Office de la Propriété Intellectuelle du Canada
Un organisme d'Industrie Canada

Canadian Intellectual Property Office
An agency of Industry Canada

CA 2168114 C 2004/12/14

(11)(21) 2 168 114

(12) BREVET CANADIEN
CANADIAN PATENT

(13) C

(86) Date de dépôt PCT/PCT Filing Date: 1994/07/28
(87) Date publication PCT/PCT Publication Date: 1995/02/09
(45) Date de délivrance/Issue Date: 2004/12/14
(85) Entrée phase nationale/National Entry: 1996/01/25
(86) N° demande PCT/PCT Application No.: FR 1994/000958
(87) N° publication PCT/PCT Publication No.: 1995/004157
(30) Priorité/Priority: 1993/07/28 (93/09294) FR

(51) Cl.Int.^{6}/Int.Cl.^{6} C12Q 1/04, C12Q 1/34

(72) Inventeur/Inventor:
RAMBACH, ALAIN, FR

(73) Propriétaire/Owner:
RAMBACH, ALAIN, FR

(74) Agent: ROBIC

(54) Titre : PROCEDE D'IDENTIFICATION DE MICROORGANISMES AVEC AU MOINS DEUX CHROMOGENES
(54) Title: PROCESS FOR INDENTIFYING MICROORGANISMS WITH AT LEAST TWO CHROMOGENS

(57) Abrégé/Abstract:
La présente invention concerne un procédé de mise en évidence de la présence ou de l'absence d'une souche de microorganisme particulière dans un milieu de culture, caractérisé en ce qu'on introduit dans le milieu de culture au moins deux chromogènes substrats d'enzyme de ladite souche, lesdits chromogènes étant choisis pour que dans le milieu de culture la présence de ladite souche soit révélée par une tierce couleur.

PCT ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIETE INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets 6 : C12Q 1/04, 1/10

A1

(11) Numéro de publication internationale: WO 95/04157

(43) Date de publication internationale: 9 février 1995 (09.02.95)

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR94/00958

(22) Date de dépôt international: 28 juillet 1994 (28.07.94)

(30) Données relatives à la priorité:
93/09294 28 juillet 1993 (28.07.93) FR

(71)(72) Déposant et inventeur: RAMBACH, Alain [FR/FR]; 73, boulevard Montparnasse, F-75006 Paris (FR).

(74) Mandataire: WARCOIN, Jacques; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).

(81) Etats désignés: CA, JP, RU, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

2168114

Publiée

Avec rapport de recherche internationale.
Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.

(54) Title: MICROORGANISM IDENTIFICATION METHOD USING AT LEAST TWO CHROMOGENS

(54) Titre: PROCEDE D'IDENTIFICATION DE MICROORGANISMES AVEC AU MOINS DEUX CHROMOGENES

(57) Abstract

A method for revealing the presence or absence of a particular microorganism strain in a culture medium, wherein at least two strain enzyme substrate chromogens are added to the culture medium, said chromogens being selected so that the presence of said strain in the culture medium is revealed by a third colour.

(57) Abrégé

La présente invention concerne un procédé de mise en évidence de la présence ou de l'absence d'une souche de microorganisme particulière dans un milieu de culture, caractérisé en ce qu'on introduit dans le milieu de culture au moins deux chromogènes substrats d'enzyme de ladite souche, lesdits chromogènes étant choisis pour que dans le milieu de culture la présence de ladite souche soit révélée par une tierce couleur.

"Procédé d'identification de microorganismes avec au moins deux chromogènes"

La présente invention concerne un procédé de mise en évidence de la présence ou de l'absence d'une souche de microorganisme particulière dans un milieu de culture.

La détection de microorganisme est très importante notamment dans l'industrie alimentaire, au niveau du contrôle des eaux ou en médecine, sachant que ces microorganismes peuvent non seulement se révéler être des agents pathogènes, mais également consister en des agents mettant en évidence certains types de contaminations.

Différents procédés permettent de mettre en évidence la présence de microorganismes, dans un milieu quelconque, consistant à prélever un échantillon du milieu considéré, puis à favoriser le développement des microorganismes présents par culture sur ou dans un milieu approprié.

De manière à simplifier la mise en évidence des microorganismes présents, il a été proposé d'utiliser dans le milieu de détection des composés colorés dont la présence est caractéristique d'un microorganisme donné.

La coloration est souvent révélatrice d'une activité enzymatique liée au microorganisme considéré, et le résultat de cette activité peut résulter en une modification du pH du milieu, mise en évidence par un indicateur coloré (EP-A-0 395 532), ou encore en la libération d'un composé chromophore ou fluorophore (FR-A-2 684 110).

Les chromophores ou fluorophores sont des composés généralement obtenus par hydrolyse enzymatique de composés chromogènes ou fluorogènes correspondants, présents dans le milieu de culture.

Les fluorophores émettent un rayonnement caractéristique par fluorescence.

Les composés chromophores sont caractérisés par une couleur d'une longueur d'onde dominante.

Parmi les composés chromophores connus, on notera notamment les dérivés de l'indoxyle, de l'hydroquinoline ou encore les dérivés naphtoïques, ou les dérivés du naphtyle et du phényle.

De manière à différencier deux genres de microorganismes différents dans un milieu de culture, il a même été proposé d'introduire deux agents chromogènes, chacun libérant un composé chromophore d'une couleur caractéristique de la présence d'un microorganisme particulier (US-A-5 210 022).

Bien que l'ensemble de ces milieux soit performant pour la détection de microorganismes d'un genre spécifique, comme par exemple Salmonella, Candida ou E.coli, et leur distinction parmi d'autres espèces, ils ne permettent toutefois pas la détection d'un grand nombre de microorganismes de genres différents sur un même milieu de culture, ou encore parmi les microorganismes d'un même genre la différenciation des espèces pathogènes des autres.

Une telle distinction parait d'autant plus importante pour certaines espèces de levures comme Candida albicans qui est responsable de plus de 50% des pathologies liées aux levures.

Or, on a mis en évidence d'une manière inattendue que l'on pouvait observer au minimum quatre colorations différentes permettant de caractériser les souches en introduisant dans le milieu de culture au moins deux chromogènes substrats d'enzymes d'une souche particulière, les deux chromogènes étant choisis pour que dans le milieu de culture la présence d'au moins une souche soit révélée par une tierce couleur, à savoir :

- les deux couleurs des chromophores correspondant aux chromogènes choisis,
- la couleur correspondant au mélange des chromophores et
- la tierce couleur.

Dans de nombreux cas, la tierce couleur ne correspond pas au mélange des couleurs des deux chromophores correspondants et est une couleur dont la longueur d'onde dominante ne correspond pas à la longueur d'onde dominante du mélange des chromophores libérés par les chromogènes présents dans le milieu de culture pris isolément.

La longueur d'onde dominante des chromophores et des tierces couleurs pourra être calculée en référence à la lumière du jour, telle que définie par la CIE (Commission Internationale de l'Energie) comme illuminant D_{65}, à partir de toute méthode standard de mesure de couleur d'objet, en particulier avec un spectrocolorimètre.

La présente invention concerne donc un procédé de mise en évidence de la présence ou de l'absence d'une souche de microorganisme particulière dans un milieu de culture, pour lequel on introduit au moins deux chromogènes substrats d'enzyme de ladite souche, lesdits chromogènes étant choisis pour

que dans le milieu de culture la présence de ladite souche soit révélée par une tierce couleur.

Les chromogènes sont notamment substrats des enzymes suivantes: β-galactosidase, β-glucosidase, β-glucuronidase, α-glucosidase, α-galactosidase, phosphatase, N-acetyl-β-glucosidase, N-acetyl-β-galactosidase, α-mannosidase, sulfatase, esterase, lipase et peptidase.

Les chromogènes sont avantageusement choisis parmi les composés d'une même famille chimique, de préférence parmi ceux qui libèrent par hydrolyse deux chromophores différents qui peuvent subir une réaction de couplage.

Par réaction de couplage, on entend toute interaction physico-chimique par laquelle la longueur d'onde dominante résultante est différente de la longueur d'onde dominante du mélange des deux chromophores pris isolément.

D'une manière préférentielle, les chromogènes sont de la famille des indoxyles, en particulier des dérivés indoxyle alkylés, halogénés ou dihalogénés.

Parmi les chromophores dérivés de l'indoxyle préférés, on trouve les dérivés indoxyle, bromo-indoxyle, chloro-indoxyle, dichloro-indoxyle, chloro-bromo-indoxyle, tri-chloro-indoxyle et méthyl-indoxyle, en particulier les dérivés suivants: 6-chloro-indoxyle, 5-bromo-indoxyle, 3-bromo-indoxyle, 4,6-dichloro-indoxyle, 6,7-dichloro-indoxyle, 5-bromo-4-chloro-indoxyle, 5-bromo-6-chloro-indoxyle ou 4,6,7-trichloro-indoxyle.

Par microorganisme dont la présence ou l'absence est mise en évidence par le procédé selon l'invention, on entendra les levures, les champignons unicellulaires ou moisissures et les bactéries.

Le procédé selon l'invention est particulièrement adapté pour la mise en évidence de la présence ou l'absence des levures du genre Candida, en particulier Candida albicans et Candida tropicalis.

De même, parmi les bactéries dont la présence ou l'absence est susceptible d'être mise en évidence par le procédé selon l'invention, on trouve notamment les bactéries du genre Streptococcus, Klebsiella, Enterobacter, Escherichia, Citrobacter, Staphylococcus, Listeria, Clostridium ou Proteus.

Par ailleurs, il a été également constaté que l'adjonction d'un hydrate de carbone dans le milieu de culture à une concentration élevée permettait d'augmenter le nombre de couleurs susceptibles d'être obtenues par le procédé selon l'invention, c'est à dire pour un nombre limité de chromogènes d'obtenir un nombre élevé de couleurs distinctes permettant de distinguer autant de microorganismes différents.

En conséquence, la présente invention concerne un procédé tel que défini précédemment, pour lequel le milieu de culture présente une concentration élevée en hydrate de carbone, de préférence en glucose dans un milieu à base de peptone.

La concentration élevée en hydrate de carbone est avantageusement comprise entre 10 et 30 g/l.

De même, lorsque au moins l'un des chromogènes est substrat de la phosphatase, il est avantageux d'employer un milieu comprenant une concentration élevée en phosphate, de préférence comprise entre 1 et 3 g/l.

Les exemples reportés dans les Tableaux ci-après permettent d'illustrer le procédé selon l'invention sans toutefois chercher à en limiter la portée.

Tableau I: Exemples de chromophores simples et de tierces couleurs

Les couleurs suivantes ont été observées pour des chromogènes correspondant à différents chromophores et pour les mélanges dans un même milieu dont la composition est donnée ci-après (g/l): agar (15), peptone (5), NaCl (5), extrait de levure (2) et extrait de viande (1).

Chromophore	Couleur
5-bromo-4-chloro-3-indoxyle	bleuâtre
5-bromo-6-chloro-3-indoxyle	rougeâtre
6-chloro-3-indoxyle	roseâtre
méthyl-indoxyle	incolore
5-bromo-4-chloro-3-indoxyle 5-bromo-6-chloro-3-indoxyle	bleu métallique*
5-bromo-4-chloro-3-indoxyle 6-chloro-3-indoxyle	violet métallique*
6-chloro-3-indoxyle méthyl-indoxyle	violacé*

* tierce couleur

Tableau II: Exemples de coloration selon l'invention pour l'identification directe d' espèces variées de bactéries, distinguant également E. coli des coliformes

Les milieux ci-après on été préparé dans une base en g/l agar (15), peptone (5), NaCl (5), extrait de levure (2) et extrait de viande (1) avec :

A (mg/l) : phenyl glucuronide (100), 5-bromo-4-chloro-3-indoxyl-glucuronide (50) , 5-bromo-6-chloro-3-indoxyl-glucoside (50).

B(mg/l): 5-bromo-4-chloro-3-indoxyl-galactoside (50), 5-bromo-6-chloro-3-indoxyl-glucoside (50).

C (g/l) : 5-bromo-4-chloro-3-indoxyl-glucoside (50), 6-chloro-3-indoxyl-galactoside (50).

	A	B	C
Streptococcus D	*rougeâtre*	*rougeâtre*	*bleu*
Klebsiella	*rougeâtre*	*bleu-métallique**	*violet-métallique**
Enterobacter	*rougeâtre*	*bleu-métallique**	*violet-métallique**
Enterobacter MUG+	*bleu-métallique**		
E. coli	*bleu*	*bleu*	*roseâtre*
Citrobacter	*rougeâtre*	*bleu-métallique**	*violet-métallique**
Proteus mirabilis	*incolore*	*incolore*	*incolore*

* tierce couleur

Les couleurs données pour les milieux standard sont les suivantes :

Streptococcus D (bleu), *Klebsiella* (bleu), *Enterobacter* (bleu), *Enterobacter MUG+* (bleu), *E. coli* (incolore), *Citrobacter* (incolore).

Tableau III : Exemples de coloration selon l'invention pour des espèces variées de levure, mettant en évidence une tierce couleur et un effet de coloration dû à la présence de glucose et de phosphate

Les milieux ci-après ont été préparés:

D (g/l) : (comparatif)agar (15), peptone (5), extrait de levure (2), extrait de viande (1),NaCl (5), 5-bromo-4-chloro-3-indoxyl-N-acétyl-glucosaminide (0,1) .

E (g/l) : agar (15), peptone (10), glucose (20), phosphate (2), 5-bromo-4-chloro-3- indoxyl-N-acétyl-glucosaminide (0,1) , 5-bromo-6-chloro-3-indoxyl-phosphate (0,1).

	D	E
Candida albicans	*bleuâtre*	*vert-bleu***
Candida glabrata	*incolore*	*rose-violet***
Candida guilliermondii		*rose-violet pâle***
Candida krusei		*rose-violet***
Candida lusitaniae		*rose-violet pâle***
Candida parapsilosis		*blanche-grise***
Candida tropicalis	*bleuâtre*	*bleu-métallique** (avec halo)
Cryptococcus neoformans		*blanche-rose***
Trichosporon beigelii		*rose-grise***

* tierce couleur, **effet de milieu

Les résultats ci-dessus montrent que l'adjonction de glucose et de phosphate permet d'élargir la gamme de couleurs disponibles pour un même milieu, permettant ici de distinguer sept espèces différentes, et en particulier de repérer Candida albicans sans ambiguité.

REVENDICATIONS

1) Procédé de mise en évidence de la présence ou de l'absence d'une souche de microorganisme particulière dans un milieu de culture, caractérisé en ce qu'on introduit dans le milieu de culture au moins deux chromogènes substrats d'enzyme de ladite souche, lesdits chromogènes étant choisis pour que dans le milieu de culture la présence de ladite souche soit révélée par une tierce couleur.

2) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que les chromogènes sont des composés de la même famille chimique.

3) Procédé selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisé en ce que les deux chromogènes libèrent par hydrolyse deux chromophores différents qui peuvent subir une réaction de couplage.

4) Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que les chromogènes sont de la famille des indoxyles, en particulier des dérivés indoxyle alkylés, halogénés ou dihalogénés.

5) Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que le chromophore est choisi parmi les dérivés indoxyle, bromo-indoxyle, chloro-indoxyle,dichloro-indoxyle,chloro-bromo-indoxyle,tri-chloro-indoxyle et méthyl-indoxyle, en particulier les dérivés suivants: 6-chloro-indoxyle, 5-bromo-indoxyle, 3-bromo-indoxyle, 4,6-dichloro-indoxyle, 6,7-dichloro-indoxyle, 5-bromo-4-chloro-indoxyle, 5-bromo-6-chloro-indoxyle ou 4,6,7-trichloro-indoxyle.

6) Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que les microorganismes sont des levures.

7) Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que les levures sont du genre Candida.

8) Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que les microorganismes sont des bactéries.

9) Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que les bactéries sont du genre Streptococcus, Klebsiella, Enterobacter, Escherichia, Citrobacter, Staphylococcus, Listeria, Clostridium ou Proteus.

10) Procédé selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que le milieu de culture présente une concentration élevée en hydrate de carbone.

11) Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que le milieu de culture présente une concentration élevée en glucose dans un milieu à base de peptone.

12) Procédé selon l'une des revendications 10 ou 11, caractérisé en ce que la concentration en hydrate de carbone est comprise entre 10 et 30 g/l.

13) Procédé selon l'une des revendications 1 à 12, caractérisé en ce que le chromogène est un substrat de la phosphatase.

14) Procédé selon la revendication 13, caractérisé en ce que le milieu comprend une concentration élevée en phosphate.

15) Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce que la concentration en phosphate est comprise entre 1 et 3 g/l.