



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101970682 B

(45) 授权公告日 2015.05.13

(21) 申请号 200980102690.9

(22) 申请日 2009.01.20

(30) 优先权数据

0850354 2008.01.21 FR

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2010.07.21

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/FR2009/050072 2009.01.20

(87) PCT国际申请的公布数据

W02009/092982 FR 2009.07.30

(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 K·阿西尔 M·P·布吉尼翁

D·哈利米 J·佩里 S·欧伦加

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 康健 林晓红

(51) Int. Cl.

C12Q 1/04(2006.01)

(56) 对比文件

WO 0110881 A1, 2001.02.15, 全文.

US 6287798 B1, 2001.09.11, 第11栏第4段,
第20栏第2段.

H. Rüssmann, et al.. Evaluation of three rapid assays for detection of *Clostridium difficile* toxin A and toxin B in stool specimens. 《Eur J Clin Microbiol Infect Dis》. 2007, 第26卷(第2期), 115-119.

Romina C. Reyes, et al.. Performance of TechLab C. DIFF QUIK CHEK™ and TechLab C. DIFFICILE TOX A/B II™

for the detection of *Clostridium difficile* in stool samples. 《Diagnostic Microbiology and Infectious Disease》. 2007, 第59卷(第1期), 33-37.

梁华正等. 京尼平苷为底物测定 β -葡萄糖苷酶活力的方法. 《食品科学》. 2006, 第27卷(第4期), 182-185.

朱永红等. 乳粉中坂崎肠杆菌的快速检验. 《中国乳品工业》. 2006, 第34卷(第9期), 57-59.

审查员 陈皓

(54) 发明名称

检测和 / 或鉴别艰难梭状芽孢杆菌的方法

(57) 摘要

本发明涉及检测和 / 或鉴别艰难梭状芽孢杆菌的方法, 特征在于其包括如下步骤: a) 提供包含至少一种能鉴别艰难梭状芽孢杆菌的 β -葡萄糖苷酶底物的反应培养基, b) 用待检测的生物样品接种该培养基, c) 保温, d) 检测 β -葡萄糖苷酶的水解, 所述的水解指示艰难梭状芽孢杆菌的存在。本发明还涉及检测和 / 或鉴别艰难梭状芽孢杆菌的反应培养基, 其包含至少一种能鉴别艰难梭状芽孢杆菌的 β -葡萄糖苷酶底物。

权利要求书1页 说明书12页

1. 可被艰难梭状芽孢杆菌水解的 β -葡萄糖苷酶底物在制备用于通过以下方法检测和 / 或鉴别艰难梭状芽孢杆菌存在的反应培养基中的用途, 所述方法包括如下步骤:

- a) 提供包含至少一种能鉴别艰难梭状芽孢杆菌的 β -葡萄糖苷酶底物的反应培养基,
- b) 用待检测的生物样品接种该培养基,
- c) 在厌氧条件下进行保温,
- d) 检测 β -葡萄糖苷酶底物的水解, 所述的水解指示艰难梭状芽孢杆菌的存在,

其中所述 β -葡萄糖苷酶底物选自茜素- β -葡糖苷、品红- β -葡糖苷(5-溴-6-氯-3-吡啶酚- β -葡糖苷)和 CHE- β -葡糖苷(3,4-环己酮七叶苷- β -葡糖苷)。

2. 权利要求 1 的用途, 其中所述 β -葡萄糖苷酶底物的浓度为 25-1000mg/L。

3. 权利要求 1 的用途, 其中所述 β -葡萄糖苷酶底物的浓度为 50-400mg/L。

4. 权利要求 1 的用途, 其中所述反应培养基还包含七叶苷。

5. 权利要求 4 的用途, 其中所述七叶苷的浓度为 5-500mg/L。

6. 权利要求 4 的用途, 其中所述七叶苷的浓度为 10-100mg/L。

7. 权利要求 1-6 任一项的用途, 其中所述反应培养基还包含 β -葡萄糖苷酶诱导剂。

8. 权利要求 1-6 任一项的用途, 其中所述反应培养基还包含艰难梭状芽孢杆菌菌株的至少一种生长活化剂。

9. 权利要求 1-6 任一项的用途, 其中所述反应培养基还包含至少一种艰难梭状芽孢杆菌孢子萌发诱导剂。

10. 权利要求 1-6 任一项的用途, 其中所述反应培养基还包含至少一种选择剂。

11. 权利要求 1-6 任一项的用途, 其中所述反应培养基还包含至少一种还原剂。

检测和 / 或鉴别艰难梭状芽孢杆菌的方法

[0001] 本发明涉及特异于艰难梭状芽孢杆菌 (*Clostridium difficile*) 的反应培养基。本发明还涉及使用这种培养基检测和 / 或鉴别艰难梭状芽孢杆菌的方法。

[0002] 艰难梭状芽孢杆菌是肠道菌群的共生微生物。艰难梭状芽孢杆菌孢子在土壤和医院中发现,活性形式仅在肠道中发现。在显微镜下,在革兰氏染色之后,它们是具有略凸出末端的细长的细菌。由于艰难梭状芽孢杆菌对大多数抗生素均具有抗性,因此在通过用抗生素处理破坏肠道菌群的事件中可发生这种情况。其分泌两种毒素 :A 和 B,这是肠毒素和细胞毒素,造成假膜性结肠炎或者使用抗生素后的腹泻。结果,目前公认艰难梭状芽孢杆菌是主要的肠道病原体,主要与成人医院感染性腹泻有关。

[0003] 诊断基于各种技术进行,如检测毒素活性 (细胞毒性活性,CTA)。然而,这种技术有缺点,如实施这种技术需要的时间量以及需要专业技术人员以读数结果。

[0004] 也可以通过免疫学利用 ELISA 测定进行诊断。然而,推荐组合免疫学技术用于使用细菌培养检测毒素,以分离艰难梭状芽孢杆菌菌株。这种培养步骤可以在由本申请人销售的艰难梭状芽孢杆菌琼脂上进行,然后通过化学方法鉴别艰难梭状芽孢杆菌菌落,所述方法如 api 20 A 条带法或者快速 ID 32 A 条带法然而,使用条带鉴别需要在合适的生长培养基上的待鉴别的细菌的纯培养物,以获得足够的生物量 (3-4 Mc Farland),最多进行 48 小时 (分离培养 24-72 小时,从样品仅提供检测假定检测开始,加上培养 24-72 小时,以产生足够的生物量)。然后对于快速 ID 32 A 法在保温 4 小时后读数条带,对于 20A 条带法在保温 24-48 小时后读数条带。最后,可以通过分子生物学技术进行诊断。然而,目前不常用这些技术。

[0005] 令人惊奇地,本发明人证实使用一或多种 β -葡萄糖苷酶酶底物使得可以简便且快速地鉴别艰难梭状芽孢杆菌。这个结果完全出乎意料,因为快速 ID 32 A 条带法的 β -葡萄糖苷酶检测对于这个物种是阴性的。本发明的培养基使得可以从 24 小时开始检测和明确鉴别样品。

[0006] 在阐述本发明之前,提供如下定义以便更清晰地理解本发明。这些定义无限制之意。

[0007] 术语反应培养基是指这样的培养基,其包含代谢物表达和 / 或微生物生长必需的所有成分。所述反应培养基可以是固体、半固体或者液体。术语“固体培养基”是指例如凝胶状培养基。琼脂在微生物学中是培养微生物常用的凝胶剂,但是也可以使用明胶、琼脂糖或者其它天然或者人工凝胶剂。某些制备物可以商购,例如 Columbia 琼脂、Trypticase-大豆琼脂、MacConkey 琼脂、Sabouraud 琼脂,或者在 Handbook of Microbiological Media (CRC Press) 中描述的那些更常用的制备物。本发明的反应培养基应可以使得艰难梭状芽孢杆菌生长。

[0008] 所述反应培养基可包含一或多种成分组合,如氨基酸、胺、碳水化合物、核苷酸、矿物质、维生素等。该培养基也可包含着色剂。对于着色剂可以提及的是 Evans 蓝、中性红、绵羊血液、马血液、遮光剂如氧化钛、硝基苯胺、孔雀绿、亮绿,一或多种代谢指示剂,一或多种代谢调节剂等。

[0009] 所述反应培养基可以是显示培养基,或者培养和显示培养基。在第一种情况中,在接种之前培养微生物;在第二种情况中,检测和/或鉴别培养基也组成所述培养培养基。

[0010] 本领域技术人员也使用双平板(biplate),可以易于对比包含各种底物或者各种选择混合物的两个培养基,在其上可放置相同生物学样品。

[0011] 所述反应培养基可包含一或多种 β -葡萄糖苷酶诱导剂。

[0012] 术语 β -葡萄糖苷酶诱导剂是指这样的化合物,其诱导靶向的代谢活性的表达增加;另外,所有实验条件是相同的,当所述诱导剂在合适的浓度存在时与其不存在或者在不合适的浓度存在的情况相比所述代谢活性较高。

[0013] 可以特别提及的是由在 β -位置与葡萄糖连接的基团组成的碳水化合物,或者具有 β -葡萄糖苷亚基的碳水化合物,特别是纤维二糖、纤维素、淀粉、纤维三糖、海藻糖或者甲基- β -葡萄糖苷。非限制性地,100ng/l-10g/l的浓度、优选10mg/l-3g/l的浓度特别适于本发明。

[0014] 所述反应培养基可包含艰难梭状芽孢杆菌菌株的一或多种生长活化剂。

[0015] 术语生长活化剂是指刺激微生物的生长的化合物或者一组化合物。可以提及的是血液、血清和蛋黄。

[0016] 非限制性地,0.1%-10%的浓度特别适于本发明。

[0017] 所述反应培养基可包含一或多种还原剂。

[0018] 术语还原剂是指这样的化合物或者一组化合物,其通过中和培养基中存在的溶解 O_2 而促进厌氧微生物生长。可以特别提及的是半胱氨酸、丙酮酸盐、oxyrase、亚硫酸钠、连二亚硫酸钠、组氨酸和硫化亚铁。

[0019] 非限制性地,0.05-50g/l的浓度、优选0.1-2g/l的浓度特别适于本发明。

[0020] 所述反应培养基可包含一或多种艰难梭状芽孢杆菌孢子萌发诱导剂。

[0021] 术语孢子萌发诱导剂是指这样的化合物或者一组化合物,其促进艰难梭状芽孢杆菌从孢子状态变为植物状态。可以特别提及的是牛磺胆酸钠。

[0022] 非限制性地,0.1-10g/l的浓度、优选1-5g/l的浓度特别适于本发明。

[0023] 所述反应培养基可包含一或多种选择剂。

[0024] 术语选择剂是指能阻止或者减缓微生物生长的任何化合物。非限制性地,5mg/l-5g/l的浓度特别适于本发明。

[0025] 作为选择剂,可以提及的是抗生素如D-环丝氨酸,头孢菌素,如头孢西丁或者头孢噻肟,粘菌素,多粘菌素,磷霉素,托普霉素,庆大霉素,噻肟单酰胺菌素,甲氧苄氨嘧啶,喹诺酮类药物如萘啶酸,抗真菌剂如两性霉素B,氟康唑或者伊曲康唑。

[0026] 术语“抗生素”是指能阻止或者减缓细菌生长的任何化合物。其特别属于头孢菌素、氨基糖苷类、多肽、磺酰胺和喹诺酮类。可以特别提及的是抗生素头孢噻肟,头孢噻甲羧肟,头孢西丁,头孢三嗪,头孢泊肟,噻肟单酰胺菌素,甲氧苄氨嘧啶,托普霉素,拉氧头孢,磷霉素,D-环丝氨酸,多粘菌素和粘菌素。

[0027] 术语“抗真菌剂”是指能阻止或者减缓酵母或者真菌生长的任何化合物。可以特别提及的是两性霉素B,氟康唑,伊曲康唑,伏立康唑和放线菌酮。

[0028] 所述反应培养基可包含另一种酶底物,例如糖苷酶(osidase)底物、酯酶底物、肽酶底物等。其可以是这样的底物,靶向由艰难梭状芽孢杆菌表达的酶如脯氨酸氨基肽酶,或

者靶向不由艰难梭状芽孢杆菌表达的酶如 β -核糖苷酶 (ribosidase)。

[0029] 术语底物是指可以由酶如 β -葡萄糖苷酶水解的分子, 以提供可以直接或者间接检测微生物的产物。这种底物特别包含特异于显示的酶活性的第一部分以及作为标记的第二部分, 在后文称作标记部分。这个标记部分可以是生色的、荧光的、发光的部分等。

[0030] 短语能鉴别艰难梭状芽孢杆菌的 β -葡萄糖苷酶底物是指这样的底物, 其在合适的生长条件下诱导艰难梭状芽孢杆菌着色。这种底物可特别通过实施例 1 中描述的检测方法选择。

[0031] 该短语具体指 2-羟苯基- β -葡萄糖苷 (邻苯二酚- β -葡萄糖苷)、品红- β -葡萄糖苷 (5-溴-6-氯-3-吡啶酚- β -葡萄糖苷)、DHF- β -葡萄糖苷 (二羟基黄酮- β -葡萄糖苷)、七叶苷 (七叶亭- β -葡萄糖苷)、CHE- β -葡萄糖苷 (3,4-环己酮七叶苷- β -葡萄糖苷)、8-羟基喹啉- β -葡萄糖苷、X- β -葡萄糖苷 (5-溴-4-氯-3-吡啶酚- β -葡萄糖苷)、粉红- β -葡萄糖苷 (6-氯-3-吡啶酚- β -葡萄糖苷)、6-溴-3-吡啶酚- β -葡萄糖苷、蓝- β -葡萄糖苷 (5-溴-3-吡啶酚- β -葡萄糖苷)、6-氟-3-吡啶酚- β -葡萄糖苷、茜素- β -葡萄糖苷、(P)-硝苯基- β -葡萄糖苷、4-甲基伞型酮- β -葡萄糖苷、萘酚苯甲醇- β -葡萄糖苷、吡啶酚-N-甲基- β -葡萄糖苷、5-溴-4-氯-3-吡啶酚-N-甲基- β -葡萄糖苷、萘基- β -葡萄糖苷、氨基苯基- β -葡萄糖苷、二氯氨基苯基- β -葡萄糖苷。

[0032] 优选地, 能鉴别艰难梭状芽孢杆菌的 β -葡萄糖苷酶底物选自 2-羟苯基- β -葡萄糖苷 (邻苯二酚- β -葡萄糖苷)、品红- β -葡萄糖苷 (5-溴-6-氯-3-吡啶酚- β -葡萄糖苷)、二羟基黄酮- β -葡萄糖苷、七叶苷 (七叶亭- β -葡萄糖苷)、3,4-环己酮七叶苷- β -葡萄糖苷和茜素- β -葡萄糖苷。

[0033] 优选地, 本发明培养基中 β -葡萄糖苷酶底物的浓度为 25-1000mg/l, 优选 50-400mg/l。

[0034] 所述反应培养基可包含另一种酶底物或者一些酶底物, 优选选自糖苷酶底物、酯酶底物或者肽酶底物。

[0035] 所述糖苷酶底物特别是指 α -葡萄糖苷酶、半乳糖苷酶、核糖苷酶、己糖胺酶、葡萄糖苷酸酶、木糖苷酶、岩藻糖苷酶、纤维二糖苷酶、阿拉伯糖苷酶和甘露糖苷酶底物。

[0036] 术语“核糖苷 (riboside)”是指呋喃核糖苷和 / 或吡喃核糖苷。术语“阿拉伯糖苷”是指阿拉伯呋喃核糖苷和 / 或阿拉伯吡喃核糖苷。术语“岩藻糖苷”是指 D-岩藻糖苷和 / 或 L-岩藻糖苷。当非特指时, 其可以是 α -糖苷或者 β -糖苷。

[0037] 提别提及的是: 5-溴-6-氯-3-吡啶酚- α -葡萄糖苷; 二羟基黄酮- α -葡萄糖苷; 3,4-环己酮七叶苷- α -葡萄糖苷; 8-羟基喹啉- α -葡萄糖苷; 5-溴-4-氯-3-吡啶酚- α -葡萄糖苷; 6-氯-3-吡啶酚- α -葡萄糖苷; 5-溴-3-吡啶酚- α -葡萄糖苷; 茜素- α -葡萄糖苷; 硝苯基- α -葡萄糖苷; 4-甲基伞型酮- α -葡萄糖苷; 萘酚苯甲醇- α -葡萄糖苷; 吡啶酚-N-甲基- α -葡萄糖苷; 5-溴-4-氯-3-吡啶酚-N-甲基- α -葡萄糖苷; 萘基- α -葡萄糖苷; 氨基苯基- α -葡萄糖苷; 二氯氨基苯基- α -葡萄糖苷; 2-羟苯基-半乳糖苷; 5-溴-6-氯-3-吡啶酚-半乳糖苷; 二羟基黄酮-半乳糖苷; 3,4-环己酮七叶苷-半乳糖苷; 8-羟基喹啉-半乳糖苷; 5-溴-4-氯-3-吡啶酚-半乳糖苷; 4-氯-3-吡啶酚-半乳糖苷; 6-氯-3-吡啶酚-半乳糖苷; 6-溴-3-吡啶酚-半乳糖苷; 5-溴-3-吡啶酚-半乳糖苷; 6-氟-3-吡啶酚-半乳糖苷; 茜素-半乳糖苷; 硝苯基-半乳糖苷; 4-甲基伞型酮-半乳糖苷; 萘酚苯

甲醇-半乳糖苷;吡啶酚-N-甲基-半乳糖苷;5-溴-4-氯-3-吡啶酚-N-甲基-半乳糖苷;萘基-半乳糖苷;氨基苯基-半乳糖苷;二氯氨基苯基-半乳糖苷;2-羟苯基-核糖苷;5-溴-6-氯-3-吡啶酚-核糖苷;二羟基黄酮-核糖苷;5-溴-4-氯-3-吡啶酚-核糖苷;6-氯-3-吡啶酚-核糖苷;5-溴-3-吡啶酚-核糖苷;6-氟-3-吡啶酚-核糖苷;茜素-核糖苷;硝苯基-核糖苷;4-甲基伞型酮-核糖苷;萘基-核糖苷;氨基苯基-核糖苷;二氯氨基苯基-核糖苷;2-羟苯基-N-乙酰-氨基葡萄糖苷;5-溴-6-氯-3-吡啶酚-N-乙酰-氨基葡萄糖苷;二羟基黄酮-N-乙酰-氨基葡萄糖苷;3,4-环己酮七叶苷-N-乙酰-氨基葡萄糖苷;5-溴-4-氯-3-吡啶酚-N-乙酰-氨基葡萄糖苷;6-氯-3-吡啶酚-N-乙酰-氨基葡萄糖苷;6-溴-3-吡啶酚-N-乙酰-氨基葡萄糖苷;5-溴-3-吡啶酚-N-乙酰-氨基葡萄糖苷;6-氟-3-吡啶酚-N-乙酰-氨基葡萄糖苷;茜素-N-乙酰-氨基葡萄糖苷;硝苯基-N-乙酰-氨基葡萄糖苷;4-甲基伞型酮-N-乙酰-氨基葡萄糖苷;5-溴-4-氯-3-吡啶酚-N-甲基-N-乙酰-氨基葡萄糖苷;萘基-N-乙酰-氨基葡萄糖苷;氨基苯基-N-乙酰-氨基葡萄糖苷;二氯氨基苯基-N-乙酰-氨基葡萄糖苷;5-溴-6-氯-3-吡啶酚-葡萄糖苷酸;二羟基黄酮-葡萄糖苷酸;3,4-环己酮七叶苷-葡萄糖苷酸;8-羟基喹啉-葡萄糖苷酸;5-溴-4-氯-3-吡啶酚-葡萄糖苷酸;6-氯-3-吡啶酚-葡萄糖苷酸;6-溴-3-吡啶酚-葡萄糖苷酸;5-溴-3-吡啶酚-葡萄糖苷酸;6-氟-3-吡啶酚-葡萄糖苷酸;茜素-葡萄糖苷酸;硝苯基-葡萄糖苷酸;4-甲基伞型酮-葡萄糖苷酸;萘基-葡萄糖苷酸;吡啶酚-N-甲基-葡萄糖苷酸;5-溴-4-氯-3-吡啶酚-N-甲基-葡萄糖苷酸;萘基-葡萄糖苷酸;氨基苯基-葡萄糖苷酸;二氯氨基苯基-葡萄糖苷酸;5-溴-6-氯-3-吡啶酚-木糖苷;二羟基黄酮-木糖苷;5-溴-4-氯-3-吡啶酚-木糖苷;6-氯-3-吡啶酚-木糖苷;5-溴-3-吡啶酚-木糖苷;茜素-木糖苷;硝苯基-木糖苷;4-甲基伞型酮-木糖苷;萘基-木糖苷;氨基苯基-木糖苷;二氯氨基苯基-木糖苷;5-溴-6-氯-3-吡啶酚-岩藻糖苷;二羟基黄酮-岩藻糖苷;3,4-环己酮七叶苷-岩藻糖苷;5-溴-4-氯-3-吡啶酚-岩藻糖苷;6-氯-3-吡啶酚-岩藻糖苷;5-溴-3-吡啶酚-岩藻糖苷;茜素-岩藻糖苷;硝苯基-岩藻糖苷;4-甲基伞型酮-岩藻糖苷;萘基-岩藻糖苷;氨基苯基-岩藻糖苷;二氯氨基苯基-岩藻糖苷;2-羟苯基-纤维二糖苷;5-溴-6-氯-3-吡啶酚-纤维二糖苷;二羟基黄酮-纤维二糖苷;3,4-环己酮七叶苷-纤维二糖苷;8-羟基喹啉-纤维二糖苷;5-溴-4-氯-3-吡啶酚-纤维二糖苷;6-氯-3-吡啶酚-纤维二糖苷;6-溴-3-吡啶酚-纤维二糖苷;5-溴-3-吡啶酚-纤维二糖苷;6-氟-3-吡啶酚-纤维二糖苷;茜素-纤维二糖苷;硝苯基-纤维二糖苷;4-甲基伞型酮-纤维二糖苷;萘基-纤维二糖苷;吡啶酚-N-甲基-纤维二糖苷;5-溴-4-氯-3-吡啶酚-N-甲基-纤维二糖苷;萘基-纤维二糖苷;氨基苯基-纤维二糖苷;二氯氨基苯基-纤维二糖苷;5-溴-6-氯-3-吡啶酚-阿拉伯糖苷;二羟基黄酮-阿拉伯糖苷;5-溴-4-氯-3-吡啶酚-阿拉伯糖苷;6-氯-3-吡啶酚-阿拉伯糖苷;5-溴-3-吡啶酚-阿拉伯糖苷;茜素-阿拉伯糖苷;硝苯基-阿拉伯糖苷;4-甲基伞型酮-阿拉伯糖苷;5-溴-4-氯-3-吡啶酚-N-甲基-阿拉伯糖苷;萘基-阿拉伯糖苷;氨基苯基-阿拉伯糖苷;二氯氨基苯基-阿拉伯糖苷;5-溴-6-氯-3-吡啶酚-甘露糖苷;二羟基黄酮-甘露糖苷;3,4-环己酮七叶苷-甘露糖苷;5-溴-4-氯-3-吡啶酚-甘露糖苷;4-氯-3-吡啶酚-甘露糖苷;6-氯-3-吡啶酚-甘露糖苷;6-溴-3-吡啶酚-甘露糖苷;5-溴-3-吡啶酚-甘露糖苷;茜素-甘露糖苷;硝苯基-甘露糖苷;4-甲基伞型酮-甘露糖苷;吡啶酚-N-甲基-甘露糖苷;5-溴-4-氯-3-吡

咪酚-N-甲基-甘露糖苷;萘基-甘露糖苷;氨基苯基-甘露糖苷;二氯氨基苯基-甘露糖苷。非限制性地,25-1000mg/l 的浓度特别适于本发明。

[0038] 优选地,所述糖苷酶底物选自 α -半乳糖苷酶、 β -半乳糖苷酶、己糖胺酶和纤维二糖苷酶底物,特别选自5-溴-4-氯-3-咪唑酚-半乳糖苷、5-溴-6-氯-3-咪唑酚-N-乙酰-氨基葡萄糖苷、3,4-环己酮七叶苷-纤维二糖苷、5-溴-4-氯-3-咪唑酚-纤维二糖苷。

[0039] 术语酯酶底物是指5-溴-6-氯-3-咪唑酚-辛酸酯;二羟基黄酮-辛酸酯;5-溴-4-氯-3-咪唑酚-辛酸酯;6-氯-3-咪唑酚-辛酸酯;6-溴-3-咪唑酚-辛酸酯;5-溴-3-咪唑酚-辛酸酯;6-氟-3-咪唑酚-辛酸酯;茜素-辛酸酯;硝苯基-辛酸酯;4-甲基伞型酮-辛酸酯;萘基-辛酸酯;氨基苯基-辛酸酯;二氯氨基苯基-辛酸酯;5-溴-6-氯-3-咪唑酚-丁酸酯;5-溴-4-氯-3-咪唑酚-丁酸酯;6-氯-3-咪唑酚-丁酸酯;6-溴-3-咪唑酚-丁酸酯;5-溴-3-咪唑酚-丁酸酯;茜素-丁酸酯;硝苯基-丁酸酯;4-甲基伞型酮-丁酸酯;萘基-丁酸酯;氨基苯基-丁酸酯;二氯氨基苯基-丁酸酯;5-溴-6-氯-3-咪唑酚-壬酸酯;5-溴-4-氯-3-咪唑酚-壬酸酯;6-氯-3-咪唑酚-壬酸酯;6-溴-3-咪唑酚-壬酸酯;5-溴-3-咪唑酚-壬酸酯;茜素-壬酸酯;硝苯基-壬酸酯;4-甲基伞型酮-壬酸酯;萘基-壬酸酯;氨基苯基-壬酸酯;二氯氨基苯基-壬酸酯;5-溴-6-氯-3-咪唑酚-磷酸酯;二羟基黄酮-磷酸酯;3,4-环己酮七叶苷-磷酸酯;5-溴-4-氯-3-咪唑酚-磷酸酯;6-氯-3-咪唑酚-磷酸酯;6-溴-3-咪唑酚-磷酸酯;5-溴-3-咪唑酚-磷酸酯;6-氟-3-咪唑酚-磷酸酯;茜素-磷酸酯;硝苯基-磷酸酯;4-甲基伞型酮-磷酸酯;萘酚苯甲醇-磷酸酯;咪唑酚-N-甲基-磷酸酯;5-溴-4-氯-3-咪唑酚-N-甲基-磷酸酯;萘基-磷酸酯;氨基苯基-磷酸酯;二氯氨基苯基-磷酸酯。非限制性地,25-1000mg/l 的浓度特别适于本发明。

[0040] 优选地,所述酯酶底物选自丁酸酯酯酶、脂肪酶和磷酸酶底物,特别选自5-溴-6-氯-3-咪唑酚-辛酸酯、5-溴-4-氯-3-咪唑酚-丁酸酯、5-溴-3-咪唑酚-壬酸酯和5-溴-6-氯-3-咪唑酚-磷酸酯。

[0041] 术语肽酶底物特别是指脯氨酸-氨基肽酶、丙氨酸-氨基肽酶、亮氨酸-氨基肽酶、吡咯烷酮基-芳基酰胺酶、苯丙氨酸-氨基肽酶、Ala-Phe-Pro-肽酶和酪氨酸-氨基肽酶底物。这些底物特别是通过肽键组合氨基酸或者相应肽和p-硝基苯胺、7-氨基香豆素、7-氨基吩噻嗪酮(7-aminophenoxazinone)、萘胺、氨基苯基或者二氯氨基苯基的化合物。具体是脯氨酰p-硝基苯胺、脯氨酰7-氨基-4-甲基香豆素、脯氨酰二氯氨基苯酚、丙氨酰-二氯氨基苯酚、亮氨酰-p-硝基苯胺、吡咯烷酮基-7-氨基-4-甲基香豆素、苯基丙酰胺-p-硝基苯胺、Ala-Phe-Pro-7-氨基-1-戊基吩噻嗪-3-酮和酪氨酰二氯氨基苯酚。非限制性地,25-1000mg/l 的浓度特别适于本发明。

[0042] 优选地,所述肽酶底物选自脯氨酸-氨基肽酶(或者脯氨酰芳基酰胺酶)、亮氨酸-氨基肽酶(或者亮氨酰-芳基酰胺酶)以及吡咯烷酮基-芳基酰胺酶底物,特别选自脯氨酰p-硝基苯胺、脯氨酰7-氨基-4-甲基香豆素、亮氨酰-p-硝基苯胺和吡咯烷酮基-7-氨基-4-甲基香豆素。

[0043] 术语生物学样品是指得自生物学体液的样品或者得自任何类型食物的食物样品。这种样品因此可以是液体或者固体的,非限制性地可以提及的是临床血液样品、血浆、尿液或者粪便样品,鼻、咽喉、皮肤、伤口或者脑脊液样品,得自水、饮料如牛奶或者果汁、酸奶、

肉、蛋、蔬菜、蛋黄酱、奶酪、鱼等的食物样品，得自动物饲料的食物样品，特别是得自动物膳食的样品。

[0044] 在这方面，本发明涉及检测和 / 或鉴别艰难梭状芽孢杆菌的方法，特征在于其包括如下步骤：

[0045] a) 提供包含至少一种能鉴别艰难梭状芽孢杆菌的 β -葡萄糖苷酶底物的反应培养基，

[0046] b) 用待检测的生物样品接种该培养基，

[0047] c) 保温，

[0048] d) 检测 β -葡萄糖苷酶底物的水解，所述的水解指示艰难梭状芽孢杆菌的存在。

[0049] 根据本发明的一个优选实施方案，在步骤 c) 期间，在厌氧条件下进行保温。

[0050] 根据本发明的一个优选实施方案，所述 β -葡萄糖苷酶底物选自茜素- β -葡萄糖苷、品红- β -葡萄糖苷 (5-溴-6-氯-3-吲哚酚- β -葡萄糖苷) 和 CHE- β -葡萄糖苷 (3,4-环己酮七叶苷- β -葡萄糖苷)。

[0051] 优选地，所述 β -葡萄糖苷酶底物的浓度为 25-1000mg/l，优选 50-400mg/l。

[0052] 根据本发明的一个优选实施方案，所述培养基还包含七叶苷。优选地，所述七叶苷的浓度为 5-500mg/l，优选 10-100mg/l。

[0053] 根据本发明的一个优选实施方案，所述反应培养基还包含至少一种 β -葡萄糖苷酶诱导剂，优选选自纤维二糖或者甲基- β -葡萄糖苷。

[0054] 根据本发明的一个优选实施方案，所述反应培养基还包含艰难梭状芽孢杆菌菌株的至少一种生长活化剂，优选选自血液、血清和还原剂，例如半胱氨酸、丙酮酸盐或者硫化亚铁。

[0055] 根据本发明的一个优选实施方案，所述反应培养基还包含至少一种艰难梭状芽孢杆菌孢子萌发诱导剂，优选牛磺胆酸钠。

[0056] 根据本发明的一个优选实施方案，所述反应培养基还包含至少一种选择剂，优选选自抗生素，如 D-环丝氨酸、头孢西丁或者头孢噻肟，以及抗真菌剂，如两性霉素 B、氟康唑、伊曲康唑或者伏立康唑。

[0057] 根据本发明的一个优选实施方案，所述反应培养基还包含至少另一种酶底物，优选选自糖苷酶底物、酯酶底物和肽酶底物。

[0058] 根据本发明的一个优选实施方案，所述反应培养基还包含至少一种还原剂，优选半胱氨酸。

[0059] 本发明还涉及检测和 / 或鉴别艰难梭状芽孢杆菌的反应培养基，其包含能鉴别艰难梭状芽孢杆菌的至少一种 β -葡萄糖苷酶底物。

[0060] 根据本发明的一个优选实施方案，所述 β -葡萄糖苷酶底物选自茜素- β -葡萄糖苷、品红- β -葡萄糖苷 (5-溴-6-氯-3-吲哚酚- β -葡萄糖苷) 和 CHE- β -葡萄糖苷 (3,4-环己酮七叶苷- β -葡萄糖苷)。

[0061] 优选地，所述 β -葡萄糖苷酶底物的浓度为 25-1000mg/l，优选 50-400mg/l。

[0062] 根据本发明的一个优选实施方案，所述反应培养基还包含七叶苷。

[0063] 优选地，所述七叶苷的浓度为 5-500mg/l，优选 10-100mg/l。

[0064] 根据本发明的一个优选实施方案，所述反应培养基还包含至少一种 β -葡萄糖苷

酶诱导剂,优选选自纤维二糖或者甲基- β -葡糖苷。

[0065] 根据本发明的一个优选实施方案,所述反应培养基还包含艰难梭状芽孢杆菌菌株的至少一种生长活化剂,优选选自血液、血清及还原剂,如半胱氨酸、丙酮酸盐和硫化亚铁。

[0066] 根据本发明的一个优选实施方案,所述反应培养基还包含至少一种艰难梭状芽孢杆菌孢子萌发诱导剂,优选牛磺胆酸钠。

[0067] 根据本发明的一个优选实施方案,所述反应培养基还包含至少一种选择剂。优选地,所述选择剂选自抗生素,优选 D-环丝氨酸、头孢西丁或者头孢噻肟,以及抗真菌剂,优选两性霉素 B、氟康唑、伊曲康唑或者伏立康唑。

[0068] 根据本发明的一个优选实施方案,所述反应培养基还包含至少另一种酶底物。优选地,所述另一种底物是糖苷酶底物、酯酶底物或者肽酶底物。

[0069] 根据本发明的一个优选实施方案,所述反应培养基还包含至少一种还原剂,优选半胱氨酸。

[0070] 本发明还涉及上述培养基在检测和 / 或鉴别艰难梭状芽孢杆菌中的应用。

[0071] 如下实施例只是解释本发明,而无限制之意。通过如下实施例可以更清晰地理解本发明。

[0072] 实施例 1:能鉴别艰难梭状芽孢杆菌的 β -葡萄糖苷酶底物的鉴别

[0073] 基于本发明,本领域技术人员通过如下实施例可以鉴别能检测艰难梭状芽孢杆菌菌株的 β -葡萄糖苷酶底物。

[0074] 通过将潜在的 β -葡萄糖苷酶底物掺入允许艰难梭状芽孢杆菌生长的培养基中进行检测,所述培养基如选择性培养基,其含有例如减缓某些细菌或者某些真核细胞生长的抑制剂,或者所述培养基是非选择性培养基,如在培养瓶中的 Columbia 琼脂 (ref 41244) 或者如 George 等所述基于蛋的培养基 (见实施例 2)。

[0075] 根据待检测的 β -葡萄糖苷酶底物,需要加入额外的试剂,如铁盐或者 α -萘酚衍生物,以显示水解产物。

[0076] 优选地,所述待检测的底物在 25-1000mg/l 浓度检测。将由此制备的培养基分散至耗材如皮氏培养皿或者试管中。接种包含至少一种艰难梭状芽孢杆菌菌株的菌株集合,优选每个培养基一种菌株。然后在厌氧条件下在适当温度保温该培养基,通常在 20-50°C,优选在 30-40°C。

[0077] 合适的底物是在接种后检测到被艰难梭状芽孢杆菌菌株水解的那些底物。通过肉眼目测或者在 UV 光下观测或者利用合适仪器观测光学性质 (着色或者荧光的菌落和 / 或培养基) 的变化进行检测,所述观测仪器如分光光度计、荧光计、光度计或者图像分析仪。

[0078] 实施例 2

[0079] 在 6 个不同的培养基上检测梭状芽孢杆菌 (*Clostridium* spp) 属菌株,每个培养基均含有生色的 β -葡萄糖苷酶底物。然后在 48 小时读数培养皿,以确定每种底物的特异性。

[0080] 1. 培养基和微生物

[0081] 所述培养基的基质是如 George 等所述的蛋黄基培养基,其成分如下 (g/l):

[0082] Proteose peptone No. 3 40

[0083] 磷酸氢二钠 5

- [0084] 磷酸二氢钾 1
- [0085] 氯化钠 2
- [0086] 硫酸镁 0.1
- [0087] 琼脂 20
- [0088] 在 116°C 灭菌及冷却至 50°C
- [0089] 在无茵盐水中的 50% 蛋黄 5ml
- [0090] 将这种培养基分成六部分。在这六部分中加入如下底物之一：品红-β-葡糖苷 (80mg/l)、茜素-β-葡糖苷 (50mg/l)、CHE-β-葡糖苷 (300mg/l)、8-羟基喹啉-β-葡糖苷 (300mg/l)、DHF-β-葡糖苷 (300mg/l)、蓝-β-葡糖苷 (150mg/l)。所述底物商购自专业供应合成酶底物的公司。基于茜素的底物是根据在专利申请 EP1235928 中描述的方案合成的。基于 CHE 的底物是根据在专利申请 EP0900230 中描述的方案合成的。
- [0091] 2. 检测
- [0092] 将该培养基分散至皮氏培养皿中。
- [0093] 从制备的预培养物中在厌氧条件下在 37°C 接种 48 小时。
- [0094] 制备 0.5McF 的生理盐水悬浮液, 然后将 1 μl 每种悬浮液加入每个培养皿中。
- [0095] 在保温 48 小时后进行读数。
- [0096] 3. 结果
- [0097]

菌株	保温时间	品红-β-葡糖苷 (80mg/l)		茜素-β-葡糖苷 (50mg/l)		CHE-β-葡糖苷 (300mg/l) ¹		DHF-β-葡糖苷 (300mg/l) ²	
		Gr	Co	Gr	Co	Gr	Co	Gr	Co
艰难梭状芽孢 杆菌	48h	18/28	16/18	22/28	18/22	21/28	20/21	28/28	20/28
其它梭状芽孢 杆菌	48h	17/17	6/17	16/17	2/16	17/17	6/17	12/14	3/12

[0098] Gr = 生长, Co = 着色

[0099] ¹ = +500mg/l 柠檬酸氨铁

[0100] ² = +50mg/l 柠檬酸氨铁

[0101] 4. 解释

[0102] 所有底物均可以显示艰难梭状芽孢杆菌。茜素-β-葡糖苷、品红-β-葡糖苷 (5-溴-6-氯-3-吡啶酚-β-葡糖苷) 及特别是 CHE-β-葡糖苷 (3,4-环己酮七叶苷-β-葡糖苷) 呈现对于艰难梭状芽孢杆菌的良好灵敏性。

[0103] 实施例 3

[0104] 在四种不同培养基上检测梭状芽孢杆菌属菌株, 每种培养基均含有生色 β-葡萄糖苷酶底物和 300mg/l 柠檬酸铁铵, 根据实施例 2 所述方案相似地进行。所述培养基的基质是 Columbia 基质, 待检测的底物如下:

- [0105] - 蓝 - β - 葡糖苷 (5- 溴 -3- 吡啶酚 - β - 葡糖苷), 浓度为 300mg/l,
 [0106] -8HQ- β - 葡糖苷 (8- 羟基喹啉 - β - 葡糖苷), 浓度为 150mg/l,
 [0107] - 茜素 - β - 葡糖苷 (1,2- 二羟基蒽醌 - β - 葡糖苷), 浓度为 50mg/l,
 [0108] -DHF- β - 葡糖苷, 浓度为 300mg/l。
 [0109] 在 48 小时读数培养皿, 以确定每种底物的特异性。
 [0110] 结果如下所示。
 [0111]

DHF- β - 葡糖苷 (300mg/l)	茜素 - β - 葡糖苷 (50mg/l)	8- 羟基喹啉 - β - 葡糖苷 (150mg/l)	蓝 - β - 葡糖苷 (300mg/l)
---------------------------------	--------------------------------	---	--------------------------------

[0112]

菌株	保温时间	Gr	Co	Gr	Co	Gr	Co	Gr	Co
艰难梭状芽孢 杆菌	48h	10/10	10/10	10/10	8/10	10/10	5/10	10/10	10/10*

[0113] Gr = 生长, Co = 着色, * = 着色扩散

[0114] 所有底物均可以显示艰难梭状芽孢杆菌。

[0115] 实施例 4

[0116] 1. 培养基和微生物

[0117] 五种培养基, 每种培养基均含有 48.10g/l 的 Columbia 基质、2.5g/l 牛磺胆酸钠、200mg/l 的柠檬酸铁铵、100mg/l 的 CHE- β - 葡糖苷, 及基于 D- 环丝氨酸在培养基中常用的艰难梭状芽孢杆菌抑制剂系统, 以及不同浓度的七叶苷和葡萄糖 (见下表):

	培养基 1	培养基 2	培养基 3	培养基 4	培养基 5
[0118] 葡萄糖 g/l	1	0	1	1	1
七叶苷 mg/l	0	37.5	25	37.5	50

[0119] 2. 检测

[0120] 在厌氧条件下在 37°C 从预培养物中进行接种 48 小时。

[0121] 制备 0.5McF 的在生理盐水中的悬浮液, 然后使用 10 μ l 校准环接种所述菌株。

[0122] 在 37°C 保温 24 小时后进行读数。

[0123] 3. 结果

[0124] 对于生长:

[0125] • 示出数值相应于菌落的直径。

[0126] 对于着色强度:

[0127] • 1 相应于存在弱强度的清晰着色,

- [0128] • 1.5 相应于存在介于 1 和 2 的着色，
 [0129] • 2 相应于存在中等强度的清晰着色，
 [0130] • 2.5 相应于存在介于 2 和 3 的着色，
 [0131] • 3 相应于存在强度着色。
 [0132]

		培养基 1		培养基 2		培养基 3		培养基 4		培养基 5	
		G	I	G	I	G	I	G	I	G	I
艰难梭状芽孢杆菌 042	24h	2.5	2	1	2.5	2	2.5	2	2.5*	2	2.5*
艰难梭状芽孢杆菌 308	24h	1.5	2	1	3	1.5	3	1.5	3*	1.5	3*
艰难梭状芽孢杆菌 169	24h	1.5	1	1.5	2	1.5	1.5	1.5	1.5*	1.5	1.5*
艰难梭状芽孢杆菌 187	24h	1.25	2	0.75	2	1.25	2.5	1.25	2.5*	1.5	2.5*

[0133] G = 生长, I = 着色强度, * = 着色扩散

[0134] 4. 解释

[0135] 根据培养基 2, 不存在葡萄糖导致菌落大小降低, 以及七叶苷对于着色的强度具有阳性作用。

[0136] 在培养基 3、4 和 5 中, 混合两种混合物。在培养基 4 和 5 中注意到较多或者较少的着色扩散。

[0137] 因此培养基 3 代表在生长改良和着色强度之间最佳折衷的培养基。

[0138] 实施例 5

[0139] 1. 培养基和微生物

[0140] 在两个种原型 (prototype) 培养基上检测 107 个艰难梭状芽孢杆菌菌株, 培养基成分如下 (每升):

	<u>培养基 1</u>	<u>培养基 2</u>
[0141] Columbia 基质	48.10 g	48.10 g
葡萄糖	1.25 g	1 g
牛磺胆酸	2.5 g	2.5 g
柠檬酸铁铵	0.2 g	0.2 g

[0142] 高压灭菌该基质及加入添加剂

[0143] CHE-β - 葡糖苷 0.100g 0.100g

[0144] 七叶苷 / 0.025g

[0145] 培养基 2 中的选择系统如 George et al., " Selective and differential medium for isolation of Clostridium difficile", Journal of Clinical Microbiology Vol. 9, p. 214-219, 1979 所述。

[0146] 2. 检测

[0147] 在厌氧条件下在 37°C 从预培养物中进行接种 48 小时。

[0148] 制备 0.5McF 的在生理盐水中的悬浮液, 然后使用 10 μ l 校准环接种所述菌株。

[0149] 在 37°C 保温 24 和 48 小时后进行读数。

[0150] 3. 结果

[0151]

	总菌株	保温时间	产生 a 的菌株%	
			培养基 1	培养基 2
艰难梭状芽孢杆菌	31	24h	90	90
		48h	94	94
其它梭状芽孢杆菌	34	24h	3	3
		48h	3	6
其它菌株 (革兰氏阳性, 革兰氏阴性)	42	24h	5	9
		48h	12	32
	107			

[0152] 4. 解释

[0153] CHE- β -葡糖苷底物呈现从 24 小时开始对于艰难梭状芽孢杆菌的良好灵敏性。该培养基的选择性自身也非常令人满意, 因为在 24 小时, 除了之外艰难梭状芽孢杆菌, 76 个菌株中仅 8 个菌株在培养基 1 上生长。这可以在培养基 1 上增加艰难梭状芽孢杆菌的着色强度以及显示具有异源表现的同源菌株。

[0154] 总而言之, CHE- β -葡糖苷底物呈现对于艰难梭状芽孢杆菌的良好特异性和灵敏性, 因为从 24 小时开始可以显示接近 90% 的最小假阳性菌株。

[0155] 实施例 6

[0156] 在四种不同培养基上检测可能感染艰难梭状芽孢杆菌菌株的患者的粪便样品。

[0157] 1. 培养基和微生物

[0158] 第一种培养基 (A) 相应于实施例 1 的培养基, 向其中加入 D- 环丝氨酸 (250mg/l) 和头孢西丁 (16mg/l)。第二种培养基 (B) 相应于实施例 5 的培养基 1。第三种培养基 (C) 和第四种培养基 (D) 基于本申请人的 chromID Salmonella 培养基, 没有其酶底物, 补加了 0.5g/l 半胱氨酸, 其选择性系统已用实施例 5 的培养基 1 置换。培养基 C 还包含 100mg/l 的 CHE- 葡糖苷、200mg/l 的柠檬酸铁铵、2.5g/l 的牛磺胆酸钠以及 1.25g/l 的葡萄糖。培养基 D 还包含 300mg/l CHE- 葡糖苷、500mg/l 的柠檬酸铁铵、1g/l 的牛磺胆酸钠以及 3% 马血清。

[0159] 2. 检测

[0160] 将培养基分散至皮氏培养皿中。

[0161] 接种均质的粪便样品。

[0162] 在保温 48 小时后进行读数。

[0163] 3. 结果

[0164]

	培养基 A		培养基 B		培养基 C		培养基 D	
	No. ¹	颜色	No.	颜色	No.	颜色	No.	颜色
艰难梭状芽孢杆菌	13	黑色	12	黑色或者具有灰色中心	14	灰色	14	黑色
其它菌株	2	黑色	2	黑色	10	无色至白色	8	无色至白色
	15	无色至白色	7	无色至白色				

[0165] 1 :No. =检测的微生物的数目

[0166] 4. 解释

[0167] 这四个培养基使得可以简便地检测在多重微生物样品如粪便样品中存在的艰难梭状芽孢杆菌菌株。令人惊奇地,这种检测在培养基 C 和 D 上更简单,然而其基于具有特异厌氧代谢物的细菌培养基。然而,艰难梭状芽孢杆菌菌落的平均大小在在培养基 A(3.8mm)上大于在培养基 B、C 和 D(分别为 1.6、2.1 和 2mm)上的大小。对于培养基 C 和 D,这种更低的生长由更好的选择性(全部或者部分抑制其它微生物)和更好的特异性补偿,黑色菌落不由不属于艰难梭状芽孢杆菌的任何菌株产生。

[0168] 培养基 C 和 D 之间 β -葡糖苷酶底物浓度的变化导致着色改变,不干扰培养基的在适当检测菌株数目方面的效力。