



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101970683 B

(45) 授权公告日 2016.02.03

(21) 申请号 200980109069.5
(22) 申请日 2009.03.12
(30) 优先权数据
0851654 2008.03.14 FR
(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2010.09.14
(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/FR2009/050413 2009.03.12
(87) PCT国际申请的公布数据
W02009/122067 FR 2009.10.08
(73) 专利权人 生物梅里埃公司
地址 法国迈合西-兰托阿喇
(72) 发明人 D·莫斯蒂科内 J-C·雷蒙
T·索菲亚 A·维蒙
(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
72002
代理人 林晓红
(51) Int. Cl.
C12Q 1/04(2006.01)
(56) 对比文件
US 2002086278 A1, 2002.07.04,
CN 101113465 A, 2008.01.30,
BRITISH STANDARDS. Microbiology of food
and animal feeding stuffs - Horizontal

method for the detection and enumeration
of *Listeria monocytogenes*. 《BRITISH
STANDARDS》. 1997,
GASANOV 等. Methods for the isolation
and identification of *Listeria* spp. and
Listeria monocytogenes: a review. 《FEMS
MICROBIOLOGY REVIEWS》. 2005, 第 29 卷 (第 5
期),
SM Hansen 等. Method for Quantitative
Detection and Presumptive Identification of
Group B Streptococci on Primary Plating.
《JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY》. 2003, 第
41 卷 (第 4 期),
BLANCO M 等. A TECHNIQUE FOR THE DIRECT
IDENTIFICATION OF HEMOLYTIC-PATHOGENIC
LISTERIA ON SELECTIVE PLATING MEDIA.
《LETTERS IN APPLIED MICROBIOLOGY》. 1989, 第
9 卷 (第 4 期),
MOREL P 等. Transfusion-transmitted
bacterial infection: residual risk and
perspectives of prevention. 《TRANSFUSION
CLINIQUE ET BIOLOGIQUE》. 2003, 第 10 卷 (第 3
期),

审查员 高雅

权利要求书2页 说明书6页

(54) 发明名称

在液体培养基中使用细胞裂解实时检测微生物的方法

(57) 摘要

本发明涉及检测可能存在于样品中的至少一种靶微生物的方法,包括步骤:a) 在容器中将所述样品、能生长靶微生物的培养基及能被靶微生物裂解的细胞群接触;b) 将所述全部物质置于促进靶微生物生长的温度;及 c) 实时观察细胞群的裂解,指示所述靶微生物的存在。本发明还涉及检测和鉴别可能存在于样品中的至少一种靶微生物的方法。

CN 101970683 B

1. 检测可能存在于样品中的至少一种靶微生物的方法,包括步骤:

a) 在单个容器中将能生长和 / 或检测靶微生物的培养基、所述样品及能被所述靶微生物裂解的细胞群接触;

b) 将所述全部物质置于促进靶微生物生长和 / 或检测的温度 ;及

c) 当步骤 b) 完成时,实时观察所述细胞群的裂解,其中当检测所述靶微生物时所述细胞群的裂解指示所述靶微生物的存在或者证实所述存在,

其中

所述细胞群为红细胞,

细胞群裂解反应采用溶血细菌 - 红细胞反应,

所述培养基中包含荧光化合物,

所述培养基为液体培养基,并且

细胞裂解通过荧光的消失而证实。

2. 检测和鉴别可能存在于样品中的至少一种靶微生物的方法,包括步骤:

a) 在单个容器中将能生长和 / 或鉴别靶微生物的培养基、所述样品及能被所述靶微生物裂解的细胞群接触;

b) 将所述全部物质置于促进靶微生物生长和 / 或鉴别的温度 ;及

c) 当步骤 b) 完成时,实时观察所述细胞群的裂解,其中当在所述培养基中鉴别所述靶微生物时所述细胞群的裂解使得能鉴别所述靶微生物或者证实所述的鉴别,

其中

所述细胞群为红细胞,

细胞群裂解反应采用溶血细菌 - 红细胞反应,

所述培养基中包含荧光化合物,

所述培养基为液体培养基,并且

细胞裂解通过荧光的消失而证实。

3. 检测和鉴别可能存在于样品中的至少一种靶微生物的方法,包括步骤:

a) 在单个容器中将能生长和鉴别所述靶微生物的培养基、所述样品及能被所述靶微生物裂解的细胞群接触;

b) 将所述全部物质置于促进所述微生物生长和鉴别的温度 ;及

c) 当步骤 b) 完成时,实时观察所述细胞群的裂解,从而能补充靶微生物的鉴别,

其中

所述细胞群为红细胞,

细胞群裂解反应采用溶血细菌 - 红细胞反应,

所述培养基中包含荧光化合物,

所述培养基为液体培养基,并且

细胞裂解通过荧光的消失而证实。

4. 权利要求 1-3 中任一项的方法,其中所述容器选自微量培养板、微孔板、微管、毛细管或者多孔卡组成的组。

5. 权利要求 1-3 中任一项的方法,还包括计数所述微生物的步骤。

6. 用于进行前述任一项权利要求的方法的微生物学诊断试剂盒,包括:

- 单个容器；
- 选择性或者非选择性培养基，所述培养基任选含有特异于待检测的微生物属的代谢的底物；及

- 能被所述待检测的微生物属裂解的细胞群，

其中

所述细胞群为红细胞，

细胞群裂解反应采用溶血细菌 - 红细胞反应，

所述培养基中包含荧光化合物，并且

所述培养基为液体培养基。

7. 权利要求 6 的诊断试剂盒，其中所述容器选自微量培养板、微孔板、微管、毛细管或者多孔卡组成的组。

在液体培养基中使用细胞裂解实时检测微生物的方法

[0001] 本发明领域是临床或工业微生物学测试领域。更特别地,其涉及通过与富集样品中的微生物同时进行的细胞裂解反应鉴别一或多种微生物的方法。

[0002] 微生物学分析需要精确技术,其中获得结果的时间应该尽可能短。

[0003] 在医学领域,需要预测和诊断感染风险:诊断越快及越精确,患者治疗越有效及传播风险越低。该方法对于动物健康是类似的。

[0004] 在食品加工领域,规范是相同的。但是这些规范区分病原微生物及其毒素,这种研究适用于上市产品,非病原微生物,其沿生产线从初级产品至最终产品用作生产方法的质量指标,及技术上如发酵感兴趣的细菌。推测的污染物的快速精确检测使得可以测试它们并且因此启动正确的措施。

[0005] 技术上,微生物学分析可以实施一或多个阶段的预富集/富集(*pré-enrichissement/enrichissement*),一或多个阶段的检测,一或多个阶段的微生物计数。对于特殊应用如食品加工微生物学测试,也可能需要证实阶段,以符合该领域中的强制标准。

[0006] 预富集/富集阶段需要本领域技术人员熟知的选择性或非选择性培养基。基于常规培养基配方的经常为液体形式的现成使用的培养基是商业可获得的。

[0007] 检测阶段基于证实待检微生物的代谢特征。常规使用特异的酶底物。这些酶底物通常由两部分组成,第一部分特异于待揭示的酶活性,也称为靶部分,第二部分作用为标记,也称作标记部分,通常由生色团或荧光团组成。通过选择这些底物,根据是否有反应,可以鉴定微生物性质或者区分各种微生物群。因此,颜色或荧光的出现或消失将是微生物属或类型的特征。关于这一点,使用生色培养基使得能同时检测和鉴别待检微生物。其简化了方法并且大大降低了获得结果所需的时间。具体举例可以提及的是申请人的 ChromID[®] 培养基。这些生色培养基基于检测特异于待检微生物的代谢特征,例如大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 的 β -葡糖醛酸糖苷酶活性。但是,一些微生物或者一些亚型例如大肠杆菌 O157:H7 不显示任何特异酶活性,因此不能用生色培养基检测。

[0008] 证实阶段部分更特别与食品加工领域的微生物学分析相关。具体地,当先前开发方法的结果是阳性时,需要证实存在待检病原体。这意味着需要额外测试及使用不同于第一次分析中使用的检测原理。基于待检微生物的基因组特征的分子生物学技术构成了用于证实所述鉴别的一种手段。例如,可提及的是常规扩增技术如 PCR(聚合酶链反应)和 NASBA(基于核酸序列的扩增),它们可以与本领域技术人员已知的实时检测技术结合。

[0009] 免疫测定构成另一种用于证实测试的技术。它们利用待检微生物的免疫原性特征。非限制性例子为竞争或夹心 ELISA(酶联免疫吸附测定)技术或者免疫凝集技术,检测待检微生物的表位。后一方法利用功能化固体支持物如用单克隆抗体或多克隆抗体包被的珠(例如胶乳颗粒),所述功能化支持物与生物学样品接触,如授权的欧洲专利 EP 0 701 624 及 EP 1 199567 所述。或者,如专利 US-4, 659, 658 所述,固体颗粒可以用与位于给定微生物表面上的糖特异结合的凝集素包被。在任何情况下,凝集的出现使得可以明确鉴别待检微生物。

[0010] 样品中微生物的完整精确鉴别因此需要若干步骤顺序：富集、检测、证实。日常使用的测试的标准化已能使检测方法自动化，但是其进行起来还是很慢。现有技术的一个缺点是事实上这些步骤依次进行。另一个缺点是用于证实步骤的特异相互作用反应，其是免疫学反应或者分子杂交反应，通常在“终点”读取。在这期间，在食品加工业，终产品的完整批次被阻断而等待证实结果，在临床时期，相关抗生素治疗和预防措施的建立被延迟。

[0011] 考虑到现有技术，因此缺少组合了富集、检测和精确鉴别步骤的方法。具体地，这种方法能将快速、特异性和灵敏性组合在一起。

[0012] 本发明因此通过在液体培养基中同时使用微生物培养和通过所述微生物的至少一种细胞裂解反应而克服了上述缺点。

[0013] 更具体地，本发明首先涉及检测和鉴别可能存在于样品中的至少一种靶微生物的方法，包括步骤：

[0014] a) 在容器中将能生长和 / 或检测靶微生物的培养基、所述样品及能被靶微生物裂解的细胞群接触；

[0015] b) 将所述全部物质置于促进靶微生物生长和 / 或检测的温度；

[0016] c) 当步骤 b) 完成时，实时观察所述细胞群的裂解，其中在检测所述靶微生物时所述细胞群的裂解指示所述靶微生物的存在或者证实所述存在。

[0017] 本发明的另一个主题涉及检测和鉴别可能存在于样品中的至少一种靶微生物的方法，包括步骤：

[0018] a) 在容器中将能生长和 / 或鉴别靶微生物的培养基、所述样品及能被靶微生物裂解的细胞群接触；

[0019] b) 将所述全部物质置于促进靶微生物生长和 / 或鉴别的温度；及

[0020] c) 当步骤 b) 完成时，实时观察所述细胞群的裂解，其中当在所述培养基中鉴别所述靶微生物时所述细胞群的裂解使得能鉴别所述靶微生物或者证实所述的鉴别。

[0021] 本发明的另一个主题涉及检测和鉴别可能存在于样品中的至少一种靶微生物的方法，包括步骤：

[0022] a) 在容器中将能生长和鉴别靶微生物的培养基、所述样品及能被靶微生物裂解的细胞群接触；

[0023] b) 将所述全部物质置于促进微生物生长和鉴别的温度；及

[0024] c) 当步骤 b) 完成时实时观察所述细胞群的裂解，从而能补充鉴别靶微生物。

[0025] 术语“补充鉴别”是指提供额外信息，使得能对说明靶微生物的鉴别提供额外的信息。例如，在步骤 a) 中，使用的培养基可以是特异于大肠杆菌属的细菌，并且可以包含特异于这一细菌属的底物，从而这种细菌在测试样品中的存在由培养基的修饰而鉴定，例如如果使用的底物是生色底物，则颜色变化。步骤 c) 中发生的细胞群（例如 Vero 细胞）的裂解可以例如使得能够证实大肠杆菌属的特定菌株，如大肠杆菌 0157:H7，其是肠道致病菌。

[0026] 术语“细胞群”是指天然来源或者衍生自化学或者生物学工程的能被靶微生物特异性或非特异性裂解的任何类型的细胞或者小泡。能用于本发明方法中的一种细胞类型是例如红细胞。具体地，这些细胞被溶血细菌特别是 β -溶血细菌如链球菌 (*Streptococcus*) 和利斯特氏菌 (*Listeria*) 的某些菌株裂解。所用的红细胞能含有检测辅助化合物，如生色团或荧光团化合物，当红细胞被裂解时其被释放。将化合物包囊在红细胞中的技术已由

ERYtech Pharma®公司开发。

[0027] 还可以设想使用脂质小泡,其膜可以由一种类型的微生物特异性或非特异性裂解。这例如是脂质体。

[0028] 促进微生物生长的温度在 20 和 44°C 之间,样品保持在这个温度一段足以实现微生物检测的时间,即在 6 和 96 小时之间的一段时间。

[0029] 这些不同技术在单个容器中的组合应用使得可以节约时间及限制操作,因此限制操作人或样品的污染,后者导致假阳性。另外,可以自动化进行本发明。还注意到节约的时间归因于将两个步骤并成一个步骤及实时检测细胞裂解。

[0030] 有利地,上述方法的步骤 a) 和 c) 使用生色化合物(也称为生色团)或荧光化合物(也称为荧光团)。

[0031] 更特别地,检测和鉴别两种方法中,检测可以优选使用着色或者荧光的存在或者消失。另外,在本发明的所有方法中,细胞裂解可以有利地通过着色或者荧光的存在或者消失证实。

[0032] 因此,根据本发明的一个特定实施方案,细胞裂解包括溶血,即红细胞的溶解。当目的在于证实溶血细菌时,这种实施方案是特别有利的。在这种情况下,溶血反应通过荧光消失而证实。这是因为发现当红细胞被裂解时,其含有的血红蛋白被释放到培养基中。其然后掩盖由培养基中含有的荧光化合物发射的荧光。

[0033] 优选地,容器选自微量培养板、微孔板(microcupule)、微管、毛细管或者多孔卡(cartes multipuits)组成的组中。

[0034] 有利地,本发明方法还可以包括计数微生物的步骤,优选根据申请人专利 EP 1 105 457 中解释的最可能数方法进行。

[0035] 另外,本发明的一个主题是用于进行上述各种实施方案的方法的诊断试剂盒。试剂盒包括:

[0036] - 容器;

[0037] - 选择性或非选择性培养基,所述培养基任选含有特异于待检测微生物属或物种的代谢的底物;及

[0038] - 能被靶微生物裂解的细胞群。

[0039] 有利地,所述容器选自微量培养板、微孔板、微管、毛细管或者多孔卡组成的组中。

[0040] 根据第一个优选的实施方案,所述细胞群由红细胞组成。

[0041] 根据第二个优选的实施方案,所述细胞群由脂质体组成。

[0042] 本发明的诊断试剂盒还可以包含至少一种生色或者荧光化合物。

[0043] 最后,本发明最后的主题涉及本发明的诊断试剂盒用于检测和/或鉴别可能存在于样品中的至少一种微生物的应用。

[0044] 本发明通过阅读如下详细描述和说明性的非限制性实施例而更清楚理解。

[0045] 本发明所述方法可以用于食品、环境或者临床来源的样品。样品被定义为分离自用于分析的实体的小部分或少量。

[0046] 食品来源的样品可提及的非限制性的是奶制品(酸奶、奶酪等)样品、肉样品、鱼样品、蛋样品、水果样品、蔬菜样品、水样品或饮料(牛奶、果汁、苏打水等)样品。这些食品来源的样品还可以来自制成的菜肴或沙司。最后,食品样品可衍生自动物饲料,如特别是动

物膳食。

[0047] 还可以提及环境相关样品,如取自表面、取自水或取自空气的样品。

[0048] 临床来源的样品可以相应于取得的生物学液体(全血、血清、血浆、尿、脑脊液)样品,取得的粪便样品,取自鼻、咽喉、皮肤、伤口、器官、组织或者分离的细胞等的样品。

[0049] 微生物学测试相应于分析样品,目的在于分离和/或鉴别和/或计数潜在存在的微生物,如细菌或酵母。技术上,这种分析包括在培养基中体外生长微生物。术语“培养基”是指包含微生物存活和/或生长必需的所有组分的介质。培养基可以含有任选的添加剂,例如:胺、一或多种生长因子、碳水化合物、一或多种选择剂、缓冲剂、一或多种胶凝剂等。这种培养基可以是即用的液体或凝胶形式,即准备用于接种试管或烧瓶或培养皿。

[0050] 为本发明目的,术语“微生物”包括革兰氏阳性或革兰氏阴性细菌、酵母、霉菌及更广泛地肉眼不可见的单细胞生物体,其可以在实验室中操作和繁殖。

[0051] 通常,培养基可以额外含有用于通过直接或间接可检测信号而检测靶微生物的酶活性或者代谢活性的底物。为直接检测,这种底物可以与作为标记的部分连接,标记部分可以是荧光的或生色的。对于间接检测,本发明的培养基可以额外包含 pH 指示剂,其对由底物消耗诱导的 pH 变化敏感并揭示靶微生物的生长。所述 pH 指示剂可以是生色团或者荧光团。作为生色团的例子,可以提及的是中性红、苯胺蓝和溴酚蓝。荧光团包括例如 4-甲基伞形酮、氨基香豆素衍生物和试卤灵衍生物。

[0052] 为本发明目的,应该证实待检微生物的鉴别,潜在地通过搜索其代谢特征而进行。这种证实可以利用细胞裂解反应。

[0053] 术语“细胞裂解”是指微生物对天然或非天然来源的细胞或小泡的直接或间接作用的结果,导致所述细胞的裂解或者所述小泡的破坏。样品中溶血细菌如 β -溶血链球菌的存在可以通过培养基中含有的红细胞的裂解而检测。

[0054] 细胞裂解可以肉眼检测或者通过自动化光学读数仪根据本领域技术人员已知的各种原理检测,可提及的非限制性例子为:

[0055] (1) 检测裂解过程中通过荧光团释放而导致的荧光的出现,所述荧光团最初包含在培养基悬浮液中的细胞或小泡中;及

[0056] (2) 由于最初在培养基悬浮液中的红细胞的裂解释放的血红蛋白的掩盖而导致的培养基中荧光的消失;

[0057] (3) 由于裂解过程中释放的化合物的掩盖导致的培养基中荧光的消失,所述化合物最初包含在培养基悬浮液中的细胞或小泡中;

[0058] (4) 检测由于裂解过程中最初在培养基悬浮液中的细胞或小泡中最初包含的生色团的释放导致的颜色的变化或颜色的出现;

[0059] (5) 检测由于最初在培养基悬浮液中的红细胞的裂解而释放的血红蛋白导致的培养基颜色的变化。

[0060] 可以使用的荧光团在以上提及并且包括 4-甲基伞形酮、氨基香豆素衍生物或者试卤灵衍生物。

[0061] 可以使用的生色团是常规用于生色培养基并且本领域技术人员熟知的那些。

[0062] 可以使用的荧光掩盖化合物是例如对硝基酚或者血红蛋白。

[0063] 以两步描述的培养/鉴别及随后在终点的细胞裂解的操作根据本发明组合成一

个单步骤,被实时检测的细胞裂解。举例而言,可提及的是在食品来源的样品中能鉴别单核细胞增生利斯特氏菌 (*Listeria monocytogenes*):单核细胞增生利斯特氏菌的检测可以用对于该细菌是选择性的培养基进行,单核细胞增生利斯特氏菌的存在的证实通过实时检测的细胞裂解反应而同时进行。这个裂解反应通过使用例如脂质体类型的合成小泡而获得,所述小泡在其表面上携带由单核细胞增生利斯特氏菌产生的溶血素特异识别的基序,由此导致所述小泡的裂解。

[0064] 在一个特定实施方案中,本发明可以在如微量培养板、微孔板、微管、毛细管等容器中进行。

[0065] 有利地,本发明的方法可以与申请人开发的TEMPO®型的自动化微生物学检测装置组合,并且可以任选地能计数检测的微生物。

[0066] 本发明的方法可以用试剂盒进行,所述试剂盒包括:含有营养基、敏化颗粒及任选地含有特异于待检微生物的生色底物的反应培养基。所述培养基重悬待分析样品的等份。有利地,进行本发明方法的试剂盒还可以含有微量培养板、微管、微孔板、毛细管、VITEK®卡或者TEMPO®卡类型的固体容器。

[0067] 基于使用动物来源的红细胞计数伊氏利斯特菌 (*Listeria ivanovii*)

[0068] 测试包括用申请人上市的TEMPO®系统对伊氏利斯特菌细菌进行生物化学计数。这个测试基于最初存在于卡的一或多个孔中的衍生于纯菌株 (ref. ATCC 70408) 的伊氏利斯特菌对红细胞特异裂解后(释放血红蛋白)对荧光的掩盖。

[0069] 方案:

[0070] 步骤 1:用待分析样品等份重悬反应培养基:

[0071] 反应培养基含有:

[0072] - 动物来源(绵羊、马)的红细胞;

[0073] - 荧光标记(例如 7-氨基甲基香豆素(7-AMC), 4-甲基伞形酮(4-MU));

[0074] - 营养基:缓冲的胨水(bioMérieux reference 51094)。

[0075] 伊氏利斯特菌的细菌悬浮液(1000CFU/ml)得自纯菌株样品。

[0076] 用 40 μl 细菌悬浮液接种 4ml 反应培养基,其相当于 1/100 细菌悬液的稀释。然后将反应培养基根据方案导入TEMPO®卡,以进行计数。

[0077] 步骤 2:卡的保温:

[0078] TEMPO 卡然后在 37°C 保温 16-24 小时。在这段保温期间,在靶细胞存在于有关孔中时,由利斯特菌溶胞素(由伊氏利斯特菌产生的溶血素)的产生所致的红细胞裂解反应与细菌生长同时发生。

[0079] 步骤 3:保温 24小时后读取测试:

[0080] 保温后,伊氏利斯特菌在卡的一或多个孔中的存在将诱导红细胞的特异性裂解,由此释放血红蛋白并因此掩盖相关孔中的荧光,它们然后被定义为阳性。

[0081] 然后计数阳性孔数以便通过 MPN 表确定每克或者每毫升样品的伊氏利斯特菌的菌落形成单位(CFU)数。

[0082] 表 1:TEMPO 卡每种类型孔中的相对荧光单位(RFU)

[0083]

孔类型	阳性孔数
-----	------

大	12
中等	8
小	1

[0084] 基于获得的阳性孔数,用最可能数 (Most Probable Number, MPN) 方法确定导入到卡中的悬浮液中的细菌浓度。这个计算用 TEMPO [®] 仪器上的算法进行。获得的值是 10CFU/ml。鉴于细菌悬浮液已在反应培养基中 1/100 稀释,因此确定其起始浓度是 1000CFU/ml。