



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105829544 A

(43)申请公布日 2016.08.03

(21)申请号 201480069807.9

(22)申请日 2014.11.10

(30)优先权数据

102013022016.5 2013.12.20 DE

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2016.06.20

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2014/074118 2014.11.10

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/090727 EN 2015.06.25

(71)申请人 布鲁克道尔顿有限公司

地址 德国不来梅

(72)发明人 马库斯·科斯切娃

(74)专利代理机构 北京天昊联合知识产权代理有限公司 11112

代理人 王静 丁业平

(51)Int.Cl.

G12Q 1/04(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

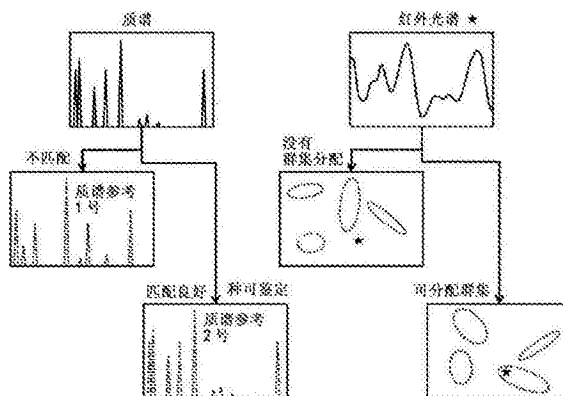
权利要求书2页 说明书10页 附图3页

(54)发明名称

通过质谱法和红外光谱法鉴定微生物

(57)摘要

本发明涉及一种鉴定样本中未知微生物的方法,其中,通过红外光谱法,使用限定的红外光谱参考库,详细确定更低的分类学等级或变种,以此补充详细到分类学等级的属或种的质谱确定。这些库可以是属特定的,仅包含一个属的微生物的红外光谱,也可以是种特定的,仅包含一个种的微生物的红外光谱。这样,利用由红外光谱法获得的亚种和变种的详细分析,有利地补充了未知微生物物种的有力的质谱鉴定,其主要目的是鉴定在医学上重要的变种,例如致病变种(例如EHEC和EPEC)和耐抗生素的微生物(例如MRSA)。



1. 一种鉴定样本中未知微生物的方法,其中,利用红外光谱法详细确定至少更低一级的分类学等级或变种,以此补充详细到分类学等级属或种的质谱测定,其中,使用限于属或种的参考红外光谱库来详细确定更低的分类学等级或变种。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中,通过红外光谱法详细确定亚种和/或变种,由此补充种的质谱法确定,其中,使用种特定的参考红外光谱库来详细确定亚种和/或变种。

3. 根据权利要求1所述的方法,其中,通过红外光谱法详细确定血清变型、致病变种或耐药性,由此补充种的质谱法确定,并且使用种特定的参考红外光谱库来进行所述详细确定。

4. 根据权利要求1所述的方法,其中,通过红外光谱法详细确定种,由此补充属的质谱法确定,并且使用属特定的参考红外光谱库来进行所述详细确定。

5. 根据权利要求1至4所述的方法,其中,在采集用于所述质谱法确定的质谱之前,采集用于所述详细确定的红外光谱,并且两种采集至少使用一部分相同的微生物材料。

6. 根据权利要求1至4之一所述的方法,其中,根据获得属或种特定的参考红外光谱库所遵照的特定规范来培养和/或制备用于所述详细确定的微生物。

7. 根据权利要求6所述的方法,其中,微生物的制备包括选择和分离各细胞成分,之后由这些细胞成分采集红外光谱。

8. 根据权利要求7所述的方法,其中,使用纯化的细胞壁来采集红外光谱。

9. 根据权利要求7所述的方法,其中,使用通过梯度离心获得的细胞成分的一部分来采集红外光谱。

10. 根据权利要求7所述的方法,其中,使用衍生化的细胞成分来采集红外光谱。

11. 根据权利要求1所述的方法,包括如下步骤:

- 提供具有参考质谱的库和种特定的具有参考红外光谱的库,
- 培养来自样本的微生物分离物,
- 通过质谱方法确定所述分离物的微生物物种,
- 选择种特定的参考红外光谱库,
- 根据获得用于所选库的微生物所遵照的特定规范来培养和制备所述分离物的微生物,
- 采集已培养和制备的微生物的红外光谱,
- 使用所选的种特定的参考红外光谱库中的参考红外光谱,通过数学统计分类方法来确定亚种或变种。

12. 根据权利要求1所述的方法,其步骤如下:

- 假设样本中存在某种微生物物种,
- 为假设的微生物物种提供具有参考质谱的库和种特定的具有参考红外光谱的库,
- 根据获得用于种特定的参考红外光谱库的微生物所遵照的特定规范在红外样品载板上培养和制备来自样本的微生物分离物,
- 采集所培养和制备的所述分离物中的微生物的红外光谱,
- 制备所述分离物中的微生物以用于MALDI电离,
- 采集质谱并确定分离物的微生物物种,以及
- 如果所述关于微生物物种的假设得到证实,则使用种特定的参考红外光谱库中的参

考红外光谱,对已采集的红外光谱进行数学统计分类来确定亚种或变种。

13. 根据权利要求12所述的方法,其中,所述红外样品载板由硒化锌或硅制成。

14. 根据权利要求12或13所述的方法,其中,还在相同的红外样品载板上制备所述来自样本的微生物分离物以用于MALDI电离。

15. 根据权利要求1所述的方法,其中,质谱法确定志贺式菌属的种或大肠杆菌物种,然后使用参考红外光谱库,通过红外光谱法详细确定种,其中所述参考红外光谱库仅包含志贺式菌属和大肠杆菌物种的微生物的红外光谱。

通过质谱法和红外光谱法鉴定微生物

技术领域

[0001] 本发明涉及通过光谱法来鉴定样本中的微生物的方法。

[0002] 在本发明中,使用通过红外光谱法获得的详细亚种和变种分析,补充对未知微生物物种的有力质谱鉴定,其主要目的是鉴定在医学上重要的变种,例如致病变种(例如EHEC和EPEC)和耐抗生素的微生物(例如MRSA)。通过红外光谱法进行详细分析需要了解微生物物种,以便使用种特定的和种限定的参考红外光谱数据库(库),特别是以便进行种特定的标准化微生物培养。微生物质谱鉴定是通过将微生物的质谱与庞大数据库(库)中整个分类学域的微生物的参考谱进行相似度比较来进行的。另一方面,亚种和变种的详细分析采用红外光谱以基本上常用的方式通过数学统计分类分析进行,本文中应用于仅单一微生物物种的变种和亚种的多个参考红外光谱。这种鉴定至少具有两步,主要对医学诊断有利。

背景技术

[0003] 快速、无错的微生物鉴定在食品分析、生物技术过程的监测和控制、河流和湖泊的监测中,特别是在临床微生物学领域发挥重要的作用。微生物(microorganism)在下文中也称为微生物(germ)和微生物(microbe),通常是通过显微镜才能看到的生物体,包括细菌、单细胞真菌(例如酵母菌)、微型藻类和原生动物。

[0004] 鉴定微生物意味着将其按分类学体系方法加以分类:域、界、门、纲、目、科、属、种和亚种。但是,细菌的鉴定还可以包括变种,例如血清型或致病变种。

[0005] 血清型或血清变型(serovar)(serovariety的缩写)这一词汇用于描述可通过血清学检测加以区分的细菌亚种中的变种。它们各自的细胞表面抗原不同,可借助特异抗体以常规微生物学方法加以鉴定。血清型的分类体系如下:属>种>亚种(subsp.)>血清型,例如,扩展的双名法种名称肠道沙门氏菌肠道亚种伤寒血清型(*Salmonella enterica* subsp.*enterica* serotype Typhi),简称伤寒沙门氏菌(*Salmonella* Typhi)。

[0006] 致病变种(其英文pathovar源自希腊语pathos,意思是“苦难”或“疾病”)是一种具有相同特性的细菌株系或株系群,可根据其致病性与种或亚种中的其他株系加以区分。致病变种可通过双名法种名称的三级或四级扩展来命名。例如,可以导致柑橘溃疡病的细菌地毯草黄单胞菌(*Xanthomonas axonopodis*),具有不同的致病变种,这些变种具有不同的宿主特化:柑橘溃疡病菌(*X. axonopodis* pv.*citri*)就是其中之一。缩写词“pv.”代表致病变种“pathovar”。人类病原体的有毒菌株也有致病变种,但在这种情况中,通过在名称前添加词语来命名它们。例如,肠道细菌大肠杆菌(*Escherichia coli*)大多数完全无害,但却具有高度危险的致病变种肠出血性大肠杆菌(*enterohaemorrhagic E. coli*, EHEC)、肠致病性大肠杆菌(*enteropathogenic E. coli*, EPEC)、肠产毒性大肠杆菌(*enterotoxigenic E. coli*, ETEC)、肠侵袭性大肠杆菌(*enteroinvasive E. coli*, EIEC)、肠聚集性大肠杆菌(*enteroaggregative E. coli*, EAEC)和弥散粘附性大肠杆菌(*diffusely adherent E. coli*, DAEC)。反过来,致病变种可以包含不同的血清型。EHEC有很多已知的血清型,大约60%的所有已鉴定的EHEC血清型是O157、O103和O26。血清亚型O157/H7尤其危

险。

[0007] 在广义上,微生物鉴定还可以包括在其他医学相关特性方面不同的变种,特别是它们对抗生素的抗性(特别是 β -内酰胺类抗生素和糖肽类抗生素),还有其毒素形成(“毒性变种(toxivar)”)或对相同或相似噬菌体的接受性(“噬菌体变种(phagovar)”)。通常,如果一个种或亚种的微生物群具有共同的生物学特性,则使用“生物变种”这一词汇。耐抗生素变种的一个示例是MRSA:耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*)。

[0008] “株系”一词用于描述从单一生物体生长而来并且保存在(通常是国家)物生物株系库中的群体。国际上标准化的株系命名被加入到命名法链中,其中包含属、种、亚种和变种。一个株系的各个生物体在遗传学上相同,不同株系的遗传组成稍有不同。

[0009] 目前,微生物实验室广泛采用两种光谱测定法来鉴定微生物。一种是质谱法(MS),另一种是红外光谱法(IR)。必须注意的是,目前为止还没有任何研究小组并行使用或实际上结合使用这两种方法,这非常奇怪。仔细研究后,发现出现这种情况的原因是,在多数情况下,这些小组的研究领域不同,鉴定的目的也不同。

[0010] 在之前无任何了解的情况下,如果需要快速轻松地鉴定完全未知种的微生物,甚至详细到分类学等级的种,则使用质谱方法始终是有利的。通常,只要能在培养基上或培养基内培养出微生物,这种方法就非常有效。优选在皮氏培养皿的凝胶营养介质上培养菌落。这种方法非常稳定:菌落的年龄和营养状况实际上对质谱鉴定没有影响;样品的数量、制备方法或在质谱样品载体上的储存期限也没有任何很重要的影响。这意味着样品繁殖和制备方法不需要任何严格的标准化。而且,只需要非常少的样品物质,所以非常小的菌落就已足够。质谱的峰指示出非常常见或易于电离的微生物蛋白质;这些峰的60%到85%属于组成核糖体的40到60种不同的蛋白质。由于每个核糖体在每个细胞中出现几千次,并且由于不同微生物物种的核糖体蛋白的质量特性彼此完全不同,因此,这些蛋白质的一致产生使其对于鉴定而言是理想的。成功培养后,该方法通过使用自动计算机程序来比较其质谱与庞大谱库中的参考质谱,从而通过几分钟之内的研究,就可鉴定微生物分类学的种,所述庞大谱库可以包含整个分类学域的微生物的数千种参考质谱。这种方法具有非常高的鉴定可靠性。仅在很少的情况下,其无法确切地区分两种微生物物种。另一方面,这种方法几乎无法鉴定亚种甚或变种,并且,根据目前的知识,依靠目前正在使用的、已对灵敏度、速度和鉴定精确性进行过优化的方法,这种情况几乎不会改变。这种情况的主要原因是,变种的核糖体蛋白质没有不同。

[0011] 与此相反,通过红外光谱法,如果有种的亚种和变种的合适参考光谱库,则可鉴定诸如血清型和致病变种等亚种和变种,在某些情况下,甚至能鉴定种内的各个株系。但是,这种库的编制通常需要准确遵照种特定的培养、制备和测量规范,这种情况完全不同于使用质谱法的情况。

[0012] 红外光谱基于生物材料中的官能团和极性键的数千次振动;而这些又源自微生物细胞的所有成分,例如DNA、RNA、蛋白质、内部结构、膜和细胞壁以及储能物质。在光谱中,分子没有明确的个体特征,虽然特定的光谱范围可以优选地分配给特定的分子种类:脂肪酸的范围为 3050 到 2800cm^{-1} , CH_2 和 CH_3 基团振动,酰胺的范围为 1750 到 1500cm^{-1} ,肽键振动,多糖的范围为 1200 到 900cm^{-1} 。范围 900 到 700cm^{-1} 称为“指纹范围”。它包含所有分子中都有的

物质,对区分种而言非常重要。

[0013] 鉴定取决于红外光谱中的细微差异,这也是通常要对红外光谱鉴定的所有方法步骤(从在规定的营养介质上以规定的时间和温度培养微生物到样品的制备和测量)进行标准化的原因。必须控制营养介质上方的氧气含量和水分水平。不同于标准化方法的小偏差(例如,培养期长半小时或培养温度高一开尔文等偏差)都足以使鉴定更加困难或歪曲结果。

[0014] 为了编制参考红外光谱库,要培养所选群的微生物并在标准化条件下进行测量。然后,对这一参考库的所有光谱进行数学统计分类程序。使用过多种数学统计方法,例如ANN(人工神经网络分析)、PCA(主成分分析)、PLS-DA(偏最小二乘判别分析)、SVM(支持向量机)、分层群集分析或其他分类方法。在借助库中的红外光谱进行学习和检验的阶段后,可将分类算法应用于以相同方式培养的样品微生物的红外光谱。这些算法提供分类学分类,例如种、亚种、血清型、致病变种,甚至株系。但是,如果样品中的微生物不属于近缘群(closely related group),那么详细的红外分析会提供完全不正确的结果。例如,如果微生物不是假设的大肠杆菌,而是(例如)相对无害的柠檬酸杆菌属(*Citrobacter*),则会错误地鉴别出致病变种EHEC。

[0015] 这些处理和结果的差异意味着MS和IR的应用领域不同。在临床诊断中,实际上只使用质谱法,因为必须跨整个分类学域来假设未知病原体。这同样应用于河流和湖泊的监测,以及所有其他对于在缺乏现有的对微生物物种的了解的情况下快速鉴定任何种类的微生物而言极其重要的领域。在此,微生物可以属于细菌、古细菌和真核生物是整个分类学域,包括单细胞藻类和真菌,例如酵母菌。

[0016] 与此形成对比的是,如果目的是检测受污染食品或受感染牲畜中微生物的污染源和传播途径,则重要的是,要确定亚种和变种以可靠鉴定感染源。这种情况下,至少在一次微生物测定之后,通常可假设微生物的种是已知的。因此,如今的红外光谱法主要用于微生物的种已知,但需要准确确定亚种和可能的变种的情况。例如,如果发生地方性沙门氏菌中毒,并且如果怀疑沙门氏菌来自泰国虾的水产养殖,则检测泰国虾中的沙门氏菌并不足够。根据当前的分类学,有两种沙门氏菌,其中一种(肠道沙门氏菌)有五个亚种,但这些亚种有大约2600种不同的血清变型作为它们之间的变种。回到虾的问题,人们必须证明涉及相同的沙门氏菌变种。因此,使来自粪便样本的沙门氏菌在沙门氏菌特定的培养液中生长,并使用红外光谱法来检测选择性生长的沙门氏菌的血清型。然后这种血清型必须追溯到泰国水产养殖。

[0017] 因此,红外光谱法主要见于食品生产、兽医和公共卫生部门,而临床诊断以质谱法为主。

[0018] 如今,在全球范围内,人们还将质谱鉴定方法用于医学诊断;在欧洲和很多其他国家,来自各个公司的方法和质谱仪由于满足适用的法律规定,已经得到临床批准。在其他国家的法律审批也正在准备中。在质谱方法中,首先要培养微生物以形成菌落。用来培养的营养介质通常在皮氏培养皿的琼脂中,通过这种方法,可在数小时或数天内培养出单微生物菌落中的纯“分离物”,具体时间取决于微生物的活力。但是,在琼脂上培养微生物并非绝对必要。还可在液体中培养。如果添加或混合菌落,则可通过第二次培养(再以通常的方式)获得分离的菌落。用小拭子(优选使用卫生清洁的木质牙签)将 10^4 到 10^6 个肉眼很难看到的微

量微生物从所选菌落转移到质谱样品载板上,然后喷洒常规基质的强酸溶液(通常是 α -氰基-4-羟基肉桂酸,HCCA,或2,5二羟基苯甲酸,DHB),以便随后通过基质辅助激光解析(MALDI)将其电离。酸(通常为甲酸或三氟乙酸)可以攻击细胞壁,并且基质溶液的有机溶剂(通常为乙腈)能够渗入微生物的细胞内并使变弱的细胞壁渗透性破裂。接下来通过蒸发溶剂干燥样品,使得溶解的基质结晶析出。微生物中的可溶性蛋白以及非常少量的细胞内的其他物质会在这一过程中掺入基质结晶中。

[0019] 使用质谱仪中的聚焦紫外激光脉冲轰击掺入有分析物分子的基质结晶,从而生成汽化等离子体形式的分析物分子的离子。然后可以在质谱仪中测量这些离子,并根据其质量将其分离。简单的飞行时间质谱仪通常用于这一用途。质谱是这些分析物离子(其主要为蛋白质离子)的质量值的分布曲线。具有最有用的鉴定信息的离子的质量为约3000道尔顿和15000道尔顿(1道尔顿=1原子质量单位)之间。在本方法中,蛋白离子绝大部分是单电荷(电荷数 $z=1$),因此,这里也可以简单地提及离子的质量 m ,而不总使用“质量电荷比” m/z ,而在其他质谱法中这实际上是必要的。

[0020] 除了简单的飞行时间质谱仪外,还可使用其他类型,例如具有正交离子注入的飞行时间质谱仪;并且除了借助MALDI的电离外,当然可以使用其他类型的电离,例如,电喷雾电离(ESI),但是它们提供的质谱更复杂。化学电离(CI)是一种不同的电离方法,可生成简单的质谱,其可与(例如)激光解析等离子体结合使用。

[0021] 可溶性蛋白质的质量分离分布曲线(即质谱)反映相关微生物物种的特征,因为每种微生物物种均产生其自己的遗传决定的蛋白质,每种蛋白质具有特征质量。如已提到的,大约60%到85%的蛋白质源自核糖体。这些是DNA和蛋白质的复合物,其始终具有相同的结构,并且始终包含介于40种和60种之间的不同的种特定的蛋白质,数量和组成精确相同。每个细菌细胞包含数千并高达上万个核糖体;真核生物的细胞包含数十万个核糖体。这意味着,这些可溶的、较高浓度的蛋白质不仅在质量上而且在产生率(incidence)上都是遗传预先决定的;它们并不取决于菌落的营养条件或成熟度,而(例如)作为储能物质的脂蛋白或脂肪酸则相反。蛋白质曲线,尤其是核糖体蛋白质的曲线,是微生物物种的特征,就像每个人的指纹那样。现在具有含数千微生物的参考质谱的参考库,其已经过法律批准可用于医学应用。

[0022] 该质谱鉴定法已被证明非常成功。其准确鉴定的可靠性远高于目前所用的微生物鉴定法。在多种研究中可以证明,针对数百个不同的微生物物种,鉴定可靠性远远超过95%,通常高于98%。在与现有微生物鉴定方法存在偏差而存在疑虑的情况中,在大多数情况下,基因测序证明质谱鉴定是正确的。

[0023] 为了鉴定微生物,测量了(例如)约2000道尔顿到高质量范围20000道尔顿的质谱,但研究发现,在到大约3000道尔顿的较低质量范围内,质量信号的评价较差,原因是产生这些信号可以源自其存在基本上是可变的物质,例如脂肪酸,其储存在营养性质。评估质量范围为大约3000-15000道尔顿的质量信号获得了最佳的鉴定结果。目前为了该目的使用的超敏感质谱仪仅具有低质量分辨率,这意味着质量信号仅相差一道尔顿的同位素基团将无法在该质量范围内被解析。只测量了同位素基团的离子包(envelope)。

[0024] 这种鉴定微生物的方法原则上需要纯的微生物培养物,即所谓的“分离物”,以便取得没有其他微生物叠加信号的质谱。然而,发现也可评估两种微生物物种的混合物的质

谱,并两种微生物种均可得到鉴定。鉴定可靠性仅受到轻微影响。如果质谱中涉及超过两种微生物物种,或者这两种微生物物种的浓度相差很大,则会大大降低鉴定可能性和可靠性。

[0025] 借助红外光谱法的微生物鉴定也依赖于在合适的营养介质上进行微生物的纯培养。但是,在这里,必须通过维持标准条件来避免微生物年龄和营养相关的差异,因为在各情况中,在整个波长范围内,细胞的所有成分都会贡献红外光谱。将在标准化条件下在标准化琼脂中培养的微生物悬浮于纯水中,并沉积到可透过红外光的载板上。必须小心以确保微生物沉积为均匀的层。干燥该层,并在红外光谱仪中测量载板上微生物的吸收。通常使用具有高分辨率的傅里叶变换光谱仪(FT-IR)。测量的光谱范围通常从 4000cm^{-1} 到 500cm^{-1} 。以每秒20个光谱的采集率测量几百个光谱并求和,以改善信噪比。

[0026] 在稍加修改的实施方案中,还可在反射光中测量红外光谱,在这种情况下,在金属反光的载板(例如由铝制成)上制备样本。还可使用拉曼光谱法,其优点是还可在液体中测量微生物光谱。

[0027] 除了食品检测和兽医领域,也有其他领域需要根据亚种和变种尽可能详细地分类微生物,但是在这些其他领域,通常最开始完全不知道微生物的种。例如,在医学诊断中,对微生物致病性、毒性、毒力、特别是抗生素耐药性的了解极其重要。对于一种微生物物种的不同亚种或变种,这些性质的确可以非常不同。

[0028] 可通过微生物的特征(例如,通过其附着行为(血清型)、毒性、致病性(致病变种)、毒力,以及通过其对不同抗生素的耐药性或不耐药性)来确定微生物的亚种、血清型、致病变种和其他变种。目前为止,没有通过光谱法区分这些变种的详细知识。

[0029] 鉴于上文所述,需要鉴定范围广泛的分类学类别的微生物,分类还应扩展到特别是低于分类学等级种的表现形式,即亚种、致病变种、毒性变种、血清型、特别是抗生素耐药性。

发明内容

[0030] 本发明提供一种鉴定样本中未知微生物的方法,其中,通过质谱法确定到分类学等级的属或种之后,再通过红外光谱法,使用限定的红外光谱参考库,详细确定更低的分类学等级或变种。这些库可以是属特定的,仅包含一个属的微生物的红外光谱,也可以是种特定的,仅包含一个种的微生物的红外光谱。

[0031] 本发明是基于这样的发现完成的:红外光谱法目前可比质谱法鉴定深入到更低等级的分类学分类(包括变种的确定),但是,只有在数学分析中所使用的参考红外光谱仅属于一小群近缘微生物时,特别是只有遵照这群近缘微生物的培养、制备和测量的标准化规范获得红外光谱时才可以。如果整个分类学域的所有微生物的参考红外光谱被一起纳入一个库中并用于分类,那么在适用情况下,不能期待样本中细菌的鉴定结果能比确定细菌是革兰氏阳性菌还是革兰氏阴性菌更进一步。如果参考库限于细菌并且考虑细菌的显微特征,并且如果所创建的各红外光谱库都限于棒状(棒状杆菌)、或球状(球菌)、或杆状(杆菌)细菌或其他形态,则结果可改善。在进一步的限制中,如果参考库仅由单一微生物亚种的不同致病变种的红外光谱组成,并且如果样本微生物确实实际上属于这一亚种,那么通常可通过红外光谱法明确确定样本中微生物的致病类型。但是,如果所研究的微生物的红外光谱根本不属于预期的初始群,则此方法可能导致错误的结果,这在医疗诊断中,可能威胁生

命。为了获得最优结果,微生物物种间的培养、制备和测量规范不同。

[0032] 本发明提供的方法是,例如,通过质谱法确定微生物物种,然后通过红外光谱法详细确定亚种和/或变种,为了此目的,使用种特定的参考红外光谱库。一旦知道微生物物种,就可决定是否有必要进一步详细确定亚种或变种,并且是否可行。对于亚种或变种分类,必须能够获得限于该种并包含不同亚种和变种的参考光谱的红外光谱数据库。当必要性和可行性的答案是肯定的时,则可分析红外光谱以确定亚种或变种。若需要,可以严格按照该种(在合适的红外光谱数据库中)的标准规范进一步培养微生物,并且可以对微生物进行制备以用于后续红外光谱的采集。为了获得最优结果,可能有必要对最利于变种的红外鉴定的各微生物物种采用一套各自的培养和制备条件。这套条件也成为红外光谱的基础,这意味着必须为每种微生物物种编制一个单独的红外参考数据库。

[0033] 因此,本发明涉及一种具有至少两个阶段的方法:首先,通过质谱方法确定微生物物种,然后通过红外光谱法确定亚种和变种,例如致病变种或血清型。如果质谱法只能可靠地确定属,但不能可靠地确定种(已知对于一些属而言),那么则可以使用红外光谱法,基于合适地编制的属特定的红外光谱库确定微生物的种。然后可能需要有三个阶段的方法来确定亚种和变种。

[0034] 在根据本发明的另一种方法中,可先采集用于详细确定的红外光谱,然后再采集用于质谱确定的质谱,并且将至少一部分的相同微生物材料用于两种采集,特别是在单次培养之后。

[0035] 为了区分亚种和变种,有利的是,仅将微生物细胞的特定部分用于红外光谱,例如,有蛋白质位于其外部的细胞壁,因为这些蛋白质决定了血清型,通常还决定了致病变种。此处的前提条件仍然是,事先明确鉴定种,并且具有微生物细胞的这些部分的红外光谱的合适的数据库。因此,所培养的微生物的制备可包括将其简单沉积到样品载板上,还包括将细胞裂解,以及选择比完整微生物更利于确定变种的细胞成分。可通过离心或过滤分离这些成分,尤其通过液体梯度离心进行,也可在衍生化、凝聚或其他修饰后进行。

[0036] 这种操作方法需要存在微生物亚种甚至微生物亚种的细胞成分的种特定的红外光谱库。这听起来像是无法掌控的巨大任务。但是,一般经验得出,在常规的微生物实验室中,日常所必须完成的鉴定中的超过80%仅仅是少量的微生物物种。这里面可能只有三、四种需要更详细的分类;此外,可能只对少数罕见的微生物物种感兴趣并进行更详细的分类。虽然根据特定的业务重点,实验室之间最感兴趣的微生物物种可能不同,但由于这些微生物物种的数量相对较少,因此可以编制适合这些微生物的红外光谱库。而且,显然,如果严格遵照标准化,则不同实验室之间可以交换光谱库。

附图说明

[0037] 图1显示了根据第一实施方案鉴定微生物亚种和变种的流程图示例。此方法首先是提供质谱库。然后,提供各个微生物物种的亚种和变种的红外光谱库,这些微生物物种通过种特定的培养和制备获得。然后培养来自样本的微生物分离物。然后对这些种进行质谱鉴定。然后询问鉴定亚种和变种是否有必要和有可能。如果否,本示例中的方法到此结束。如果是,对分离物的微生物进行种特定的培养和制备,以用于之后的红外光谱采集。然后采集红外光谱。最后,使用种特定的红外参考光谱鉴定亚种和变种。

[0038] 图2的左侧显示了用于确定微生物的简单示意性实施方案。采集微生物典型成分的质谱,这些成分由质谱中特定的质量信号图形表示。将信号图形与参考光谱库中的图形比较,此处是质谱参考1号和2号。质谱参考1号与测得的信号图形匹配不足;与此相反,质谱参考2号与测得的信号图形匹配良好,所以可确定微生物的种。图2的右侧显示了用于通过红外吸收光谱法确定亚种和变种的简单示意性实施方案。为此,在特别的实施方案中,在特定的预定条件下,培养、制备已使用质谱分析成功按种分类的微生物,然后使用红外吸收光谱法测量这些微生物。之后,由此获得的红外吸收光谱(红外光谱)的特征可(例如)通过在种特定的参考红外光谱内应用主成分分析(PCA)来进行制作和可视化。然后可将测得的红外吸收光谱的主要部分(在图中用星号★表示)输入到的“图谱”上,即在可比较的培养、制备和红外测量后标定特定亚种和变种的参数的位置。在第一个示例中,参数★位于所有群集之外,因此不可鉴定。在第二示例中,参数★可分配至群集中,因此可确定是亚种或变种。

[0039] 图3显示了根据第二实施方案鉴定微生物亚种和变种的流程图示例。该方法首先是假设样本中含有某种微生物物种。然后,提供假设的微生物物种的亚种和变种的质谱库和红外光谱库,这些微生物物种通过种特定的培养和制备获得。然后种特定地培养来自样本的微生物分离物。然后在红外样品载板上制备分离物的微生物以用于红外光谱采集。然后采集红外光谱。然后在红外样品载板上制备微生物以用于MALDI电离。然后采集质谱。然后对这些微生物物种进行质谱鉴定。然后询问关于微生物物种的假设是否正确,如果否,本示例中的方法到此结束。如果是,利用已经采集的红外光谱和种特定的红外参考光谱鉴定亚种和变种。

具体实施方式

[0040] 目前使用的质谱方法通常仅能可靠地鉴定种,在有利的情况下,也能鉴定亚种,但是在极少数情况下,仅能鉴定微生物的属。在此应再次强调,本发明基于这样的发现:与质谱法鉴定相比,红外光谱法目前能深入到更低等级的分类学分类。这仅适用于数学分类分析中所使用的红外光谱包含一小群近缘微生物的情况,例如,仅有一个属或仅有一个种甚至一个亚种的情况,并且微生物优选在标准化的属、种、或亚种特定的条件下生长。如果参考库仅由单一微生物物种的不同致病变种和血清变型的红外光谱组成,并且前提是样本微生物实际上属于这一种,则通常可以明确确定样本中微生物的致病类型或血清型(或至少确定致病变种或血清变型群体)。如果微生物光谱不属于预期的种,则不可分配。

[0041] 然而,特别是在医学诊断中,会存在这种情况:来自血液、鼻粘液、粪便或尿液中的微生物最初在很大程度上是未知的,但通常在确定种之后,必须尽可能准确地确定到变种,例如生物变种、血清变型、噬菌体变种或致病变种。术语“致病变种”本身的意思并非指该种的所有变种都有致病性,但在医学诊断中,该词主要是指有效的致病性。由于这种确定通常不能通过质谱法单独完成,因此在这种情况下可使用根据本发明的方法之一。

[0042] 根据本发明的用于样本中微生物的分类学鉴定的方法,其基本特征是,通过红外光谱法确定亚种和/或变种,由此补充通过质谱法确定种。使用种特定的参考红外光谱库来确定亚种和变种。

[0043] 在根据本发明方法的第一实施方案中,先通过质谱法鉴定微生物物种,然后再重新培养和制备微生物,以确定亚种和变种。要精确按照获得种特定的红外参考光谱库的

外光谱所遵照的相同规范进行这种重新培养和制备。制备用于红外光谱的微生物甚至可以包括,选择和分离由其采集红外光谱的各细胞成分。例如,纯化的细胞壁可用来采集红外光谱。还可使用通过梯度离心获得的细胞成分中的任何所选部分。还可将细胞成分衍生化以获得可提供信息的红外光谱。

[0044] 从图1中可以看出,根据本发明的用于确定样本中未知微生物的种、亚种和/或变种的方法的第一实施方案包括下列步骤:

[0045] a)提供具有参考质谱的库和针对种获得的具有参考红外光谱的库;

[0046] b)培养来自样本的微生物分离物;

[0047] c)通过质谱法确定微生物的种;

[0048] d)按照获得用于该种的参考红外光谱库的微生物所遵照的种特定的规范培养和制备分离物的微生物;

[0049] e)采集红外光谱;

[0050] f)通过使用种特定的参考红外光谱的数学统计分类方法确定亚种和/或变种。

[0051] 如果,在步骤c)中通过质谱法确定微生物物种之后,确定不需要更详细的分类,或没有用于此类分类的参考红外光谱数据库,则本方法可在步骤c)之后终止。

[0052] 根据用于相应参考红外光谱库中该种的规范培养和制备微生物的步骤d)已经指出,对于每个种,都有分别收集的参考光谱,这些参考光谱通过测量按照精确适于该种的标准方法而培养的微生物而得。这些标准方法包括有关营养介质、培养持续时间和温度、营养介质上方氧气和水分含量以及红外光谱仪的样本制备类型、甚至用于分类的红外光谱的各部分的加权方式的规定。

[0053] 如果选择特定的细胞成分是实现足够良好地区分变种的唯一方式,则制备方法还可要求选择特定的细胞成分。例如,细菌的很多血清变型是通过外层细胞膜的不同类型的脂多糖(如表面抗原)进行区分的,然后命名为例如O104:H4(这是最近流行的EHEC在2011年爆发的EHEC血清变型)。此处的“O”表示“表面抗原”。精确区分脂多糖需要分离和纯化细胞壁,但不需要溶解细胞膜的外层。

[0054] 因此第一实施方案可包括这样的制备方法,其中微生物细胞被小心破坏并且细胞成分被彼此分离,然后从这些成分之一获得红外光谱。通过破坏细胞壁而进行的细胞消化不得丢失或破坏诸如包被蛋白和脂多糖等重要成分。虽然,通常使用强酸(70%的甲酸或三氟乙酸)来进行细胞消化以尽可能溶解所有蛋白质,但在此处使用溶菌酶进行细胞消化更有利。然后优选使用梯度离心将消化的细胞分离为各种细胞成分,只有某些成分(例如细胞壁)用于红外光谱测量。

[0055] 然而,在第一实施方案中,先获得质谱,然后再获得红外光谱,在第二实施方案中,顺序相反。如果对样本中存在何种微生物物种已有想法,则第二实施方案更优选。基于这一假设培养种特定的培养物,并且在红外光谱样品载板上制备来自菌落的分离物。诸如硒化锌板或硅板等可透过红外光的材料已成功用作红外样品载板。在采集红外光谱后,制备微生物样品以用于MALDI电离,即消化微生物并在基质结晶中制备微生物细胞的内容物。这可在用于红外测量的样品载板上进行,例如在硅载板上。采集质谱从而鉴定微生物物种,从而证实或证伪关于种的假设。如果假设的微生物物种存在,则可通过已采集的红外光谱确定亚种以及变种(若适用)。如果未通过质谱法确认假设的种就进行此类确定,则可能导致危

险的假阳性或假阴性。

[0056] 第二实施方案特别有吸引力,因为红外光谱和质谱可来自相同的微生物,在特别的实施方案中,还在相同的样品载板上。图3显示了第二实施方案的流程图的示例。

[0057] 第二实施方案特别适用于肠细菌,即特别是大肠杆菌。经过培训的专业人士已经能够正确地将皮氏培养皿中凝胶营养介质上的菌落鉴定为大肠杆菌,概率大约为90%,因此这一程序有很高的成功概率。对于大肠杆菌,迫切需要鉴定致病型,例如EHEC。然而,如果未通过质谱法确认大肠杆菌,那么,例如由于是柠檬酸杆菌(*Citrobacter*),则红外光谱的评估可导致在诊断上非常危险的错误结果。

[0058] 上述示例方法需要存在种特定的或制备特定的红外光谱库。实际上可由专业人士在自己的微生物实验室中创建这些光谱库,尽管这起初听起来像无法掌控的巨大任务。但是显然,首先,严格的标准化使得不同实验室之间可以交换光谱库;其次,在微生物常规实验室中,仅四到六个微生物物种占据了日常必须进行的超过80%的鉴定。这里面只有三、四种可能需要更详细的分类(例如:大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌);另外,实验室可能只对少数几个较罕见的微生物物种感兴趣并进行更详细的分类。虽然由于具体业务重点不同,实验室间最感兴趣的微生物物种可能不同,但经过一定时间,各实验室确实能够为这些微生物编制此种红外光谱库。

[0059] 如以上简述,在少数但有时很重要的情况中,质谱鉴定方法不能很好地可靠区分两个种(甚至属)。对于一个微生物物种,质谱参考库通常包含五个和二十个之间的不同株系的参考光谱,以这样的方式选择这些株系:其参考光谱尽可能广泛地覆盖该微生物物种质谱中的变化。就相似度而言,特定种的质谱变化可能与不同种甚至属的质谱重叠。这种情况必须得到重视,这是明确区分大肠杆菌物种(除了上述EHEC变种外,还有一个变种,是相对无害的旅行者痢疾的病原体)和志贺氏菌(*Shigella*)属(四个种;志贺氏菌病(杆菌性痢疾)的病原体,需要医学治疗)的问题。大肠杆菌物种的质谱具有非常大的变化。因此它们偶尔会与四种志贺氏菌物种(波伊德氏志贺氏菌(*Shigella boydii*)、痢疾志贺氏菌(*Shigella dysenteriae*)、弗氏志贺氏菌(*Shigella flexneri*)和宋内志贺氏菌(*Shigella sonnei*),它们彼此之间可通过质谱法轻松区分)中的一种或其他种的质谱极其相似,因此通常无法进行明确的质谱鉴定。

[0060] 此时,值得一提的是,系统发生的相似性让一些分子生物学家认为这四个志贺氏菌物种不能构成独立的属,而实际上代表大肠杆菌的四个亚种。无论将来是否发生重新分类,不同的治疗需求意味着鉴定该亚种的问题仍然存在。

[0061] 根据本发明方法的上述特别的实施方案为此提供了帮助,但在这种情况中,使用了包含志贺氏菌属和大肠杆菌物种的微生物的红外参考库。如果志贺氏菌或大肠杆菌的质谱鉴定非常明确,则程序成功结束。但是,如果不明确,则使用包含志贺氏菌属和大肠杆菌物种的红外光谱参考库,并且优选按照用于培养该红外光谱参考库的参考光谱的微生物的规范来培养微生物。然后,红外光谱使得可以可靠地确定种的存在。少量的这类相似情况需要使用红外光谱法最终确定种,因此,需要含有不能通过质谱法区分的所有种的参考红外光谱的数据库。

[0062] 若要确定该种的亚种和变种,则可能需要使用针对该种选择的该种的特定参考红外光谱或该属的参考光谱的特定评估算法进行第三步分析。因此,可在明确鉴定大肠杆菌

之后,确定变种。大肠杆菌是肠道正常菌群的一部分,其本身无害,但是有很多致病性变种。除了上面提到的EHEC(于1977年首次描述,包括不同的血清变型,例如血清变型O157、血清变型O103和血清变型O26),还有其他致病性大肠杆菌:肠致病性大肠杆菌(enteropathogenic *E.coli*,EPEC)、肠产毒性大肠杆菌(enterotoxigenic *E.coli*,ETEC)、肠侵袭性大肠杆菌(enteroinvasive *E.coli*,EIEC)、肠聚集性大肠杆菌(enteroaggregative *E.coli*,EAEC)和弥散粘附性大肠杆菌(diffusely adherent *E.coli*,DAEC)。在此,可以有利地应用破坏微生物细胞和使细胞成分彼此分离的基本方法,然后再采集其中一种成分的红外光谱。仅将某些成分(例如细胞壁)用于红外光谱测量。

[0063] 对于任何治疗来说,微生物对某些抗生素的耐药性特别有意义,但这仍需使用费时费力的分析方法确定。改进的红外光谱测量方法将能够确定具体的耐药性类型。还可期待血清变型可与抗生素耐药性相关联。

[0064] 根据本发明的方法使用红外光谱法可直接检测不同类型的抗生素耐药性,也可只使用微生物的某些部分用于光谱测量。这些部分可(例如)在通过离心(特别是密度梯度离心)破坏细胞之后用基本上已知的方法获得。适用情况下,还可通过衍生化、凝聚或其他生物化学修饰制备微生物的成分,使得可通过它们的红外光谱使具有不同耐药性的微生物彼此区分。

[0065] 已经使用多个不同实施方案描述了本发明。但是,应当认识到,在不偏离本发明技术教导的前提下,如果可行,本发明的不同方面或细节可以修改,或不同实施方案的不同方面或细节可以任意组合。一般来说,以上描述仅出于说明目的,并非出于限制本发明的目的,本发明的范围仅由所附权利要求书限定。

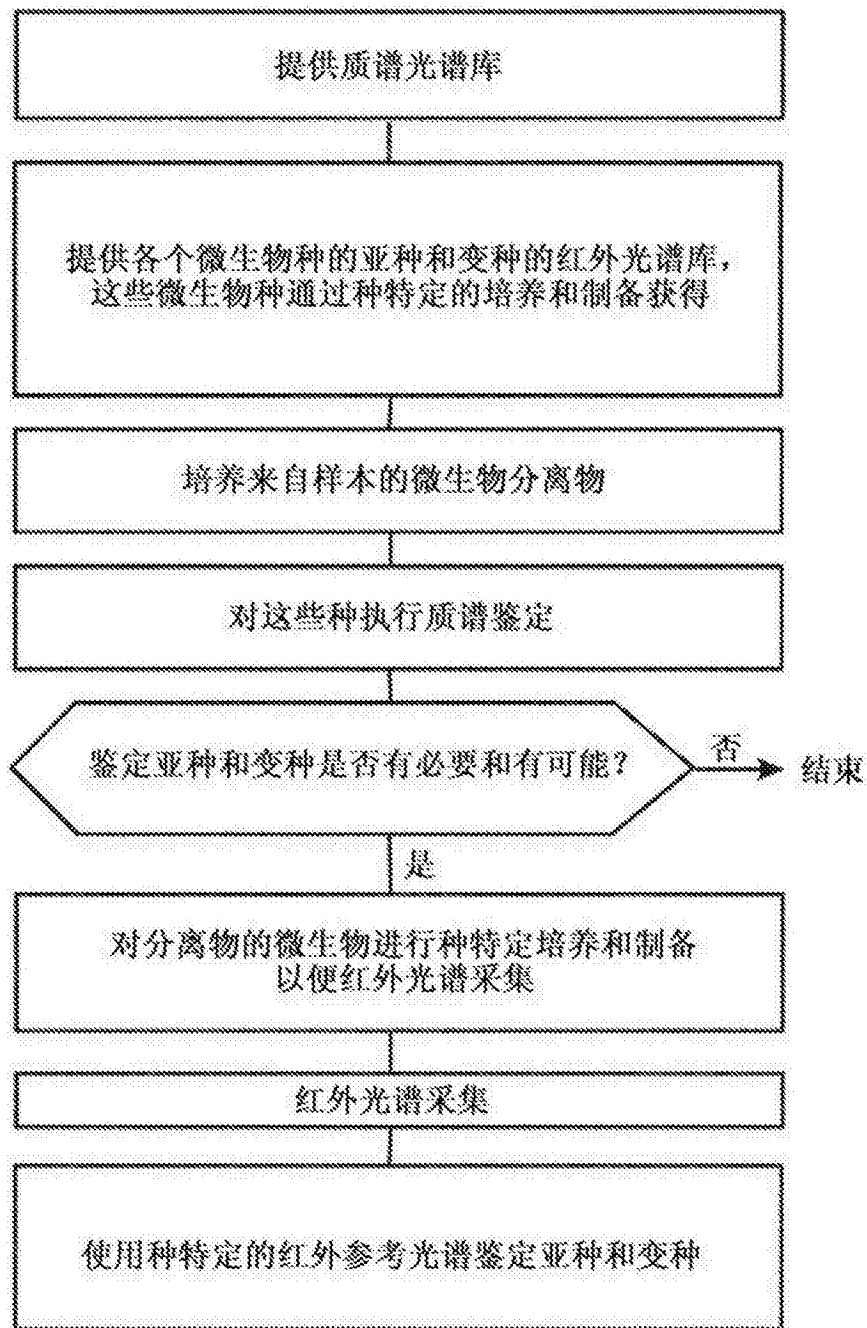


图1

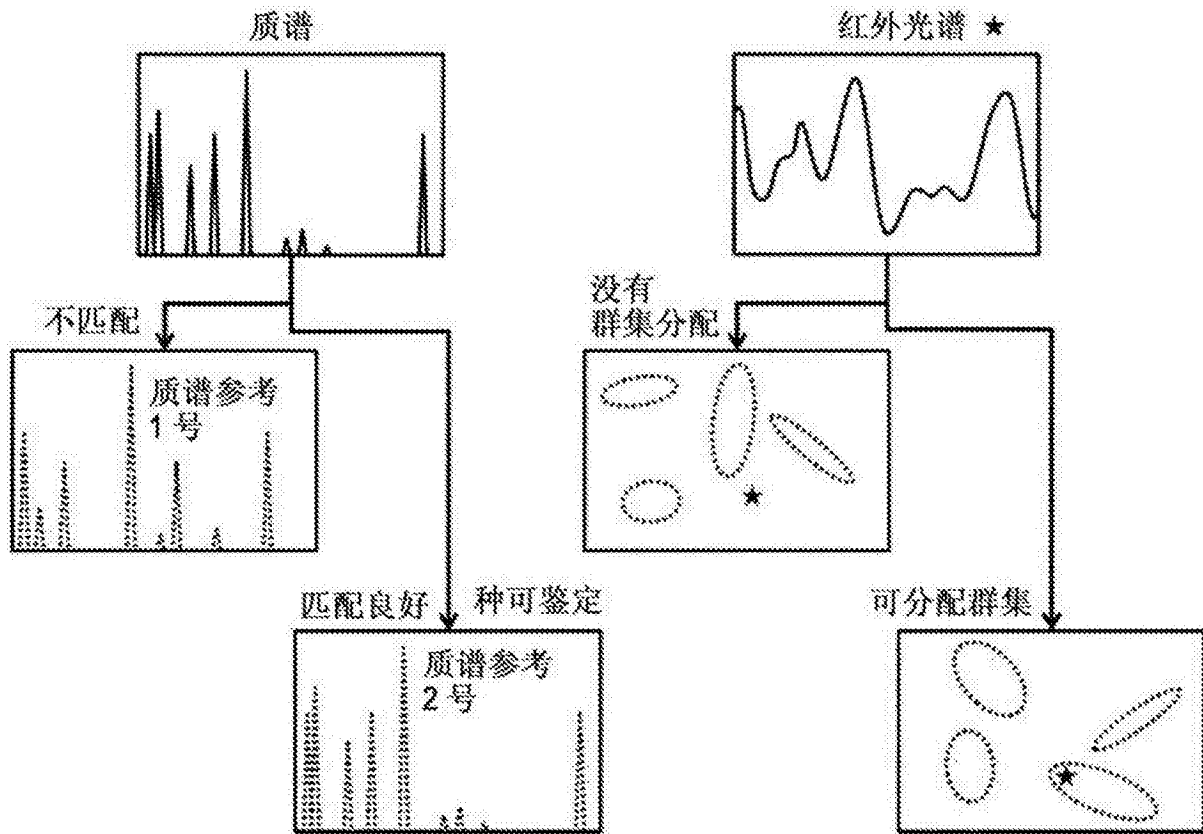


图2

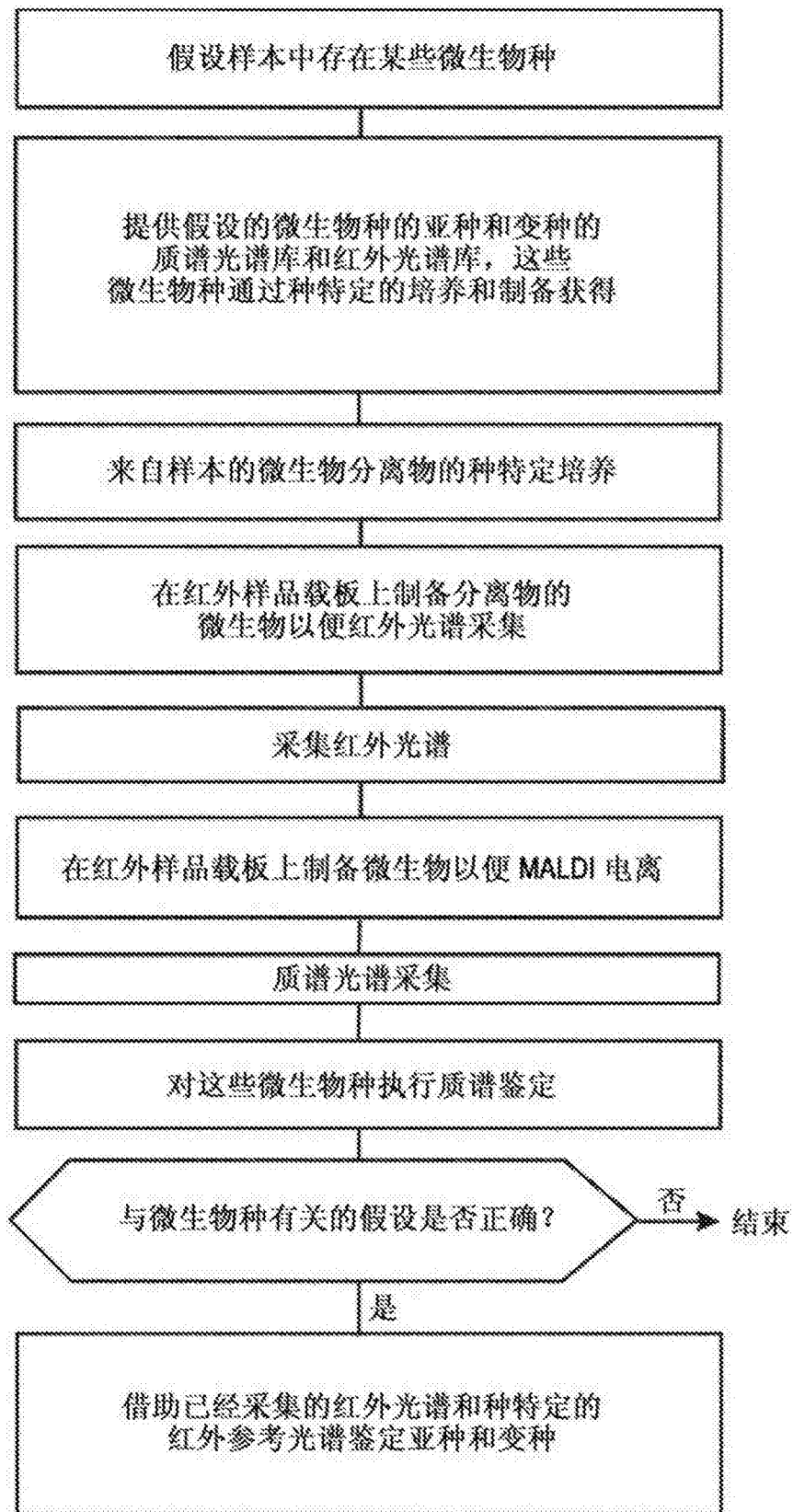


图3