

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03822691. X

[51] Int. Cl.

C12N 5/00 (2006.01)

C12Q 1/14 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009 年 4 月 8 日

[11] 授权公告号 CN 100475954C

[22] 申请日 2003.9.23 [21] 申请号 03822691. X

[30] 优先权

[32] 2002. 9. 23 [33] FR [31] 02/11718

[86] 国际申请 PCT/FR2003/002788 2003. 9. 23

[87] 国际公布 WO2004/027086 法 2004. 4. 1

[85] 进入国家阶段日期 2005. 3. 23

[73] 专利权人 A·兰巴赫

地址 法国巴黎

[72] 发明人 A·兰巴赫 A·勒库斯蒂米耶

[56] 参考文献

WO0053799A1 2000. 9. 14

CEFOTETAN A NEW CEPHAMYCIN COMPARISON OF IN - VITRO ANTI MICROBIAL ACTIVITY WITH OTHER CEPHEMS BETA LACTAMASE STABILITY AND PRELIMINARY RECOMMENDATIONS FOR DISC DIFFUSION TESTING. AYERS L W ET AL. Antimicrobial Agents and chemotherapy, Vol. 22 No. 5. 1982

审查员 安玉苹

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

代理人 程伟

权利要求书 1 页 说明书 8 页

[54] 发明名称

检测甲氧西林抗性的微生物的方法

[57] 摘要

本发明涉及新的用于检测甲氧西林抗性的微生物的固体培养基，含有选自头孢菌素类的抗生素，特别是二代或三代的头孢菌素，以及携带发光团的显色剂，在用所述微生物中的活性酶水解后，该发光团被释放。

1. 用于检测甲氧西林抗性的金黄色葡萄球菌的培养基，除了用于所述金黄色葡萄球菌生长的营养外，包含选自二代或三代头孢菌素的抗生素，以及一种显色剂，被在所述金黄色葡萄球菌中有活性的酶水解后，
5 显色剂释放一种发光团。
2. 根据权利要求 1 所述的培养基，其中所述显色剂为 5-溴-6-氯-3-吡啶磷酸盐。
3. 根据权利要求 1-2 的任何一项所述的培养基，特征在于所述抗生素是头孢孟多。
10
4. 根据权利要求 1-2 的任何一项所述的培养基，特征在于所述抗生素选自头孢霉素和氧头孢烯。
5. 权利要求 4 所述的培养基，其特征在于所述抗生素选自头孢西丁、头孢美唑、拉氧头孢、cefotetan 和氟氧头孢。
- 15 6. 权利要求 5 所述的培养基，特征在于所述抗生素是头孢西丁。
7. 权利要求 5 所述的培养基，特征在于所述抗生素是 cefotetan。
8. 权利要求 5 所述的培养基，特征在于所述抗生素是氟氧头孢。
9. 根据权利要求 5 所述的培养基，特征在于其含有 5-溴-6-氯-3-吡啶磷酸盐和 5-溴-4-氯-3-吡啶葡萄糖苷。
- 20 10. 根据权利要求 1 所述的培养基，特征在于其还包含如下的两种显色剂中的至少一种：5-溴-4-氯-3-吡啶半乳糖苷和 5-溴-4-氯-3-吡啶葡萄糖醛酸化合物。
11. 根据权利要求 1 所述的培养基，特征在于其还含有选自万古霉素、替考拉宁和阿伏霉素，以及它们的混合物的抗生素。
- 25 12. 根据权利要求 1 所述的培养基，特征在于其进一步包含氯化钠。
13. 根据权利要求 12 所述的培养基，特征在于氯化钠的浓度小于 3%。
14. 根据权利要求 13 所述的培养基，特征在于氯化钠的浓度等于 2-2.5%。
15. 根据权利要求 1 所述的培养基，特征在于抗生素的浓度在
30 0.5-50mg/l 之间。
16. 根据权利要求 1 所述的培养基，特征在于显色剂的浓度在 0.01-0.5g/l 之间。

检测甲氧西林抗性的微生物的方法

5 本发明涉及新的用于检测甲氧西林 (meticillin) 抗性的微生物的胶状培养基, 含有选自头孢菌素类特别是二代或三代头孢菌素的抗生素, 以及携带发光团的显色剂, 在用所述微生物中的活性酶水解后, 该发光团被释放。

系统地检测甲氧西林 (也写作 methicillin) 抗性的金黄色葡萄球菌 (MRSA) 是很重要的。

实际上, 虽然 MRSA 的毒性未超过 MSSA (甲氧西林敏感的金黄色葡萄球菌), 但是被 MRSA 感染后, 治疗更加困难并且昂贵。这是由于甲氧西林抗性使所有个体具有对 β -内酰胺化的抗性, 这种抗性通常与对多种其他主要的抗葡萄球菌抗生素的抗性相关 (Lyon 和 Skurry, 15 Microbiol. Rev. 51; 88-134)。

添加甲氧西林的琼脂生长培养基有时被用于这种检测。这种方法检测特定 MRSA 菌株的效果差, 特别是群体中含有极低比例的对甲氧西林的完全抗性的细菌的异种型菌株 (其中每 10^4 或 10^8 个菌株中, 有一个菌株表达这种抗性), 因此, 目前通常不采用这种方法。这种方法产生 20 大量假阴性结果。

通常, 采用添加了新青二 (oxacillin) 的琼脂生长培养基, 但是与甲氧西林相比, 这种培养基难以检测某些菌株。

此外, 为了使这些抗生素 (甲氧西林、新青二) 高效或低效地作为一种选择性添加剂, 只有一些培养基可以被使用。因此, 推荐使用的 25 培养基为, 例如, Muller Hinton 琼脂或 Mannitol Salt 琼脂的衍生物。不幸的是, 对于使用者来说, 这些培养基对金黄色葡萄球菌种属通常相对不容易识别, 进一步降低灵敏度和特异性。

相对于不容易识别的培养基 (例如, 来源于 Mannitol Salt 琼脂) 或识别性高的 CHROMagar Staph aureus, 推荐使用添加托普霉素或氧 30 氟沙星 (ofloxacin) 的琼脂生长培养基, 但是其与甲氧西林抗性的相关性不突出, 因此, 出现大量的假阳性和假阴性。

还可以采用琼脂扩散方法，例如，使用 Muller Hinton 琼脂，其包括将浸渍抗生素的纸盘放到植入了所试验的细菌的琼脂上。围绕每个纸盘，在琼脂中建立抗生素浓度梯度。接种后，在各个纸盘的周围形成抑菌圈，可以测定直径，反映 MIC 值（最小抑制浓度，未检测到微生物生长的最小浓度）。

本发明涉及高灵敏度和特异性的琼脂培养基，用于检测甲氧西林抗性的微生物，特别是葡萄球菌，尤其是金黄色葡萄球菌。

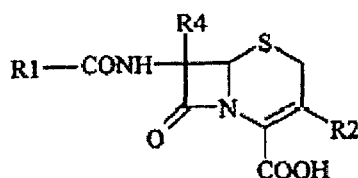
因此，在本发明中，利用显色培养基的可识别性作用，结合二代或三代头的孢菌素家族的抗生素的特性，使检测甲氧西林抗性的微生物成为可能。

因此，本发明涉及用于检测甲氧西林抗性的微生物的培养基，除了用于所述微生物生长的营养外，其包含至少一种选自二代或三代的头孢菌素的抗生素，以及显色剂，在被在所述微生物中有活性的酶水解后，显色剂释放发光团。

由于这些微生物在按照本发明的培养基上生长，并且存在显色剂，因此可以确定微生物的性质，因此，按照本发明的培养基，可以直接检测甲氧西林抗性的微生物。从而无需其他步骤来确定在按照本发明的培养基上生长的微生物的性质。

按照本发明的培养基，使采用划线在培养皿上的接种物来检测甲氧西林抗性的细菌成为可能，而现有技术的大部分方法采取将约 10^4 到 10^8 个细菌添加到琼脂上。按照本发明的培养基可以被直接用于来自患者的样本，或者用于富集阶段后。

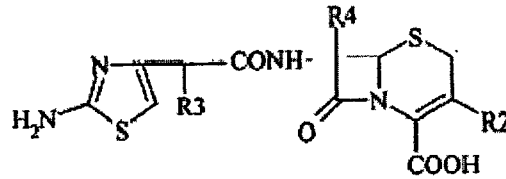
表达“二或三代的头孢菌素”用于表示具有衍生于下面的化学式(I)的化学式的头孢菌素家族的抗生素：



其中，R2 是 H、乙酰氧甲基、甲硫四唑、二甲基乙硫基四唑、三嗪、乙酰氨基吡啶（吡啶盐）或者用氨基甲酰基团取代的吡啶盐、环五吡啶或者硫甲基乙酰氧三嗪，R1 为氨基-2-噻唑杂环、 α -哌嗪二酮、 α -

磺苯基, R4 是 H 或者 α -甲氧基。

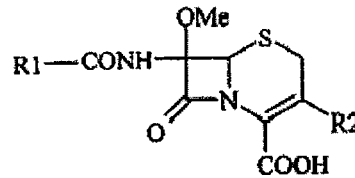
特别地, 表示具有如下化学式的化合物:



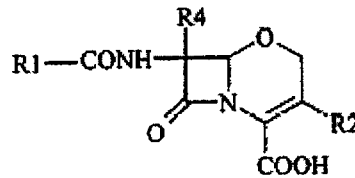
其中, R3 是 H 或 α -甲氧基亚氨基。

5 在特定情形下, R4 是氢。

头孢霉素是 R4 为 α -甲氧基的化合物, 防止 β -内酰胺环被 β -内酰胺酶水解, 对应于如下化学式:



10 氧头孢烯 (oxacephem) 是头孢烯环中的硫原子被氧原子取代的化合物, 被认为是上面给出的化学式 (I) 的衍生物。



总之, 对于这些化合物来说, R4 是 α -甲氧基。

15 头孢菌素的定义存在于 Bingers 中 (Mécanisme d' Action des Bêtalactamines, (de la structure bactérienne à la structure de la molécule) [β -乙酰胺的作用机制 (从细菌结构到分子结构)], 1986, Roussel (巴黎) 出版社, 第三章, 第 47-62 页和第四章第 63-68 页), 在 Richmond 的工作中 (β -乙酰胺抗生素 (作为治疗剂的背景), Hoechst Aktiengesellschaft, D-6230 Frankfurt (Main) 80 出版社, 1981, 第 3 章, 第 55-65 页)。

20 其次, 还应当指出, 二代环孢菌素具有比一代环孢菌素更好的抗革兰氏阴性细菌的作用, 具有更好的对 β -乙酰胺酶降解的抗性, 三代环孢菌素具有更广的革兰氏阴性菌抗菌谱。

在二代和三代头孢菌素中，需要提及：氯碳头孢（loracarbef）、头孢克洛（cefaclor）、头孢呋肟（cefuroxime）、头孢丙烯（cefprozil）、头孢西丁（Cefoxitin）（cefoxitan）、头孢孟多（Cefamandole）、cefotian、头孢替坦、头孢美唑（cefmetazole）、5 cefocinide、头孢雷特、头孢泊肟、头孢克肟、头孢噻肟、头孢唑肟、头孢曲松、头孢他啶、头孢甲肟、头孢地秦、头孢哌酮、头孢吡肟、头孢匹罗、cefsulfonide、头孢他美（cefetamete）、头孢布烯（ceftibutene）、拉他头孢（moxalactam）、拉氧头孢（latamomef）和氟氧头孢（flomoxef），特别是盐的形式（钠盐）。本领域的技术人员10 能够获得一系列这种化合物，特别在网站 www.biam2.org 或者 www.fpnotebook.com。

在优选实施方案中，所述抗生素是头孢孟多。

在另一个优选实施方案中，所述抗生素选自头孢素（头孢甲氧噻吩、cefotetan、头孢美唑、cefbutperazone、cefminox）和氧头孢烯（拉15 氧头孢、latamoxef 或氟氧头孢）。

在一个优选实施方案中，所述抗生素是头孢甲氧噻吩。

在优选实施方案中，所述抗生素为头孢美唑。

在优选实施方案中，所述抗生素是拉氧头孢。

在优选实施方案中，所述抗生素是 cefotetan。

20 在按照本发明的培养基中，抗生素的浓度优选在 0.5 和 50mg/l 之间，优选在 1.5 和 30mg/l 之间，特别在 1.5 和 15mg/l 之间。本领域技术人员通过极少数的常规试验，就能够将所试验的抗生素的浓度相对于所研究的微生物调整为 MIC 作用（最小抑制浓度，未检测到微生物生长的最小浓度）。

25 应当指出，在能够形成本发明的培养基的组成部分的抗生素中，一些抗生素赋予所述培养基某些特性。例如，头孢西丁或头孢美唑使所述培养基具有至少 2 个月的特定稳定性。

例如，当培养基温度为 48℃ 时，往培养基中加入浓度为 5mg/l 的头孢西丁来制备按照本发明的培养基，具有至少 2 个月的稳定性。当培30 培养基为 48℃ 时，往所述培养基中添加浓度为 2.5mg/l 的头孢美唑来制

备按照本发明的培养基，所述培养基的稳定性将达到至少 5 个月。

表达“培养基的稳定性”用于指按照本发明的培养基的性能，使得可以在特定时间内可选择地检测甲氧西林抗性的微生物，特别是金黄色葡萄球菌，在整个时间段中，具有相同的可靠性。

5 还应当指出，其他的头孢菌素、氟氧头孢，部分地具有在超过 100 °C 的温度下保留其抗生素活性的性能（本发明人甚至在 121 °C 下验证了其抗性）。

这种特性使得可能以简单的粉末形式来制备按照本发明的培养基，这显著地减少需要在无菌条件下进行的制备各种培养基的操作。因此，
10 可以在加热前将氟氧头孢添加到所制备的培养基中，方便了制备。这种优点不是毫无意义的，它使需要制备这种培养基的任何个体的任务变得更加容易，而无论他们具有多少本领域的经验。

在优选的实施方案中，所述微生物是葡萄球菌，优选使用选自专利申请 W000/53799 中描述的 5-溴-6-氯-3-吡啶磷酸盐和 5-溴-4-氯-3-吡啶葡萄糖苷的显色剂。
15

金黄色葡萄球菌的培养基是已知的，被描述在手册“Oxoid Unipath Litimed”，Wade Road, Basingstoke, Hampshire, RG24 OPW, 英格兰。例如，该培养基可以是“Nutrient Agar Oxoid CM3”，一种主要基于酵母提取物、蛋白胨和琼脂的培养基。

20 在优选实施方案中，所述培养基含有 5-溴-6-氯-3-吡啶磷酸盐和 5-溴-4-氯-3-吡啶葡萄糖苷。

按照本发明的培养基优选含有 0.01-0.50g/l，特别是 0.05-0.40g/l 的 5-溴-6-氯-3-吡啶磷酸盐，优选 0.01-0.20g/l 的 5-溴-4-氯-3-吡啶葡萄糖苷，优选 0.01-0.20g/l 的 5-溴-4-氯-3-吡啶半乳糖苷，优选
25 0.01-0.20g/l 的 5-溴-4-氯-3-吡啶葡醛酸化合物。

在特别的实施方案中，按照本发明的培养基还包含至少一种如下的显色剂：5-溴-4-氯-3-吡啶半乳糖苷和 5-溴-4-氯-3-吡啶葡醛酸化合物。

在特别的实施方案中，所述培养基还含有去铁胺（deferoxamine）。
30 实际上，去铁胺使培养基能够抑制表皮葡萄球菌，而不抑制金黄色葡萄球菌，所用浓度优选为 0.01-0.10g/l 之间。

在一个实施方案中，按照本发明的培养基还含有选自万古霉素、替考拉宁 (teicoplanin)、阿伏霉素 (avoparcin) 以及它们的混合物的糖肽抗生素，检测抗甲氧西林和万古霉素的微生物。可以使用约 5mg/l-50mg/l 的这些抗生素，更特别地为 5mg/l-30mg/l，
5 10mg/l-30mg/l 和约 25mg/l。

在本发明中，发明人已经证明培养基无需高的渗透负载 (load)。因此，与以新青二 (oxacillin) 作为抗生素，添加了氯化钠的检测甲氧西林抗性的金黄色葡萄球菌的培养基不同，具有小于 3% 的钠浓度，约等于 2-2.5% 时，按照本发明的培养基还是有功能的。可以按照培养
10 基中的氯化钠含量来调整培养条件 (培养时间、较高或较低的温度等)。

本发明还涉及按照本发明的培养基用于检测甲氧西林抗性的微生物的用途。

本发明还涉及检测样本中的甲氧西林抗性的微生物的方法，包括步骤：

15 一用所述样本或来源于所述样本的接种物接种按照本发明的培养基，
一在允许所述微生物生长的条件下培养所述微生物，
一通过是否存在被染色的菌落来在所述培养基上检测是否存在甲氧西林抗性微生物。

培养条件对本领域技术人员来说是已知的，通常采用在 25°C 和 42
20 °C 之间的温度下进行培养，优选在 30°C 和 38°C 之间。

培养时间是常规的 (约 24 小时)。

根据所试验的微生物，可以采用较短或更长的培养时间，在有氧或无氧的条件下进行，等。

按照本发明的培养基使得可能容易地检测甲氧西林抗性的葡萄球菌，同时减少分析时间。实际上，在本发明中，组合选择抗生素和显色剂，能够减少假阳性和假阴性的数量，从而减少实施附加分析的必要。
25

实施例

实施例 1

30 用于检测甲氧西林抗性的金黄色葡萄球菌的按照本发明的培养基的组成：

	蛋白胨和酵母提取物	40g/l
	NaCl	25g/l
	5-溴-6-氯-3-吡啶磷酸盐	0.10g/l
	5-溴-4-氯-3-吡啶葡萄糖苷	0.05g/l
5	5-溴-4-氯-3-吡啶半乳糖苷	0.05g/l
	5-溴-4-氯-3-吡啶葡醛酸化合物	0.05g/l
	去铁胺	0.05g/l
	琼脂	0.05g/l

10 高压灭菌后，在培养基固化之前，将新青二（6mg/ml）或者头孢西丁（cefoxintin）（5g/l）加入培养基中（温度约 45℃）。

这种培养基含有 5-溴-6-氯-3-吡啶磷酸盐和 5-溴-4-氯-3-吡啶葡萄糖苷，可以特异地检测金黄色葡萄球菌（菌落染色为紫色），还含有 5-溴-4-氯-3-吡啶半乳糖苷和 5-溴-4-氯-3-吡啶葡醛酸化合物，用以对可能存在于接种物中的其他微生物进行染色。

15

实施例 2

研究甲氧西林抗性的金黄色葡萄球菌在 CHROMagar Staph aureus 培养基（购自 CHROMagar 公司，法国巴黎，4, Place du 18 Juin 1940, 75006）中的生长：

AR4295 MetiS: 甲氧西林敏感性菌株

20 AR4297 MetiS: (同种型) 甲氧西林抗性菌株

Mrhet: (异种型) 甲氧西林抗性菌株

Z252: 甲氧西林抗性菌株, 同种型, 低抗性

	AR4295 MetiS	AR4297 MetiR	Mrhet	Z252
CHROMagar Staph aureus	+	+	+	+
CHROMagar Staph aureus +新青二 6mg/ml	-	+/-*	-	-
CHROMagar Staph aureus +头孢西丁 5mg/l	-	+	+	+

+ = 菌落生长; - = 不生长; * = 微菌落

通过划线，将细菌培养物接种到 Petri 培养皿上，在 37℃ 下培养

24 小时后观察分离的细菌的生长。

生长的细菌在培养基中产生紫色菌落，证明微生物是金黄色葡萄球菌。

因此，由于结合了细菌生长和菌落着色，按照本发明的培养基能够
5 直接检测甲氧西林抗性的金黄色葡萄球菌，该金黄色葡萄球菌中包括
异种型菌株或低抗性水平的菌株。