



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104105795 B

(45)授权公告日 2018.05.29

(21)申请号 201280065530.3

亚当·J·斯塔内纳斯

(22)申请日 2012.12.18

(74)专利代理机构 中原信达知识产权代理有限公司 11219

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104105795 A

代理人 张爽 郭国清

(43)申请公布日 2014.10.15

(51)Int.Cl.

C12Q 1/04(2006.01)

(30)优先权数据

C12Q 1/34(2006.01)

61/580,860 2011.12.28 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2014.06.30

(56)对比文件

W0 2007017601 A1,2007.02.15,

MANAFI M ET AL.New developments in chromogenic and fluorogenic culture media.《MICROBIOLOGY》.2000,第60卷(第2-3期),211-213页.

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/070223 2012.12.18

JOHN D PERRY ET AL.ABC MEDIUM,A NEW CHROMOGENIC AGAR FOR SELECTIVE LSOLATION OF Salmonella spp..《JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY》.1999,第73卷(第3期),全文.

(87)PCT国际申请的公布数据

W02013/101530 EN 2013.07.04

(73)专利权人 3M创新有限公司

地址 美国明尼苏达州

审查员 冯晓亮

(72)发明人 克里斯蒂娜·A·宾斯费尔德

帕特里克·A·马赫

玛拉·S·切尔特

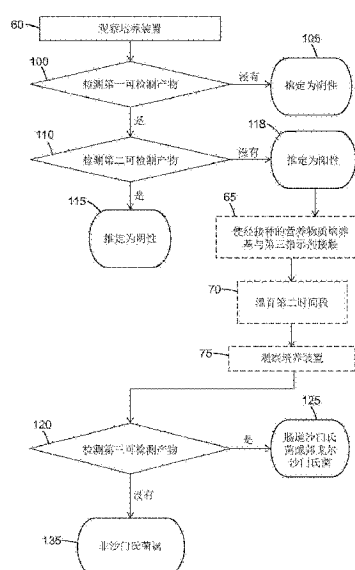
权利要求书2页 说明书19页 附图2页

(54)发明名称

检测沙门氏菌属微生物的方法

(57)摘要

本发明提供了检测沙门氏菌属微生物的方法。所述方法包括选择性生长培养基、被沙门氏菌属微生物转化为第一可检测产物的第一指示剂系统和被 β -半乳糖苷酶活性转化为第二可检测产物的第二指示剂系统的使用。所述方法还包括接种所述生长培养基以及在高于40℃的温度下温育经接种的生长培养基。



1. 一种检测沙门氏菌属 (*Salmonella*) 微生物并区分邦戈尔沙门氏菌 (*Salmonella bongori*) 与产 β -半乳糖苷酶的非沙门氏菌属微生物的非诊断或非治疗目的的方法, 所述方法包括:

提供:

待测试的样品;

培养装置;

有利于革兰氏阴性肠道微生物的生长的营养物质培养基;

抑制革兰氏阳性微生物的生长的第一选择剂;

包括第一区别性指示剂化合物的第一区别性指示剂系统, 所述第一区别性指示剂化合物能够被包括菌种邦戈尔沙门氏菌的微生物在内的一组沙门氏菌属微生物的成员转化为第一可检测产物; 和

包括第二区别性指示剂化合物的第二区别性指示剂系统, 所述第二区别性指示剂化合物能够被 β -半乳糖苷酶活性转化为第二可检测产物;

在所述培养装置中使所述营养物质培养基、所述第一选择剂、所述第一区别性指示剂系统和所述第二区别性指示剂系统与样品接触以形成经接种的培养装置;

在高于40°C的温度下温育所述经接种的培养装置第一时间段;

观察所述培养装置以检测所述第一可检测产物的存在或不存在; 以及

观察所述培养装置以检测所述第二可检测产物的存在或不存在;

其中观察到所述第一可检测产物的存在指示在所述样品中可能存在沙门氏菌属微生物;

其中观察到所述第一可检测产物与所述第二可检测产物一起存在指示在所述样品中存在不是所述菌种邦戈尔沙门氏菌的产 β -半乳糖苷酶的成员的微生物。

2. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述培养装置被提供为薄膜培养装置, 所述薄膜培养装置具有以基本上脱水的形式设置在其中的所述营养物质培养基、所述第一选择剂、所述第一区别性指示剂系统和所述第二区别性指示剂系统。

3. 根据权利要求1所述的方法, 其中观察到所述第一可检测产物的不存在指示在所述样品中不存在沙门氏菌属微生物。

4. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述第一区别性指示剂化合物包含酶底物, 其中所述酶底物包括用以检测辛酸酯酶活性或用以检测 α -半乳糖苷酶活性的酶底物。

5. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述第一区别性指示剂系统包含pH指示剂和至少一种碳水化合物, 所述碳水化合物选自蜜二糖、2-脱氧-D-核糖、甘露糖醇、L-阿拉伯糖、己六醇、麦芽糖、L-鼠李糖、海藻糖、D-木糖和山梨醇。

6. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述第一可检测产物是基本上水溶性的并且所述第二可检测产物是基本上水不溶性的, 或者作为另外一种选择, 其中所述第一可检测产物是基本上水不溶性的并且所述第二可检测产物是基本上水溶性的。

7. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述培养装置还包含至少一种第二选择剂, 其中所述至少一种第二选择剂抑制不为沙门氏菌属成员的至少一种革兰氏阴性肠道微生物的生长。

8. 根据权利要求1所述的方法, 其中温育所述培养装置包括在41-44°C之间的包括端值

在内的温度下温育所述培养装置。

9. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,该方法还包括:

提供具有包含第三区别性指示剂化合物的第三区别性指示剂系统的制品,所述第三区别性指示剂化合物能够被沙门氏菌属微生物转化为第三可检测产物;

使所述制品与所述经接种的培养装置接触;

温育所述经接种的培养装置第二时间段;以及

观察所述培养装置以检测所述第三可检测产物;

其中观察到所述第三可检测产物与所述第一可检测产物一起存在指示在所述样品中存在沙门氏菌属微生物。

10. 根据权利要求9所述的方法,该方法还包括:

提供能够被肠道微生物转化为第四可检测产物的非区别性指示剂化合物;以及

观察所述培养装置以检测所述第四可检测产物的存在或不存在;

其中在所述培养装置中使所述营养物质培养基、所述第一选择剂、所述第一区别性指示剂系统和所述第二区别性指示剂系统与样品接触以形成经接种的培养装置还包括在所述培养装置中使所述营养物质培养基、所述第一选择剂、所述第一区别性指示剂系统、所述第二区别性指示剂系统和所述非区别性指示剂化合物与所述样品接触以形成经接种的培养装置。

检测沙门氏菌属微生物的方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2011年12月28日提交的美国临时专利申请61/580,860的权益,该专利申请全文以引用方式并入本文。

背景技术

[0003] 肠杆菌科(Enterobacteriaceae)包括能够将糖类发酵为乳酸和其他终产物的很多种代谢上不同的、兼性厌氧的细菌。该科包括多种熟知的人类致病菌,例如大肠杆菌(*Escherichia coli*)、沙门氏菌属(*Salmonella*)的若干亚种、鼠疫耶尔森菌(*Yersinia pestis*)、克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)的若干菌种、和志贺氏菌属(*Shigella*)的若干菌种。

[0004] 沙门氏菌属包括两个物种,肠道沙门氏菌(*S. enterica*)和邦戈尔沙门氏菌(*S. bongori*),其包括能够导致人类疾病的亚种。一些病原性沙门氏菌能够通过受污染的食物或饮料的摄取而传染至人类。由于样品中相对低数量的沙门氏菌属微生物的存在、样品中相对高数量的近缘的非沙门氏菌属肠道微生物的存在、和/或样品中能够干扰沙门氏菌属微生物的生长或检测的非微生物的物质(例如,食物颗粒或可溶性化学物质)的存在,食品样品中沙门氏菌属微生物的检测能够是困难的。

[0005] 已开发了多种选择性的和/或区别性微生物培养基,以检测样品中的沙门氏菌属微生物和将它们与一种或多种非沙门氏菌属微生物加以区分。通常,这些培养基包含抑制非肠道微生物的生长的选择剂。此外,许多这些培养基依靠一种或多种区别性指示剂系统来区分沙门氏菌属和非沙门氏菌属的微生物。

[0006] 尽管有多种用于检测样品中沙门氏菌属微生物的微生物培养基,仍然存在对检测样品中沙门氏菌属微生物的改进的方法的需求。

发明内容

[0007] 一般来讲,本公开涉及检测沙门氏菌属微生物的方法。具体地,本方法包括包括了阳性区别性指示剂系统(即,包括被沙门氏菌属微生物转化为可检测产物的指示剂化合物的指示剂系统)和阴性区别性指示剂系统(即,包括能够被 β -半乳糖苷酶活性转化为可检测产物,并从而不被沙门氏菌属微生物转化为可检测产物的指示剂化合物的指示剂系统)的使用。令人吃惊地,邦戈尔沙门氏菌(*S. bongori*)种的成员在高于40℃的温育温度下不与所述第二指示剂系统反应。

[0008] 在一个方面,本公开提供了检测沙门氏菌属微生物的方法。所述方法能够包括提供待检测的样品、培养装置、有利于革兰氏阴性肠道微生物的生长的营养物质培养基、抑制革兰氏阳性微生物的生长的第一选择剂、包括能够被沙门氏菌属微生物(其包括邦戈尔沙门氏菌(*Salmonella bongori*)种的微生物)的成员转化为第一可检测产物的第一区别性指示剂化合物的第一区别性指示剂系统和包括能够被 β -半乳糖苷酶活性转化为第二可检测产物的第二区别性指示剂化合物的第二区别性指示剂系统。所述方法还能够包括在培养装置中使用营养物质培养基、第一选择剂、第一区别性指示剂系统和第二区别性指示剂系统与

样品接触,以形成经接种的培养装置、在高于40℃的温度下温育经接种的培养装置第一时间段、观察所述培养装置以检测第一可检测产物的存在或不存在、和观察所述培养装置以检测第二可检测产物的存在或不存在。其中观察到所述第一可检测产物的存在指示在所述样品中可能存在沙门氏菌属微生物;其中观察到所述第一可检测产物与所述第二可检测产物一起存在指示在所述样品中存在不是菌种邦戈尔沙门氏菌的产 β -半乳糖苷酶的成员的微生物。

[0009] 在任何实施例中,所述培养装置能够被提供为薄膜培养装置,所述薄膜培养装置具有以基本上脱水的形式在其中设置有所述营养物质培养基、第一选择剂、第一区别性指示剂系统和第二区别性指示剂系统。在上述实施例中的任一种中,观察到第一可检测产物的不存在能够指示在样品中不存在沙门氏菌属微生物。在上述实施例中的任一种中,观察所述营养物质培养基以检测第一可检测产物的存在能够包括观察所述培养装置以检测第一可检测颜色。在上述实施例中的任一种中,所述第一区别性指示剂化合物能够包括酶底物。在一些实施例中,所述酶底物能够包括用以检测辛酸酯酶活性或用以检测 α -半乳糖苷酶活性的酶底物。在一些实施例中,所述酶底物能够选自5-溴-6-氯-3-吡啶基辛酸酯、4-硝基苯基辛酸酯、2-萘基辛酸酯、5-溴-4-氯-3-吡啶氧基- α -D-半乳吡喃糖苷、试卤灵- α -D-半乳吡喃糖苷和4-硝基苯基- α -D-半乳吡喃糖苷。

[0010] 在上述实施例中的任一种中,所述第一区别性指示剂系统能够包括pH指示剂和至少一种碳水化合物,所述碳水化合物选自蜜二糖、2-脱氧-D-核糖、甘露糖醇、L-阿拉伯糖、己六醇、麦芽糖、L-鼠李糖、海藻糖、D-木糖和山梨醇。

[0011] 在上述实施例中的任一种中,所述第一可检测产物能够是基本上水溶性的,其中观察所述第一可检测产物能够包括观察邻近微生物菌落的有色区域。

[0012] 在上述实施例中的任一种中,观察所述第二可检测产物包括观察所述培养装置以检测第二可检测颜色。在上述实施例中的任一种中,所述第二区别性指示剂化合物能够选自5-溴-4-氯-3-吡啶基- β -D-半乳吡喃糖苷、5-溴-3-吡啶基- β -D-半乳吡喃糖苷、5-溴-6-氯-3-吡啶基- β -D-半乳吡喃糖苷、2-硝基苯基- β -D-半乳吡喃糖苷和4-硝基苯基- β -D-半乳吡喃糖苷。

[0013] 在上述实施例中的任一种中,所述第一可检测产物能够是基本上水溶性的并且所述第二可检测产物能够是基本上水不溶性的,或者作为另外一种选择,其中所述第一可检测产物能够是基本上水不溶性的并且所述第二可检测产物能够是基本上水溶性的。

[0014] 在上述实施例中的任一种中,所述第一选择剂选自抗生素、胆汁盐、胆汁盐3号、脱氧胆酸、胆酸、脱氧胆酸、结晶紫、新生霉素、萘啶酸、多粘菌素B、链霉素、甲氧西林、头孢磺啶、或上述选择剂中的任何两种或更多种的组合。在上述实施例中的任一种中,所述培养装置还能够包含至少一种第二选择剂,其中所述至少一种第二选择剂抑制非沙门氏菌属成员的至少一种革兰氏阴性肠道微生物的生长。在一些实施例中,所述第二选择剂能够选自 β -内酰胺抗生素、氨基糖苷抗生素、喹诺酮抗生素、磺胺类抗生素、多粘菌素抗生素、以及上述抗生素中的任何两种或更多种的组合。在一些实施例中,所述至少一种第二选择剂包括萘啶酮酸、链霉素、和多粘菌素B的组合。在上述实施例中的任一种中,温育培养装置包括在41-44℃之间、包括端值在内的温度下温育所述培养装置。

[0015] 在上述实施例中,所述方法还能够包括提供具有包括第三区别性指示剂化合物的

第三区别性指示剂系统的制品,所述第三区别性指示剂化合物能够被沙门氏菌属微生物转化为第三可检测产物、使所述制品与经接种的培养装置接触、温育经接种的培养装置第二时间段、以及观察所述培养装置以检测第三可检测产物;观察到所述第三可检测产物与所述第一可检测产物一起存在指示在样品中存在沙门氏菌属微生物。

[0016] 在上述实施例中的任一种中,所述方法还能够包括提供能够被肠道微生物转化为第四可检测产物的非区别性指示剂化合物,和观察所述培养装置以检测第四可检测产物的存在或不存在;其中在所述培养装置中使所述营养物质培养基、第一选择剂、第一区别性指示剂系统和第二区别性指示剂系统与样品接触以形成经接种的培养装置还包括在所述培养装置中使所述营养物质培养基、第一选择剂、第一区别性指示剂系统、第二区别性指示剂系统和非区别性指示剂化合物与所述样品接触以形成经接种的培养装置。

[0017] 在上述实施例中的任一种中,观察培养装置可包括在视觉上观察所述培养装置。在上述实施例中的任一种中,观察培养装置可包括使用成像装置生成所述培养装置的图像。在上述实施例中的任一种中,所述方法还可包括使用处理器分析所述图像。在上述实施例中的任一种中,所述方法还可包括计数由属于所述组的微生物形成的菌落的数量。

[0018] 词语“优选的”和“优选地”是指在某些情况下可以提供某些有益效果的本发明实施例。然而,在相同的情况或其它情况下,其它实施例也可以是优选的。此外,对一个或多个优选实施例的表述并不暗示其它实施例不是可用的,并且并非意图从本发明的范围中排除其它实施例。

[0019] 如本文所用,“沙门氏菌属微生物”是指属于沙门氏菌属的任何微生物。

[0020] 如本文所用,“区别性指示剂系统”是指基于两种类型的微生物各自将区别性指示剂化合物转化为可检测产物的能力,而用于区分这两种类型的微生物的一种或多种化合物。在一些情况下,例如,区别性指示剂化合物(例如,2-硝基苯基- β -D-半乳糖苷)可被一种类型的微生物直接转化为可检测产物(例如,2-硝基苯酚)。在一些情况下,例如,区别性指示剂化合物(例如,5-溴-4-氯-3-吡啶氧基- α -D-半乳糖苷)可以被一种类型的微生物转化为中间产物,中间产物在空气的存在下能够反应生成可检测产物(一种类型的靛蓝染料)。在一些情况下,例如,区别性指示剂化合物(例如,可发酵的碳水化合物如蜜二糖)能够被一种类型的微生物转化为可检测产物(例如,乳酸),其能够与区别性指示剂系统的另一种组分(例如,pH指示剂如氯酚红)反应,导致另一种组分中可检测的颜色变化。

[0021] 如本文所用,“选择剂”是指以比对第二微生物或第二组微生物更高的程度抑制第一微生物或第一组微生物的生长,从而有利于较少被抑制的微生物的生长的化合物。

[0022] 当术语“包括”及其变型形式出现在说明书和权利要求书中时,这些术语并不具有限制性含义。

[0023] 本文所用的“一种(个)”、“所述(该)”、“至少一种(个)”以及“一种或多种(一个或多个)”可互换使用。因此,例如,微生物可以解释为意指“一种或多种”微生物。

[0024] 术语“和/或”意指所列要素的一个或全部,或所列要素的任何两个或两个以上的组合。

[0025] 另外,本文通过端点表述的数值范围包括范围内包含的所有数值(如,1至5包括1、1.5、2、2.75、3、3.80、4、5等)。

[0026] 本发明的上述发明内容并不意在描述本发明的每个公开的实施例或每种实施方

式。以下描述更具体地例示了示例性实施例。在本专利申请全文的若干地方,通过例子列表提供指导,例子可用于多种组合中。在每一种情形下,所列举的列表仅仅作为代表性群组,而不应被理解为排他性列表。

[0027] 下面将结合附图和具体实施方式介绍上述及其他实施例的更多细节。通过具体实施方式、附图和权利要求书,其他特征、目标和优点将变得明显。

附图说明

[0028] 图1显示了根据本公开的检测沙门氏菌属微生物的方法的一个实施例的框图。

[0029] 图2显示了与图1中显示的方法的实施例相关的附加的分析步骤和任选的工艺步骤的框图。

具体实施方式

[0030] 沙门氏菌属包括两个物种,肠道沙门氏菌 (*Salmonella enterica*) 和邦戈尔沙门氏菌。Fookes等人已研究了这两个物种的遗传相关性 (“*Salmonella bongori* Provides Insights into the Evolution of the *Salmonellae*” (邦戈尔沙门氏菌提供了对沙门氏菌的进化的深入了解), *PLoS Pathogens*, www.plospathogens.org, 2011年,第7卷,文章编号 e1002191, 第1-16页,该文献全文以引用方式并入本文)。尽管肠道沙门氏菌 (*S. enterica*) 的亚种由于它们感染和导致人类疾病的能力而比邦戈尔沙门氏菌更加有名,邦戈尔沙门氏菌 (*S. bongori*) 也已被显示导致人类的感染。因此,被设计为检测潜在的病原性沙门氏菌属微生物的测试应当能够同时检测两种物种。

[0031] 本公开一般涉及用于检测样品中沙门氏菌属微生物的方法。具体地,本公开涉及能够区分某些产 β -半乳糖苷酶的沙门氏菌属微生物(例如,邦戈尔沙门氏菌种的成员)与产 β -半乳糖苷酶的非沙门氏菌属微生物(例如,大肠杆菌和肠杆菌科 (*Enterobacteriaceae*) 的其他产 β -半乳糖苷酶的成员)的基于生长的检测方法。本发明的方法结合了包括多种区别性指示剂的选择性生长培养基和升高的温育温度来区分邦戈尔沙门氏菌微生物。

[0032] 沙门氏菌属的基于生长的检测和鉴定一般要求使用在非沙门氏菌属微生物的存在下特异性地检测沙门氏菌属菌株的生物化学反应。遗憾的是,大多数常规的检测系统不能提供足够区分沙门氏菌属微生物与可能存在于样品中的非沙门氏菌属的肠杆菌科 (*Enterobacteriaceae*) 微生物的特异性。这些测试经常需要附加的试剂和流程(例如免疫学或基因检测)来区分样品中存在的非沙门氏菌属微生物与沙门氏菌属微生物。

[0033] 遗憾的是,一些常用于检测非沙门氏菌属的肠道微生物(例如,大肠杆菌)的组的反应并不阴性地区分全部的沙门氏菌属菌株。例如,存在一些 lac 阳性的(产生 β -D-半乳糖苷酶),并从而在使用 β -半乳糖苷酶底物(例如,5-溴-4-氯-3-吡啶基- β -D-半乳糖苷)的测试中并不阴性地与非沙门氏菌属的微生物区分的沙门氏菌属菌株。研究人员已发现,当在升高的温度下温育时,某些 β -D-半乳糖苷酶-阳性的沙门氏菌属菌株不与 β -半乳糖苷酶底物反应。此外,升高的温育温度能够抑制一些非沙门氏菌属的产 β -半乳糖苷酶的微生物的生长和/或基本上不影响检测它们的 β -半乳糖苷酶活性的能力。因此,本公开提供了用于区分邦戈尔沙门氏菌的生长菌落与其他产 β -半乳糖苷酶的肠道微生物的菌落的方法。

[0034] 本公开提供了检测样品中沙门氏菌属微生物的方法。图1显示了检测样品中沙门

氏菌属微生物的方法10的一个实施例。

[0035] 方法10包括提供测试流程的组分的步骤45。提供测试流程的组分包括提供待检测的样品、培养装置、有利于革兰氏阴性肠道微生物的生长的营养物质培养基；抑制革兰氏阳性微生物的生长的第一选择剂、包括能够被沙门氏菌属微生物(其包括邦戈尔沙门氏菌种的微生物)的成员转化为第一可检测产物的第一区别性指示剂化合物的第一区别性指示剂系统和包括能够被 β -半乳糖苷酶活性转化为第二可检测产物的第二区别性指示剂化合物的第二区别性指示剂系统。方法10还包括接触测试流程的组分以形成经接种的营养物质培养基的步骤50。接触测试流程的组分以形成经接种的营养物质培养基包括在培养装置中使所述营养物质培养基、第一选择剂、第一区别性指示剂系统和第二区别性指示剂系统与样品接触以形成经接种的培养基。方法10还包括在高于40℃的温度下温育经接种的培养基第一时间段的步骤55,以及观察所述培养装置以检测第一可检测产物的存在或不存在以及观察所述培养装置以检测第二可检测产物的存在或不存在的步骤60。在这些实施例中,观察到第一可检测产物的存在指示在所述样品中可能存在沙门氏菌属微生物(例如,肠道沙门氏菌(*Salmonella enterica*)和/或邦戈尔沙门氏菌)。观察到所述第一可检测产物与所述第二可检测产物一起存在指示在所述样品中存在不是菌种邦戈尔沙门氏菌的产 β -半乳糖苷酶的成员的微生物。

[0036] 在一些实施例中,方法10还能够包括使经接种的营养物质培养基与包括第三区别性指示剂化合物的第三区别性指示剂系统接触的步骤65,所述第三区别性指示剂化合物能够被沙门氏菌属微生物转化为第三可检测产物,如本文所述。

[0037] 能够使用多种方法使第三区别性指示剂系统与经接种的营养物质培养基接触,包括本文所描述的用于使第一区别性指示剂化合物、第二区别性指示剂化合物、第三区别性指示剂化合物、或非区别性指示剂化合物与样品和/或营养物质培养基接触的那些。此外,能够通过使包括第三区别性指示剂系统的制品与经接种的营养物质培养基接触,在第一温育时期之后使第三区别性指示剂系统与经接种的营养物质培养基接触。这可以通过例如使用具有包括第三区别性指示剂系统的涂层的制品来进行。例如,所述制品可包括如美国专利6,022,682(该专利全文以引用方式并入本文)中所述的涂层和/或涂覆的底物。

[0038] 在包括第三区别性指示剂化合物的第三区别性指示剂系统与经接种的营养物质培养基接触之后,所述方法可包括温育平板第二时间段的任选的步骤70。在第二温育时段中,当存在时,沙门氏菌属微生物可将第三区别性指示剂化合物转化为第三可检测产物。

[0039] 在一些实施例中,方法10还能够包括提供非区别性指示剂化合物的任选的步骤(未显示)。在这些实施例中,在培养装置中使样品、营养物质培养基、第一选择剂、第一区别性指示剂系统和第二区别性指示剂系统接触以形成经接种的培养基任选地还可包括在所述培养装置中使样品、营养物质培养基、第一选择剂、第一区别性指示剂系统、第二区别性指示剂系统与非区别性指示剂化合物接触以形成经接种的培养基。能够使用任何适合的方法,包括本文所述的那些,使非区别性指示剂化合物与经接种的培养基的其他组分接触。

[0040] 适合的非区别性指示剂化合物包括被生长的微生物代谢或换句话说讲与它们反应,并且在这种情况下产生第四可检测产物的指示剂化合物,所述第四可检测产物可导致微生物菌落或邻近菌落的营养物质培养基显色或发荧光,以便于可视化、成像、和/或定量。当存在于经接种的培养基中时,非区别性指示剂以及从其来源的第四可检测产物,应当基本上

不妨碍第一可检测产物或第二可检测产物和/或第三可检测产物的检测。适合的非区别性指示剂化合物的非限制性例子包括显色的氧化还原指示剂,如三苯基四唑鎓氯化物、对-甲苯基四唑红、四唑紫、藜芦基四唑蓝、和5-溴-4-氯-3-吡啶基-磷酸二钠盐。在非区别性指示剂在其中与经接种的营养物质培养基接触的一个实施例中,观察所述培养装置以检测第一可检测产物和/或第二可检测产物的存在还可包括观察所述培养装置以检测第四可检测产物的存在。

[0041] 在本公开的方法中被检测的样品包括多种可能被怀疑包含沙门氏菌属微生物的样品。尤其值得关注的样品包括来自食品加工或饮料加工操作的原材料、中间产物、或成品材料。其他适合的样品包括例如水样品(例如,地表水、工业用水)、环境样品(例如,空气样品;来自墙壁、地板、排水沟、食品接触表面、加工设备的表面样品);和临床样品。临床样品的非限制性例子包括胃肠样品、直肠样品、和粪便样品。测试样品可包括液体以及溶于或悬浮于液体介质中的一种或多种固体。

[0042] 本公开的培养装置包括在用以检测样品中存在的微生物的方法中被用于容纳营养物质培养基的任何培养装置。在某些优选的实施例中,所述营养物质培养基包含胶凝剂以有利于微生物的计数。适合的培养装置的非限制性例子包括皮氏培养皿、多孔板、管、烧瓶、薄膜培养装置(例如,美国专利4,565,783;5,601,998;5,681,712;6,265,203;和6,638,755中公开的薄膜培养装置,上述专利中每一专利全文以引用方式并入本文)等。

[0043] 在一些实施例中,提供培养装置可包括提供包含有利于革兰氏阴性肠道微生物的生长的营养物质培养基、抑制革兰氏阳性微生物的生长的第一选择剂、包括能够被沙门氏菌属微生物(其包括邦戈尔沙门氏菌种的微生物)的成员转化为第一可检测产物的第一区别性指示剂化合物的第一区别性指示剂系统和/或包括能够被 β -半乳糖苷酶活性转化为第二可检测产物的第二区别性指示剂化合物的第二区别性指示剂系统的培养装置。

[0044] 在一些实施例中,至少一种选自下列的组分是以基本上脱水的状态被提供的(任选地,在所述培养装置中):有利于革兰氏阴性肠道微生物的生长的营养物质培养基;抑制革兰氏阳性微生物的生长的第一选择剂;包括第一区别性指示剂化合物的第一区别性指示剂系统,所述第一区别性指示剂化合物能够被包括菌种邦戈尔沙门氏菌的微生物在内的一组沙门氏菌属微生物的成员转化为第一可检测产物;和/或包括能够被 β -半乳糖苷酶活性转化为第二可检测产物的第二区别性指示剂化合物的第二区别性指示剂系统。在这些实施例中,所述至少一种脱水的组分能够在与样品接触之前或期间被含水液体(例如,水、缓冲溶液、稀释剂、液体样品)再水化。

[0045] 在一些实施例中,至少一种选自下列的组分是在将该组分添加至培养装置之前与样品混合的(例如,溶解或稀释在液体样品中):有利于革兰氏阴性肠道微生物的生长的营养物质培养基;抑制革兰氏阳性微生物的生长的第一选择剂;包括第一区别性指示剂化合物的第一区别性指示剂系统,所述第一区别性指示剂化合物能够被包括菌种邦戈尔沙门氏菌的微生物在内的一组沙门氏菌属微生物的成员转化为第一可检测产物;和/或包括能够被 β -半乳糖苷酶活性转化为第二可检测产物的第二区别性指示剂化合物的第二区别性指示剂系统。

[0046] 本公开的营养物质培养基包括有利于革兰氏阴性肠道微生物的生长的任何营养物质培养基。多种适合的营养物质培养基是本领域已知的。适合的营养物质培养基包括蛋

白质性营养物质(例如,动物或植物蛋白质的化学和/或酶消化物),其能够提供碳、氮、和能量来促进革兰氏阴性的微生物的生长。营养物质培养基可包含其他营养物质(例如,矿物质或其他组分),只要它们基本上不妨碍第一区别性指示剂系统、第二区别性指示剂系统和/或第三区别性指示剂系统(当存在时)的功能。

[0047] 本公开的第一区别性指示剂系统包含能够被沙门氏菌属微生物转化为第一可检测产物的第一区别性指示剂化合物。优选地,第一区别性指示剂化合物能够被包括菌种邦戈尔沙门氏菌的微生物在内的一组沙门氏菌属微生物的成员转化为第一可检测产物。更优选地,第一区别性指示剂化合物还被属于不是邦戈尔沙门氏菌的菌种(例如,肠道沙门氏菌)的沙门氏菌属微生物转化为第一可检测产物。在一些实施例中,所述第一区别性指示剂系统包含能够被至少一种能够在所述培养装置中生长的非沙门氏菌属肠道微生物转化为第一可检测产物的第一区别性指示剂化合物。

[0048] 在一些实施例中,所述第一区别性指示剂化合物是能够被沙门氏菌属微生物转化(例如,通过发酵)为第一可检测产物(例如,酸性化合物如乳酸,例如,和/或气体如二氧化碳)的营养物质化合物(例如,碳水化合物)。优选地,第一区别性指示剂包含被多种沙门氏菌属物种和/或亚种转化为第一可检测产物的营养物质化合物。更优选地,第一区别性指示剂包含不被许多不属于沙门氏菌属的微生物物种转化为第一可检测产物的营养物质化合物。甚至更优选地,第一区别性指示剂包含不被非沙门氏菌属的微生物转化为第一可检测产物的营养物质化合物。适合的第一区别性指示剂的非限制性例子包括选自蜜二糖、2-脱氧-D-核糖、甘露糖醇、L-阿拉伯糖、己六醇、麦芽糖、L-鼠李糖、海藻糖、D-木糖和山梨醇的化合物。

[0049] 在一些在其中酸性化合物是第一可检测产物的实施例中,所述第一区别性指示剂系统还能够包括pH指示剂。用于检测由细菌产生的酸性化合物的多种pH指示剂是本领域已知的。适合的pH指示剂的非限制性例子包括酚红、氯酚红、中性红、溴百里酚蓝、和溴百里酚紫。在一些在其中所述第一可检测产物包括气体的实施例中,气体可通过例如捕集所述气体而被检测(例如,通过在发酵培养物中在杜汉氏发酵管中捕集气体,通过在薄膜培养装置中在水凝胶中捕集气体,如PETRIFILM Enterobacteriaceae Count Plate (PETRIFILM肠杆菌计数平板)的解释指南中所述,该文献全文以引用方式并入本文)。

[0050] 在一些实施例中,所述第一指示剂化合物可包括酶底物。适合的显色的或荧光的酶底物被包括邦戈尔沙门氏菌种的微生物在内的一组沙门氏菌属微生物的成员转化(例如,通过酶水解)为第一可检测产物(例如,有色的产物或荧光产物)。优选地,酶底物被属于不是邦戈尔沙门氏菌的菌种(例如,肠道沙门氏菌)的沙门氏菌属微生物转化为第一可检测产物。适合的酶底物的非限制性例子包括用于检测辛酸酯酶活性或用于检测 α -半乳糖苷酶活性的酶底物。适合的显色酶底物包括例如选自5-溴-6-氯-3-吡啶基辛酸酯、4-硝基苯基辛酸酯、2-萘基辛酸酯、5-溴-4-氯-3-吡啶氧基- α -D-半乳糖苷、试卤灵- α -D-半乳糖苷、4-硝基苯基- α -D-半乳糖苷、以及它们的组合的酶底物。

[0051] 本公开的第二区别性指示剂系统包含能够被 β -半乳糖苷酶活性转化为第二可检测产物的第二区别性指示剂化合物。因此,第二区别性指示剂系统区分了产生 β -半乳糖苷酶活性的微生物和不产生 β -半乳糖苷酶活性的微生物。例如,许多沙门氏菌属不产生 β -半乳糖苷酶活性,并且能够通过使用 β -半乳糖苷酶活性的指示剂而与肠杆菌科

(Enterobacteriaceae)的利用乳糖的成员相区分,如A.Rambach所公开的(“New plate medium for facilitated differentiation of *Salmonella* spp. From *Proteus* spp. And other enteric bacteria”,1990,Appl.Environ.Microbiol.,vol.56,pp.301-303(“用于帮助区分沙门氏菌属物种与变形杆菌属物种以及其他肠道细菌的新的平板培养基”,1990年,Appl.Environ.Microbiol.,第56卷,第301-303页);其本文以引用方式并入本文)。

[0052] 然而,一些报道指示,超过90%的来自一些沙门氏菌属物种(例如,邦戈尔沙门氏菌)和亚种(例如,肠道沙门氏菌亚利桑那亚种(*S.enterica arizonae*)和肠道沙门氏菌双相亚利桑那亚种(*S.enterica diarizonae*))的分离的微生物已被发现产生 β -半乳糖苷酶活性(例如,参见A.M.Littell,“Plating medium for differentiating *Salmonella arizonae* from other *Salmonellae*”,1977,Appl.Environ.Microbiol.,vol.33,pp.485-487(“用于区分亚利桑那沙门氏菌与其他沙门氏菌属的平板培养基”Appl.Environ.Microbiol.,第33卷,第485-487页);其本文以引用方式并入本文)。因此,如果样品中存在产 β -半乳糖苷酶的沙门氏菌属,被设计为基于 β -半乳糖苷酶活性区分沙门氏菌属微生物和非沙门氏菌属的微生物的培养基和相应的方法可能错误地低估样品中沙门氏菌属微生物的数量。研究人员已发现了即使在该方法中使用的培养基依靠 β -半乳糖苷酶活性的指示剂来区分沙门氏菌属微生物和非沙门氏菌属的微生物时,也出人意料地能够区分一些产 β -半乳糖苷酶的沙门氏菌属微生物的方法。根据本公开的适合的第二区别性指示剂化合物的非限制性例子是5-溴-4-氯-3-吡啶基- β -D-半乳糖苷、5-溴-3-吡啶基- β -D-半乳糖苷、5-溴-6-氯-3-吡啶基- β -D-半乳糖苷、2-硝基苯基- β -D-半乳糖苷、4-硝基苯基- β -D-半乳糖苷。在一些实施例中,所述第二区别性指示剂系统包含乳糖和pH指示剂。

[0053] 本公开的方法使用第一选择剂来抑制革兰氏阳性的微生物的生长,从而减少对营养物质的竞争和有利于诸如沙门氏菌属成员的革兰氏阴性的微生物的生长。适合的第一选择剂的非限制性例子包括选自抗生素、胆汁盐、胆汁盐3号、脱氧胆酸、胆酸、脱氧胆酸、结晶紫、新生霉素、或上述选择剂中的任何两种或更多种的组合。

[0054] 本公开的方法任选地可使用至少一种第二选择剂来抑制至少一种不是沙门氏菌属成员的革兰氏阴性肠道微生物的生长。在一些实施例中,所述第二选择剂还可抑制至少一种革兰氏阳性的微生物的生长。有利地,第二选择剂与第一选择剂结合,进一步抑制微生物(革兰氏阴性的和/或革兰氏阳性的微生物),从而减少对营养物质的竞争和有利于沙门氏菌属微生物的生长。此外,所述至少一种第二选择剂还可基本上阻止否则将使第一区别性化合物和/或第三区别性化合物转化为其相应的可检测产物的非沙门氏菌属革兰氏阴性微生物的生长。因此,所述第二选择剂可降低非沙门氏菌属的微生物被作为可能的沙门氏菌属微生物的概率。适合的第二选择剂的非限制性例子包括选自 β -内酰胺抗生素、氨基糖苷类抗生素、喹诺酮类抗生素、磺胺类抗生素、多粘菌素类抗生素、以及上述抗生素中的任何两种或更多种的组合的选择剂。在一个实施例中,所述至少一种第二选择剂包括萘啶酮酸钠盐、链霉素、和多粘菌素B的组合。优选地,所述至少一种第二选择剂各自在营养物质培养基中的浓度被选择为允许沙门氏菌属微生物的生长。更优选地,所述至少一种第二选择剂各自在营养物质培养基中的浓度被选择为允许所有沙门氏菌属微生物的生长。

[0055] 本公开的方法包括在所述培养装置中使用营养物质培养基、第一选择剂、第一区别

性指示剂系统和第二区别性指示剂系统与样品接触以形成经接种的培养基。样品能够以任何的多种方式在培养装置中与营养物质培养基、第一选择剂、第一区别性指示剂系统和第二区别性指示剂系统接触。例如,在本方法的一个实施例中,营养物质培养基、第一选择剂、第一区别性指示剂系统和第二区别性指示剂系统能够作为含水形式的混合物(例如,在含水的琼脂培养基中)被置于培养装置中。在该实施例中,样品(例如,液体样品、固体样品、过滤器上捕集的液体和/或固体样品、液体介质中悬浮的固体样品)能够通过本领域已知的技术,例如移液、铺板接种技术、和划线平板接种技术,被沉积在、并任选地分布在所述混合物内或在其上。

[0056] 在一个可供选择的实施例中,样品(例如,包括液体和/或固体材料)与包含营养物质培养基、第一选择剂、第一区别性指示剂系统和第二区别性指示剂系统的液体混合物(例如,熔化的、温热的液体琼脂溶液)接触和混合,并且所述混合物随后被转入培养装置中。

[0057] 在另一个可供选择的实施例中,一种或多种组分(例如,营养物质培养基、第一选择剂、第一区别性指示剂系统和第二区别性指示剂系统)可被置于脱水形式的培养装置中,例如类似于美国专利4,565,783;5,601,998;5,681,712;6,265,203;和6,638,755中所公开的培养装置的薄膜培养装置。在该实施例中,例如,样品(例如,含水液体样品或悬浮在含水的悬浮培养基中的固体样品)能够通过将该样品吸移进培养装置而与脱水的组分接触。在该实施例中,所述组分中的一种或多种可以在样品被置入培养装置中之前或之后被溶解或悬浮在样品中。

[0058] 在另一个可供选择的实施例中,所述组分中的一种或多种(例如,营养物质培养基、第一选择剂、第一区别性指示剂系统和第二区别性指示剂系统)可被置于脱水形式的培养装置中,例如薄膜培养装置,如本文所述。将适合的含水液体(例如,无菌水、无菌缓冲液;任选地将包含上述组分)中的一种或多种移液至培养装置中,并使培养装置中的胶凝剂(当存在时)再水化。随后,样品能够被置入(例如,通过吸移、划线、置入包括样品的膜过滤器)培养装置,与上述组分接触。

[0059] 本领域的普通技术人员将认识到能够使上述组分(例如,营养物质培养基、第一选择剂、第一区别性指示剂系统和第二区别性指示剂系统)与培养装置中的样品接触的多种其他方法。

[0060] 本公开的方法还包括温育经接种的培养装置第一时间段。经接种的培养装置的温育能够包括将该装置保持在升高的温度(例如,在温控培养箱中)。在升高的温度(例如,高于25℃)下温育经接种的培养装置有利于肠道微生物如沙门氏菌属的微生物的生长。用于培养沙门氏菌属微生物的大多数技术涉及将培养装置置于约37℃(大约为人类的体温)的环境。然而,在这一温度下,邦戈尔沙门氏菌种的成员能够产生使用本公开的第二区别性指示剂系统可检测的 β -D-半乳糖苷酶活性。然而,在高于40℃的温度下,许多邦戈尔沙门氏菌能够生长,但不产生使用本公开的第二区别性指示剂系统可检测的 β -D-半乳糖苷酶活性。因此,本公开的方法包括在高于40℃的温度(例如,在高于或等于41℃的温度)下温育经接种的培养装置第一时间段。在一些实施例中,温育经接种的培养装置包括在41℃和44℃之间、包括端值在内的温度下温育经接种的培养装置。在一些实施例中,温育经接种的培养装置包括在41℃的温度下温育经接种的培养装置。在一些实施例中,温育经接种的培养装置包括在42℃的温度下温育经接种的培养装置。在一些实施例中,温育经接种的培养装置包

括在43℃的温度下温育经接种的培养装置。在一些实施例中,温育经接种的培养装置包括在44℃的温度下温育经接种的培养装置。

[0061] 培养装置被温育足以允许样品中存在的肠道微生物生长和增殖的第一时间段。通常,培养装置将被温育约10小时的第一时间段。在一些实施例中,培养装置被温育约14至约48小时的第一时间段。在一些实施例中,培养装置被温育约18至约48小时的第一时间段。在一些实施例中,培养装置被温育约24至约36小时的第一时间段。在一个优选的实施例中,培养装置被温育约24±2小时的第一时间段。

[0062] 本公开的方法包括观察培养装置以检测第一可检测产物的存在或不存在。第一可检测产物由包括邦戈尔沙门氏菌种的微生物在内的一组沙门氏菌属微生物的成员产生。所述组的成员将第一区别性指示剂化合物转化(例如,通过发酵、通过代谢活动、通过酶活性)为第一可检测产物。通常,在第一温育时期之后观察营养物质培养基。在任何实施例中,观察所述营养物质培养基以检测第一可检测产物的存在能够包括观察所述培养装置以检测第一可检测颜色。在一些实施例中,第一可检测颜色能够通过荧光被检测(例如,在第一区别性指示剂化合物在其中包括4-甲基伞形基- α -D-半乳糖苷的实施例中)。

[0063] 在其中第一区别性指示剂系统包括可发酵碳水化合物和pH指示剂的一个实施例中,所述第一可检测颜色可以是能够将所述碳水化合物转化为一种或多种酸性产物的微生物菌落附近的(即,相邻的)与pH指示剂相关的有色区域。因此,随着酸性产物在菌落和/或菌落周围的营养物质培养基中积聚,由于该酸性产物与pH指示剂的相互作用而产生的有色区域在菌落附近形成,并且在某些情况下,还可以使菌落着色。所述酸性区域的尺寸可通过营养物质培养基中缓冲液的使用来控制,如美国专利5,601,998中所述。

[0064] 在其中第一区别性指示剂化合物包括显色酶底物的一个实施例中,第一可检测颜色可以是微生物菌落附近的有色区域。例如,有色区域可以包含从微生物的酶与显色底物(例如,4-硝基苯基- α -D-半乳糖苷)的反应产生的水溶性产物(例如,4-硝基苯酚)。作为另外一种选择,有色区域可包含从微生物的酶与显色底物(5-溴-4-氯-3-吲哚基- α -D-半乳糖苷)的反应产生的水不溶性产物(例如,靛蓝)。

[0065] 本公开的方法包括观察培养装置以检测第二可检测产物的存在或不存在。第二可检测产物由具有 β -半乳糖苷酶活性的微生物产生。具有 β -半乳糖苷酶活性的微生物使第二区别性指示剂化合物转化为第二可检测产物。通常,在第一温育时期之后观察营养物质培养基。在任何实施例中,观察所述营养物质培养基以检测第二可检测产物的存在能够包括观察所述培养装置以检测第二可检测颜色。在一些实施例中,第二可检测颜色能够通过观察光的吸收或反射来检测。在一些实施例中,第二可检测颜色能够通过荧光被检测(例如,在其中第一区别性指示剂化合物包括4-甲基伞形基- β -D-半乳糖苷的实施例中)。

[0066] 本领域的普通技术人员将认识到,在任何实施例中,第一可检测产物应当基本上不妨碍(例如,通过颜色掩蔽或荧光淬灭)第二可检测产物的检测,并且第二可检测产物应当基本上不妨碍(例如,通过颜色掩蔽或荧光淬灭)第一可检测产物的检测。本领域的普通技术人员将认识到,在其中第一可检测颜色和第二可检测颜色通过荧光被检测的实施例中,第一可检测产物应当包含与第二可检测产物不同的荧光团。

[0067] 本公开的方法包括观察培养装置以检测第一可检测产物和/或第二可检测产物。在本发明方法的任何实施例中,观察培养装置能够包括观察包含营养物质培养基;第一选

择剂;第一区别性指示剂系统;第二选择成分;第二选择剂(当存在时);和第三区别性指示剂系统(当存在时)的混合物。在本发明方法的任何实施例中,观察培养装置能够包括通过在视觉上观察所述培养装置(例如,利用一个或多个眼)。

[0068] 另外或作为另外一种选择,在本发明方法的任何实施例中,观察培养装置能够包括以机械方式观察所述培养装置(例如,使用成像系统,例如,美国专利6,243,486、7,496,225、和7,351,574中描述的成像系统,这些专利的每一篇全文以引用方式并入。在上述实施例中,观察培养装置能够包括使用成像装置生成所述培养装置的图像。除生成培养装置的图像外,所述方法还任选地能够包括使用处理器分析该图像。

[0069] 本公开的方法能够被用于检测样品中的沙门氏菌属微生物并任选地对其进行计数。例如,观察到第一可检测产物在培养装置中的存在能够指示在样品中可能存在沙门氏菌属微生物(例如,邦戈尔沙门氏菌种的成员或肠道沙门氏菌(*Salmonella enterica*)种的成员)。然而,在根据本公开的方法中,观察到第一可检测产物与第二可检测产物一起存在指示在样品中存在不是菌种邦戈尔沙门氏菌的产 β -半乳糖苷酶的成员的微生物。

[0070] 第三区别性指示剂化合物能够是用于检测沙门氏菌属微生物的任何适合的指示剂化合物,只要从其产生的第三可检测产物是可与第一区别性指示剂系统的第一可检测产物和第二区别性指示剂系统的第二可检测产物区分的;优选地,光学上区分的,更优选地在视觉上区分的。因此,在一个实施例中,第三区别性指示剂系统可包括与能够被转化(例如,通过发酵)为第一可检测产物(例如,酸性化合物如乳酸,和/或例如气体如二氧化碳)的营养物质(例如,碳水化合物)结合的pH指示剂,如本文所述。在另一个实施例中,第三区别性指示剂系统可包括显色酶底物,如本文所述。在另一个实施例中,第三区别性指示剂系统可以是显色酶底物,如本文所述。本文所述的任何第一区别性指示剂系统可适合被用作第三区别性指示剂系统,只要其基本上不妨碍并且可区分于第一和第二区别性指示剂系统和/或第四指示剂系统(当存在时)。

[0071] 有利地,第三区别性指示剂系统能够被用作“确认”沙门氏菌属微生物在样品中的存在的方式。即,当观察到第一可检测产物在培养装置中的存在时,这种存在能够被解释为沙门氏菌属微生物在样品中可能的存在的指示。然而,当一起观察到第三可检测产物的存在与第一可检测产物的存在时(即,第一可检测产物和第三可检测产物与相同的细菌菌落相关联);这种观察结果能够指示沙门氏菌属微生物在样品中存在的更高的可能性(例如,显著更高的可能性)。

[0072] 温育经接种的培养装置第二时间段能够包括将该装置保持在升高的温度(例如,在温控培养箱中)。在升高的温度(例如,高于25°C但低于或等于约44°C)下温育经接种的培养装置能够有利于第三区别性指示剂混合物通过肠道微生物(例如,沙门氏菌属的成员)向第三可检测产物的转化。在一个优选的实施例中,培养装置将在35°C至42°C之间、包括端值在内的温度被温育第二时间段。在一个更优选的实施例中,培养装置将在42°C $\pm$ 1°C之间的温度被温育第二时间段。

[0073] 在一些实施例中,第三区别性指示剂系统在温育的第一时期之后与经接种的营养物质培养基接触。有利地,这样可缩短检测第三可检测产物所需的第二温育时期的长度。因此,在一些实施例中,第二温育时期能够是1小时至约6小时。在一些实施例中,第二温育时期能够是约2小时至约4小时。在一个优选的实施例中,第二温育时期是4小时 $\pm$ 1小时。

[0074] 当根据本公开使用时,本发明的方法能够检测在样品中存在或不存在沙门氏菌属微生物。图2显示了与图1中显示的方法相关联的多个分析步骤和任选的工艺步骤的一个实施例。在温育了培养装置第一时间段之后,如图1中所示,观察(步骤60)培养装置以检测(步骤100)第一可检测产物的存在或不存在和检测(步骤110)第二可检测产物的存在或不存在。第一和/或第二可检测产物能够如本文所述被检测。

[0075] 如果在足够的温育时期之后没有检测到第一可检测产物,则受试样品被推测为不包含沙门氏菌属微生物,如步骤105所示。如果观察到第一可检测产物,则针对第二可检测产物与第一可检测产物一起的存在进一步观察(步骤110)培养装置。如果观察到第一可检测产物与第二可检测产物一起存在,则样品被推测为不包含沙门氏菌属微生物,如步骤115所示。

[0076] 如果第一可检测产物被观察到与微生物菌落相关联而没有观察到第二可检测产物,或者如果第二可检测产物不与微生物菌落附近的第一可检测产物一起存在,则受试样品被推测为包含至少一种沙门氏菌属微生物,如步骤118所示。该沙门氏菌属微生物可能是邦戈尔沙门氏菌种的成员,或者其可能是肠道沙门氏菌种的非产 β -半乳糖苷酶的成员。任选地,操作者可能希望确认产生第一可检测产物的微生物是否是沙门氏菌属的成员。这能够通过例如进行使经接种的营养物质培养基与第三指示剂系统接触的任选的步骤65(例如,通过提供包含第三指示剂系统的制品并使经接种的营养物质培养基与该制品接触)实现,如本文所公开的。任选的接触步骤65之后是温育培养装置第二时间段的任选的步骤70,如本文所述。在第二温育时期之后,观察(步骤75)培养装置以检测(步骤120)第三可检测产物的存在或不存在,如本文所述。如果观察到第三可检测产物,则能够推论,具有与其相关联的第一和第三可检测产物的微生物菌落很可能是沙门氏菌属的成员(例如,产 α -半乳糖苷酶的成员),如步骤125所示。如果微生物菌落不产生第三可检测产物,则推测该菌落不是沙门氏菌属的成员(例如,其可能是非产 β -半乳糖苷酶的肠道微生物),如步骤135所示。

[0077] 在任何实施例中,所述方法还可包括对由属于一组的微生物(例如,由沙门氏菌属微生物组成的组、由产 β -半乳糖苷酶的微生物组成的组、由产 β -半乳糖苷酶的沙门氏菌属组成的组、非产 β -半乳糖苷酶的沙门氏菌属的组)形成的菌落数量进行计数。计数可以简单地通过根据每一菌落与其反应的一个或多个指示剂系统计算培养装置中分离的微生物菌落的数量来进行。

[0078] 实施例

[0079] 实施例1是检测沙门氏菌属微生物的方法,所述方法包括:

[0080] 提供:

[0081] 待检测的样品;

[0082] 培养装置;

[0083] 有利于革兰氏阴性肠道微生物的生长的营养物质培养基;

[0084] 抑制革兰氏阳性微生物的生长的第一选择剂;

[0085] 包括第一区别性指示剂化合物的第一区别性指示剂系统,所述第一区别性指示剂化合物能够被包括菌种邦戈尔沙门氏菌的微生物在内的一组沙门氏菌属微生物的成员转化为第一可检测产物;和

[0086] 包括第二区别性指示剂化合物的第二区别性指示剂系统,所述第二区别性指示剂

化合物能够被 β -半乳糖苷酶活性转化为第二可检测产物；

[0087] 在所述培养装置中使所述营养物质培养基、所述第一选择剂、所述第一区别性指示剂系统和所述第二区别性指示剂系统与样品接触以形成经接种的培养装置；

[0088] 在高于40℃的温度下温育所述经接种的培养装置第一时间段；

[0089] 观察所述培养装置以检测所述第一可检测产物的存在或不存在；和

[0090] 观察所述培养装置以检测所述第二可检测产物的存在或不存在；

[0091] 其中观察到所述第一可检测产物的存在指示在所述样品中可能存在沙门氏菌属微生物；

[0092] 其中观察到所述第一可检测产物与所述第二可检测产物一起存在指示在所述样品中存在不是菌种邦戈尔沙门氏菌的产 β -半乳糖苷酶的成员的微生物。

[0093] 实施例2是根据实施例1所述的方法，其中所述培养装置被提供为薄膜培养装置，所述薄膜培养装置具有以基本上脱水的形式在其中设置有所述营养物质培养基、所述第一选择剂、所述第一区别性指示剂系统和所述第二区别性指示剂系统。

[0094] 实施例3是根据实施例1或实施例2所述的方法，其中观察到所述第一可检测产物的存在指示在所述样品中不存在沙门氏菌属微生物。

[0095] 实施例4是根据前述实施例中任一项所述的方法，其中观察所述营养物质培养基以检测所述第一可检测产物的存在包括观察所述培养装置以检测第一可检测颜色。

[0096] 实施例5是根据前述实施例中任一项所述的方法，其中所述第一区别性指示剂化合物包含酶底物。

[0097] 实施例6是根据实施例5所述的方法，其中所述酶底物包括用以检测辛酸酯酶活性或用以检测 α -半乳糖苷酶活性的酶底物。

[0098] 实施例7是根据实施例6所述的方法，其中所述酶底物选自5-溴-6-氯-3-吡啶基辛酸酯、4-硝基苯基辛酸酯、2-萘基辛酸酯、5-溴-4-氯-3-吡啶氧基- α -D-半乳吡喃糖苷、试卤灵- α -D-半乳吡喃糖苷和4-硝基苯基- α -D-半乳吡喃糖苷。

[0099] 实施例8是根据前述实施例5至7中任一项所述的方法，其中所述第一可检测产物是基本上水不溶性的。

[0100] 实施例9是根据实施例1至6中任一项所述的方法，其中所述第一区别性指示剂系统包含pH指示剂和至少一种碳水化合物，所述碳水化合物选自蜜二糖、2-脱氧-D-核糖、甘露糖醇、L-阿拉伯糖、己六醇、麦芽糖、L-鼠李糖、海藻糖、D-木糖和山梨醇。

[0101] 实施例10是根据前述实施例中任一项所述的方法，其中所述第一可检测产物是基本上水溶性的，其中观察所述第一可检测产物包括观察邻近微生物菌落的有色区域。

[0102] 实施例11是根据前述实施例中任一项所述的方法，其中观察所述第二可检测产物包括观察所述培养装置以检测第二可检测颜色。

[0103] 实施例12是根据前述实施例中任一项所述的方法，其中所述第二区别性指示剂化合物选自5-溴-4-氯-3-吡啶基- β -D-半乳吡喃糖苷、5-溴-3-吡啶基- β -D-半乳吡喃糖苷、5-溴-6-氯-3-吡啶基- β -D-半乳吡喃糖苷、2-硝基苯基- β -D-半乳吡喃糖苷和4-硝基苯基- β -D-半乳吡喃糖苷。

[0104] 实施例13是根据前述实施例中任一项所述的方法，其中所述第一可检测产物是基本上水溶性的并且所述第二可检测产物是基本上水不溶性的，或者作为另外一种选择，其

中所述第一可检测产物是基本上水不溶性的并且所述第二可检测产物是基本上水溶性的。

[0105] 实施例14是根据实施例1至13中任一项所述的方法,其中所述第一选择剂选自抗生素、胆汁盐、胆汁盐3号、脱氧胆酸、胆酸、脱氧胆酸、结晶紫、新生霉素、萘啶酸、多粘菌素B、链霉素、甲氧西林、头孢磺啉、或上述选择剂中的任何两种或更多种的组合。

[0106] 实施例15是根据前述实施例中任一项所述的方法,其中所述培养装置还包含至少一种第二选择剂,其中所述至少一种第二选择剂抑制非沙门氏菌属成员的至少一种革兰氏阴性肠道微生物的生长。

[0107] 实施例16是根据实施例15所述的方法,其中所述第二选择剂选自 β -内酰胺抗生素、氨基糖苷抗生素、喹诺酮抗生素、磺胺类抗生素、多粘菌素抗生素、以及上述抗生素中的任何两种或更多种的组合。

[0108] 实施例17是根据实施例16所述的方法,其中所述至少一种第二选择剂包括萘啶酮酸、链霉素、和多粘菌素B的组合。

[0109] 实施例18是根据前述实施例中任一项所述的方法,其中温育所述培养装置包括在41-44°C之间、包括端值在内的温度下温育所述培养装置。

[0110] 实施例19是根据前述实施例中任一项所述的方法,还包括:

[0111] 提供具有包括第三区别性指示剂化合物的第三区别性指示剂系统的制品,所述第三区别性指示剂化合物能够被沙门氏菌属微生物转化为第三可检测产物;

[0112] 使所述制品与所述经接种的培养装置接触;

[0113] 温育所述经接种的培养装置第二时间段;和

[0114] 观察所述培养装置以检测所述第三可检测产物;

[0115] 其中观察到所述第三可检测产物与所述第一可检测产物一起存在指示在所述样品中存在沙门氏菌属微生物。

[0116] 实施例20是根据前述实施例中任一项所述的方法,还包括:

[0117] 提供能够被肠道微生物转化为第四可检测产物的非区别性指示剂化合物;和

[0118] 观察所述培养装置以检测所述第四可检测产物的存在或不存在;

[0119] 其中在所述培养装置中使所述营养物质培养基、第一选择剂、第一区别性指示剂系统和第二区别性指示剂系统与样品接触以形成经接种的培养装置还包括在所述培养装置中使所述营养物质培养基、第一选择剂、第一区别性指示剂系统、第二区别性指示剂系统和非区别性指示剂化合物与所述样品接触以形成经接种的培养装置。

[0120] 实施例21是根据前述实施例中任一项所述的方法,其中观察所述培养装置包括在视觉上观察所述培养装置。

[0121] 实施例22是根据前述实施例中任一项所述的方法,其中观察所述培养装置包括使用成像装置生成所述培养装置的图像。

[0122] 实施例23是根据实施例22所述的方法,还包括使用处理器分析所述图像。

[0123] 实施例24是根据前述实施例中任一项所述的方法,还包括计数由属于所述组的微生物形成的菌落的数量。

[0124] 实例

[0125] 本发明的目的和优点进一步通过以下实例来说明,但这些实例中列举的特定材料及其量,以及其他条件和细节不应解释为对本发明的不当限制。除非另外指明,所有份数和

百分比均以重量计,所有水为蒸馏水,并且所有分子量为重均分子量。

[0126] 材料:实例的制备中利用的材料示出于表1中。

[0127] 表1:材料

[0128]

组分	说明	来源
TSA	胰酶大豆琼脂	
缓冲蛋白胨水		美国新泽西州吉布斯敦的 EMD 化学品公司 (EMD Chemicals, Inc., Gibbstown, NJ)
Butterfield 缓冲液		美国田纳西州孟菲斯的边缘生物制品公司 (Edge Biologicals, Inc.; Memphis, TN)
Tris	-- 三(2-氨基-2-羟甲基-丙烷-1,3-二醇)	美国密苏里州圣路易斯的西格玛公司 (Sigma Chemical Co.; St. Louis, MO)
TSA 斜面培养基	胰酶大豆琼脂斜面培养基	美国宾夕法尼亚州拉德诺的 VWR 公司 (VWR International, Radnor, PA)
X-gal	5-溴-4-氯-3-吲哚氧基-β-D-半乳糖苷	瑞士斯塔德的 Biosynth AG 公司 (Biosynth AG; St. Gallen, Switzerland)

[0129]

IPTG	异丙基-β-D-硫代半乳糖苷	美国密苏里州圣路易斯的西格玛奥德里奇公司 (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO)
硫酸链霉素盐		西格玛奥德里奇公司 (Sigma-Aldrich)
多粘菌素 B 硫酸盐		西格玛奥德里奇公司 (Sigma-Aldrich)
萘啶酸钠盐		西格玛奥德里奇公司 (Sigma-Aldrich)

[0130] 实例中使用的细菌菌株列于表2中。名称为“FSD”之后是数字的细菌菌株是从食品样品或从食品加工环境分离的。通过DNA序列分析确认了阿贡纳沙门氏菌 (*S. agona*) FSD122

的身份。名称为“ATCC”之后是数字的细菌菌株得自美国弗吉尼亚州马纳萨斯的美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection, Manassas, VA)。

[0131] 表2:细菌菌株列表

[0132]	菌株名称	特性
	ATCC43975	邦戈尔沙门氏菌
	FSD122	邦戈尔沙门氏菌
	FSD2577	邦戈尔沙门氏菌
	FSD2579	邦戈尔沙门氏菌
	FSD140	肠道沙门氏菌阿贡纳血清型 (<i>Salmonella enterica serovar agona</i>)
	FSD99001	肠道沙门氏菌亚利桑那亚种
	FSD17	肠道沙门氏菌亚利桑那亚种
	FSD115	肠道沙门氏菌亚利桑那亚种
	FSD43973	肠道沙门氏菌双相亚利桑那亚种
	FSD99002	弗氏柠檬酸杆菌 (<i>Citrobacter freundii</i>)
	ATCC25922	大肠杆菌

[0133] 实例1:沙门氏菌属薄膜培养装置的制备。

[0134] 根据2011年5月20日提交的美国专利申请61/488,492 (代理人案卷号67673US002) 中描述的方法制备薄膜培养装置;该文献全文以引用方式并入本文。通过将2重量份的2-脱氧-D-核糖(2DDR;美国伊利诺伊州普洛斯派克特山的Research Products International 公司(Research Products International Corp.;Mt.Prospect,IL))和98份的瓜尔胶(M150guar MEYPROGATgum,Meyhall化学公司(Meyhall Chemical AG))混合,制备了用于制备粉末涂覆的纸质基底的粉末组合物。在粉末涂覆之前,用包含TTC的粘合剂涂覆了纸材。

[0135] 通过将表3中列出的材料添加到容器中的1升去离子水,制备了包含混合物的液体培养基,并且根据美国专利6,022,682的实例1中所述的方法混合。

[0136] 表3:用于液体培养基涂覆混合物的成分。

[0137]

材料	量(克)
示蛋白胨3号	50.0
猪蛋白胨	14.0
酵母提取物	6.0
氯化钠	10.0
MOPS酸	3.2
MOPS钠盐	5.2

苯酚红钠盐	1.0
胆汁盐3号	2.0
5-溴-4-氯-3-吡啶氧基-β-D-半乳糖苷	0.8
瓜尔胶	14

[0138] 通过将0.1g IPTG、2.0g尿素、5.0g蜜二糖(Sigma)、0.005g羧酸钠盐、0.005g硫酸链霉素盐和0.00075g多粘菌素B硫酸盐添加至50mL无菌离心管中的30mL无菌去离子水中并涡旋混合,制备了选择剂混合物。使液体培养基混合物冷却至约40℃,在剧烈混合下加入选择剂混合物。通过将液体培养基涂覆至2.9密耳聚酯薄膜的电晕处理侧上,制备了覆盖膜。

[0139] 根据美国专利6,022,682装配了培养装置;使用粘合剂转移条带将基座构件、具有从中央切下的7.3cm直径圆形以提供一个孔的泡沫隔片、和盖板粘合到一起。板经测量为大约10.3cm乘10.2cm,在板的大约中央处具有使干燥的液体培养基涂覆的混合物暴露的圆形孔。

[0140] 实例2:温育温度对由肠杆菌科(Enterobacteriaceae)的多种菌株产生的β-半乳糖苷酶活性的影响。

[0141] 根据实例1制备了培养装置。在使用前用1毫升无菌的Butterfield缓冲液使每一培养装置中的生长培养基水化。在接种之前,将上述装置在室温下保持至少一小时,以允许水凝胶溶胀。

[0142] 来自表2中所列的每一菌株的单独的纯培养物(在TSA斜面培养基上)的菌落被转移至包含1.0mL缓冲蛋白胨水的无菌小瓶中,并在37℃下温育24±2小时,以产生每一菌株的纯的细菌悬浮液。将上述沙门氏菌属悬浮液各自以1:100稀释在Butterfield缓冲液中。大肠杆菌(E.coli)悬浮液没有被稀释。然后,通过用10微升的无菌塑料环划线,接种了每一稀释的和未稀释的悬浮液。以这种方式制备了一组经接种的培养装置,各自划线接种了不同的细菌。然后将这组培养装置密封在塑料袋中,并通过浸没在水浴中进行温育。以这种方法在下列温度下温育袋子:39℃、40℃、41℃、42℃、43℃、44℃和45℃。水浴温度被控制在±0.1℃,并且袋子被浸没24±2小时。测试了每种细菌的两个平行测定。从袋子中取出经接种的培养装置,并且在表4中显示观察结果。

[0143] 表4:观察结果。

微生物	观察结果
邦 戈 尔 沙 门 氏 菌 (ATCC43975)	在于 39℃和 40℃下温育的板上的菌落附近观察到蓝色沉淀。在于 41℃、42℃、43℃、44℃、和 45℃下温育的板上的菌落附近没有观察到蓝色沉淀。在 45℃下，菌落显得更小。
邦 戈 尔 沙 门 氏 菌 (FSD122)	当在 39℃和 40℃下温育时，菌落附近观察到蓝色沉淀。当在 41℃、42℃、43℃、44℃、和 45℃下温育时，菌落附近没有观察到蓝色沉淀。在 45℃下，菌落显得更小。
肠道沙门氏菌阿贡 纳 血 清 型 （ <i>S. enterica</i> <i>serovar agona</i> ） (FSD140)	当在 39℃、40℃、41℃、42℃、43℃、44℃、或 45℃下温育时，菌落附近没有产生蓝色沉淀。
肠道沙门氏菌亚利 桑 那 亚 种 （ <i>S. enterica</i> <i>subsp. arizonae</i> ） (FSD99001)	当在 37℃和 42℃下温育时，由菌落产生了蓝色沉淀（菌落附近）。没有测试其他温度。
大肠杆菌（ <i>E. coli</i> ） (ATCC25922)	当在 39℃、40℃、41℃、42℃、43℃、44℃、或 45℃下温育时，由菌落产生了蓝色沉淀（菌落附近）。
肠道沙门氏菌双相 亚 利 桑 那 亚 种 (FSD43973)	当在 39℃、40℃、41℃、42℃、43℃、44℃、或 45℃下温育时，菌落附近有蓝色沉淀。
邦 戈 尔 沙 门 氏 菌 (FSD2579)	当在 37℃下温育时，菌落附近有蓝色沉淀。当在 42℃下温育时，菌落没有产生蓝色沉淀。
邦 戈 尔 沙 门 氏 菌 (FSD2577)	当在 37℃下温育时，菌落附近有蓝色沉淀。当在 42℃下温育时，菌落没有产生蓝色沉淀。
肠道沙门氏菌亚利 桑 那 亚 种 (FSD115)	当在 39℃、40℃、41℃、42℃、43℃、44℃、或 45℃下温育时，菌落附近有蓝色沉淀。
弗 氏 柠 檬 酸 杆 菌 (<i>Citrobacter freundii</i>) (FSD99002)	当在 39℃、40℃、41℃、42℃、43℃、44℃、或 45℃下温育时，菌落附近有蓝色沉淀。
肠道沙门氏菌亚利 桑那亚种 (FSD17)	当在 39℃、40℃、41℃、42℃、43℃、44℃、或 45℃下温育时，菌落附近有蓝色沉淀。

[0145] 上述结果指示，肠道沙门氏菌阿贡纳血清型 (*Salmonella enterica* serovar *agona*) 的受试菌株在从 39℃ 至 45℃ 的任何温度下没有产生 β -半乳糖苷酶活性。上述结果还指示，大肠杆菌 (*E. coli*)、弗氏柠檬酸杆菌 (*Citrobacter freundii*)、肠道沙门氏菌亚利桑那亚种 (*Salmonella enterica* subsp. *arizonae*) 和肠道沙门氏菌双相亚利桑那亚种 (*Salmonella enterica* subsp. *diarizonae*) 在 39℃ 和 45℃ 之间的每一温度下全部产生 β -半乳糖苷酶活性。上述结果还指示，邦戈尔沙门氏菌的受试菌株在低于或等于 40℃ 的温度

下产生 β -半乳糖苷酶活性,但在高于40℃的温度下不产生 β -半乳糖苷酶活性。

[0146] 实例3:具有用于确认沙门氏菌属微生物的存在的区别性指示剂的检测制品的使用。

[0147] 如PCT国际公布W02012/092181的实例1所述制备了检测制品(盘);该文献全文以引用方式并入本文。

[0148] 打开包含推定的阳性结果(将鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*) ATCC14028和邦戈尔沙门氏菌FSD122接种至培养装置中并温育,如实例2中所述)的薄膜培养装置(如实例1所述制备),并将一个盘在凝胶表面滚动(以使气泡最少化)。封闭板并在42℃温育4小时。针对菌落附近的颜色变化分析上述盘,以确认该菌落是否与上述检测制品中存在的指示剂(5-溴-4-氯-3-吡啶基- α -D-半乳糖苷)反应。菌落颜色从红色或棕色向蓝色或深蓝色的变化指示沙门氏菌属微生物在该菌落中的存在。测试结果示出于表5中。

[0149] 表5:培养装置中观察到的结果分析。

板#	细菌	沙门氏菌属物种(<i>Salmonella</i> spp.) 确认结果
1	鼠伤寒沙门氏菌 (<i>Salmonella typhimurium</i>) (ATCC 14028)	<u>阳性:</u> 在菌落周围具有黄色区域的红色至棕色的推定的菌落变为蓝色至深蓝色的菌落
2	邦戈尔沙门氏菌(FSD 122)	<u>阳性:</u> 在菌落周围具有黄色区域的红色至棕色的推定的菌落变为蓝色至深蓝色的菌落

[0151] 本文引用的所有专利、专利申请、出版物和电子文献的全部公开内容以引用方式并入。在本专利申请和以引用方式并入本文的任何文献的公开内容之间存在矛盾的情况下,应以本发明的公开内容为准。给出上述详细说明及实例仅为清楚地理解本发明。这些说明和实例不应被理解成对本发明进行不必要的限制。而且,本发明并不局限于本文所显示及所描述的具体细节,本发明的各种变化对于本领域技术人员来说是显而易见的,这些变化都包括在本发明由权利要求书所界定的范围内。

[0152] 所有的标题是为了阅读者方便,而不应该被用于限制该标题后面的正文的含义,除非是这么规定的。

[0153] 在不脱离本发明的实质和范围的前提下,可以进行各种修改。这些和其他实施例均在所附权利要求书的范围内。

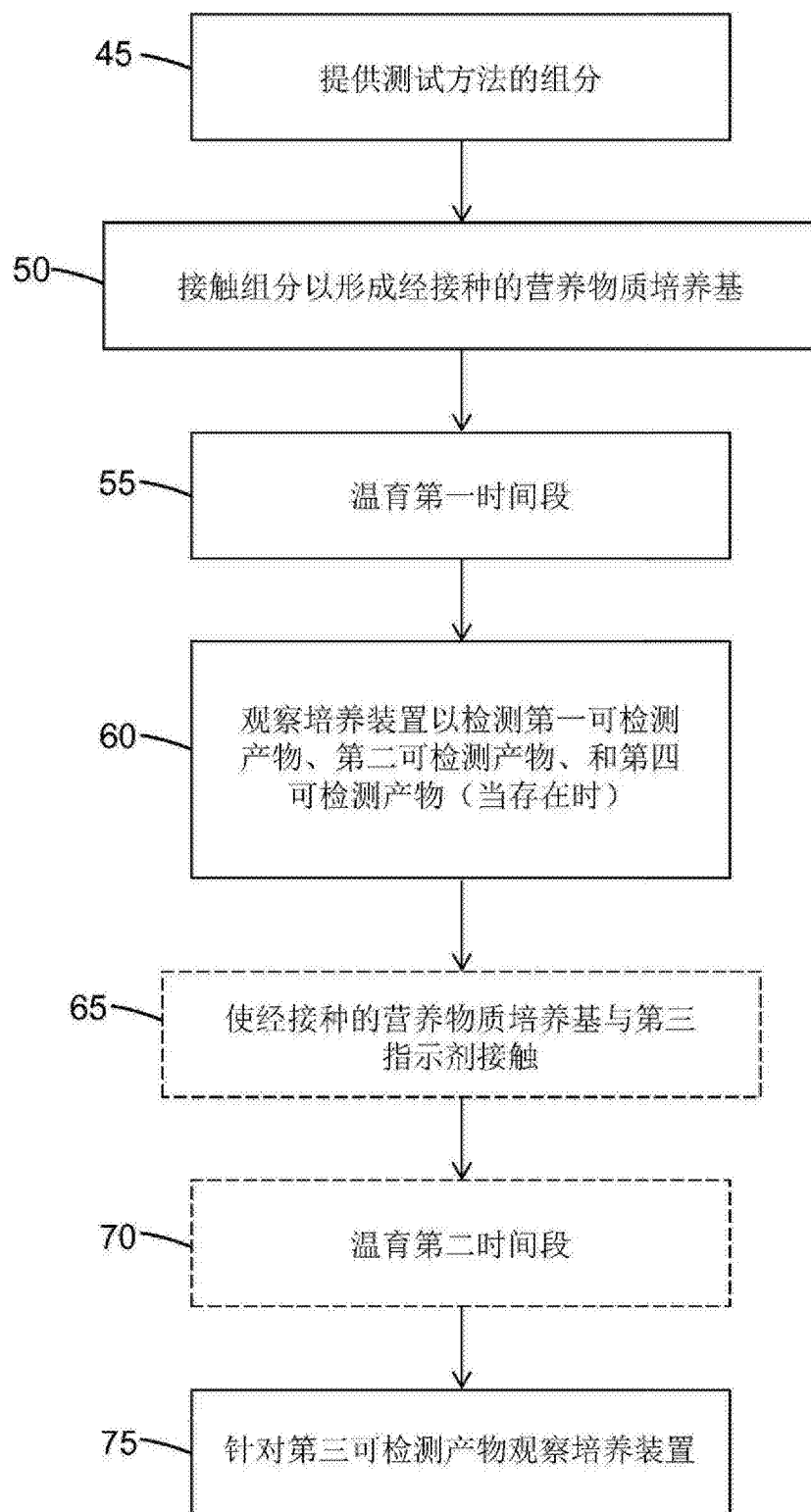


图1

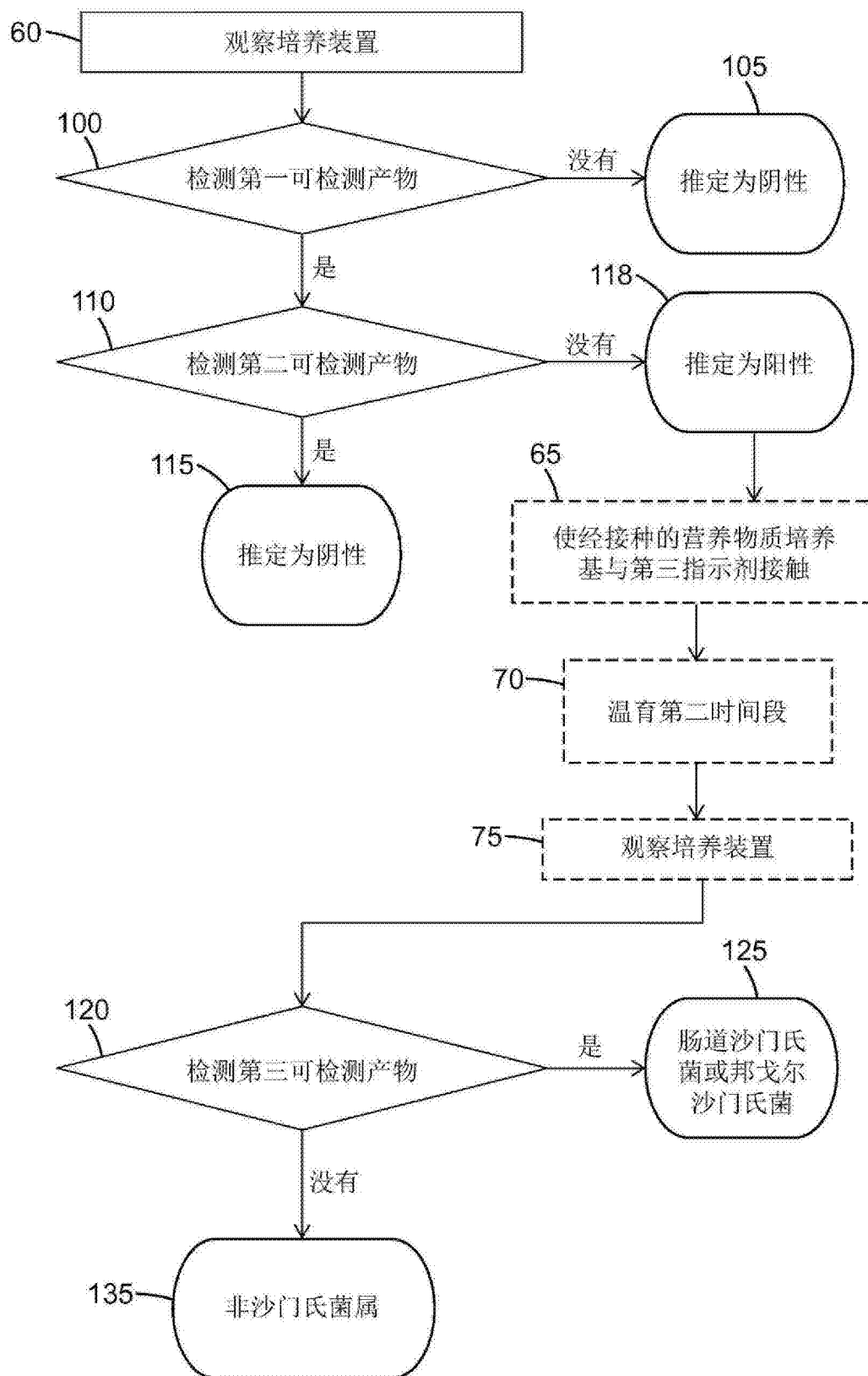


图2