネル又は 2 つ以上の異なる臨床試験パネル、その他の組み合わせ等の、少なくとも 2 つ以上のタイプの検定パネルを遂行するために、少なくとも望まれるものを含むように選択され得る。例えば、いくつかのカートリッジは、核酸増幅、核酸プローブに基づく反応、代謝 / 生化学的検定、一般化学、免疫学的検定、又は血球計算から選ばれる、少なくとも 2 つの異なる検定タイプを支持する試薬、希釈剤、及び / 又は反応容器を有し得る。

30

【0088】

前記カートリッジの構成要素の任意の 1 つ以上は、前記サンプル処理機器のサンプル取扱いシステム、又は流体取扱いシステムによりアクセスされ得る。前記カートリッジ内の異なるゾーンは、このシステムにおいて用いられるピペットのピッチに適合するために構成され得る。随意的に、いくつかのゾーンは、ピペット・ヘッドのピッチの倍数又は分数のピッチになるように構成される。例えば、前記カートリッジのいくつかの構成要素は、1 / 3 x 前記ピッチであり、他のものは 1 / 2 x 前記ピペットのピッチ、他のものは 1 x ピッチ、他のものは 2 x ピッチ、更に他のものは 4 x ピッチである。

40

【0089】

未だに図 2 を参照するが、前記カートリッジの一平面に配置される構成要素があり得る一方で、他のものはより低い又はより高い平面に配置され得ることを理解されたい。例えば、いくつかの構成要素は、キュベット又は他の構成要素の下に配置され得る。従って、一旦上部の構成要素が取り除かれると、その下部の構成要素がアクセス可能になる。この多層アプローチは、カートリッジ上の構成要素に関して、より大きな充填密度を提供する。前記システム中で配置を受ける前記カートリッジ上の適合するスロットに係合するために構成された、それには限定されないが、ルール 9834 等の位置決め特徴も前記カートリッジ 9900 上にあり得る。前記カートリッジは、前記カートリッジが一旦前記システムにより認識されると、前記カートリッジの構成要素に正確に係合することを可能にする

50

、システム登録特徴（物理的、光学的等の）も有し得る。非制限的な実施例として、検定処理の間に、構成要素が前記カートリッジ 9900 から取り除かれることができるが、いくつかの実施形態は、統一的な廃棄のために、全ての構成要素が、前記カートリッジに戻ることを許容し得ることを理解されたい。随意的に、前記システムのいくつかの実施形態は、前記カートリッジを前記システムから排出するに先立ち、それらの前記カートリッジの構成要素を、前記カートリッジに戻さないで廃棄するための、廃棄領域、コンテナ、傾斜台等を有し得る。いくつかの実施形態では、これらの領域は、前記システムが、廃棄物を受け取るための専用領域であり得る。

【0090】

図3を参照し、前記カートリッジの別の実施形態について記載する。この実施形態は、低下された高さのカートリッジ 9901 を用いること以外は、図2の実施形態と同様であり、その側壁が低下された垂直高さを有する。このことは、廃棄のための、より少ない材料の使用を提供し、及び反応容器及び/又は試薬の節約をもたらす。再度、1つの非制限的な実施例では、前記カートリッジ 9901 上の、これらの領域の1つは、これらの領域の1つの上に、本明細書において記載される1つ以上の抗菌薬又は他の薬剤を収容できる少なくとも1つの容器又はコンテナを含み得る。

10

【0091】

別の実施形態では、図4Aは、拭い取りを保持するための例示的な容器（拭い取りコンテナ）及び貯蔵所（例えば、拭い取りコンテナ、試薬容器、検定ユニット、混合容器、輸送ユニット、ピペット・チップ、廃棄物容器、及びサンプル収集容器のための空洞及びウエル）を含む例示的な試薬容器、反応容器、及び他の容器及び備品を保持するために構成されたカートリッジを示す。拭い取りは、被験者からサンプルを取得するために用い得る。被験者は、自分自身で、拭い取りを用いてサンプルを取得できるか、又は医療専門家（例えば、採血技術者、看護師、又は医師）が、被験者からサンプルを取得するために、拭い取りを用い得る。拭い取りは、被験者の鼻、喉、口、耳、皮膚、又は他の身体の領域等からサンプルを取得するために用い得る。拭い取りコンテナから出ている矢印は、拭い取りコンテナが、前記カートリッジ中の貯蔵所内にどのように配置され得るかを示す。

20

【0092】

図4Bは、例示的な拭い取りコンテナ（拭い取りを保持するために構成された）、及び例示的なカートリッジ（試薬及び容器のための洞及びウエルを含み、及び試薬容器、反応容器、及び他の容器及び備品を保持するために構成される）を示す。図4Aの実施形態に示される、試薬容器、反応容器、他の容器及び備品を保持するために構成された空洞及びウエルに加えて、図4Bに示される例示的なカートリッジは、他のサンプル容器、例えば、血液又は尿サンプル容器を、拭い取りコンテナに加えて保持するために適切な空洞及びウエルを含む。拭い取りコンテナから出ている矢印は、拭い取りコンテナが、前記カートリッジ中の貯蔵所内にどのように配置され得るかを示す。

30

【0093】

図4Cは、例示的な拭い取りコンテナ、及び拭い取り及び拭い取りコンテナを保持するための空洞及びウエルと同時に、試薬容器、反応容器、及び他の容器及び備品（随意的に他のサンプル容器、例えば、血液又は尿サンプル容器を含む）を保持するために構成された空洞及びウエルを含む例示的なカートリッジを示す。拭い取りコンテナから出ている矢印は、拭い取りコンテナが、前記カートリッジ中の貯蔵所内にどのように配置され得るかを示す。拭い取りコンテナから出ている矢印は、拭い取りコンテナが、前記カートリッジ中の拭い取りコンテナ貯蔵所内にどのように配置され得るかを示す。

40

【0094】

図4A、図4B、及び図4Cに示されるように、拭い取りを保持するための容器は、それが処理のために必要とされるまでカートリッジの上に充填されて保持されることができ；このカートリッジサンプル処理機器の上に充填されることができ、それにより拭い取りを（及び任意の他のサンプル又はサンプルコンテナを前記カートリッジ上に同様に）充填する。図4A、4B、及び4Cは、拭い取りを保持するための例示的なコンテナ（拭い取り

50

コンテナ)及び例示的なカートリッジ(試薬及び容器のための空洞及びウエルを含み、及び例えば、血液又は尿サンプル容器他のサンプル容器を含む、試薬容器、検定ユニット、混合容器、ピペット・チップ、輸送ユニット、及び他の容器及び備品の1つ以上を保持するために構成された)を示す。拭い取りコンテナから出ている矢印は、拭い取りコンテナが、前記カートリッジ中貯蔵所内にどのように配置され得るかを示す。

【0095】

図4Aに示されるように、拭い取りを保持するための容器(拭い取りコンテナ10)は、貯蔵所30内に配置することによりカートリッジ20上に充填され得る。示されている前記カートリッジ20は、試薬及び容器を受け取り及び保持するための空洞及び孔40も含む。拭い取りコンテナ10は、拭い取り容器10の中の場所に拭い取りを含むことができるか、又は拭い取りコンテナ10の中の場所に拭い取りを持たずに、カートリッジの上に充填され得る。

10

【0096】

図4Bに示されるように、拭い取りコンテナ10は、貯蔵所30中に配置することにより、カートリッジ20の上に充填され得る。示されているように、前記カートリッジ20は、試薬及び容器を受け取り及び保持するための空洞及びウエル40も含む。図20Bに示される実施形態では、前記カートリッジ20は、サンプル収集容器50も含み、これは、例えば、血液、尿、又は他のサンプルを保持し得る。拭い取り容器10から出ている矢印は、拭い取り容器10が、前記カートリッジ20中のレセプタクル30中にどのように配置され得るかを示す。従って、図4Bに示されるように、拭い取りコンテナ10はカートリッジ20の上に充填され、そこに分析のために必要とされるまで保持され;前記カートリッジ20は分析機器又は分析システム上に充填されることができ、それにより拭い取りコンテナ10(及び同様に前記カートリッジ20の上に同様に配置されているサンプルコンテナ又はサンプルコンテナがあれば、それらも)を充填する。カートリッジ20は貯蔵所30を有し得る。図4Bに示されるように、拭い取りコンテナ10貯蔵所30中に配置することにより、カートリッジ20の上に充填され得る。前記カートリッジ20は、試薬及び容器を受け取り及び保持するための空洞及びウエル40も含む。前記カートリッジ20は、サンプル収集容器50も含み、これは、例えば、血液、尿、唾液又は他のサンプルを保持し得る。前記サンプル収集容器50は、前記カートリッジ20中のサンプル収集容器貯蔵所51の適切な位置において示される。拭い取りコンテナ10から出ている矢印は、拭い取りコンテナ10が、前記カートリッジ20中の貯蔵所内にどのように配置され得るかを示す。

20

30

【0097】

図4Cに示されるように、拭い取りコンテナ10は、貯蔵所30中に配置することにより、カートリッジ20の上に充填され得る。示されているように、前記カートリッジ20は、試薬及び容器を受け取り及び保持するための空洞及びウエル40も含む。図4Cの実施形態に示されるように、前記カートリッジ20は、拭い取り70を保持するために構成された拭い取り貯蔵所60を含む。実施形態(例えば、図4Cに図示される実施形態)では、拭い取り貯蔵所を有する60カートリッジ20は、随意的に、例えば、血液、尿、又は他のサンプルを保持できるサンプル収集容器50を含み得る。そのような拭い取り70は、サンプルを収集することにおいて用いられる前に、拭い取り貯蔵所60の中に保持され得る。実施形態においては、拭い取り70は、拭い取り70によりサンプルを収集した後で、拭い取り容器10の中に配置され得る。図4Cに示される実施形態では、拭い取り容器10は、拭い取り70の使用の前に、拭い取り容器10の中の場所に拭い取りを持たないでカートリッジの上に充填されることができ、及び拭い取り容器10は、貯蔵所30中に戻されることができ、拭い取り70によるサンプルの収集の後で、拭い取り70を拭い取り容器10の中に保持する。

40

【0098】

実施形態においては、カートリッジは1つ以上の抗菌薬を含み得る。カートリッジ内では、抗菌薬は、分離された構造(例えば、流体的に分離されたウエル又は容器)中に提供さ

50

れることができるので、前記カートリッジ中では、前記抗菌薬は、最初は他の試薬又はサンプルとは直接接触しない。一旦カートリッジが、サンプル処理機器中に挿入されると、前記抗菌薬には、前記カートリッジ中の1つ以上の他の試薬又はサンプルとの接触がもたらされ得る（例えば、流体取扱いシステムにより）。抗菌薬は、乾燥された、溶液中、又は懸濁物中等の任意の適切な形状であることができる。カートリッジは、例えば、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15以上の異なる特異的な抗菌薬化合物又は異なるクラスの抗菌薬化合物を含み得る。特定の実施形態では、抗菌薬は、カートリッジ中で微生物成長培地又は他の適切な物質と、あらかじめ混合され得る。

【0099】

実施形態においては、一旦サンプル110がサンプル処理機器100中に導入されると（図1に示されるように）、前記サンプル110は、前記サンプル処理機器100内で複数の異なる方法により処理され得る。例えば、前記サンプル処理機器100内では、サンプル110は少なくとも2つの異なる流体的に分離された部分（例えば、少なくとも第一の部分及び第二の部分）に、流体取扱いシステムにより分割され得る。前記第一の部分は、少なくとも第一の臨床検査又はその一部分に用いることができ、及び第二の部分は、少なくとも第二の臨床検査又はその一部分に用いることができる。実施形態においては、前記サンプルの第一の部分は、前記サンプル中に特定の興味ある病原体が存在するかを決定するための第一の臨床検査に用いることができ、及び前記サンプルの第二の部分は、サンプル中の病原体抗菌薬に耐性を持つか、又は感受性であるかを決定するための第二の臨床検査に用いることができる。

10

20

【0100】

実施形態においては、少なくとも2つのサンプルが、サンプル処理機器内に導入されることができ、及びそれぞれのサンプルは、異なるサンプル処理機器内で処理され得る。例えば、第一のサンプルは少なくとも第一の臨床検査又はその一部分に用いることができ、及び第二のサンプルは、少なくとも第二の臨床検査又はその一部分に用いることができる。実施形態においては、前記第一のサンプルは、前記サンプル中に特定の興味ある病原体が存在するかを決定するための第一の臨床検査に用いることができ、及び前記第二のサンプルは、サンプル中の病原体抗菌薬に耐性を持つか、又は感受性であるかを決定するための第二の臨床検査に用いることができる。実施形態においては、前記カートリッジは、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10以上のサンプルを含み得る。前記1つ以上のサンプルは、前記カートリッジ内の別々の流体的に分離された容器内に提供されることができ、及び前記サンプル処理機器に導入され得る。

30

【0101】

実施形態においては、サンプル中の病原体の存在、及び/又は病原体の抗菌薬に対する反応を試験するための検定は、本発明において提供されるサンプル処理機器100内で、自動化された処理による生じ得る。実施形態においては、サンプルの一部分は、前記サンプル中の病原体の抗菌薬に対する反応を試験するために直接使用され得る。他の実施形態では、サンプル中の病原体は、最初に前記サンプル処理機器内で、（例えば、病原体のための抗体に基づく捕捉表面の使用、病原体の培養、病原体を、その病原体の液体懸濁物を含むチューブの底に向かって移動するための遠心分離、又は病原体の液体懸濁物からその病原体を捕捉するためのろ過等の物理的な方法により）富化されるか、又は濃縮されることができ、及びこの富化されたか、又は濃縮された病原体は、前記病原体の存在又は病原体の抗菌薬に対する反応のための試験に用いられ得る。従って、前記サンプル処理機器は、前記病原体の富化又は濃縮のための、遠心分離等の構成要素を含み得る。加えて、前記病原体富化又は濃縮するための試薬又は構成要素が、カートリッジを經由して前記サンプル処理機器に提供され得る。例えば、前記カートリッジは、前記病原体に結合するための、抗体に基づく捕捉表面、前記病原体を培養するための成長培地、前記病原体を遠心分離するための遠心分離容器、及び前記病原体を捕捉するためのフィルターを含み得る。前記試薬又は構成要素のそれぞれは、前記カートリッジ中の、別々の、流体的に分離された容器又は槽の中に提供され得る。

40

50

【0102】

本発明において提供される実施形態では、サンプル処理機器100内に導入されたサンプル110の1つ以上の部分は、1つ以上の抗菌薬に対する病原体の反応を試験するための検定において用いられ得る。抗菌薬の存在下での病原体の成長を測定するために、微生物成長培地及び抗菌薬が、サンプル処理機器内に提供され得る。加えて、核酸染料、代謝指標（レザズリン等の）、又は他の試薬が、抗菌薬の存在下での病原体の成長を検定するために提供され得る。実施形態においては、成長培地が、機器内での処理のためにサンプルも含むカートリッジを介して、サンプル処理機器中に導入され得る。他の実施形態では、成長培地は、サンプルの機器中への導入とは別にサンプル処理機器に導入され得る。実施形態においては、数の異なるタイプの病原体の成長を支持するために、複数の異なるタイプの成長培地がサンプル処理機器中に導入される（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20以上の異なるタイプの病原体の成長を支持するための、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20以上の異なるタイプの成長培地）。実施形態においては、単一のタイプの成長培地の複数の異なる別々の流体的に分離された部分が、サンプル処理機器中に導入され得る（単独又は他のタイプの成長培地との組み合わせで）。実施形態においては、単一の容器中の成長培地は、サンプル処理機器内で、流体取扱いシステム等により2つ以上の部分に分割され得る。

10

【0103】

実施形態においては、サンプル処理機器中に導入された成長培地は、病原体の成長を検定するために抗菌薬とあらかじめ混合されることができ、成長培地を前記サンプル処理機器に導入する時点では前記抗菌薬はすでに成長培地中にある。他の実施形態では、成長培地がサンプル処理機器に導入されるときには、成長培地は抗菌薬を含んでおらず、及び次いで抗菌薬が、前記サンプル処理機器内の成長培地に加えらる。例えば、成長培地は、カートリッジを経由してサンプル処理機器に導入されることができ、及び前記カートリッジは、成長培地及び抗菌薬を別々の容器中に含み得る。前記サンプル処理機器中に入ると、前記抗菌薬及び成長培地は混合されることができ（例えば、液体形状、又は懸濁形状の前記抗菌薬を吸入し、及び次いで前記抗菌薬を成長培地中に分注するか、又は前記液体成長培地を吸入し、及び液体又は固体形状の前記抗菌薬中に分注することにより、流体取扱いシステムが、前記抗菌薬及び成長培地の間に流体的連結をもたらすことができる）。更に、前記サンプルには、前記流体取扱いシステムにより、前記抗菌薬及び成長培地との流体的連結がもたらされる。

20

30

【0104】

実施形態においては、サンプル処理機器中に導入された前記成長培地は、抗菌薬及び代謝指標とあらかじめ混合され得る。他の実施形態では、前記成長培地は、i s 抗菌薬とあらかじめ混合され、及び前記代謝指標が、前記サンプル処理機器中の成長培地に加えらる。他の実施形態では、前記成長培地は、サンプル処理機器中に導入されるときには抗菌薬又は代謝指標を含まないが、前記抗菌薬及び代謝指標が、前記サンプル処理機器中の成長培地に加えらる。例えば、カートリッジは、成長培地、抗菌薬、及び代謝指標を別々の容器中に含み得る。前記サンプル処理機器中に入ると、前記抗菌薬、成長培地、及び代謝指標は、前記流体取扱いシステムにより混合され得る。別の例においては、前記抗菌薬及び成長培地は、カートリッジ内の同じ容器中にある。更に別の例では、前記抗菌薬、成長培地、及び代謝指標は、カートリッジ内の同じ容器中にある。更に、前記サンプルには、前記流体取扱いシステムにより、前記抗菌薬、成長培地、及び代謝指標との流体的連結がもたらされ得る。

40

【0105】

いくつかの実施形態では、複数の異なる抗菌薬がサンプル処理機器中に導入され得るので、所望に応じて、異なる抗菌薬が成長培地中に導入され得る。例えば、成長培地及び第一の抗菌薬及び第二の抗菌薬を運搬するカートリッジは、サンプル処理機器中に導入され得る。前記サンプル処理機器中に入ると、試験されるべき前記病原体又は抗菌薬耐性について選択されたプロトコルに基づき、第一の抗菌薬又は第二の抗菌薬のいずれかが前記成

50

長培地と混合され得る。従って、本発明において提供される実施形態に従うと、本明細書において提供されるサンプル処理機器中で、その中のサンプル又は病原体についての様々な異なる処理目的に従って異なる抗菌薬が、異なる成長培地と、混合・適合され得る。

【0106】

例えば、本発明において提供される実施形態により、成長培地及び第一の抗菌薬及び第二の抗菌薬を含むサンプル処理機器の制御装置にプロトコルが提供されることができ、前記プロトコルは、サンプル中で同定された病原体及び/又は前記病原体に対して試験する興味ある抗菌薬に依存して、前記サンプル処理機器により、第一の抗菌薬又は第二の抗菌薬のいずれかを前記成長培地と混合するための、流体取扱いシステム（例えば、自動化されたピペット）のための指示を含む。実施形態においては、病原体を、抗菌薬の存在下での成長について、そのオリジナルのサンプルから病原体を別の成長培地に移動させることなく評価し得る。そのような例においては、抗菌薬は、病原体を含むサンプルと直接混合されることができ、及び前記病原体の前記抗菌薬に対する反応が、続いて評価され得る。抗菌薬を含む成長培地中での病原体の成長についての、本明細書におけるいかなる記載も、文脈が明確に他のことを支持しない限り、前記抗菌薬が、病原体を含むサンプルに直接導入される条件にも適用され得る。抗菌薬への反応としてのウイルスの成長が評価される場合には、典型的には、前記ウイルスのための成長培地は、その中でウイルスが複製できる宿主細胞を含む。

10

【0107】

実施形態においては、病原体を含み得るサンプルは、前記サンプルが、可能性のある病原体のクラスからのバクテリア、ウイルス、真菌、寄生虫、又は原生生物等の、少なくとも1つのタイプの生命体を含むことを示す、1つ以上のマーカーについて、サンプル処理機器中で処理され得る。例えば、サンプルは、前記サンプル処理機器により、16SrRNA、23SrRNA、rpoB、gyrB、dnaK、amoA、及びmip遺伝子、又はその遺伝子産物等の微生物マーカーについて検定され得る。別の例においては、サンプルは、リボソームのシストロンの内部転写スペーサー（ITS）領域等の真菌マーカーについて検定され得る。前記1つ以上のマーカーは、前記サンプル処理機器中で、核酸増幅、核酸プローブに基づく反応、又は他の任意の適切な検定により検出され得る。一実施形態では、前記核酸増幅反応のための試薬及び/又は核酸プローブに基づく反応のための試薬は、カートリッジ中に提供され得る。前記カートリッジは、前記サンプルも別々の流体的に分離された容器中に含み得る。前記試薬及びサンプルは、前記カートリッジを前記サンプル処理機器中に挿入することにより、前記サンプル処理機器中に導入され得る。一実施形態では、前記サンプル処理機器の流体取扱いシステムは、サンプル、又はその一部を、前記核酸増幅及び/又は核酸プローブに基づく反応のための試薬との流体連結をもたらすために輸送する。前記混合物は、次いで前記サンプル中の病原体の核酸の増幅を支持するために十分な条件下でインキュベートされ得るか、又は前記サンプル中の病原体の核酸に対する核酸プローブのハイブリダイゼーションを支持するために十分な条件下でインキュベートされ得る。

20

30

【0108】

核酸増幅又は核酸プローブに基づく反応を遂行するサンプル処理機器は、熱的制御ユニット等の核酸検定の遂行を促進するための1つ以上のハードウェア構成要素を含み得る。前記熱的制御ユニットは、核酸検定を遂行又は支持するために（例えば、PCR検定のための熱サイクル、若しくは等温検定、又は核酸プローブに基づく反応のために選択された一定の温度を維持するために）、選択された温度又は温度範囲又はサイクルを維持し得る。前記サンプル処理機器は、更に前記核酸検定をモニターするために、及び非核酸検定（例えば、一般化学検定、免疫学的検定、代謝検定等）を測定するためにも用いられる、1つ以上の検出器又はセンサーを含むことができる。

40

【0109】

他の実施形態では、病原体を、細胞分裂、DNA複製、又は他の前記病原体の特性について検定するために、病原体は、前記機器内の流体取扱いシステムにより、前記サンプル処

50

理機器内の血球計算器に移動されることができ、そこでは前記サンプル血球計算器は、顕微鏡のスライドを受け取ることができる、顕微鏡のステージを含む。実施形態においては、サンプルは顕微鏡のスライドを含むカートリッジに提供され、及び前記カートリッジは、前記サンプル処理機器中に挿入される。前記病原体は、次いで前記サンプル処理機器内の顕微鏡のスライドの上に導入される。

【0110】

実施形態においては、本発明において提供されるシステム及び方法により、細胞死を示すマーカー、染色体構造における変化、又は特定の細胞形態の発展等の細胞中の1つ以上の生化学的マーカーの発現が、上述したように測定され得る。前記サンプルは、抗菌薬により接触されることができ、及び前記病原体は、細胞死の1つ以上のマーカーについて、前記抗菌薬を前記サンプルに導入した後に、1つ以上の時間間隔の後に評価され得る。実施形態においては、前記細胞死の1つ以上のマーカーは、特定の抗菌薬に曝露された病原体を染色し、及び前記サンプル処理機器中で画像化することにより検出し得る。実施形態においては、サンプルは、染料を含むカートリッジに提供されることができ、及び前記カートリッジは、電荷結合素子(CCD)カメラ又はCMOSセンサー等の画像捕捉機器を含む前記サンプル処理機器内に挿入される。実施形態においては、前記サンプルの染色及び画像化は前記サンプル処理機器で自動化される。

10

【0111】

実施形態においては、前記サンプル中の病原体の検出又は同定のための複数の異なる試薬が、サンプル処理機器に提供され得る。そのような複数の異なる試薬は、サンプル処理機器に、例えば、処理のためのサンプルも含むカートリッジ中で提供され得る。例えば、単一のカートリッジ内に、以下のタイプの試薬の任意の数及び組み合わせが提供され得る：

- a) 病原体からの特定の核酸の存在を検出し、及びそれにより前記サンプル中の病原体の存在を示すための、核酸増幅反応のためのプライマー対(即ち、第一のプライマー及び第二のプライマーを含む)；
- b) 病原体中の特定の抗菌薬耐性遺伝子の存在を検出し、及びそれにより前記サンプル中の抗菌薬耐性遺伝子の存在を示すための、核酸増幅反応のためのプライマー対；
- c) 病原体中の特定の抗菌薬耐性変異(例えば、遺伝子中の点変異)の存在を検出し、及びそれにより前記サンプル中の抗菌薬耐性変異を示すための、核酸増幅反応のためのプライマー対；
- d) 微生物のクラス(例えば、バクテリア、ウイルス、又は真菌)を示す核酸配列を検出し、及びそれにより前記サンプル中の微生物の一般的なクラスの微生物の存在を示すための、核酸増幅反応のためのプライマー対；
- e) 前記サンプル中の病原体の存在を決定するための、核酸プローブに基づく反応に用いる、病原体の標的核酸に特異的な核酸プローブ；
- f) 前記病原体中の抗菌薬耐性遺伝子を決定するための、核酸プローブに基づく反応に用いる病原体中の抗菌薬耐性遺伝子に特異的な核酸プローブ；
- g) 前記抗菌薬耐性変異の存在を決定するために、核酸プローブに基づく反応に用いる、病原体中の抗菌薬耐性変異(例えば、遺伝子中の点変異)に特異的な核酸プローブ；
- h) 微生物のクラスの存在を検出するための、核酸プローブに基づく反応に用いる、微生物のクラス(例えば、バクテリア、ウイルス、又は真菌)を示す核酸配列に特異的な核酸プローブ；
- i) 興味ある病原体のための成長培地；
- j) 抗菌薬への病原体の反応を決定するために、前記病原体が、前記抗菌薬の存在下で、前記成長培地中での成長の機会を与えられ得るような抗菌薬；
- k) 核酸染料(例えば、Hoechst染料、DAPI、臭化エチジウム、SYBR染料)；及び
- l) 抗菌薬の存在下での病原体の成長を検出するための代謝指標(例えばレザズリン、CTC、CFDA-SE、及びルシフェリン)。更に、実施形態においては、複数の数の(例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10以上の)任意の上記の試薬が、サンプル処理機器に提供されることができ、及びそのような試薬は異なるプライマー、プローブ、抗菌薬、成長培地等であってよい。一実施形態では、特定の検定に必要な全ての試薬も、本明細書において記載されるカートリッジを介して、サンプル処理機器に提供され得る。一実施形態では、前記試薬のそれぞれは、カートリッジ中の別々の流体的に分離された容器内であってよい。別の実施形態では、試薬の任意の数又は組み合わせが容器が、カートリッジ中の同じ容器内にあることができる。

20

30

40

50

【0112】

本発明において提供されるシステム及び方法により、サンプルは病原体について評価されることができ、及び実施形態においては、前記サンプル中の可能性のある病原体の、以下の1、2、3、又は4つの全ての特性が評価され得る：a) サンプル中に存在する病原体のクラス（例えば、バクテリア、ウイルス、又は真菌）；b) サンプル中の病原体の特定の種、亜種、又は菌株；c) サンプル中の病原体の抗菌薬に対する成長反応；又はd) その中のサンプル又は病原体が、抗菌薬耐性遺伝子または抗菌薬耐性変異を含んでいるかどうか。更に、サンプルは、病原体の異なるクラス、又は病原体の異なる種、亜種、又は菌株について検定されることができ、及び病原体は、異なる抗菌薬への反応又は抗菌薬耐性遺伝子について検定され得る。実施形態においては、検定のいずれか、又はすべてが、単一のサンプル処理機器の筐体内で遂行され得る。他の実施形態では、前記検定は、1つ以上のサンプル処理機器により遂行され得る。

10

【0113】

実施形態においては、フィードバック・ループは、本発明において提供される、システム、機器、及び方法において別の検定が開始又は完了した後に、開始されるべき後続する検定、調製ステップ、及び/又は他の処理を引き起こし得る、反射試験を許容し得る。そのような後続する検定、調製ステップ、及び/又は他の処理は、人間の介入なしで自動的に開始され得る。随意的に、反射試験は、第一の検定結果への応答として遂行される。例えば、カートリッジが、サンプル中の病原体の存在の検出のための第一の検定のための試薬（病原体の核酸を検出するための核酸増幅反応のための試薬）及び病原体の抗菌薬耐性又は感受性を決定するための第二の検定のための試薬（例えば抗菌薬、微生物成長培地、及び代謝指標）と共にあらかじめ充填されることができ、もし前記第一の検定の結果が、病原体が前記サンプル中に存在することを示すと、前記第二の検定が、前記機器中の同じサンプルについて実行される。前記機器プロトコルは、反射試験を実行する可能性を組み入れるように計画される。前記第二の検定のいくつかの、又は全てのプロトコルステップは、前記第一の検定が完了する前に開始又は遂行され得る。例えば、前記サンプルの微生物成長培地中での抗菌薬の存在下での培養は、病原体の存在の検出のための検定が完了する前に開始され得る。

20

【0114】

実施形態においては、サンプルは、そのサンプル中に存在する病原体のパネル、及び前記パネル中の1つ以上の病原体中に存在する1つ以上の抗菌薬耐性形質について検定され得る。例えば、サンプル複数の性感染疾患病原体、について試験されることができ、及び前記サンプルは、1つ以上の抗菌薬に対する、そのような病原体の反応についても評価され得る。本明細書において提供されるシステム及び方法に従い試験され得る、パネルの他の例としては、院内感染パネル（例えば、MRSA）、又は熱帯病病原体パネルが挙げられる。実施形態においては、被験者が患者ケアの場所（例えば、病院又はクリニック）に受け入れられる前に、被験者は、1つ以上の病原体又は病原体のパネルについて試験されることができ、及び患者ケアの場所に受け入れられると、それに加えて、又は別々に、1つ以上の病原体又は病原体のパネルについて試験される。本明細書において提供されるシステム及び方法は、患者を感染症について継続的にモニターするために用いることができ、及び従ってケアの場所における患者又は自宅内の患者のケアを改善するために用い得る。例えば、患者が特定の抗菌薬に感受性である、病原体により感染されていると決定された場合、前記患者には前記抗菌薬が投与され得る。特定の実施形態では、例えば、もし患者が感染症に罹患しているが手術も必要とする場合、手術中に使われ得る、又は手術中に被験者に埋め込まれる物体（パッチ等）は、感染起因病原体の成長を阻害する抗菌薬によりあらかじめ被覆されるか、さもなければそれらには抗菌薬が組み込まれる。

30

40

【0115】

実施形態においては、サンプル処理機器は、サンプルから得られたデータを送信するために構成されることができ、実施形態では、サンプル処理機器は、ネットワークを通じて通信するために構成され得る。サンプル処理機器は、ネットワークと連結できるための通

50

信モジュールを含み得る。サンプル処理機器は、有線接続又は無線的にネットワークに接続され得る。前記ネットワークは、ローカル・エリア・ネットワーク（LAN）またはインターネットなどの広域ネットワーク（WAN）などのネットワークであり得る。いくつかの実施形態では、前記ネットワークはパーソナル・エリア・ネットワークであってよい。前記ネットワークはクラウドを含み得る。前記サンプル処理機器は、前記ネットワークに、仲介機器なしで接続され得るか、又は仲介機器がサンプル処理機器をネットワークに接続するために必要であり得る。サンプル処理機器は、ネットワークを通じて、別の機器と通信でき、前記別の機器は、限定はされないが、パーソナルコンピュータ、サーバーコンピュータ、又はラップトップコンピュータ；Windows（登録商標）CE機器等のパーソナル・デジタル・アシスタント（PDA）、セリフォン等の電話、スマートフォン（例えば、iPhone（登録商標）、Android（登録商標）、BlackBerry（登録商標）等）、又は位置把握携帯電話（GPS等の）；ネットワークに接続されたローミング機器等のローミング機器；無線電子メール機器等の無線機器又はコンピュータ・ネットワークと無線的に通信する能力を有する他の機器；又はネットワークを通じて通信することができ、及び電子的なやり取りを行い得る任意のタイプのネットワーク機器を含む、任意のタイプのネットワーク化された機器であり得る。そのような通信は、クラウドコンピューティングインフラストラクチャー、又は他の機器によりアクセスされ得る、任意の他のタイプのデータ保存インフラストラクチャーにデータを提供することを含み得る。

10

【0116】

20

サンプル処理機器は、サンプルに関するデータを、例えば、ヘルスケア専門家、臨床検査施設等のヘルスケア専門家の場所、又はその関係者に提供し得る。臨床検査施設、ヘルスケア専門家、又は被験者の1つ以上は、又は前記サンプル処理機器から提供されるデータを受信するか、又はアクセスし得るネットワーク機器を有し得る。サンプル処理機器は、サンプルに関するデータをデータベースに提供するために構成され得る。サンプル処理機器は、サンプルに関するデータを、電子医学記録システム、臨床検査施設情報システム、臨床検査施設自動化システム、又は他のシステム又若しくはソフトウェアに提供するために構成され得る。サンプル処理機器は、データを報告書の形態で提供し得る。

【0117】

臨床検査施設、機器、又は他の実体又はソフトウェアは、サンプルに関するデータの分析をリアルタイムで遂行し得る。分析は、サンプル定性的及び/又は定量的評価を含み得る。データ分析は、サンプルの後続する定性的及び/又は定量的評価を含み得る。随意的に、生データ、前処理されたデータ、又は分析されたデータに基づいて報告書が作成され得る。そのような報告書は、前記サンプルから得られたデータ、そのサンプルが取得された被験者の身元及び他の情報、データの分析、及び他の機密情報の機密性を維持するために作成されることができる。前記報告書及び/又は前記データは、ヘルスケア専門家に送信され得る。サンプル処理機器により得られたデータ、そのようなデータの分析、又は報告書は、データベース、電子的医学記録システム、臨床検査施設情報システム、臨床検査施設自動化システム、又は他のシステム又はソフトウェアに提供されることができる。

30

【0118】

実施形態においては、本明細書において提供されるシステム及び方法の使用は、患者での中心静脈カテーテル（“中心ライン”）の使用の必要性を減少させ得る。いくつかの状況においては、中央ラインは、少なくとも一部には患者から比較的大量の血液サンプルを定期的に取得する必要性に起因して、患者中に維持され得る。患者での中央ラインの存在は、例えば、患者が、黄色ブドウ球菌又は表皮ブドウ球菌などによる1つ以上の感染のリスクを増大させるために、望ましくない。被験者からの小容積のサンプルを処理する、本明細書において提供されるシステム及び方法の使用では、特定の患者においては中央ラインを使用しないことが可能であり得る。例えば、分析のために比較的大きな容積の血液を患者から、中心ラインを介して取得する代わりに、小容積の血液が、代替的な部位（例えば、指）から取得されることができ、及びその小容積の血液が、本発明において提供される

40

50

システム及び方法による分析のために用いられ得る。実施形態においては、本明細書において提供される方法は、患者の中央ラインを介して得られたものではないサンプルを用いて遂行され得る。実施形態においては、本明細書において提供されるシステム又は方法により使用されるサンプルは、24時間の間に、患者からなくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、15、又は20回収集され、そのうちのいずれのサンプルも患者の中央ラインから得られたものではない。実施形態においては、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、15、又は20サンプルが、24時間の間に収集されることができ、及び本発明において提供されるシステム又は方法により用いられるが、そのうちのいずれのサンプルも患者の中央ラインから得られたものではない。

10

【0119】

本明細書において本発明の好適な実施形態が示され及び記載されるが、当業者にとってはそのような実施形態は、例としてのみ提供されていることが明白であろう。いまや、本発明を逸脱することなく、当業者は膨大な変形、変更、及び置換を思いつくであろう。本明細書に記載される本発明の実施形態に対する様々な代替物が、本発明の実施に使用できることを理解されたい。例えば、本明細書に記載されるか否かに関わらず、一実施形態の特徴は、別の実施形態の特徴と組み合わせることができる。本明細書において提供される本発明は、便宜性の目的で、限定された数の用語及びフレーズを用いて、本明細書において記載されているが、本発明は、本明細書において提供されていないが、本発明を正確に記述する他の用語及びフレーズを用いても記述され得るであろうことも理解されたい。

20

【0120】

本明細書の記載、及びそれに続く特許請求範囲の全体を通して用いられるものとしての、「a(1つ)」、「an(1つ)」、「the(前記の)」は、文脈において明白に示さない限り、複数の意味を含むことを理解されたい。例えば、「an assay」への言及は、単一の検定又は複数の検定を指すことができる。更に、本明細書の記載、及びそれに続く特許請求の範囲の全体を通して用いられるものとしての、「in(～の中に)」の意味は、文脈で明白に示されない限り、「in(～の中に)」、及び「on(～の上に)」を含む。「means for(ための手段)」の語句を使用して、所定の請求項が明確に言明されていない限り、添付された請求項は、手段プラス機能の限定を含むものとは解釈されない。本明細書の記載、及びそれに続く特許請求の範囲の全体を通して用いられるものとしての、第二の物体の“少なくとも一部分”を含むとして記載される第一の物体は、完全な第二の物体の全量を含み得る。

30

【0121】

本明細書の記載、及びそれに続く特許請求の範囲の全体を通して用いられる、用語としての、“comprise”、“include”、及び“contain”、並びに関係する時制は、包括的であり、及び制約が無く、及び追加的な、列挙されていない要素又は方法のステップを排除しない。更に、広げる言葉(broadening word)及び“1つ以上の”、“少なくとも”、“限定はされないが”等の語句は、ある場合には、より狭いケースが意図されていると読まれるべきではなく、又はそのような広げる言葉がなくてよい例の中に要求されると読まれるべきではない。最後に、本明細書の記載、およびそれに続く特許請求の範囲の全体を通して用いられるものとしての、「or(又は)」の意味は、文脈で明白に示されない限り、接続詞および離接的接続詞の両方を含む。従って、用語“or(又は)”は文脈で明白に指示しない限り、“及び/又は”を含む。

40

【0122】

この文書は著作権保護の対象になる資料を含む。それらが米国特許商標局の特許ファイル又は記録に現われるので、著作権所有者(本明細書における特許申請人)は、特許文献及び開示の複製に反対しないが、そうでなければ、何であるかに関わらず、全て

【0123】

以下の実施例は説明の目的のみのために提供され、本開示をいかなる方法によっても制限することを意図していない。

50

【実施例】

【0124】

実施例 1

【0125】

抗菌薬耐性又は感受性を検出するためのレザズリンの還元方法

【0126】

カナマイシン耐性であることが知られる単一の大腸菌バクテリアのコロニー（大腸菌 K 1 2 M G 1 6 5 5）及びカルベニシリンに耐性であることが知られる、単一の大腸菌バクテリアのコロニー（大腸菌 K 1 2 M G 1 6 5 5）が、LB培地中で、別々にバクテリアの細胞が、対数期中期（約 10^8 細胞/ml）になるまで12～15時間培養された。前記培養物は、次いで、 $50 \mu\text{g/ml}$ カナマイシン又は $100 \mu\text{g/ml}$ カルベニシリンのいずれかを含むLB培地中で、 5×10^2 、 5×10^3 、 5×10^4 、及び 5×10^5 細胞に順次希釈された。レザズリンが、それぞれの希釈物に、 $100 \mu\text{l}$ の合計反応容積中で、20、40、又は $80 \mu\text{M}$ の最終濃度になるように加えられた。それぞれの希釈された培養物は 37°C で培養され、及び前記抗生物質の存在下での培養の開始から0、1、2、3、4、5、及び6時間後に波長 590 nm において蛍光が測定された。

10

【0127】

図5A～5Cは、カナマイシン耐性菌株が、カナマイシンの存在下で、全ての細胞濃度において、及び全てのレザズリン濃度で成長を示したことを示す。より高い初期細胞濃度（例えば 5×10^3 、 5×10^4 、及び 5×10^5 細胞における）は、カナマイシンの存在下で、より速い成長を示し、及び従って、前記抗生物質に対する耐性は、培養を開始してから1～5時間以内で検出され得た。より低い初期細胞濃度（ 5×10^2 細胞）は、培養開始後約6時間で、前記抗生物質に対する耐性を示し始めた。対照的に、図5D～5Fは、カルベニシリンの存在下で、カナマイシン耐性菌株が、全てのレザズリン濃度において、それぞれの細胞濃度遅い成長を示したか、又は成長しなかったことを示す。

20

【0128】

図6A～6Cは、前記カルベニシリン耐性菌株が、カルベニシリンの存在下で、すべての細胞濃度で、及び全てのレザズリン濃度で成長を示したことを示す。より高い初期細胞濃度（例えば 5×10^3 、 5×10^4 、及び 5×10^5 細胞における）は、カルベニシリンの存在下で、より速い成長を示し、及び従って、前記抗生物質に対する耐性は、培養を開始してから1～5時間以内で検出され得た。より低い初期細胞濃度（ 5×10^2 細胞）は、培養開始後約6時間で、前記抗生物質に対する耐性を示し始めた。対照的に、図6D～6Fは、カナマイシンの存在下で、カルベニシリン耐性菌株が、全てのレザズリン濃度において、それぞれの細胞濃度遅い成長か、又は成長しなかったことを示す。

30

【0129】

実施例 2

【0130】

小さな反応容積中でのレザズリン還元方法

【0131】

前記レザズリン還元方法が、カナマイシン耐性菌株を用いるが、 $10 \mu\text{l}$ の合計反応容積及び反応ごとに 5×10^1 、 5×10^2 、 5×10^3 、及び 5×10^4 細胞の最終細胞濃度を用いて繰り返された。同じ最終レザズリン濃度（20、40、又は $80 \mu\text{M}$ ）、カナマイシン濃度、及びカルベニシリン濃度が上記と同じく用いられた。及び前記抗生物質の存在下での培養の開始から0、1、2、3、4、5、6及び7時間後に波長 590 nm において蛍光が測定された。

40

【0132】

図7A～7Cに示されるように、カナマイシン耐性菌株が、カナマイシンの存在下で、全ての細胞濃度において、及び全てのレザズリン濃度で成長を示したことを示す。より高い初期細胞濃度（例えば 5×10^2 、 5×10^3 、及び 5×10^4 細胞における）は、カナマイシンの存在下で、より速い成長を示し、及び従って、前記抗生物質に対する耐性は、培養を

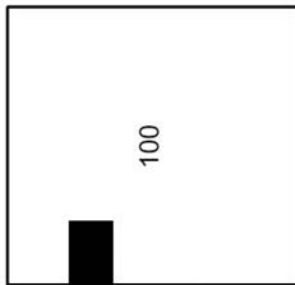
50

開始してから 1 ~ 6 時間以内で検出され得た。より低い初期細胞濃度 (5×10^1 細胞) は、培養開始後約 7 時間で、前記抗生物質に対する耐性を示し始めた。対照的に、図 7D ~ 7F は、カルベニシリンの存在下で、カナマイシン耐性菌株が、全てのレザズリン濃度において、それぞれの細胞濃度遅い成長か、又は成長しなかったことを示す。

【 0 1 3 3 】

従って、このレザズリン還元検定は、病原体の低いコピー数 (例えば $10^1 \sim 10^5$ 細胞) を含む少量のサンプル (例えば $10 \sim 100 \mu\text{l}$) により、及び短い時間 (例えば前記抗菌薬の存在下で培養を開始してから 1 ~ 7 時間以内) で、抗菌薬耐性 / 感受性を検出するために用いることができる。更に、このレザズリン還元検定は、細胞を溶解する必要なく及び 37°C において遂行され得る。従って、このレザズリン還元検定は、病原体の抗菌薬への耐性又は感受性を決定するために便利かつ迅速な検定である。

【 図 1 】



110

図 1

【 図 2 】

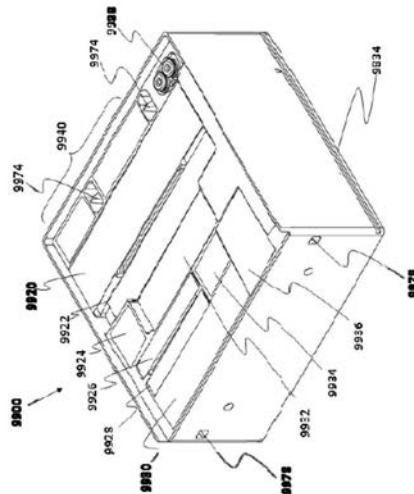


図 2

【 図 3 】

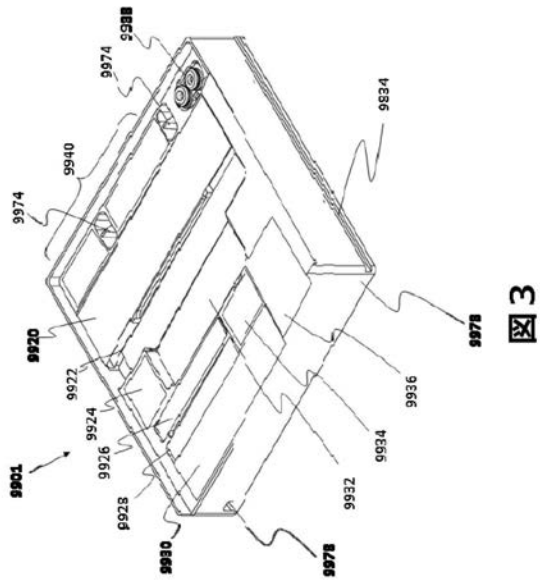


図 3

【 図 4 A 】

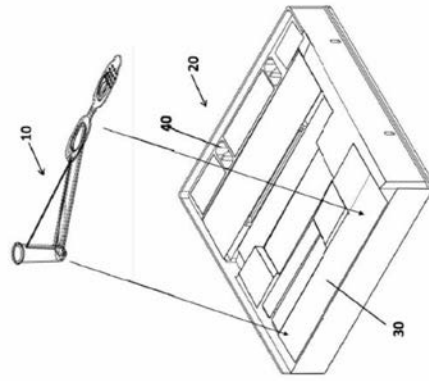


図 4 A

【 図 4 B 】

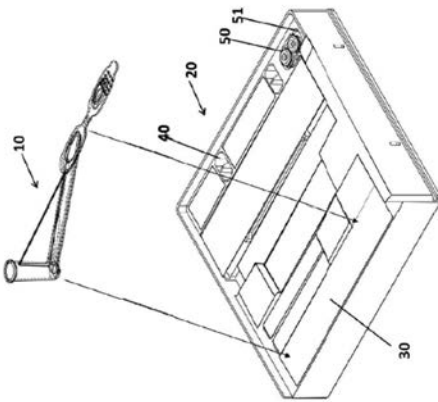


図 4 B

【 図 4 C 】

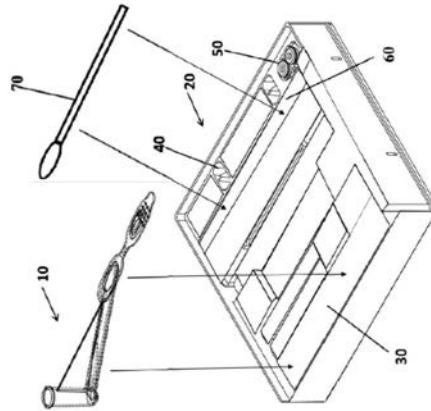


図 4 C

【 図 5 - 1 】

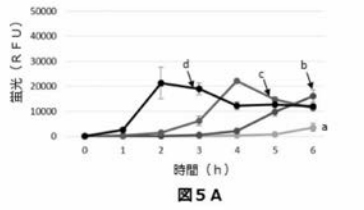


図 5 A

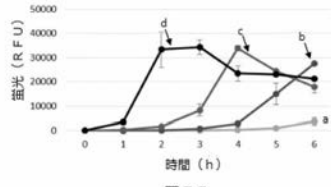


図 5 B

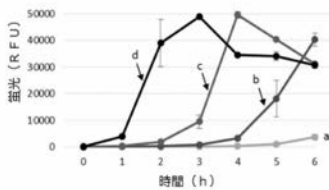


図 5 C

【 図 5 - 2 】

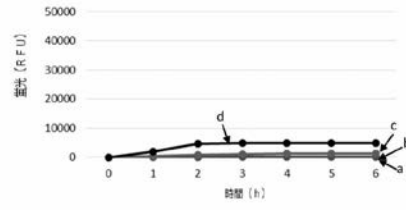


FIG. 5D

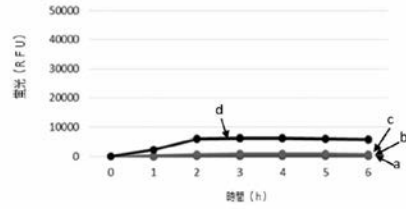


FIG. 5E

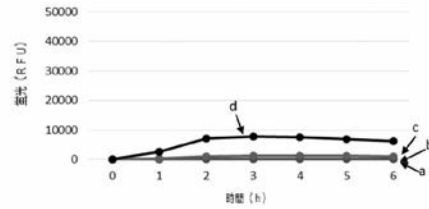


FIG. 5F

【 図 6 - 1 】

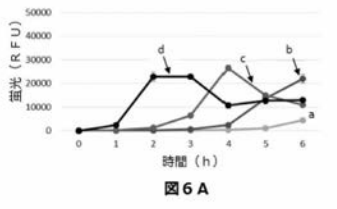


図 6 A

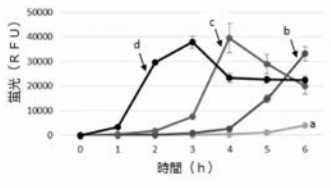


図 6 B

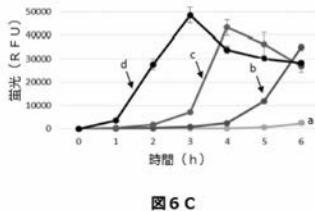


図 6 C

【 図 6 - 2 】

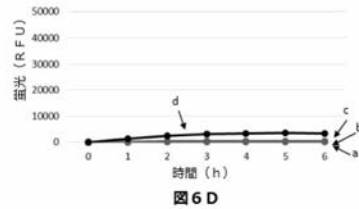


図 6 D

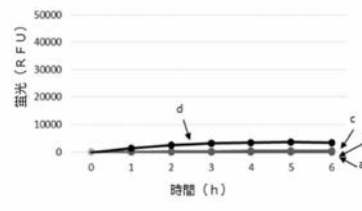


図 6 E

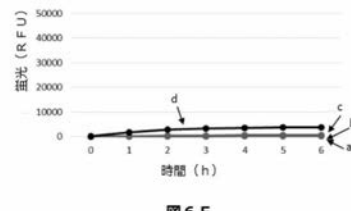


図 6 F

【 図 7 - 1 】

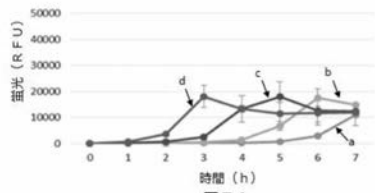


図 7 A

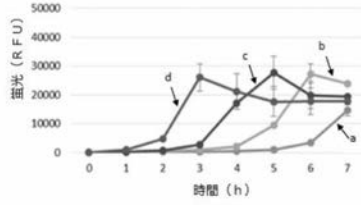


図 7 B

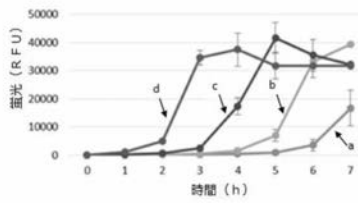


図 7 C

【 図 7 - 2 】

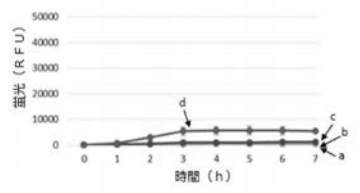


図 7 D

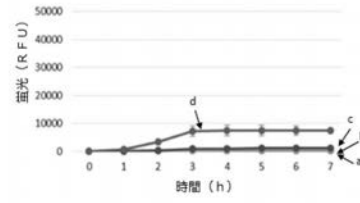


図 7 E

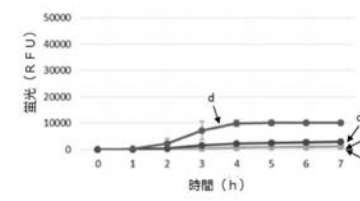


図 7 F

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/US 2015/048533
Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)	
This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
<p>1. <input type="checkbox"/> Claims Nos.:</p> <p style="padding-left: 20px;">because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:</p> <p>2. <input type="checkbox"/> Claims Nos.:</p> <p style="padding-left: 20px;">because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:</p> <p>3. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: 4-29, 35-50, 57-71, 78-99</p> <p style="padding-left: 20px;">because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).</p>	
Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)	
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:	
<p>1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.</p> <p>2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.</p> <p>3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:</p> <p>4. <input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:</p> <p>Remark on Protest</p> <p><input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.</p> <p><input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.</p> <p><input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 2015/048533
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<i>C12Q 1/04 (2006.01)</i> <i>C12Q 1/68 (2006.01)</i> <i>G01N 33/50 (2006.01)</i> <i>C12M 1/34 (2006.01)</i> <i>C12M 3/00 (2006.01)</i>		
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)		
C12Q 1/04, 1/68, G01N 33/48, 33/50, C12M 1/34, 3/00		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
NCBI, PubMed, PatSearch (RUPTO internal), USPTO, WIPO, PAJ, Esp@cenet, PCTonline, USPTO DB, CIPO(Canada PO), SIPO DB, CA, K-PION, KIPRIS, GoogleScholar		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2014/100456 A1 (NANOMR, INC) 26.06.2014, pp.4-10, 15, 21-32, 36, 39-48, 53-68, 70-90, 111-116, 129, 136-150, claims	1-3, 30-34, 51-56, 72-77
A	EP 1984520 A2 (STIRUS GLOBAL SOLUTIONS LTD) 29.10.2008, claims	1-3, 30-34, 51-56, 72-77
A	US 2005/026144 A1 (UNIV MICHIGAN STATE) 03.02.2005	1-3, 30-34, 51-56, 72-77
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E"	earlier document but published on or after the international filing date	"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
"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)	"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
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
02 December 2015 (02.12.2015)		17 December 2015 (17.12.2015)
Name and mailing address of the ISA/RU: Federal Institute of Industrial Property, Berezhkovskaya nab., 30-1, Moscow, G-59, GSP-3, Russia, 125993 Facsimile No: (8-495) 531-63-18, (8-499) 243-33-37		Authorized officer A.Silkin Telephone No. 495 531 65 15

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, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, 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, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, 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, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(74)代理人 100181674

弁理士 飯田 貴敏

(74)代理人 100181641

弁理士 石川 大輔

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 ホームズ, エリザベス

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94304, パロ アルト, ページ ミル ロード 1701

(72)発明者 シー, チャンダン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94304, パロ アルト, ページ ミル ロード 1701

Fターム(参考) 4B029 AA07 BB01 BB20 FA01

4B063 QA01 QA06 QQ03 QQ42 QQ52 QR08 QR32 QR35 QR42 QR55

QR62 QS25 QS28 QS34 QX02

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2017527288A5	公开(公告)日	2018-10-11
申请号	JP2017512696	申请日	2015-09-04
[标]申请(专利权)人(译)	赛拉诺斯股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	塞拉诺斯公司		
[标]发明人	ホームズエリザベス シーチャンダン		
发明人	ホームズ, エリザベス シー, チャンダン		
IPC分类号	C12M1/00 C12Q1/68 C12Q1/04 G01N33/53		
CPC分类号	C12Q1/04 C12Q1/689 C12Q2600/158 G01N33/53 G01N33/56911 G01N2469/20 C12Q2600/156 G01N2469/10		
FI分类号	C12M1/00.A C12Q1/68.A C12Q1/04 G01N33/53.M		
F-TERM分类号	4B029/AA07 4B029/BB01 4B029/BB20 4B029/FA01 4B063/QA01 4B063/QA06 4B063/QQ03 4B063 /QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR42 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS28 4B063/QS34 4B063/QX02		
代理人(译)	夏木森下 饭田TakashiSatoshi 石川大介 山本健作		
优先权	62/046135 2014-09-04 US 62/061093 2014-10-07 US		
其他公开文献	JP2017527288A		

摘要(译)

提供了用于确定样品中病原体 and 病原体的抗微生物抗性的系统和方法。在一个实施方案中，本文提供了用于分析样品的盒，其包含：抗微生物剂；微生物生长培养基；和微生物培养基。至少一种试剂选自代谢指示剂，核酸扩增反应试剂和基于核酸探针的反应试剂。任选地，盒还包括样品，该样品可含有或怀疑病原体。