



(12)发明专利申请



(10)申请公布号 CN 111164218 A

(43)申请公布日 2020.05.15

(21)申请号 201880063073.1

(22)申请日 2018.10.12

(30)优先权数据

1716883.2 2017.10.13 GB

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2020.03.27

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2018/077852 2018.10.12

(87)PCT国际申请的公布数据

W02019/073025 EN 2019.04.18

(71)申请人 Q-莱纳公司

地址 瑞典乌普萨拉

(72)发明人 乔纳斯·贾维斯 扬·格拉维

马库斯·克林特斯特

(74)专利代理机构 北京清亦华知识产权代理事
务所(普通合伙) 11201

代理人 宋融冰

(51)Int.Cl.

G12Q 1/06(2006.01)

G01N 33/542(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

权利要求书6页 说明书39页 附图20页

(54)发明名称

确定样品中完整微生物的浓度的方法

(57)摘要

本发明涉及一种确定样品中完整微生物的浓度的方法以及设备、消耗物和试剂盒,该方法包括:任选地稀释样品的等分试样以提供处于稀释值的稀释等分试样;使该样品的等分试样或稀释等分试样的至少一部分与能够结合DNA的第一和第二染色剂接触,其中第一染色剂是荧光染色剂,是可渗透细胞的,并具有第一发射波长,并且第二染色剂是不可渗透细胞的,并能够在FRET对中充当受体分子,而所述第一染色剂充当供体分子;在第一发射波长下对等分试样-染色剂混合物成像,并确定与成像的混合物中的完整微生物相对应的对象的数量的图像分析值;并将所述等分试样的图像分析值与预定校准曲线进行比较。

1. 一种确定样品中完整微生物的浓度的方法,所述方法包括:
 - a. 提供含有微生物的样品;
 - b. 任选地稀释所述样品的等分试样以提供处于稀释值的稀释等分试样;
 - c. 使步骤(a)的所述样品的等分试样的至少一部分或在稀释步骤(b)期间或之后的所述样品的稀释等分试样的至少一部分与能够结合DNA的第一和第二染色剂接触以提供样品-染色剂混合物,其中所述第一染色剂是荧光染色剂,是可渗透细胞的,并具有第一发射波长,并且所述第二染色剂是不可渗透细胞的,并且能够在FRET对中充当受体分子,而所述第一染色剂充当供体分子;
 - d. 在所述第一发射波长下对步骤(c)的等分试样-染色剂混合物进行成像,并确定与成像的混合物中的完整微生物对应的对象的数量图像分析值;以及
 - e. 将所述等分试样的所述图像分析值与预定校准曲线进行比较,从而确定所述样品中完整微生物的浓度。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中将所述样品的等分试样稀释以提供处于稀释值的稀释等分试样,其中接触步骤(c)在稀释步骤(b)期间或之后进行,并且其中步骤(c)-(e)在所述稀释等分试样上进行。
3. 根据权利要求1或权利要求2所述的方法,其中,所述方法包括稀释所述样品的等分试样以提供处于不同稀释值的两个或更多个稀释等分试样,其中,所述两个或更多个等分试样在步骤(c)之前或期间同时制备,或者依次进行制备,其中在步骤(d)和/或(e)之后制备第二或进一步的稀释等分试样。
4. 根据权利要求1至3中任一项所述的方法,其中,在处于不同稀释值的两个或更多个等分试样上进行步骤(c)和(d),并且其中步骤(e)包括鉴定包括在预定校准曲线的范围内的图像分析值的等分试样,并将所述等分试样的图像分析值与所述预定校准曲线进行比较,从而确定所述样品中的活微生物的浓度。
5. 根据权利要求4所述的方法,其中,步骤(c)和(d)在每个等分试样上同时进行。
6. 根据权利要求4所述的方法,其中,步骤(c)和(d)在每个等分试样上依次进行。
7. 根据权利要求1至6中任一项所述的方法,其中,所述第二染色剂具有比所述第一染色剂更高的DNA结合亲和力,使得所述第二染色剂能够从DNA上置换所述第一染色剂。
8. 根据权利要求1至7中任一项所述的方法,其中,所述方法不包括检测所述第二染色剂。
9. 根据权利要求1至7中任一项所述的方法,其中,所述方法包括检测所述第二染色剂。
10. 根据权利要求9所述的方法,其中步骤(d)包括对每个等分试样-染色剂混合物同时成像以检测所述第一和第二染色剂。
11. 根据权利要求1至10中任一项所述的方法,其中,所述样品包括包含在生长培养基中的微生物。
12. 根据权利要求1至11中任一项所述的方法,其中,在步骤(c)中接触所述样品的等分试样或所述样品的稀释等分试样或其一部分之前,将所述第一和第二染色剂预混合以形成染色液。
13. 根据权利要求1至12中任一项所述的方法,其中,所述第一荧光染色剂在所述第一发射波长处的荧光强度在所述染色剂与核酸结合时被增强。

14. 根据权利要求1至13中任一项所述的方法, 其中, 所述第一荧光染色剂具有在350-700nm的波长范围内的激发波长和发射波长。

15. 根据权利要求1至14中任一项所述的方法, 其中, 所述第一荧光染色剂是绿色荧光染色剂。

16. 根据权利要求1至15中任一项所述的方法, 其中, 所述第一荧光染色剂是不对称花菁染料。

17. 根据权利要求15或权利要求16所述的方法, 其中, 所述绿色荧光染色剂是SYTO染色剂。

18. 根据权利要求16所述的方法, 其中所述SYTO染色剂是SYTO BC。

19. 根据权利要求1至18中任一项所述的方法, 其中, 所述第二染色剂是荧光染色剂。

20. 根据权利要求19所述的方法, 其中, 所述第二染色剂是红色荧光染色剂。

21. 根据权利要求20所述的方法, 其中, 所述红色荧光染色剂是碘化丙啶。

22. 根据权利要求1至21中任一项所述的方法, 其中, 所述成像是微生物的悬浮液进行的。

23. 根据权利要求22所述的方法, 其中, 通过所述悬浮液在一个或多个焦平面处获得图像。

24. 根据权利要求22或权利要求23所述的方法, 其中, 所述成像包括沿着光轴获得一系列2-D图像, 其中, 每个图像是沿着所述光轴在不同位置处通过一体积的所述悬浮液获得的。

25. 根据权利要求1至24中任一项所述的方法, 其中, 与所述染色剂接触的步骤(c) 在大于4℃的温度下进行。

26. 根据权利要求1至25中任一项所述的方法, 其中, 在步骤(c) 的接触中, 将所述等分试样或稀释等分试样或其一部分与所述第一和第二染色剂一起孵育1至20分钟的时间段。

27. 根据权利要求1至26中任一项所述的方法, 其中, 步骤(d) 中的所述成像是室温下进行的。

28. 根据权利要求1至27中任一项所述的方法, 其中, 在成像步骤(d) 中, 鉴定所述微生物是聚集的还是非聚集的, 并且使用针对聚集的或非聚集的微生物而预定的校准曲线。

29. 根据权利要求1至28中任一项所述的方法, 其中, 分析所述图像的荧光强度和/或每个枚举对象的大小, 以及可选地每个枚举对象的形态。

30. 根据权利要求1至29中任一项所述的方法, 其中, 分析所述图像的最大荧光强度、中值荧光强度和/或每个枚举对象的面积。

31. 根据权利要求1至30中任一项所述的方法, 其中, 分析所述图像的最大、中值和/或平均荧光强度和/或对象群的面积。

32. 根据权利要求1至31中任一项所述的方法, 其中确定活微生物的浓度。

33. 一种确定样品中微生物的抗微生物敏感性的方法, 所述方法包括:

(i) 提供含有活微生物的样品;

(ii) 对所述样品进行根据权利要求1-32中任一项所述的步骤(b) 至(e), 以确定所述样品中完整微生物细胞的浓度;

(iii) 使用在步骤(i) 中的样品接种一系列测试微生物培养物进行抗生素敏感性测试

(AST), 其中所述一系列测试微生物培养物包含至少两种不同的生长条件, 其中所述不同的生长条件包含一种或更多种不同的抗微生物剂, 并且每种抗微生物剂均以两种或更多种不同的浓度进行测试; 并且

(iv) 评估在每种生长条件下微生物的生长程度;

其中, 如果需要, 将所述样品或所述测试微生物培养物中微生物细胞的浓度调节至所需或预定浓度; 并且

其中, 在每种生长条件下微生物的生长程度用于确定至少一种抗微生物剂的至少一个 MIC 值, 从而确定所述样品中所述微生物的抗微生物敏感性。

34. 根据权利要求 33 所述的方法, 其中, 基于步骤 (ii) 中确定的浓度, 调节步骤 (i) 的至少一部分样品的浓度, 以提供用于接种步骤 (iii) 中的测试微生物培养物的接种物。

35. 根据权利要求 33 或 34 所述的方法, 其中, 调节浓度的步骤包括基于步骤 (ii) 中确定的浓度的稀释液。

36. 根据权利要求 35 所述的方法, 其中在步骤 (ii) 之后, 将步骤 (i) 的至少一部分样品稀释以提供用于步骤 (iii) 的接种物。

37. 根据权利要求 33 至 36 中任一项所述的方法, 其中, 在所述接种的微生物测试培养物中的微生物浓度在 $4.5 \times 10^5 \pm 80\%$ 或 $5 \times 10^5 \pm 60\%$ 的范围内。

38. 根据权利要求 33 至 37 中任一项所述的方法, 其中, 所述测试微生物培养物中的至少一种包括苛养培养基。

39. 根据权利要求 33 至 38 中任一项所述的方法, 其中, 所述浓度调节包括培养或进一步培养所述样品。

40. 根据权利要求 33 至 39 中任一项所述的方法, 其中, 如果所述样品中的微生物浓度低于 1×10^6 个微生物, 则不对所述样品进行 AST 测定。

41. 根据权利要求 1 至 40 中任一项所述的方法, 其中, 通过从样品中回收微生物来提供微生物样品, 从而提供回收的微生物样品。

42. 一种用于确定样品中完整微生物的浓度的设备, 所述设备包括:

- a. 用于接收含有微生物的样品的容器;
- b. 样品等分装置, 用于从所述样品中取出样品等分试样;
- c. 包含第一染色剂和第二染色剂的染色剂储存器, 或包含第一染色剂的第一染色剂储存器和包含第二染色剂的第二染色剂储存器, 其中所述第一染色剂是荧光染色剂, 是可渗透细胞的, 并具有第一发射波长, 并且所述第二染色剂是不可渗透细胞的, 并且能够在 FRET 对中充当受体分子, 而所述第一染色剂充当供体分子;
- d. 第一成像装置, 其可操作用来在第一发射波长下对所述样品等分试样和所述第一和第二染色剂的混合物进行成像; 以及
- e. 处理器, 其可操作用来确定与成像的混合物中的完整微生物对应的对象的数量图像分析值, 并将所述图像分析值与预定校准曲线进行比较, 从而确定所述样品中完整微生物的浓度。

43. 根据权利要求 42 所述的设备, 其被配置为执行根据权利要求 1 至 41 中任一项所述的方法。

44. 根据权利要求 42 或 43 所述的设备, 包括: 含有稀释剂的稀释剂储存器, 以及用于从

所述稀释剂储存器中取出稀释剂等分试样的稀释剂等分装置,其中,所述设备被配置为使所述样品等分试样与所述稀释剂等分试样接触以提供处于稀释值的稀释等分试样,可选地,其中所述装置包括用于接收所述稀释等分试样的容器。

45. 根据权利要求44所述的设备,其中,所述设备被配置为以不同的稀释值从所述样品提供两个或更多个稀释等分试样。

46. 根据权利要求42至45中任一项所述的设备,其中,所述处理器被配置为确定所述图像分析值是否落在预定校准曲线的范围内。

47. 根据权利要求42至46中任一项所述的设备,其中,所述第二染色剂具有第二发射波长,并且所述第一成像装置可操作用来在所述第二发射波长下对所述等分试样以及第一和第二染色剂的混合物进行成像,任选地与在所述第一发射波长下的成像同时。

48. 根据权利要求42至47中任一项所述的设备,其中,所述样品含有包含在生长培养基中的微生物。

49. 根据权利要求42至48中任一项所述的设备,其中,所述第二染色剂具有比所述第一染色剂更高的DNA结合亲和力,使得所述第二染色剂能够从DNA上置换所述第一染色剂。

50. 根据权利要求42至49中任一项所述的设备,其中,所述第二染色剂是荧光染色剂,可选地是红色荧光染色剂,并且优选地是碘化丙啶。

51. 根据权利要求42至50中任一项所述的设备,其中,所述第一荧光染色剂在所述染色剂与核酸结合时在所述第一发射波长处的荧光强度被增强。

52. 根据权利要求42至51中任一项所述的设备,其中,所述第一荧光染色剂具有在350-700nm的波长范围内的激发波长和发射波长,

和/或其中所述第一荧光染色剂是绿色荧光染色剂,

和/或其中所述第一荧光染色剂是不对称花菁染料。

53. 根据权利要求42至52中的任一项所述的设备,其中,所述第一成像装置是显微镜,并且可选地被配置为利用一种或多种包括以下的显微镜技术:明场、斜场、暗场、色散染色、相差、微分干涉差、荧光、共焦、单平面照明、光片和宽视场多光子显微镜。

54. 根据权利要求42至53中任一项所述的设备,包括用于成像的孔,其中所述孔用于容纳样品等分试样和第一和第二染色剂的混合物的至少一部分,或容纳稀释等分试样和第一和第二染色剂的混合物的至少一部分。

55. 根据权利要求54所述的设备,其中所述成像装置被配置为穿过所述孔的深度在一个或多个焦平面上获得图像,

和/或其中所述成像装置被配置为沿所述成像装置的光轴获得一系列2-D图像,其中每个图像是沿所述光轴在不同位置获得的。

56. 根据权利要求42至55中任一项所述的设备,其中,所述处理器可操作用来分析所述图像从而检测与完整微生物或其聚集相对应的对象。

57. 根据权利要求42至56中任一项所述的设备,其中,所述处理器可操作用来确定所述微生物是聚集的还是非聚集的,并且基于所述确定,所述处理器可操作用来根据情况使用适合于聚集的或非聚集的微生物的预定校准曲线。

58. 根据权利要求57所述的设备,其中,所述处理器被配置为通过对每个对象中包含的连续像素的数量计数来确定每个对象的面积,并且可选地被配置为对面积小于预定面积阈

值的对象不计数。

59. 根据权利要求58所述的设备, 其中, 所述处理器被配置为确定每个对象的最大荧光强度和/或平均或中值荧光强度, 并且可选地被配置为对具有低于预定最大荧光强度阈值的最大荧光强度的对象或具有低于预定阈值的模态或中值荧光强度的对象不计数。

60. 根据权利要求59所述的设备, 其中, 所述处理器被配置为确定每个对象的对象分析值, 所述对象分析值对应于所述对象面积与所述对象的最大荧光强度或模态荧光强度的乘积, 并且被配置为计算与所述对象的对象分析值之和相对应的图像分析值。

61. 根据权利要求59或60所述的设备, 其中, 所述处理器被配置为确定所述对象群的最大、中值和/或平均荧光强度, 面积和/或对象分析值。

62. 根据权利要求52至61所述的设备, 用于抗生素敏感性测试 (AST) 以确定至少一种抗微生物剂的至少一个最小抑制浓度 (MIC) 值。

63. 根据权利要求42至62中任一项所述的设备, 还包括用于测试微生物培养物的多个孔, 其中所述设备被配置为使用所述样品在所述孔中接种一系列测试微生物培养物, 其中所述一系列测试微生物培养物包括至少两种不同的生长条件, 其中所述不同的生长条件包括一种或多种不同的抗微生物剂, 和两种或更多种不同浓度的抗微生物剂, 任选地, 其中所述多个孔包括所述至少两种不同的生长条件。

64. 根据权利要求63所述的设备, 其包括用于评估每种生长条件下的微生物生长程度的成像装置, 优选地, 其中所述成像装置是线相机。

65. 根据权利要求64所述的设备, 其中, 所述处理器被配置为基于每种生长条件下的微生物生长程度, 从至少一种抗微生物剂确定至少一个MIC值。

66. 根据权利要求62至64中任一项所述的设备, 其中, 所述设备被配置为基于所确定的样品中完整微生物的浓度来调节所述样品的至少一部分的浓度, 以接种所述一系列测试微生物培养物。

67. 根据权利要求66所述的设备, 其中, 所述设备被配置为通过以下步骤来调节所述样品的至少一部分的浓度:

稀释所述样品的至少一部分, 或者
培养或进一步培养所述样品。

68. 根据权利要求63至67中任一项所述的设备, 其中, 所述测试微生物培养物中的至少一种包括苛养培养基。

69. 根据权利要求42至68中任一项所述的设备, 包括第一消耗物, 在所述第一消耗物中提供了所述染色剂储存器。

70. 根据权利要求69所述的设备, 其中, 将所述样品等分试样与第一和第二染色剂的混合物在所述第一消耗物中成像。

71. 根据权利要求69所述的设备, 其中所述样品等分试样与第一和第二染色剂的混合物在第二消耗物中成像。

72. 根据权利要求69至71中任一项所述的设备, 当引用权利要求61至67中的任一项时, 其中用于测试微生物培养物的多个孔设置在第一消耗物中、或在第二消耗物中、或在第三消耗物中。

73. 根据权利要求62至68中任一项所述的设备, 其中, 所述设备被配置为从样品中回收

微生物,从而提供回收的微生物样品。

74. 根据权利要求73所述的设备,其中,所述设备包括:包含用于选择性裂解样品中的非微生物细胞的缓冲液的裂解缓冲液储存器,以及用于从所述样品回收完整微生物的回收工具。

75. 根据权利要求74所述的设备,其中,所述裂解缓冲液储存器和回收工具在所述第一消耗物中提供。

76. 根据权利要求74或75所述的设备,其中,所述回收工具是过滤器。

77. 根据权利要求42至76中任一项所述的设备,其中,所述设备是自动化的。

78. 一种浓度确定消耗物,包括:

染色剂储存器,其包含第一染色剂和第二染色剂,或包含含有第一染色剂的第一染色剂储存器和含有第二染色剂的第二染色剂储存器,其中所述第一染色剂是荧光染色剂,是可渗透细胞的,并具有第一发射波长,并且所述第二染色剂是不可渗透细胞的,并且能够在FRET对中充当受体分子,而所述第一染色剂充当供体分子;以及

用于成像的孔,其中所述孔用于容纳样品等分试样和第一和第二染色剂的混合物的至少一部分,或稀释等分试样和第一和第二染色剂的混合物的至少一部分;

以及任选地包括:

裂解缓冲液储存器,其包含用于选择性裂解样品中非微生物细胞的缓冲液;和/或回收工具,用于从样品中回收完整的微生物,其中所述回收工具优选为过滤器;和/或稀释剂储存器,其包含稀释剂,以及优选地用于接收所述样品的稀释等分试样的容器。

79. 一种浓度确定试剂盒,其包括:

包含染色剂储存器的第一消耗物,所述染色剂储存器包含第一染色剂和第二染色剂,或所述染色剂储存器包含含有第一染色剂的第一染色剂储存器和含有第二染色剂的第二染色剂储存器,其中所述第一染色剂是荧光染色剂,是可渗透细胞的,并具有第一发射波长,并且所述第二染色剂是不可渗透细胞的,并且能够在FRET对中充当受体分子,而所述第一染色剂充当供体分子;

以及任选地包括:

裂解缓冲液储存器,其包含用于选择性裂解样品中非微生物细胞的缓冲液;和/或回收工具,用于从样品中回收完整的微生物,其中所述回收工具优选为过滤器;和/或稀释剂储存器,其包含稀释剂,以及优选地是用于接收所述样品的稀释等分试样的容器;

以及

包含用于成像的孔的第二消耗物,其中所述孔用于容纳样品等分试样和第一和第二稀释剂的混合物的至少一部分,或是用于容纳稀释等分试样和第一和第二染色剂的混合物的至少一部分。

80. 根据权利要求42至77中任一项所述的设备的用途,其用于确定样品中完整微生物的浓度,以用于抗生素敏感性测试(AST),以确定至少一种抗微生物剂的至少一个最小抑菌浓度(MIC)值。

确定样品中完整微生物的浓度的方法

[0001] 本发明总体上涉及样品中微生物的检测和表征。特别地,本发明提供了一种用于测量样品中完整微生物的浓度的快速方法。特别地,完整微生物是活的。

[0002] 传统上,样品中微生物的生长和微生物的浓度是通过测量样品的光学参数(例如浊度)来确定的。例如,McFarland标准品在微生物学中用作样品浊度的参考,使得样品中的微生物(通常是细菌)的数量将处于给定的浊度范围内,并且此类标准品可用于浊度计中以确定样品中微生物的浓度。可以使用包括分光光度法的替代技术来确定样品中微生物的浓度。然而,尽管快速且容易实施,但这种技术仅能够估计样品中的微生物数量。浊度或特定波长的光的吸光度与样品中微生物浓度之间的关系也随不同的微生物种类而变化,因此当不清楚所讨论的微生物的类别时,很难估计微生物的浓度。此外,此类技术仅能够测量样品的总浊度或吸光度,因此无法区分样品中的活细胞(即有生命的细胞)和非活细胞(即死细胞),或者实际上无法区分样品中的完整微生物或细胞或其他碎片。浊度测量样品中微生物的浓度也具有低灵敏度,并且为了能够测量样品中微生物的浓度,需要相对较高的微生物浓度。这种情况阻碍了以这种方式测量低浓度,并且在进行测量之前可能还需要延长培养步骤。

[0003] 还可以通过将样品的一部分(或稀释的一部分)铺在固体生长培养基上,孵育样品并计数形成的菌落数量来更定量地估计样品中的活微生物的数量。然而,这种技术的缺点在于,它需要漫长的孵育步骤,以便有足够的时间进行微生物的生长。因此,这样的经典技术可用于在特定的时间点测量样品中微生物的浓度,但是在需要迅速获知微生物的浓度的情况下用途有限,例如对需要事先了解样品中存在的微生物数量的样品中的微生物进行测试或确定。

[0004] 在微生物检测领域中众所周知,活的(即有生命的)细胞也可以与死细胞区分开,并且许多技术可用于此目的。本领域已知的方法集中于核酸染色剂、膜电位、氧化还原指示剂或报告基因。通常,这些技术依赖于以下事实:活微生物的膜完好无损,而死亡微生物的膜则被破坏和/或破裂(Gregori等,2001.Appl.Environ.Microbiol.67,4662-4670)。

[0005] 区分死细胞与活细胞的一种具体的技术是死/活染色技术。通过使用不可透过膜的染料或染色剂,只有膜破裂的细胞才被染色,而具有完整膜的细胞则不会。染料/染色剂因此用作死细胞的标志物,因为只有那些具有破损膜的细胞(即死细胞)才会被这种染色剂染色。以这种方式,可以检测死细胞,并且此外可以计算死细胞占总数的比例。该领域的进一步发展已导致使用两种单独的染色剂的技术发展:第一种是可渗透细胞的,可进入活细胞和死细胞。第二种是不渗透细胞的,只能进入死细胞。因此,可以对活细胞和死细胞进行差异标记,从而进行区分。用于执行此技术的试剂盒的一个例子是LIVE/DEAD BacLight细菌活力试剂盒(Invitrogen),其包含SYTO9(可渗透细胞)染色剂和碘化丙啶(PI)(不可渗透细胞)荧光染料。通过检测用于此类试剂盒的第一和第二种染色剂的发射波长处的微生物细胞,这样的技术在区分活微生物和死微生物细胞时特别有用,从而可确定样品中存在的活微生物的比例。可以使用许多不同的检测技术来区分样品中差异染色的活细胞和微生物细胞。例如,可以直接计数样品中被示为活的和非活的微生物细胞的数目,例如在显微镜视

场中,以这种方式确定样品中存在的活微生物的比例。但是,这样的技术是劳动和时间密集的,并且不能准确地确定活微生物的浓度。当与活/死染色技术结合使用时,诸如流式细胞仪之类的自动化细胞计数方法也可用于测量样品中活微生物的比例(Berney等,2007.*Applied and Environmental Microbiology* 73,3283-3290),然而,在流式细胞术方法中需要复杂且高度专业的仪器,并且需要定期校准(例如,在测量每个样品之前进行单独的校准)。因此,这样的技术通常不适合用于诸如常规临床实验室所需的稳定(robust)的检测方法中,并且这样的技术的自动化可能是困难的。因此,需要用于测量样品中完整微生物的浓度的方法和仪器,特别是用于临床的简单、快速和稳定的方法和仪器。

[0006] 如上所述,当使用合适的染色剂时,具有完整细胞膜的微生物可以与具有受损或破坏的细胞膜的微生物不同地染色。因此,通过活/死染色检测活细胞通常包括检测具有完整细胞膜的细胞,因此出于测量样品中活微生物细胞浓度的目的,具有完整细胞膜的细胞被认为代表活细胞。完整细胞与存活细胞之间的相关性很好,因此利用差异染色为直接确定存活细胞的浓度提供了直接而快速的方法,而无需进行通常包括漫长的孵育步骤的直接活力测定。在某些情况下,据报道,虽然在活/死染色试验中显示为“存活”的一部分微生物细胞可能包含完整的细胞膜,但事实上它们可能在代谢上是无活性的或者是不可培养的(Trevors 2012.*J Microbiol Meth* 90,25-8)。此外,在营养丰富的环境中快速指数生长期期间,可能会降低存活微生物细胞的膜完整性,从而使第二种荧光染色剂进入细胞(Shi等,2007.*Cytom Part A* 71A,592-298)。因此,这样的细胞将以第二发射波长发射光,并且由于第二荧光染色剂具有淬灭第一荧光染色剂的荧光的能力,因此可以减少这种细胞在第一发射波长下的荧光。此外,诸如褪色以及第一(可渗透细胞的)荧光染色剂的吸收高于预期的问题可能会影响此类方法的准确性(Stiefel等,2015.*BMC Microbiology* 15:36)。但是,这些因素并未被认为会显著影响确定样品中存活微生物的数量或浓度的方法的结果,检测完整细胞被认为是检测待测样品中存活细胞的数量或浓度的有效方法。实际上,本发明人已经表明,如下文进一步描述的,可以使用这样的染色方法来提供样品中活微生物的浓度的指示。

[0007] 如上所述,在微生物学中的许多情况下,希望确定微生物的浓度,尤其是活微生物的浓度。可能希望允许提供适当浓度或数量的微生物以用于表征微生物的测定,从而可以正确进行所述测定,或者实际上确保样品适合用于特定测定。值得注意的是,这可能包括标准(或标准化)培养物或培养物的接种物的制备。这尤其包括用于抗生素敏感性试验(AST)的标准接种物的制备,出于临床目的,在检测和鉴定微生物感染时需要已知浓度或预定浓度或标准浓度的接种物。然而,也可能需要确定样品中微生物的浓度,或为下文将详细讨论的其他测定提供标准培养物。

[0008] 生物学和医学中的许多过程都需要准确测定样品中微生物(特别是活微生物)的数量,并根据所述确定方法制备接种物。这些包括,例如,水和食品质量控制分析、监测环境样品中的微生物、医疗设备或患者体内或表面的生物膜形成、以及实验室微生物研究。特别地,准确确定样品中活微生物细胞的浓度,并由此制备含有期望浓度的微生物的接种物可用于诊断微生物感染。

[0009] 微生物感染是人类和动物疾病的主要类别,具有重大的临床和经济意义。尽管可以使用各种类型和类型的抗微生物剂来治疗和/或预防微生物感染,但是抗微生物剂耐药

性是现代医学中的一个日益严重的问题。因此,在治疗微生物感染的背景下,希望并确实很重要的一点是,获得有关感染微生物的性质及其抗微生物敏感性的信息,以确保有效治疗并减少不必要的使用或无效的抗生素,从而帮助控制抗生素或更普遍的耐药性传播。尤其是在严重或威胁生命的感染中,快速有效的治疗至关重要。

[0010] 败血症是由严重感染引起的可能致命的全身性炎症,是美国最昂贵的疾病和医院成本的驱动因素,占全国医院总成本的5%。如果不进行适当的治疗,严重败血症的死亡率会每小时增加7%,而引起耐药菌株的耐药性败血症的患病率上升,使得对败血症的正确治疗方法的预测越来越困难。当前用于诊断引起败血症或其他感染的微生物的金标准是基于表型和生化鉴定技术,其需要分离和培养感染微生物的纯培养物。可能需要几天的时间来进行微生物鉴定(ID)和抗生素敏感性(AST)测试,以鉴定感染并确定可能对一种或多种抗生素具有抗药性的微生物的敏感性。AST分析可为在微生物上测试的每种抗微生物剂提供“最小抑菌浓度”或“MIC值”,因此可提供有关哪些抗微生物剂可有效对抗微生物的信息。该类信息提供得越快越好,因此,快速的AST方法是人们所期望的,并且正在开发中。

[0011] 一般而言,在不同方法和/或不同临床实验室之间,在临床领域用于AST测定的结果应具有可比性。为此,习惯上使用规定的和公认的条件进行AST测试。这可能涉及使用指定的培养基(例如Muller-Hinton(MH)培养基)和培养条件。特别地,习惯上也使用标准化的微生物滴度(即微生物细胞的标准化(或标准)数量或量(例如浓度))来建立在AST测试中进行(即监测生长)的培养物,使得培养物中细菌的数量或量处于设定值。例如,通常将McFarland标准品用作调整微生物悬浮液(尤其是细菌悬浮液)浊度的参考,从而用于建立培养物的培养物制备中的微生物的数量将在给定范围内以标准化AST测试。根据参考悬浮液的浊度设定McFarland标准品,并调整微生物悬浮液的浓度(或细菌数量)以匹配所选McFarland标准品的浊度。

[0012] 常规上(例如,针对用于确定抗微生物剂MIC的EUCAST标准方法进行的描述(欧洲临床微生物学和传染病学会(ESCMID)欧洲抗微生物药敏试验委员会(EUCAST)(2003年), Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. Clinical Microbiology and Infection, 9:ix-xv.), 将待测试AST的微生物细胞(例如来自临床样品培养物)铺板并孵育以获得分离的菌落。然后可以收集菌落,并用于制备微生物细胞悬液,以用作AST测定中的接种物。通常,并且如上述指南中所述,将如此制备的悬浮液中的微生物浓度设定为标准或预定水平,例如0.5McFarland单位,以允许将标准浓度的微生物用于AST分析。在使用前,可以将微生物悬浮液的浊度调节至0.5McFarland。或者,分离的单个菌落可用于接种可被培养以提供接种物的培养基。在将其用作接种物之前,可以使培养物生长到所需的标准(0.5McFarland)和/或根据需要对标准进行调整。因此,在对AST之前的细菌浓度进行归一化之前,通常使微生物培养物生长直至其生长达到等于或大于0.5McFarland标准品的浊度。如果需要,可以调节培养物以提供具有等于0.5McFarland标准品的浊度的培养物。然后可以将其用于建立AST分析的接种物。在肉汤中稀释此时获得的接种物(即约0.5McFarland单位的培养物或悬浮液),以得到用于AST培养的所需的标准化最终细胞数浓度。作为参考,0.5McFarland单位的微生物培养物/悬浮液包含约 1×10^8 CFU/ml的微生物浓度。建立AST培养时,通常将这种微生物培养物/悬浮液在肉汤中稀释约200倍,即每个AST培养条件通常将包括约 5×10^5 CFU/ml的

起始微生物浓度。

[0013] 对于某些微生物感染,例如败血症,通常将血液样品收集在血液培养瓶中,并且使微生物培养物(即临床样品培养物)生长,直到在培养物监测系统中获得阳性培养结果为止。在自动培养检测系统中,例如Bactec或Bact/Alert系统需要指示为阳性的细菌浓度在 10^8 至 10^9 CFU/ml之间,相当于0.5至3.5McFarland单位(如果在盐溶液中测量)。易于检测到的最低McFarland值(通过肉眼或比浊法测量)约为0.5McFarland单位。

[0014] 通常,一旦获得阳性培养结果,就可以使用这种临床样品培养进行ID测试和AST测定。对于AST测试,通常需要从临床样品培养物中制备进一步的培养物(例如阳性培养物),以用作AST测试培养物或将其制成标准接种物,并将其在用于接种AST测试培养物之前标准化为预设值微生物浓度或McFarland值(通常为0.5McFarland单位)。因此,通常使用或从0.5McFarland单位的培养物或微生物悬浮液制备用于AST的接种物。如上所述,这在本领域的方法中通常是通过选择通过对临床样品培养物或从其分离的微生物进行铺板而获得的菌落来完成的。

[0015] 需要与McFarland标准品进行比较以确定样品中微生物浓度的技术只能提供浓度的近似值,而不能提供有关样品中存活微生物细胞浓度的具体信息。此外,此类技术依赖于样品中微生物的浓度相对较高(例如,0.5McFarland单位)以测量浓度。

[0016] 因此,特别需要提高确定样品中微生物浓度的速度和灵敏度,特别是在建立AST测定的情况下。特别地,需要一种稳定而简单的方法,该方法允许进行快速、准确和灵敏的微生物浓度确定而无需复杂的仪器,例如包括流式细胞术的方法。本发明通过提供一种用于确定微生物浓度的改进的方法来满足该需求,该方法可以用于制备微生物接种物,并且还提供一种用于进行AST测定的改进的工作流程,并且该方法允许准确且快速地确定样品中微生物的浓度,更重要的是样品中完整的或活的微生物的浓度。特别地,本发明的浓度确定方法在使得能够进行快速AST测定中具有价值。因此,本发明寻求提供一种快速、准确和精确的方法来确定样品中微生物的浓度,更重要的是确定完整微生物的浓度。如上所述,完整微生物的浓度可以用作存活微生物的可靠指示信号,并且在一个实施方案中,该方法可以用于确定存活微生物的浓度。

[0017] 特别地,本发明的方法是基于对完整的微生物进行染色(基于活/死染色原理),并对样品或样品的稀释等分试样成像,以确定与样品中完整的微生物对应的对象的数量,而不是直接计数样品中的微生物或相对于预定标准以比浊的方式估算样品中的微生物浓度,或通过对培养菌落进行计数来对存在的活微生物的数量进行计数。通过使用预定的标准曲线,可以将通过成像检测到的对象的数量确定值与样品中存在的微生物的浓度相关联。

[0018] 因此,在第一方面,本发明提供一种确定样品中完整微生物的浓度的方法,所述方法包括:

[0019] a. 提供含有微生物的样品;

[0020] b. 任选地稀释所述样品的等分试样以提供处于稀释值的稀释等分试样;

[0021] c. 使步骤(a)的样品的等分试样的至少一部分或在稀释步骤(b)期间或之后的样品的稀释等分试样的至少一部分与能够结合DNA的第一和第二染色剂接触以提供样品-染色剂混合物,其中所述第一染色剂是荧光染色剂,是可渗透细胞的,并具有第一发射波长,并且所述第二染色剂是不可渗透细胞的,并且能够在FRET对中充当受体分子,而所述第一

染色剂充当供体分子；

[0022] d. 在所述第一发射波长下对步骤(c)的等分试样-染色剂混合物进行成像,并确定与成像的混合物中的完整微生物对应的对象的数量的图像分析值;以及

[0023] e. 将所述等分试样的所述图像分析值与预定校准曲线进行比较,从而确定所述样品中完整微生物的浓度。

[0024] 通过将步骤(c)中通过成像检测到的对象的数量的图像分析值与预定校准曲线进行比较,可以获得样品中完整微生物数量的更准确的测量。这种方法允许考虑上述可能会对样品中活细胞浓度的确定产生不利影响的因素(即“考虑”到任何此类确定中),从而可以更准确地测量微生物活力。因此,如上所述,完整的微生物细胞的浓度可以用来表示、指示或对应或近似于活微生物细胞的浓度。具体地,通过将步骤(c)中成像的对象的数量的图像分析值与预定校准曲线进行比较,当尝试计算样品中存在的完整的、尤其是有活力的微生物的浓度,可以考虑对诸如以上讨论的存活和非活的微生物细胞的不正确染色等因素,从而可以更准确地确定样品中完整的或活微生物的浓度。

[0025] 本发明提供了一种快速而灵敏的确定样品中微生物浓度的方法。这可能具有许多用途,并且具有在许多情况下用于确定微生物浓度的稳定且简单的方法中可能是有利的。除了在需要的情况下准确地确定浓度或作为绝对浓度外,该方法还可以用于指示样品中的微生物负载,因此可以用于需要得知或估算或了解存在多少微生物的任何方法或环境。因此,可以使用该方法的环境不受限制。实际上,鉴于此方法较低的检测下限,该方法可用于确定样品中是否含有微生物。因此,一方面,本发明提供了一种用于确定样品中微生物的存在的方法,所述方法包括执行本发明的浓度确定方法的步骤(a)-(e),以及确定在样品中是否存在微生物。

[0026] 该方法可以在可能需要评估或确定微生物浓度的不同样品的环境中具有实用性。如下面进一步讨论的,这可以是临床样品,也可以是其中可能存在微生物的任何样品(食品、环境样品等)。因此,该方法可以用于确定样品中是否存在足够或适当浓度的细胞,以能够进行进一步的测试。这将在下面的AST分析中进一步描述,但是该方法可用作后续分析样品中微生物的任何步骤之前的预备步骤。例如,该方法可用于在进行质谱测试和/或基于核酸的测试和/或对该微生物的任何其他评估(例如,基于生长的研究)之前确定或评估样品中完整的(或存活的)微生物的浓度。

[0027] 一旦确定了样品中完整的(或存活的)微生物的浓度,该信息就可以有利地用于准确制备含有已知或所需数量或浓度的微生物的接种物。

[0028] 因此,在另一方面,本发明提供了一种制备微生物接种物(或可替代地表达为用于制备微生物培养物的接种物)的方法,所述方法包括使用根据本文所定义的浓度测定法测定微生物样品中完整微生物的浓度,然后将样品的至少一个等分试样或其一部分中的微生物细胞的浓度调节至所需浓度,从而提供包含所需浓度的微生物的接种物。

[0029] 一旦确定了样品中微生物的浓度,本发明还提供了表征样品中微生物的方法。因此,本发明的浓度确定方法可以与用于表征微生物的测定结合使用。特别地,这可以是需要已知或预定浓度或数量的微生物的测定。

[0030] 因此,另一方面,本发明提供了表征样品中微生物的方法,所述方法包括:

[0031] (i) 提供含有微生物的样品;

[0032] (ii) 对所述样品进行如上和本文定义的本发明的浓度确定方法的步骤(b) - (e), 以确定所述样品中完整微生物细胞的浓度;

[0033] (iii) 必要时将所述样品中微生物细胞的浓度调节至所需或预定的浓度; 以及

[0034] (iv) 表征样品中的微生物。

[0035] 因此, 本发明允许在进行测定、特别是在需要特定浓度或数量的微生物以表征所述微生物的测定之前确定样品中微生物的浓度。因此, 这使得可以确定样品是否适合用于给定的测定, 并且如果不合适, 则可以适当地调节微生物的浓度。

[0036] 在另一方面, 本发明提供了一种用于确定样品中微生物的抗微生物敏感性的方法, 所述方法包括:

[0037] (i) 提供含有微生物的样品;

[0038] (ii) 对所述样品进行如上和本文所定义的本发明的浓度确定方法的步骤(b) - (e), 以确定所述样品中活微生物细胞的浓度;

[0039] (iii) 使用步骤(i)中的样品接种一系列测试微生物培养物进行抗生素敏感性测试(AST), 其中所述一系列测试微生物培养物包含至少两种不同的生长条件, 其中不同的生长条件包含一种或多种不同的抗菌剂, 每种抗菌剂均以两种或更多种不同的浓度进行测试; 并且

[0040] (iv) 评估每种生长条件下微生物的生长程度;

[0041] 其中, 如果需要, 将所述样品或所述测试微生物培养物中微生物细胞的浓度调节至所需或预定浓度; 并且

[0042] 其中, 在每种生长条件下微生物的生长程度用于确定至少一种抗微生物剂的至少一个MIC值, 从而确定所述样品中所述微生物的抗微生物敏感性(antimicrobial susceptibility)。

[0043] 因此, 本发明提供了一种用于进行AST分析的更准确的方法, 因为与测定样品的浊度相比(例如, 通过单纯比较样品的浊度与McFarland标准品的浊度来比较), 该方法可以更准确地确定微生物的浓度。

[0044] 如上所述, 根据EUCAST指南进行的标准AST分析通常需要一段时间才能使微生物充分生长, 以便在进行AST分析的下一步中使用。例如, 在以上概述的方案中, 需要一定的孵育时间以使临床样品培养物中的微生物浓度增加到将临床样品培养物视为“阳性”的点(即达到至少0.5McFarland单位)。在接种临床样品培养物之后需要进一步的孵育步骤以使单个菌落生长, 并且可选地, 在预备好AST分析之前需要另外的进一步的孵育步骤以使如上所述制备的微生物悬浮液达到0.5McFarland单位。

[0045] 此外, 在上面概述的用于准备AST分析的方案中, 通常仅使用一个或少量菌落(相对于临床样品培养物中存在的微生物总数)来制备接种物, 并最终用于进行接种物AST分析。因此, 这样的方案依赖于所使用的一个或多个菌落可代表引起感染的微生物。如果不是这种情况, AST分析的结果可能无法真正反映出引起感染的微生物的抗菌敏感性, 因此, 基于此类结果的任何临床干预措施均可能无法充分治疗感染。

[0046] 如以下更详细描述, 可以使用本发明的浓度确定方法来确定样品中存在的微生物的浓度, 所述样品包含已经从另一样品中回收的微生物。这对于减少表征样品中微生物所需的时间是重要的。特别地, 可以以这种方式有意义地使用本发明的浓度确定方法, 以减

少进行AST分析所需的时间,并提高从中获得的结果的可靠性。换句话说,本发明允许使用直接从样品中回收的微生物样品(即使用回收的微生物样品)来建立AST分析。

[0047] 因此,本发明提供了一种表征样品中微生物的方法,所述方法包括:

[0048] (i) 从所述样品中回收微生物以提供回收的微生物样品;

[0049] (ii) 进行如上和本文定义的本发明的浓度确定方法的步骤(b)-(e),以确定回收的微生物样品中完整微生物的浓度;

[0050] (iii) 必要时将所述回收的微生物样品中微生物细胞的浓度调节至所需或预定浓度;以及

[0051] (iv) 表征回收的微生物样品中的微生物。

[0052] 特别地,本发明提供了一种用于确定样品中微生物的抗微生物敏感性的方法,所述方法包括:

[0053] i) 从样品中回收微生物以提供回收的微生物样品;

[0054] ii) 进行如上和本文定义的本发明的浓度确定方法的步骤(b)-(e),以确定回收的微生物样品中完整微生物的浓度;

[0055] iii) 使用在步骤(i)中回收的微生物样品接种一系列测试微生物培养物用于抗微生物敏感性测试(AST),其中所述一系列测试微生物培养物包含至少两种不同的生长条件,其中不同的生长条件包括一种或多种不同的抗微生物剂,每种抗微生物剂均以两种或更多种不同的浓度进行测试;以及

[0056] iv) 评估每种生长条件下微生物的生长程度;

[0057] 其中,如果需要,将回收的微生物样品中或所述测试微生物培养物中的微生物浓度调节至所需或预定浓度;并且

[0058] 其中,在每种生长条件下微生物的生长程度用于确定至少一种抗微生物剂的至少一个MIC值,从而确定所述样品中所述微生物的抗微生物敏感性。

[0059] 从中回收微生物的样品可以是任何包含微生物的样品,包括微生物的纯培养物或悬浮液,以及临床或生物或食品、水或环境的样品,或可能需要测试微生物感染、污染或定植的任何其他样品,尤其是此类样品的培养物(尤其是临床样品的培养物),如下文进一步所讨论的。因此,可以在回收步骤中从样品中分离(或分开或纯化)微生物。下文描述了将微生物细胞与其他(非微生物)细胞(例如哺乳动物细胞)和/或样品中存在的其他物质选择性分离的方法。

[0060] 通常,从样品中回收微生物细胞的方法导致细胞碎片的形成,例如在临床样品中非微生物细胞的选择性裂解中裂解的非微生物细胞的残留物。有利地,本发明的方法允许鉴定完整的(或活的)微生物,并且更重要地将其与回收后可能存在于在从样品回收微生物细胞后的样品中的非微生物细胞碎片(实际上是非完整或非活的微生物细胞)区分开。因此,可以快速而准确地确定从样品中回收的完整微生物的浓度。

[0061] 因此,从样品中回收的微生物可用于随后的测定中,以对其进行表征。因此,在一个实施方案中,从样品中回收的微生物因此可以用于在AST分析中接种测试微生物培养物。这样,在制备用于接种每种测试微生物培养物的接种物时,不仅可以省略至少一个孵育步骤(从而减少建立AST分析之前所花费的时间),而且所述接种物还将包含更完整的(即,更具代表性的)原始临床样品培养物中存在的微生物的样品,即在受试者中引起感染的微生

物。因此,本发明提供了一种更快速、更可靠的方法来确定样品中微生物的抗菌敏感性。

[0062] 然而,更广泛地讲,本发明提供了用于快速和准确地确定样品中完整微生物的浓度的方法,以允许将合适浓度或数量的微生物细胞用于定性或定量测定中以表征所述微生物。换句话说,可以在表征微生物的任何理想方法之前确定样品中完整微生物的浓度,以便为表征方法提供合适的浓度或数量的微生物细胞。因此,其可以表征使用任何此类分析的微生物。

[0063] 确定样品中完整微生物的浓度的可能特别有利的分析方法包括,例如质谱分析(包括MALDI-TOF、ESI-MS和CyTOF)、拉曼光谱、基于核酸的测试(包括PCR、滚环扩增(RCA)、连接酶链反应(LCR)和基于核酸序列的扩增(NASBA),其在鉴定微生物和/或其中的抗微生物性标记时可能特别有用。如本文其他地方更详细描述,在进行AST分析之前确定样品中完整微生物的浓度可能特别有益。

[0064] 如本文所用,术语“微生物细胞”和“微生物”是可互换的,并且被认为具有等同的含义,即微生物。该术语在本文中被广泛地使用以包括所有种类的微生物,无论是否是单细胞的,并且包括细菌,包括古细菌和分枝杆菌,真菌,原生动物,包括原生动物和藻类,如下面更详细地讨论的。当进行该方法时,微生物的类别可以是已知的或未知的。此外,样品可以包含一种或多种微生物或一种以上的微生物,即,样品可以是单一微生物或可以是包含微生物的混合物。

[0065] 此外,提及“可渗透细胞”和“不可渗透细胞”的染色剂是针对微生物细胞进行的。换句话说,用于本发明方法的第一和第二染色剂的渗透性是微生物对所述染色剂的渗透性。

[0066] 在本发明的上下文中,术语“活的”(viable)是指能够生长和/或繁殖的微生物。换句话说,本发明允许确定样品中能够生长的微生物的浓度(例如在AST分析中)。术语“生存力”(viability)是指微生物细胞生长和/或繁殖的能力。可通过差异染色确定完整微生物的浓度从而间接确定样品中活微生物的浓度。因此,活微生物的浓度源自样品中完整细胞的浓度,并且本发明的方法提供了用于确定样品中活微生物的浓度的准确而快速的方法。更特别地,当在步骤(a)中使用含有活微生物的样品时,根据本发明的完整微生物浓度的确定反映或提供了活微生物浓度的指示。

[0067] 活微生物的浓度可以与完整微生物的浓度成比例,并且样品中活微生物的浓度可基于关于完整微生物的特定浓度与活微生物的特定浓度如何相关的知识来确定样品中的微生物。这种相关可能受到诸如样品和/或微生物的性质和/或从样品中回收微生物的任何步骤等因素的影响。这种相关可以以类似于如下文所述的预定校准曲线的制备的方式直接确定,即通过确定已知样品(即微生物浓度由或已通过其他方法确定)中完整细胞和活细胞的浓度之间的关系来确定。举例来说,这可以包括将包含已知浓度的完整微生物(因此为已知数量的完整微生物)的样品铺板并确定由此形成的菌落的总数(即菌落形成单位的数目)。确定完整微生物和活微生物的浓度之间的关系可以允许在本发明的方法中确定样品中活微生物的浓度。

[0068] 如以下更详细描述,可以在本发明的方法中分析包含一定范围的可能微生物的一系列样品。因此,可用的样品可包含多种可能的不同浓度的微生物,并且不可能制备单个校准曲线或多个校准曲线以允许准确确定这样的浓度范围。因此,在执行本发明的方法的

过程中,将含有微生物的样品的等分试样稀释以使步骤(d)中确定的对象数量的图像分析值落在预定的校准曲线范围内是有益的。

[0069] 此外,取决于样品的性质,还可能需要稀释样品以允许进行浓度确定,例如,稀释(或最小化或减少其数量)可能会干扰浓度确定方法的污染物或成分。例如,某些培养基(例如Muller Hinton培养基)含有可能干扰荧光测定的成分,如果样品是含有这种培养基的培养样品,或者如果回收的微生物重悬浮在这种培养基中,则可能需要稀释步骤。

[0070] 当要进行稀释时,即在步骤(b)中将样品的等分试样稀释以提供处于稀释值的稀释等分试样时,在稀释步骤(b)期间或之后进行接触步骤(c)。因此,样品的等分试样可以在与第一和第二染色剂接触之前被稀释。在这种情况下,稀释培养基可以是缓冲液,也可以是盐水或水或其他水溶液等。然而,在某些实施方案中,稀释步骤(b)可包括使样品的等分试样与能够结合DNA的第一和第二染色剂(例如作为包含第一和第二染色剂的溶液)接触,并且由于等分试样与第一和第二染色剂接触而导致样品等分试样体积的增加,因此可以认为是稀释步骤,或至少一部分稀释步骤。此外,在使所述样品等分试样的一部分与第一或第二染色剂的接触可以在所述等份试样与另一稀释剂(如下所述)接触之前进行,从而提供样品的稀释等分试样,并且这样的程序可认为落入了在稀释步骤(b)期间使样品的稀释等分试样与第一和第二染色剂接触的定义。

[0071] 可以制备两个或更多个等分试样,使得每个等分试样被稀释至不同程度。换句话说,每个等分试样可以以不同的稀释因子或稀释值稀释。在这样的实施方案中,第一等分试样(即处于第一稀释值)可以是样品的等分试样,而第二等分试样(或后续)等分试样可以是第二(或后续的)稀释值的稀释等分试样。或者,可以进行两个分开的稀释。一个或多个稀释的等分试样可以通过系列稀释来稀释。因此,可以根据需要通过一系列连续、分开或同时的步骤来制备稀释系列。

[0072] 稀释液可以在步骤(b)和/或(c)期间但是在步骤(d)之前顺序地制备,和/或它们可以在步骤(d)和/或(e)期间或之后顺序地制备。

[0073] 在本发明的某些实施方案中,当制备两个或更多个等分试样时,每个所述等分试样可以在接触步骤(c)之前或期间同时(或基本同时地,包括通过依次或系列步骤)制备。在这种情况下,步骤(d)和(e)可以同时或依次对每个等分试样执行。换句话说,可以同时(即,并行地)或依次地对每个等分试样成像,并且可以将每个等分试样获得的各个图像分析值与预定校准曲线进行比较。或者,可以对第一等分试样执行步骤(d)和(e),并且如果从所述等分试样获得的图像分析值落入预定标准校准曲线的范围内,则可以省去针对第二或其他等分试样的步骤(d)和(e)。

[0074] 然而,在替代实施方案中,仅在对第一等分试样(其可以是样品的等分试样或稀释等分试样)执行了该方法的步骤之后,才制备稀释等分试样(或第二或进一步的稀释等分试样)。如果例如图像分析值不落入在预定校准曲线的范围内,则这样的实施例可能是期望的。在这样的实施方案中,可能有必要在第二(或进一步的)等分试样上以不同的稀释值重复本发明的方法。在这种情况下,将看到两个(或进一步的)等分试样是依次制备的,即,在对例如第一等分试样执行步骤(d)和/或(e)之后。

[0075] 因此,即使制备了一个以上的等分试样,步骤(d)和/或(e)也可能在一个等分试样(可以是稀释的或非稀释的等分试样)上进行,也可以在超过两个的等分试样(可以是稀释

等分试样,或可以包括未稀释等分试样)上进行。

[0076] 因此,可以对两个或更多个等分试样的每个等分试样执行步骤(c)和(d),从而确定在每个等分试样中对应于活微生物的对象数量的图像分析值。在针对两个或更多个等分试样的每一个已经获得两个或更多个图像分析值的情况下,步骤(e)可以包括鉴定包括在预定校准曲线范围内的图像分析值的等分试样,并且比较所述等分试样的图像分析值与预定校准曲线,从而确定所述样品中微生物的浓度。在这种情况下,可以依次或同时对每个等分试样执行步骤(c)和(d)。如上所述,这些等分试样可以是稀释等分试样,或者它们可以包括未稀释的等分试样。

[0077] 稀释可包括使样品的等分试样与一定体积的合适的无菌缓冲液或水溶液(例如盐水或盐溶液)或实际上任何合适的稀释剂接触。在其他实施方案中,稀释剂可包括含有第一和/或第二稀释剂中的一个或两个的溶液。可以使用不同的稀释剂以稀释系列制备不同的稀释等分试样。在一个实施方案中,可以使用不含染色剂的稀释剂制备一种或多种稀释液,并且可以使用含有染色剂的溶液制备进一步的稀释液(即,在步骤(c)期间),并且这些随后的稀释等分试样在步骤(d)中使用。因此,可以将不含染色剂的稀释剂简单地用于制备中间稀释的等分试样(在步骤(b)中),然后将其在步骤(c)中进一步稀释以用于该方法的后续步骤。或者,可以仅在步骤(c)中使用一种或多种含染色剂的溶液进行稀释。

[0078] 在某些实施方案中,可以在接触样品的等分试样的至少一部分之前将第一和第二染色剂预先混合。但是,还可以考虑可以进行分开和依次的接触,此外,可以以任何顺序进行(例如,等分试样的至少一部分可以与第一或第二染色剂接触,然后接触剩下的染色剂)。

[0079] 在本发明的方法中使用的第一和第二染色剂均能够与DNA结合,并且各自需要具有使其适于使用此类方法的特定性质。具体地,第一染色剂是荧光染色剂,并且需要是可渗透细胞的,以使得它可以穿过完整(例如活的)微生物的(完整)膜,从而结合位于完整(例如活的)微生物细胞内的DNA,而第二种染色剂必须是不渗透细胞的。以这种方式,预期仅第一染色剂进入完整的微生物细胞,而第二染色剂无法进入完整的微生物细胞,从而确保完整的微生物细胞仅被第一染色剂染色。相比之下,第一和第二染色剂均能够进入非完整的微生物细胞(即具有受损或破裂的细胞膜的微生物细胞),因此非完整(例如,非活)的微生物细胞可以与完整的(例如活的)细胞区分开。

[0080] 在本发明的方法中,完整微生物细胞和非完整微生物细胞之间的进一步区别是通过使用第一荧光染色剂实现的,该荧光染色剂的荧光被第二染色剂淬灭。换句话说,第二染色剂能够在Förster共振能量转移(FRET)(也称为荧光共振能量转移)对中充当受体分子,而第一荧光染色剂用作供体分子。换句话说,选择第一和第二染色剂,使得第一(荧光)染色剂(即,FRET供体)的发射光谱与第二染色剂(即,FRET受体)的吸收光谱至少部分重叠。

[0081] 以此方式,被第一和第二染色剂染色的任何细胞在第一发射波长处将具有降低的荧光信号强度,因为由第一染色剂产生的任何信号的至少一部分将通过FRET被第二染色剂淬灭。这样的结果是,不仅非完整的微生物细胞被第二荧光染色剂差异染色,而且所述细胞在第一荧光染色的发射波长处的荧光度也降低了。在本发明的某些实施方案中,这可以仅允许检测第一染色剂以确定样品中完整微生物的浓度。

[0082] 在一个优选的实施方案中,通过提供第一和第二染色剂使完整和非完整微生物细胞之间的进一步区分成为可能,其中第一染色剂具有比第二染色剂更低的DNA结合亲和力。

以此方式,在被第一和第二染色剂都染色的任何(非完整)细胞中,第二染色剂将能够从细胞内的DNA上置换第一染色剂,从而进一步减弱所述细胞在第一发射波长的荧光强度。因此,第二染色剂可优选具有比第一染色剂更高的DNA结合亲和力,使得第二染色剂能够从DNA上置换第一染色剂。

[0083] 与溶液中自由存在时相比,与DNA结合时,某些能够与DNA结合的染色剂也具有增强的荧光。优选基于显示该特性来选择第一和/或第二荧光剂。换句话说,在优选实施例中,当染色剂与DNA结合时,染色剂的荧光强度增强。特别优选以此方式增强第一荧光染色剂的荧光强度。具有这种特性的第一(和任选的第二)染色剂的选择可以帮助降低在第一(和任选的第二)发射波长的检测过程中产生的背景信号的水平。特别地,可以选择当不与DNA结合时(即当在溶液中游离时)具有低荧光的染色剂。例如,当在溶液中游离时,染色剂可表现出小于50%、或更优选地小于40、30、20或10%的荧光,或更优选地小于10%,例如,小于9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或1%的与DNA结合时显示的荧光,或小于0.9%、0.8%、0.7%、0.6%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%或0.1%的荧光。

[0084] 优选的是,第一染色剂具有在350-700nm波长内的激发波长和发射波长。具有在该范围内的发射波长的一系列合适的荧光染色剂是本领域公知的,并且下面描述了示例性荧光染色剂。优选地,在本发明的方法中,第一荧光染色剂是绿色荧光染色剂,即在波长为510nm的处或附近具有峰值荧光发射强度。

[0085] 具有上述所有理想特性的特别优选的第一染色剂包括SYTO绿色荧光核酸染色剂(Molecular Probes)。SYTO染色剂是不对称花菁染料,因此,不对称花菁染料可以优选用作本发明方法中的第一染色剂。可用的SYTO染料的结构在US5658751、US6291203、US5863753、US5534416和US5658751中提供。可获得许多不同的SYTO染色剂,包括SYTO9、SYTO 11、SYTO 12、SYTO 13、SYTO 14、SYTO 16、SYTO 21和SYTO 24,它们可用于本发明的方法,特别优选是SYTO 9和/或SYTO 13或SYTO BC,它们是染色剂的混合物。SYTO BC染色剂混合物的激发波长为473-491nm,发射波长为502-561nm。

[0086] 第二染色剂可优选具有在350-700nm的波长中的吸收波长。在第二染色剂是荧光染色剂的情况下,第二染色剂的激发波长可以在该范围内。但是,如上所述,要求第二染色剂的吸收光谱与第一涉及的发射光谱至少部分重叠,因此第二染色剂的激发波长将接近于第一染色剂的发射波长。

[0087] 在某些实施方案中,第二染色剂也可以是荧光染色剂。换句话说,在某些实施方案中,第一和第二染色剂都可以是荧光染色剂,并且本发明方法的步骤(a)包括使样品的等分试样的至少一部分与第一和第二荧光染色剂接触。优选地,当第二染色剂是荧光染色剂时,第二染色剂的发射波长也在350-700nm的波长内。

[0088] 在第一和第二染色剂是荧光染色剂的情况下,各个染色剂将具有不同的发射波长,以便允许分别区分和检测每种染色剂。因此,第一和第二次发射波长是不同的。通常,在第一和第二染色剂均为荧光染色剂的情况下,由于各个染色剂均能够充当如上所述的FRET供体/受体的事实,因此第二染色剂的发射波长将比第一染色剂的发射波长更长。

[0089] 在一个优选的实施方案中,第二荧光染色剂是红色荧光染色剂,即在波长为650nm的波长或附近具有峰值荧光发射强度。适用于本发明方法的第二荧光染色剂是碘化丙啶(PI)。

[0090] 已显示出令人惊讶地有效地区分活微生物细胞和非活微生物细胞的荧光染色剂的优选组合包括作为第一荧光染色剂的SYTO染色剂,例如SYTO 9或BC,和作为第二荧光染色剂的PI。

[0091] 然而,在某些实施例中,第二染色剂可以是非荧光染色剂,即,不响应于特定波长的光的激发而发光的染色剂。非荧光受体,例如dabcyl和QSY染色剂,具有消除由直接受体激发(例如,特别是在非完整细胞内)引起的背景荧光的潜在问题的优点。

[0092] 等分试样可以在对其中的微生物无害的温度下与染色剂接触,该温度允许染色剂适当地渗透完整微生物和非完整微生物,并允许染色发生。例如,可以基于样品的性质或其中的微生物的类别来选择合适的温度。但是,通常使用37℃或更低的温度,以避免破坏样品中的微生物。因此,可以使用35℃、30℃或25℃以下的温度。还优选使用4℃或更高的温度,例如5℃、10℃或15℃或更高。在一个优选的实施方案中,样品在20-30℃、更特别地在20℃-25℃下与染色剂接触。在某些实施方案中,样品因此可以在室温下与染色剂接触。

[0093] 任选地,等分试样可以在接触步骤(c)之前(即,预处理)或期间进行处理,例如用来在染色前失活或修饰该微生物。这样的处理步骤可以包括在接触步骤(c)之前或期间,使等分试样与醇例如乙醇接触。这可以在步骤(b)中将等分试样稀释之前、同时或之后进行,和/或使等分试样与醇接触可以包括稀释步骤(b)的至少一部分。在一个特定的实施方案中,这可以在使等分试样与染色剂接触的步骤(c)期间进行。任选地,可以在执行步骤(d)之前除去醇,但是不要求除去醇,因此步骤(d)可以在乙醇等分试样/染色剂混合物上进行。因此,这种乙醇处理可以改善微生物的污染。在某些实施方案中,等分试样可以与乙醇接触以提供包含20-50%v/v乙醇(例如25-50%v/v乙醇或30-45%v/v乙醇)的混合物。在一个具体的实施方案中,将等分试样与乙醇接触以提供包含45%v/v乙醇的混合物。

[0094] 通过检测在第一发射波长的荧光信号,将对象识别为与完整微生物相对应。由于所用染色剂的各自性质,第一发射波长的荧光信号来自完整的微生物,而样品中的其他物质(例如样品中存在的非完整微生物、细胞碎片或其他颗粒)在所述波长下不发荧光,或者比完整的微生物细胞所发出的荧光的程度要小。因此,与完整微生物细胞相对应的对象具有与样品中的其他对象不同的荧光特性,并且可以与样品中的其他对象区分开,从而可得对应于待确定的完整微生物细胞的对象的数量。

[0095] 等分试样-染色剂混合物的成像通过视觉检测工具进行。获得等分试样-染色剂混合物的放大图像并进行分析以检测与完整微生物相对应的对象。

[0096] 虽然对应于完整微生物的对象可以是完整的微生物细胞,但它也可以是两个或多个细胞的聚集,例如以聚集形式生长的克隆和/或非克隆细胞的聚集。因此,对象可以是微生物细胞或细胞聚集。不同的微生物可能以不同的方式生长,例如聚集或非聚集,或具有不同的模式或形态,对于给定的微生物,这也可以根据生长条件(例如抗微生物剂的存在或数量)而变化。通过分析图像并计数对象,然后将对象的数量与微生物浓度相关联,可以考虑这样的不同生长模式和/或形态等。因此,可以通过对对象的数量进行计数并基于例如对象的尺寸和/或强度来调整数量从而分析图像(例如以说明细胞的聚集或集聚),以针对对象数量提供图像分析值,然后可以使用校准曲线将其与完整微生物的浓度相关联。这将在下面进一步讨论。

[0097] 对等分试样-染色剂混合物的成像可以在对微生物无害的温度下进行。典型地,这

将在室温或20-25℃下进行,尽管其他温度例如至少4℃到37℃(即小于37℃)也可以使用。

[0098] 至少在第一染色剂的发射波长下进行成像,即用来检测被第一荧光染色剂染色的对象。如上所述,这可以提供足够的信息以允许将与完整微生物相对应的对象与样品中可能存在的其他对象区分开。

[0099] 在某些实施方案中,成像可仅包括在第一发射波长下对等分试样-染色剂混合物进行成像,因此可选地,步骤(d)不包括检测第二染色剂。然而,在一些实施例,检测由第一和第二染色剂产生的信号可能是有益的,因此可以在第一发射波长下进行成像,并且还可以包括检测第二染色剂。因此,在某些实施例,成像可以在除了第一荧光染色剂的发射波长之外的对应于第二荧光染色剂的发射波长的波长下进行,或者换句话说,可以包括检测第二发射波长。

[0100] 在该方法包括检测第一和第二染色剂的情况下,每种染色剂的检测可以分别进行,例如,依次或同时进行。因此,步骤(c)可以包括分别对等分试样-染色剂混合物成像以检测第一染色剂(即在第一发射波长),或者可以包括同时对等分试样-染色剂混合物成像以检测第一染色剂和第二染色剂。

[0101] 成像可包括使用显微镜,包括明场、斜场、暗场、色散染色、相差、微分干涉差、荧光、共焦、单平面照明、光片和宽视场多光子显微镜。

[0102] 可以允许微生物接触、结合、缔合或吸附到用于成像的检测表面上。但是,在一个优选的实施方案中,可以在微生物(即在合适的培养基或缓冲液中的微生物)的悬浮液上进行成像,而不是固定在表面上或表面的微生物。换句话说,一体积的染色剂-等分试样混合物可以被成像。在对微生物的悬浮液进行成像的情况下,可以通过该悬浮液在一个或多个焦平面上获得图像。可能优选的是通过悬浮液在两个或更多个(不同的)焦平面上获得图像(例如,在通过等分试样-染色混合物的不同深度或截面上)。换句话说,可以对要成像的体积的单独的子体积进行成像(即,可以从染色剂等分混合物体积的单独的子体积获得图像)。因此,可以获得多个(即两个或更多个)不重叠的图像。这样的多个图像可以包括至少5、10、20、30、40、50、60、70、80、90或100或更多个图像。分析图像以检测和/或识别对应于完整微生物的对象。由此获得针对对象数量的图像分析值。在样品获得的所有图像中检测到的对象可以提供样品中对象的总数。

[0103] 为了执行成像步骤,将步骤(c)的染色剂-等分试样混合物或其等分试样的一部分提供(例如转移到)可以进行成像的器皿或容器(例如板的孔)中,或适合成像的载体隔室。这样的孔或隔室将具有光学观察区域或空间,即显微镜(或更具体地,其对象)可接近的观察(或可观察)区域或空间,并且具有允许显微镜观察和成像的光学质量。孔/隔室的几何形状可以给出限定的或期望的尺寸(例如,至少2mm×2mm)的可视区域,具有合适或期望的液体高度以使体积成像(例如,至少2mm的液体高度)。可在孔或隔室内部的平面上聚焦对象,例如平行于底部,并与底部间隔一定距离(例如,约0.1-0.5,例如距离底部约0.2mm),并且显微镜可以配置为在成像期间将焦平面连续移动通过液体,例如在图像采集时间内(例如10-60或20-30秒)总共移动1-3mm(例如1.5mm)。

[0104] 在一个特别优选的实施例中,成像可以包括沿着光轴获得一系列2-D图像,其中每个图像是沿着光轴在不同位置通过一体积的悬浮液获得的。在某些实施例中,每个图像可以垂直于光轴对准(在此称为xy对准)。等分试样-样品混合物的特定区域被覆盖在单个xy

对齐图像中,该图像的大小取决于成像设备的光学特性。对于xy空间中的每个位置,可以沿光轴或z轴以不同间隔收集一个或多个2D图像。因此,可以生成一系列或堆叠的2D图像,在一个实施例中,其可以用于提供样本量的3D信息。或者,可以使用提供2D信息的多个单独的图像。从样品中提取3D信息的另一种方法是Unisensor采用的方法(参见例如US 8780181),其中光轴相对于xy平面倾斜,并且样品或检测器沿x或y平面移动。在此,除了xy空间之外,还获取了一系列扩展到z空间的图像。通过图像数据的后续转换,也可以使用此方法实现垂直于xy平面对齐的2D图像堆栈。这样,一系列图像中的每个图像都是单独区域(单独的截面)的图像,或者可以替代地被认为是单独的体积(截面在z方向上具有限定的体积,因此包含可以为每个图像提供深度为z的xy空间)。

[0105] 一旦提取,则可以利用2D图像堆栈中固有的3D信息来识别与样品中完整微生物相对应的对象。在一个实施例中,例如可以通过例如z堆栈投影到一个2D图像(投影的2D图像)中从3-D信息生成2-D图像。然后可以使用所得的二维图像来执行分析。可替代地,可以对通过悬浮液的体积获得的每个图像进行分析,并且可以将分析结果整合到从样品获得的所有2-D图像中。作为又一替代方案,可以对获得的各个2-D图像中的每个图像分别进行分析(即,可以在每个2-D图像中分别确定对象),并且可以将从其收集的信息进行组合。可以将对象确定为荧光强度的点或区域,该点或区域指示在所研究的视场中(例如在图像或投影的2D图像中)完整的微生物。可以对荧光图像执行分析,并且存在许多备选算法,例如Cellprofiler,也可以在大多数商业图像分析系统中使用。

[0106] 在另一个实施方案中,记录了在xy空间中的每个位置上延伸的z空间中的强度变化,表明在特定位置中的微生物质量。集成在整个xy空间中,其可以测量总微生物量。用于此过程的算法也存在于通常可用的图像分析软件中,例如免费软件Cellprofiler。

[0107] 一旦已经通过成像检测到与完整微生物相对应的对象(即,在第一发射波长检测到的对象),则由此获得的信息可以用于生成等分试样的图像分析值。可以分析图像的荧光强度和/或(例如,每个)对象的大小,以及任选地(例如,每个)对象的形态。诸如对象的圆形度、对象中的荧光强度的均匀性或最大荧光强度(例如其中像素的最大强度)、模态荧光强度、对象中的中值或平均荧光强度、和/或检测到的每个对象的面积等因素通过成像可以确定。在某些实施例中,仅具有在给定范围内的这些参数中的一个或多个的那些对象可以被包括在分析中(例如,计数或枚举),从而生成图像分析值。图像分析值可以是在代表或对应于对象数量(即计数)的意义上识别的对象的组合值。可以基于每个对象中包含的连续像素的数量来确定对象区域,并且分析中可以仅包括那些包含至少或超过一定数量的像素的对象。在某些实施例中,可以基于针对对象区域 $\times$ 强度的导出值来识别和检测对象,并且仅可以对具有属于特定参数范围内的性质的那些对象进行计数或枚举,从而生成图像分析值。换句话说,图像分析值表示与具有特征落入特定参数范围内的完整微生物相对应的对象数量,或者换句话说,与完整微生物相对应的校正(或调整)对象数量。

[0108] 针对每个对象确定的因素(例如上述任何因素)或导出值(例如针对所有对象的对象面积 $\times$ 强度)也可以组合以提供关于成像对象的数量,即关于对象总数的信息。这样,例如,可以确定成像对象(或更具体地,一批或一组成像对象)的最大值、模态或中位荧光强度。可替代地,可以确定成像对象的荧光强度的分布,或者诸如成像对象的对象面积 $\times$ 强度的导出值。因此,每个对象可以具有分配给它的值(例如,面积、最大荧光强度、总强度、中值

或平均强度),并且可以针对成像对象的数量确定一个或多个所述因子的中值或平均值或方差或标准差。如下面更详细地描述的,这种信息可以指示样品中微生物的性质,并且可以用于选择合适的校准曲线以用于确定其中完整微生物的浓度。此外,这样的信息可以提供关于样品中微生物标记效率的信息,并且可以用于确定荧光强度低于检测极限的微生物的比例。

[0109] 可以可选地对图像进行背景扣除或归一化步骤作为初始步骤,即在本文所述的任何后续图像分析步骤之前。这可以使用任何方便的已知标准方法来执行,例如,滚球减法(rolling ball subtraction)。

[0110] 可以在执行阈值之后确定图像分析值。换句话说,可以设置阈值以确定是否已经检测到对象。可以执行阈值来设置针对样品图像获得的信号强度的下限,在该下限以下的对象不考虑。在本发明的方法的环境中,阈值允许在任何未来的分析中舍弃在第一发射波长处具有低荧光强度的对象(即,没有被第一染色剂强染色的对象)。阈值可以设置为一个或多个级别,并且对象可以以不同的阈值进行计数。

[0111] 在某些实施例中,可以执行全局阈值处理,即,可以为整个图像(或图像组)设置单个阈值。然而,在替代实施例中,可以执行局部阈值处理(例如,如果照明和/或背景信号在整个图像上不均匀)。局部阈值估计根据相邻像素的灰度信息为给定像素的阈值。

[0112] 此外,根据本领域中已知的技术,在确定图像分析值之前,可以执行其他图像分析操作,例如以将图像转换为灰度级(其中,荧光强度可以被读取为灰度级),和/或减去背景(例如使用滚球法)等。

[0113] 可以基于从成像获得的信息来表征样品,例如,微生物是聚集微生物还是非聚集微生物。有利地,可以仅基于样品中对象的外观,例如,样品中检测到的对象的特定比例是否具有特定的面积和/或最大强度,来选择用于该过程的合适的校准曲线。在通过本发明的方法可以测定完整微生物的浓度之前,不需要已知样品中微生物的类型。因此,可以选择针对聚集或非聚集微生物预先确定的校准曲线。

[0114] 样品中完整微生物的浓度与图像分析值之间的关系可以取决于与所述样品中的微生物有关的许多参数,例如微生物的大小和形态,和/或微生物形成聚集或生物膜的趋势。因此,样品中对象的数量不能直接用于确定样品中完整微生物的浓度,因为每个对象可能对应于两种或多种微生物。此外,在本发明的实施例中,如果在不同的焦平面处拍摄微生物或微生物聚集,则它们可能出现在两个单独的图像中,在本发明的实施例中,在两个或更多个焦平面处进行成像,并且因此可以被检测为两个单独的对象。因此,样品中微生物的类别可能影响样品中微生物的浓度与在本发明方法的步骤(c)中成像的对象数量之间的关系。

[0115] 诸如此类的因素以及本领域先前确定的那些因素会影响确定样品中活微生物浓度的方法的准确性(例如通过对活和非活细菌进行不完全的染色),通过使用校准曲线,可以在本发明的方法中克服这些问题。

[0116] 可以通过对含有已知浓度的微生物的一系列样品,即通过另一种方法确定或已确定微生物浓度的样品进行本发明的浓度测定方法的步骤(c)和(d),来制备校准曲线。因此,可以针对包含不同浓度的微生物的每个样品来确定与完整微生物相对应的对象的数量,并且因此可以建立所述对象的数量与微生物的浓度之间的关系。

[0117] 从在执行本发明的浓度确定方法之前准备校准曲线的意义上来说,校准曲线是预先确定的。因此,在确定给定(即每个)样品中微生物的浓度之前,可以单独准备校准曲线。然而,优选地,可以准备校准曲线并用于确定多个样品中完整微生物的浓度,或者换句话说,可以使用相同的校准曲线来确定多个样品中完整微生物的浓度。换句话说,该方法没有必要包括校准曲线的产生;可以使用预先准备的校准曲线,不需要为每个样品生成单独的校准曲线。可以周期性(例如每天、每周或每月)地准备新的或新近的校准曲线,或者可以分批准备,例如在使用一批新的染色剂之前,可以使用所述新的校准曲线确定完整微生物的浓度,直到需要准备新的校准曲线为止。

[0118] 但是,当执行本发明的方法时,可以提供用于确定给定微生物或微生物类型的浓度的校准曲线,因此可能优选的是,针对不同的微生物或具有不同特性的微生物类型,例如不同的增长方式的微生物,分别制备校准曲线。因此,这不必一定处于特定的微生物属或种的水平,而是可以取决于例如微生物的形态和/或生长模式。

[0119] 在某些情况下,用于确定样品中完整微生物浓度的校准曲线的适用性可能取决于所述微生物的类别,并将决定校准曲线允许从图像分析值确定完整微生物浓度的准确度。例如,使用特定微生物生成的单个校准曲线可能适用于确定一系列不同微生物(例如单个科或属的微生物)的浓度,以这种方式,可能仅需要制备用于本发明方法的单个校准曲线。可替代地,可以使用从不同科、属、种或菌株的微生物和/或具有相似特性和/或形态的不同微生物获得的成像数据来制备用于该目的的校准曲线,并且可以将从其获得的数据组合以提供单个校准曲线。

[0120] 例如,有可能从不同种的非聚集性革兰氏阴性细菌中收集数据,从而制备校准曲线。因此,由此制备的校准曲线可用于确定许多不同的(合适的)微生物的浓度,该微生物即证明成像对象的数量与样品中的微生物浓度之间具有令人满意的(即代表性的)相关性的微生物。

[0121] 或者,如果特定微生物表现出不规律或异常的特性,则可能有必要为该特定微生物生成单独的校准曲线,以确定样品中该微生物的浓度。

[0122] 因此,可以提供(即,在执行本发明的浓度确定方法之前准备好)许多不同的校准曲线,每个适合用于确定不同选择的微生物的浓度。因此,例如,可以为非聚集类革兰氏阴性细菌、非聚集类革兰氏阳性细菌、聚集类革兰氏阴性细菌或酵母提供单独的校准曲线。因此可以选择合适的校准曲线以确定样品中特定微生物的浓度。因此,可以制备2、3、4、5或6个或更多个不同的校准曲线,并且一旦已经对样品中的微生物进行了成像,就可以从中选择合适的校准曲线。

[0123] 在本发明的一个优选实施方案中,在成像步骤(d)中获得的信息可以通知选择使用哪个校准曲线以确定特定样品中的活微生物的浓度。可以为步骤(d)中检测到的对象确定上述对象的一个或多个参数(即,如上所述的对象的最大强度、模态强度和/或面积或导出值),任选地在扣除背景和阈值步骤,并且此类信息可用于为该样品选择合适的校准曲线。优选地,使用为聚集或非聚集微生物预定的校准曲线。

[0124] 诸如样品的性质、其中微生物被提供的培养基以及样品存储或孵育的条件因素也都可能影响样品中微生物的浓度与本方法步骤(c)中成像的对象数量之间的关系,因此优选在与对等分试样-染色剂混合物成像的那些条件相似或相同的条件下制备校准曲线。

[0125] 如上所述,样品可以是任何含有或疑似含有微生物细胞的样品,并且可以包含其他成分(该成分可能会妨碍对样品中存在的微生物细胞的准确测试),因此可能需要从样品中去除。样品通常可以是生物样品或可以包含生物样品,或者表达的样品可以包含生物材料。特别地,样品可以包含生物来源的非微生物(例如细胞)材料。因此,样品可以是环境样品,例如水样品(例如废水)、污水排放、土壤样品或悬浮液、食品样品(例如水果或蔬菜汁、肉、水果、蔬菜或乳制品)或其匀浆,或医学或临床样品。

[0126] 微生物可以是任何微生物(例如,如下文进一步讨论的任何细菌或真菌微生物或原生动物),特别是任何病原性微生物或引起体内感染的任何微生物,因此可以特别地使用本发明的方法。在检测或诊断受检者身体任何部位上或身体任何部位中的微生物感染(即任何微生物感染)的情况下,确定微生物的浓度。

[0127] 因此,在一个优选的实施方案中,样品是或包括临床样品。临床样品可以是可以从测试对象获得的任何样品,该测试对象通常将是人类患者,但是可以是任何人类或动物,通常是哺乳动物。因此,它可以是人体组织、细胞或体液的任何样品,或者是源自(例如,擦拭、洗涤、抽吸、冲洗等)人体的任何样品。合适的临床样品包括但不限于血液、血清、血浆、血液成分、关节液、尿液、精液、唾液、粪便、脑脊液、胃内容物、阴道分泌物、粘液、组织活检样品、组织匀浆、骨髓抽吸物、骨匀浆、痰、抽吸物、呼吸道样品、伤口渗出液、拭子和拭子冲洗液(例如鼻咽拭子)、其他体液等。在一个优选的实施方案中,临床样品是血液或血液来源的样品,例如血清或血浆或血液部分。

[0128] 临床样品的性质可以根据感染或可疑感染的症状表现或受试者的一般临床状况来确定。尽管包括任何微生物感染,但是本发明的方法在败血症的检测或诊断(或更一般地,败血症的管理)或疑似败血症的过程中具有特定的用途。因此,临床样品可以来自患有或疑似患有败血症或有败血症风险的受试者。在这种情况下,样品通常是血液或血液来源的样品。通常,对于败血症,样品将是血液或将包含血液,但是并不排除其他类型的样品,例如上面列出的类型。

[0129] 可以将临床样品引入包含培养基的培养容器中。这是标准步骤,其可以根据本领域众所周知的并且在文献中广泛描述的标准程序进行。因此可以对临床样品进行培养,因此该方法中使用的样品可以是临床样品培养物,或者,如下面更详细地描述的,它可以是包含从临床样品培养物中回收或分离的微生物的样品。

[0130] 可以在含有适合于培养微生物细胞的培养基的容器中收集临床样品。在本发明的一方面,可将临床样品(例如血液样品)收集在含有培养基的培养瓶中,并且任选地在回收微生物细胞之前进行培养。在一些实施方案中,可能需要将临床样品引入培养瓶中,并且立即或仅在短时间的培养后从培养瓶中取出临床样品/培养基混合物的等分试样进行测试(例如,针对微生物ID),同时对培养瓶进行连续培养,然后再进行进一步测试(例如,AST测试)。这种方法在我们的共同未决申请WO 2015/189390有描述。

[0131] 培养容器可包括适合于微生物细胞培养的任何器皿或容器,例如板、孔、管、瓶、烧瓶等。方便的是,在临床样品是血液或血液来源的样品的情况下,培养容器是血液培养瓶,例如BacT/ALERT(Biomerieux)血液培养瓶、Bactec血液培养瓶(Becton Dickinson)或VersaTrek血液培养瓶(Thermo Fisher),或者实际上是任何已知的用于采样血液的管、烧瓶或瓶子,特别是用于检测微生物的培养。因此,样品可以是血液培养样品。

[0132] 方便地,可以向培养容器提供已经包含在其中的培养基。然而,可在添加临床样品之前、同时或之后,单独提供培养基并将其引入培养容器。

[0133] 培养基可以是任何合适的培养基,并且可以根据临床样品和/或疑似微生物的性质和/或受试者的临床病症等进行选择。适用于这种用途的许多不同的微生物培养基是已知的。如本领域中已知的,培养基通常可以包含足够的营养以促进微生物的快速生长。在许多情况下,合适的培养基是复合的生长培养基,包括诸如Muller-Hinton (MH) 培养基、MH-苛养 (MHF) 培养基、补充有裂解马血的Muller-Hinton培养基、溶血性肉汤 (LB)、2X YT培养基、胰蛋白酶大豆肉汤、哥伦比亚肉汤、脑心浸液肉汤、布鲁氏肉汤以及本领域已知的通用生长培养基,并且可以包括添加特定的生长因子或补充剂。培养物可以被搅动或可以不被搅动。培养基有多种形式,包括液体、固体和悬浮液等,并且可以使用这些中的任何一种,但是方便地,培养基将是液体培养基。如上所述,在培养容器是随时可用的血液培养瓶的情况下,这些容器可以包含经过特殊修饰的特定培养基,以允许多种微生物生长。通常,制造商在血液培养瓶中提供的培养基将包含一种试剂或添加剂,以中和存在于从测试对象中获取的临床样品中存在的任何抗生素。可以使用含有或不含这种中和剂的烧瓶,并且如果需要,可以将中和剂加入培养容器中。

[0134] 在本发明的特定方面,临床样品是血液或血液来源的样品,并收集在血液培养瓶 (BCF) 中。血液培养瓶的例子包括BacT/ALERT (Biomérieux) 血液培养瓶、Bactec血液培养瓶 (Becton Dickinson) 或VersaTrek血液培养瓶 (Thermo Fisher),或者实际上是任何已知用于采样血液的试管、烧瓶或瓶子,特别是用于培养以检测微生物的目的。

[0135] 因此,根据本发明的样品可以在培养基中包含临床样品。此外,样品可以是临床样品培养物 (即已培养一段时间的临床样品)。在这方面将看到,属于本发明方法的样品可以是收集或制备的复合样品的一部分。因此,在一个实施方案中,本发明的方法的样品可以是样品中取出或移出的等分试样 (例如测试等分试样)。取自含有临床或其他样品的培养容器 (烧瓶) 的内容物,无论是在培养之前、期间还是之后 (即孵育)。此外,如下文更详细地描述,本发明的浓度确定方法可以用于确定从所述临床样品或临床样品培养物中回收的微生物的制剂 (例如,悬浮液) 中的微生物浓度。因此,样品可以是含有回收的微生物的样品。在一个特定的实施方案中,本发明包括从临床样品培养物 (例如血液培养瓶) 中回收微生物细胞,优选其中临床样品已经在血液培养瓶中培养了一段时间,因此提供了一种确定从这种临床样品培养物中回收的样品中微生物细胞浓度的方法。

[0136] 因此,在一个实施方案中,步骤 (a) 中使用的样品可以是已被指定为对微生物生长呈阳性的临床样品的培养物 (例如在临床样品培养系统中)。因此,它可以是阳性血液培养瓶。然而,根据本发明的方法,不必将临床样品培养物指定为阳性,并且可以在该临床培养物样品被指定为阳性之前的阶段使用该临床样品培养物,例如,如果培养时间少于必要的时间,则表示为阳性。因此,样品可以是非阳性的血液培养瓶 (例如,微生物细胞少于将其指定为阳性的所需数量、或者已经培养了较短的时间的血液培养瓶中)。实际上,在某些临床样品的情况下,可以在进行任何培养之前 (例如,当建立临床样品培养物时) 取出临床样品培养物的样品并用于本发明的方法中。然而,有利的是,代替直接在浓度确定方法中使用这种阳性或非阳性临床样品培养物,步骤 (a) 中使用的样品是含有从这样的临床样品培养物 (例如,包含此类回收的微生物的悬浮液或制剂) 中回收或分离的微生物的样品。

[0137] 在一个替代实施方案中,可以根据用于确定上述抗微生物剂的MIC的EUCAST标准方法制备样品。特别地,这样的样品可以被准备用于常规AST方法中,但是可以被用于本文所述的本发明的AST方法中。可以将微生物细胞(例如来自临床样品培养物)铺板以获得分离的菌落,并且可以收集所得菌落并用于制备微生物细胞悬浮液,以用于制备用于AST测试微生物培养物的接种物。这种悬浮液可以是步骤(a)中使用的样品。或者,分离的单个菌落可用于接种可被培养以提供接种物的培养基。这种培养物可以是步骤(a)中使用的样品。

[0138] 如上所述,可以执行本发明的浓度确定方法来确定样品中的微生物浓度,该样品包含从本文定义的样品中回收的微生物(即,从上述任何样品中回收的微生物,但特别是临床样品或临床样品培养物)。换句话说,本发明的“样品”可以是回收的微生物样品。上述样品可能包含可能以某种方式干扰微生物细胞的制备、处理和培养的成分,例如妨碍精确测定样品中完整微生物的浓度、影响微生物的生存能力或抑制微生物的生长。因此,回收此类样品中的微生物以从任何此类组分中分离出微生物可能是有利的。一旦微生物被回收,就可以确定回收的微生物样品中的微生物浓度。在一个特定的实施方案中,回收的微生物样品可以用于提供用于本文所述的AST测定的微生物。因此,本文所述的浓度确定方法和AST方法可以针对并使用回收的微生物样品进行。

[0139] 当样品是临床样品或临床样品/培养基混合物时,从样品中回收微生物可能特别有利。可以在培养期之前、期间或之后从临床样品/培养基混合物中回收微生物细胞。在培养瓶中提供的培养基,例如血液培养瓶中可能含有中和抗菌化合物作用的成分(例如通过吸附降低其功效和/或在样品中的浓度),和/或化合物,例如可抑制样品中可能存在的受试者先天免疫系统组分(例如补体或其他因素)的抗微生物活性的聚茴香脑磺酸钠(SPS)。因此,可能期望从含有诸如此类化合物的培养基中回收微生物细胞。

[0140] 从样品中回收微生物可以通过从样品中选择性分离微生物细胞或富集样品中的微生物细胞来进行。“富集”是指增加样品中微生物细胞的浓度,或从样品中去除或以其他方式降低任何非微生物组分(例如非微生物细胞)的浓度的任何方法。在本文中,富集可以包括从样品中去除源自被测受试者的细胞(例如哺乳动物细胞),以及从中分离微生物细胞。因此,可以将微生物细胞与样品分离,例如从临床样品培养物中(或更特别地从其等分试样中)提取,并且可以进行根据本发明的浓度确定步骤,特别是在AST测定的情况下,以确定抗微生物的敏感性。

[0141] 从样品中回收微生物的合适方法可以包括选择性地裂解存在的任何非微生物细胞,和/或选择性地回收微生物细胞(即样品中微生物细胞的阳性或阴性选择)。用于非微生物细胞的裂解和从包含非微生物细胞的混合物中分离微生物细胞的方法和试剂是可商购的,例如购自Molzym或Biocartis。其他裂解条件和方法在本领域中被广泛描述,例如,Sullivan等,1975,J Clin Microbiol 1,30-36;Zierdt等,1977J Clin Microbiol 5,46-50。

[0142] 因此,回收可以包括从样品中去除任何非微生物真核细胞。例如,这可以包括去除源自被测对象的任何细胞,其中样品是临床样品。这可以在裂解非微生物真核细胞,优选哺乳动物细胞,但不裂解微生物细胞,并且优选在维持微生物细胞的生存力的任何条件下进行。例如,合适的裂解试剂(如裂解缓冲液)可以被添加到样品中,以选择性裂解不需要的细胞。非微生物细胞的选择性裂解可以使微生物细胞与样品中可能存在的其他成分分离。因

此,所述裂解试剂能够选择性地裂解(例如通过裂解细胞膜)细胞(例如哺乳动物细胞)。裂解试剂可包含一种或多种去垢剂、一种或多种离液剂、一种或多种酶或其任意组合。选择性裂解试剂的不同组分可以作为单一裂解试剂与样品接触,或者以不同组分(例如含有裂解缓冲液和一种或多种酶的去垢剂)可以与样品分别、顺序或同时接触。这种接触可以通过将样品添加到一种或多种试剂组分中来进行,反之亦然。

[0143] 术语“裂解”是指细胞破裂。特别地,使细胞破裂以释放细胞内容物。这可以通过本领域已知的任何方式来实现,例如通过病毒、酶、机械、电、化学、热、冷或渗透机制的方式,其损害细胞完整性,导致细胞成分部分或全部释放到周围溶液中。

[0144] 术语“选择性地裂解”或“选择性裂解”是指裂解样品中存在的细胞的特定子集。在当前情况下,期望仅选择性地裂解临床样品中存在的非微生物细胞,或更特别地裂解源自被测对象的细胞(例如哺乳动物细胞),而基本上不裂解存在于临床样品中的微生物细胞。另外,根据本发明的某些方法,期望从样品获得的微生物细胞能够生长和繁殖(需要生长以便确定抗微生物的敏感性),因此期望具有微生物细胞的生长和/或繁殖(生存力)不受样品中非微生物或测试对象衍生细胞的选择性裂解的影响。

[0145] 优选地,从样品中回收的所有(即100%)或基本上所有的微生物细胞在进行任何此类处理后都可以存活,并且优选至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%的从样品中回收的微生物细胞在选择性裂解步骤之后是活的。

[0146] 然而,由于本发明的方法需要确定回收的微生物样品中完整或活的微生物的浓度,因此,在至少80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%或10%的回收的微生物细胞是完整或活的事件中,仍然评估抗生素敏感性。因此,这样的方法不限于微生物活力或回收的任何特定水平。

[0147] 选择性裂解非微生物细胞以选择性富集样品中的微生物的方法,其不依赖于已知微生物的类别,例如描述于US 2013/0171615、US 2012/0231446、US 2010/0184210、US 7893251和US 8481265中描述的实例,以及在US 2005/0202487中描述了选择性去除真核细胞的方法。

[0148] 有用的去垢剂可包括一种或多种非变性溶解性去垢剂,例如Triton X100-R、Triton X-114、NP-40、Genapol C-100、Genapol X-100、Igepal CA 630、Aslasolve 200、Brij 96/97、CHAPS、辛基 β -D-吡喃葡萄糖苷、皂角苷和单十二烷基九乙二醇醚(C12E9,聚多卡醇)。任选地,可以包括变性的溶解性去垢剂,例如十二烷基硫酸钠(SDS)、N-月桂基肌氨酸、脱氧胆酸钠、胆汁盐、十六烷基三甲基溴化铵、SB3-10、SB3-12、氨基磺基甜菜碱-14和C7BzO。还可任选包含增溶剂,例如Brij 98、Brij 58、Brij 35、吐温80、吐温20、普兰尼克L64、普兰尼克P84、非洗涤剂磺基甜菜碱(NDSB 201)、aphipols (PMAL-C8) 和甲基- β -环糊精。在一个实施方案中,聚氧乙烯去垢剂可以是优选的。聚氧乙烯去垢剂可包含结构C₁₂₋₁₈/E₉₋₁₀,其中C₁₂₋₁₈表示碳链长度为12至18个碳原子,E₉₋₁₀表示9至10个氧乙烯亲水头组。例如,聚氧乙烯去垢剂可以选自Brij 97、Brij 96V、Genapol C-100、Genapol X-100、单十二烷基九乙二醇醚(聚多卡醇)或其组合和乙二胺四乙酸(EDTA)。

[0149] 裂解溶液还可包含一种或多种酶。裂解液中可使用的酶包括但不限于消化核酸和其他膜污染物质的酶(例如,蛋白酶XXIII、DNase、神经氨酸酶、多糖、Glucanex和Pectinex、蛋白酶K、微球菌核酸酶、胃蛋白酶或胰蛋白酶)。

[0150] 合适的离液剂或离液试剂可包括尿素、盐酸胍、丁醇、乙醇、高氯酸锂、乙酸锂、苯酚、丙醇或硫脲。

[0151] 在另一个实施方案中,可以使用一种或多种其他试剂,包括例如还原剂,例如2-巯基乙醇或二苏糖醇(DTT),稳定剂,例如镁、丙酮酸和湿润剂,和/或螯合剂,例如乙二胺四乙酸(EDTA)。

[0152] 裂解试剂可以在适合于裂解所需细胞的任何pH下进行缓冲,并且将取决于多种因素,包括但不限于样品的类型、裂解的细胞和所用的去垢剂。在一些实施方案中,pH可以在2-13的范围内,例如6-13、8-13或10-13。合适的pH缓冲剂包括能够将pH维持在期望范围内的任何缓冲剂,例如约0.05M至约1.0M CAPS。

[0153] 另外,裂解试剂可包含任何合适的盐,包括NaCl、KCl、MgCl₂、Na₂HPO₄、NaH₂PO₄,其可有助于裂解或微生物细胞的后续处理。如果存在盐,则可以以任何合适的浓度存在,例如至少0.01M、0.02M、0.05M、0.1M、0.2M、0.5M、1M、2M或5M,具体取决于缓冲液和所用样品的体积等因素。

[0154] 或者,可以选择性地从测试等分试样中积极地选择微生物细胞,而不是选择性地除去非微生物细胞。例如,如果已知微生物的类别,则可以通过与能够特异性或选择性地结合微生物细胞的固定的或固定的双重配体(亲和结合伴侣)结合来选择微生物细胞。

[0155] 从测试等分试样中去除(例如裂解)非微生物细胞之后,可以从所得混合物(例如裂解物)中回收微生物细胞。尽管在一个实施方案中,分离和回收步骤可以看作是相同的(例如,该方法可以以使微生物细胞与测试等分试样选择性分离的方式执行,或者通过非微生物细胞的裂解来进行回收),在一个优选的实施方案中,作为单独的步骤从裂解物中回收微生物细胞,即,在裂解步骤之后从样品中物理回收微生物细胞。这可以以任何方便的方式来完成,例如通过过滤或离心。

[0156] 因此,在从样品中回收微生物细胞之后,将回收的细胞重悬,从而提供回收的微生物样品。可以使用适合微生物细胞生长的培养基进行重悬,或者可以使用缓冲液或任何其他合适的培养基进行重悬。

[0157] 在本发明的一个优选实施方案中,通过过滤从样品中回收微生物细胞,并直接使用培养基将其从过滤器中重悬。有利的是,回收可以通过使用包括合适孔径的过滤器进行过滤来进行,以捕获任何微生物细胞,同时允许样品中任何其他组分例如培养基和/或裂解的哺乳动物细胞碎片和片段流过。过滤后,可任选地使用培养基或任何合适的洗涤缓冲液洗涤回收在过滤器上的微生物细胞,所述洗涤缓冲液包含一种或多种如上文针对裂解缓冲液所定义的组分,例如去垢剂。可通过重复移液以将细胞从过滤器的表面重悬而将其从过滤器重悬。在本发明的一个优选实施方案中,可以使液体(例如培养基或缓冲液)通过过滤器反冲(即,在与过滤滤液相反的方向上),以便重新悬浮微生物细胞。可替代地,可以通过使用整个过滤器,例如通过培养基添加到过滤器中或使过滤器与培养容器中的培养基接触,回收微生物细胞。

[0158] 或者,可以通过离心来去除非微生物细胞之后回收微生物细胞,即从悬浮液中沉淀完整的微生物细胞以形成沉淀。然后可以丢弃所得的上清液。可以将微生物沉淀物重悬于如上所定义的合适的洗涤缓冲液中,并再离心一次以形成沉淀物。因此,在一个实施方案中,步骤(a)中的样品可以通过将通过离心获得的微生物细胞的沉淀物重新悬浮而获得。一

种替代形式是通过使用例如在US 7547526中的中空纤维来回收微生物细胞。

[0159] 当使用培养基重悬微生物细胞时,该培养基通常是指被批准或认可用于AST测试的培养基。优选地,培养基是液体培养基。因此,在一个实施方案中,它是Muller-Hinton (MH) 培养基或Muller-Hinton培养基(MHF) 培养基或阳离子调节的Mueller Hinton培养基(CAMHB)。对于非标准AST,本发明可以使用任何其他通常已知的培养基。通过使用“非标准”培养基进行AST分析获得的MIC值可以进行调整(相关),以得出标准AST结果。

[0160] 一旦微生物细胞被回收,例如在从样品中除去非微生物细胞并获得回收的微生物样品后,根据本发明的方法测定回收的微生物样品中存在的微生物细胞的浓度。如上所述,在一个特定的实施方案中,这尤其是出于进行AST测定的目的,即,可以在进行AST测定之前确定微生物的浓度。

[0161] 有利地,使用回收的微生物样品进行AST测定可以允许进行更快速的AST分析。特别地,通过直接从临床样品或临床样品培养物中回收微生物细胞,从而获得回收的微生物样品,其是不含任何污染物的均质样品。

[0162] 某些样品,例如特别是食品或环境样品,可能包含颗粒物质,可能需要在确定样品中活微生物的浓度之前去除。另外,某些可商购获得的培养容器(例如血液培养瓶)配有树脂珠,该树脂珠可中和临床样品(即在测试下已被施用于受试者中)中存在的任何抗微生物剂的作用,以便促进培养中微生物细胞的生长。因此,在一个优选的实施方案中,可以过滤样品以除去样品中可能存在的任何大颗粒。优选地,该过滤步骤将利用具有如下孔径的过滤器,该孔径基本上不会从测试等分试样中去除任何细胞物质,但是能够去除例如颗粒。至少100、200或300 μm ,但可以高达1000 μm 。

[0163] 本发明的方法可以用于确定任何微生物的浓度。一般而言,涉及临床相关的微生物,但是该微生物可以是病原性或非病原性的。如本文所用,术语微生物包括可能属于“微生物”类别的任何生物。尽管不是必须的,但是微生物可以是单细胞的,或者可以具有单细胞的生命阶段。微生物可以是原核的或真核的,并且通常包括细菌、古细菌、真菌、藻类和原生生物,特别是原生动物。特别令人感兴趣的是细菌,其可以是革兰氏阳性或革兰氏阴性或革兰氏不定或革兰氏无反应的,以及真菌,例如酵母。

[0164] 细菌可能是需氧的或厌氧的,尽管在一个特别的实施方案中,其中涉及本发明的AST方法,细菌是需氧的。细菌可以是或可以包括分枝杆菌。

[0165] 特别是,细菌的临床相关属包括葡萄球菌(包括凝固酶阴性葡萄球菌)、梭菌、大肠埃希氏菌、沙门氏菌、假单胞菌、丙酸杆菌、芽孢杆菌、乳杆菌、军团菌、分枝杆菌、微球菌、梭杆菌、莫拉菌、变形杆菌、大肠埃希菌、克雷伯菌、不动杆菌、伯克霍尔德菌、肠球菌、肠杆菌、柠檬酸杆菌、嗜血杆菌、奈瑟菌、沙雷氏菌、链球菌(包括 α -溶血性链球菌和 β -溶血性链球菌)、拟杆菌、耶尔森氏菌和嗜麦芽窄食单胞菌,以及事实上任何其他肠道或大肠菌群。 β 溶血性链球菌包括A组、B组、C组、D组、E组、F组、G组和H组链球菌。

[0166] 革兰氏阳性细菌的非限制性实例包括金黄色葡萄球菌、溶血葡萄球菌、表皮葡萄球菌、腐生葡萄球菌、路邓葡萄球菌、施氏葡萄球菌、山羊葡萄球菌、肺炎葡萄球菌、无乳葡萄球菌、唾液葡萄球菌、血葡萄球菌、血管葡萄球菌、肺炎链球菌、化脓链球菌、轻链球菌、无乳链球菌、血管链球菌、马链球菌、牛链球菌、产气荚膜梭菌、粪肠球菌和粪肠球菌。革兰氏阴性菌的非限制性例子包括大肠杆菌、邦戈里沙门氏菌、肠沙门氏菌、科斯柠檬酸杆菌、弗

劳迪柠檬酸杆菌、肺炎克雷伯菌、催产克雷伯菌、铜绿假单胞菌、流感嗜血杆菌、脑膜炎奈瑟菌、阴沟肠杆菌、产气肠杆菌、粘质沙雷氏菌、嗜麦芽窄食单胞菌、摩根氏菌、脆弱细菌、鲍曼不动杆菌和奇异变形杆菌。

[0167] 临床上相关的真菌可包括酵母,尤其是念珠菌属的酵母,以及曲霉属、镰刀菌属、青霉菌属、肺孢菌属、隐球菌属、球虫属、马拉色菌属、毛孢子菌属、支顶孢属、根霉、毛霉菌和犁头霉属的真菌。特别感兴趣的是念珠菌和曲霉属。真菌的非限制性实例包括烟曲霉、白色念珠菌、热带念珠菌、光滑念珠菌、都柏林念珠菌、副念珠菌和克鲁斯氏念珠菌。

[0168] 临床相关原生动物的非限制性实例包括溶组织性阿米巴虫、蓝氏贾第鞭毛虫、布鲁氏锥虫、besnoiti贝诺孢子虫属、bennetti贝诺孢子虫属、tarandi贝诺孢子虫属、犬异孢子虫、柔嫩艾美耳球虫、细小隐孢子虫、海氏哈德曼球虫、弓形虫、犬新孢子虫、犬肝簇虫、恶性疟原虫、间日疟原虫、卵形疟原虫、马来疟原虫和诺尔疟原虫。

[0169] 如上所述,本发明的浓度确定方法在执行AST测定的情况下,特别是在确定接种物中的微生物浓度的情况下,在确定样品中完整的(并因此是活的)微生物的浓度方面特别有用。因此,本发明提供了一种确定微生物的抗微生物敏感性的方法,所述方法包括如上所述确定样品中活微生物的浓度,并进行AST测定。

[0170] 有利地,本发明可以提供一种方法,其从临床样品或临床样品培养物开始,并且包括从临床样品或临床样品培养物中回收(或分离)活微生物,确定在回收的微生物的悬浮液中的完整(并因此指示)微生物的浓度,以及任选地从悬浮液制备接种物(这可以包括调节悬浮液或其一部分或等分试样中微生物的浓度)。回收的微生物或由其制备的接种物的悬浮液可用作在AST测定中制备的AST微生物测试培养物的接种物。

[0171] 如以下进一步描述的,AST测定可以以任何方便或期望的方式进行。因此,可以在不同的抗微生物剂(例如抗生素)和/或抗微生物剂(例如抗生素)的量或浓度的存在下评估(或确定)微生物生长。生长可以直接评估,也可以通过生长标志物评估(确定)。

[0172] 一般而言,通过监测抗微生物剂对微生物生长的作用来进行AST测定。包含微生物的样品用于在一系列至少两个培养容器中接种培养基(即建立至少两个AST微生物测试培养物),每个容器包含不同浓度的抗微生物剂,并将该微生物培养一段时间。以这种方式,测试一系列至少两种不同浓度的抗微生物剂,以便确定阻止微生物生长所需的最小抑菌浓度(MIC)。因此,获得的MIC值指示微生物对单个抗微生物剂是抵抗性还是敏感性。

[0173] 除了接种至少两种包含不同浓度抗微生物剂的AST微生物测试培养物外,AST分析还将具有阳性对照条件(不包含抗微生物剂的培养基)以确认该微生物是活的并且能够用于AST分析的生长培养基中的生长条件,以及阴性对照条件(未接种微生物培养物且不含抗微生物剂的培养基)以确认生长培养基未被未从临床样品中获得的微生物污染。因此,除了至少两种不同的生长条件外,用于确定样品中微生物的抗微生物敏感性的方法的步骤(iii)通常将包括设置合适的阳性和阴性对照条件。

[0174] 在一些实施方案中,可以将阳性对照样品视为提供第一浓度的抗微生物剂(即,浓度为0M),并且可以仅建立包含抗微生物剂的第二条件。在这样的实施方案中,可以评估阳性对照条件和包含抗微生物剂的条件生长,以确定抗微生物剂的敏感性。因此,“至少两种不同的生长条件,其中……每种抗微生物剂以两种或两种以上不同的浓度进行测试”可以被视为涵盖一个实施方案,其中仅将抗微生物剂添加到单一的生长条件中,而阳性对照

条件代表抗微生物剂的第二浓度。

[0175] 在一个优选的方面,对一个以上(即两个或更多个)不同抗微生物剂进行了测试,从而提供了两个或多个不同的MIC值,每种不同的抗微生物剂都有一个。不同MIC值的组合提供了给定微生物的抗微生物敏感性曲线,即微生物对哪一组抗微生物剂具有抗性,以及微生物对哪一组抗微生物剂敏感。如果需要,可以为每种单独的抗微生物剂设置单独的阳性和阴性对照条件,但是在测试多种不同的抗微生物剂的情况下,单个阳性和单个阴性对照条件是足够的。

[0176] AST方法中的微生物生长可以通过任何期望的或合适的手段,包括通过本领域已知的任何手段来评估。更特别地,可以通过确定微生物和/或微生物菌落或聚集体的量和/或数量和/或大小来评估微生物的生长。如将在下面更详细地讨论的,在某些优选的实施方案中,通过对微生物成像或通过可视化微生物表达来评估(确定)微生物生长。因此,可以将可能包括细胞的聚集体或团块(簇)或微生物菌落的微生物细胞可视化或成像,作为确定(或评估或监测)生长的手段。这可能包括对细胞或菌落进行计数,但不限于此类方法,还包括通过评估(或确定)微生物细胞的大小、面积、形状、形态和/或数量来目视评估微生物生长量的任何方法,集落或聚集体(术语“聚集体”包括物理上邻近的任何细胞集合,例如团块或簇;这可能包括聚集或粘在一起的非克隆团块/簇(例如已聚集的相邻细胞)以及克隆菌落)。用于测量微生物生长的参数可以但不必根据微生物的类别和所使用的抗菌剂而变化。确实,取决于生物体和所使用的抗微生物剂,可能会影响细胞的形态或生长方式,并且可以从“正常”或“典型”的形态或生长方式发生改变,例如在没有抗菌剂的情况下。尽管某些AST生长监测方法可能取决于检测这种变化,但是根据本发明并不一定要考虑这样的变化,并且可以确定微生物生长的量或生物量(例如面积),而与形态和/或生长模式无关。因此,可以使用相同的生长监测方法,而与所使用的微生物细胞和/或抗微生物剂无关。进行AST测定的方法在下面进一步描述。

[0177] 本发明提供了一种确定样品中完整的或活的微生物的浓度的方法,并且该信息可以用来准确地提供测试微生物培养物中特定的微生物细胞浓度。例如,一旦确定浓度,就可以调节至少一部分样品中的微生物浓度,以提供用于接种步骤(iii)中的测试微生物培养物的接种物。因此,样品中微生物细胞的浓度可以任选地,或者如果需要的话,例如通过调节落在适合用于AST测定的范围内。并非在每种情况下都需要进行此调整,即可以将样品直接用于接种在步骤(iii)中设置的一系列测试微生物培养物(即可以直接使用样品,即无需进行任何进一步的调整)。或者,可以将样品(或其等分试样)调节至所需或预定浓度。更进一步可选地,可以将样品直接(即不进行调节)用于接种一系列测试微生物培养物,并且如果需要的话,可以将测试微生物培养物中的微生物浓度调节至期望的或预定的浓度。任何此类调整将基于在浓度确定方法中确定的活微生物的浓度(即基于样品中的微生物)。

[0178] 因此,可以调节样品或其部分和/或测试微生物培养物中微生物细胞的浓度。更特别地,可以调节浓度以增加或减少微生物细胞的数量或浓度。

[0179] 在一个实施方案中,可以调节至少一部分样品中的微生物浓度,以提供用于接种步骤(iii)中的测试微生物培养物的接种物。因此,例如可以通过例如将样品培养一段时间以使微生物细胞生长来增加接种物中微生物细胞的浓度,或例如通过在接种测试微生物培养物之前通过稀释减少接种物中微生物细胞的浓度,或者例如通过选择适当的量(例如体

积)来建立测试培养物,或者在将一部分或等份的接种物添加到一定体积的抗生素和/或AST测试的培养基中时添加到固体中(例如冷冻干燥的抗生素)或者进行稀释。因此,可用样品(或其等分试样)或从其中调整的(例如稀释的)接种物接种测试微生物培养物。

[0180] 在一个实施方案中,其中样品包含微生物的浓度过高而不能用于AST分析中,则可以使用适当的缓冲液或培养基(例如液体培养基)稀释微生物培养物,以将细胞密度降低至适合进行AST的水平。优选地,使用要用于进行AST测定的培养基进行稀释。在一个实施方案中,这可以使用Muller Hinton (MH) 肉汤进行。调节浓度可以例如包括基于AST方法的步骤(ii)中确定的浓度的稀释液。

[0181] 在一个可选的实施方案中,其中样品包含的微生物浓度太低而不能用于AST测定中,可以将样品培养(或进一步培养)一段时间,以便允许其中存在的微生物生长并增加数量。可以连续或在一系列单独的时间点监测样品中存在的微生物细胞的浓度,直到微生物的浓度达到足够高的细胞密度以至于可以进行AST测定(即步骤(iii))。可以通过本文所述的用于监测AST测定本身中的生长的任何方法来监测该阶段中微生物培养物的生长,例如细胞成像或集落计数,和/或本发明的浓度确定方法可以在生长一段时间后进行。

[0182] 因此,在一个实施方案中,本发明利用了具有标准微生物浓度(例如0.5McFarland单位或 10^8 CFU/ml)或其区域中的浓度的接种物(例如样品或稀释的样品),以便接种用于AST测定中的测试培养物。样品中存在的微生物细胞的浓度可任选地或根据需要进行调节,取决于样品中存在的细胞数的增加或减少,以获得具有标准浓度的样品。备选地,样品中存在的微生物细胞的浓度可以在标准范围内,而无需执行调节步骤。无论如何,样品中存在的微生物细胞的浓度是通过本发明的方法确定的,并且可以根据需要进行调整以获得具有标准浓度的样品。可替代地,可以在不进行重新调整的情况下使用样品,并且可以基于样品中确定的微生物浓度来调节测试微生物培养物中微生物细胞的浓度(例如,通过选择用于建立测试培养物的合适的稀释因子或合适的体积)。

[0183] AST分析通常利用具有固定(或标准或标准化)细胞密度或微生物浓度的微生物培养物,以使从一个样品或一个位置获得的结果与在其他地方获得的结果进行比较,因为已知微生物对抗微生物剂的反应根据样品中微生物的浓度以及抗微生物剂本身的类型和浓度而变化。影响临床结果的因素,例如给患者开出的抗微生物剂的剂量和治疗方案,是基于根据设定的标准进行的AST分析获得的结果。

[0184] 使用“非标准”(或“非标准化”)微生物培养物进行的AST分析获得的结果(微生物的抗微生物敏感性曲线或一组MIC值)可能与AST获得的结果不同根据标准进行的测定,例如使用“标准”微生物培养。但是,如果已知用于接种AST测试培养物的样品或接种物中微生物细胞的浓度是已知的,则可以确定使用非标准微生物培养物获得的MIC值与使用标准微生物培养物获得的MIC值变化的程度。因此,可以根据使用非标准微生物培养物获得的MIC值来计算理论上的“标准”MIC值。

[0185] 使用非标准微生物培养物获得的MIC值与“标准”MIC值变化的程度可以根据微生物和抗微生物剂的性质而变化,并且可以分别确定,例如用于测试的每种不同的抗菌剂以及包含不同浓度微生物细胞的微生物培养物。

[0186] 因此,本发明提供了一种使用包含非标准浓度微生物细胞的接种物来确定微生物的抗微生物敏感性的方法,其中在进行AST分析之前测量测试微生物培养物中微生物细胞

的浓度(间接地,通过测量用于接种所述测试微生物培养物或用于制备接种物的样品中微生物细胞的浓度)(即测量样品中微生物细胞的浓度,并且可以基于在用于给出标准MIC值的从其制备的测试微生物培养物中的微生物细胞的浓度调整在AST分析中获得的MIC值。

[0187] 如上所述,在现有技术的方法中用于建立AST测试分析的标准接种物通常约为0.5McFarland单位。如上所述,这相当于大约 10^8 CFU/ml。通常将其以1:200的稀释度稀释以提供包含约 5×10^5 CFU/ml的测试微生物培养物。然而,尽管本发明的方法可以使用这些标准值,并且通常优选的是AST试验中接种的微生物试验培养物中微生物的浓度在 $4.5 \times 10^5 \pm 80\%$ 或 $5 \times 10^5 \pm 60\%$ 的范围内,在本发明的方法中,接种物(例如样品和由此制备的接种物)和/或测试微生物培养物可能包含任何确定的或预定浓度的微生物,只要已知用于获得AST值的测试微生物培养物中微生物细胞的浓度是已知的即可。因此,在其他实施方案中,AST试验中接种的微生物试验培养物中微生物的浓度可以在 $1 \times 10^5 \pm 80\%$ 或 $5 \times 10^4 \pm 80\%$ 或 $5 \times 10^4 \pm 60\%$ 等的范围内。

[0188] 因此,样品中微生物细胞的浓度可以是适合于以AST方法建立微生物测试培养物的任何所需浓度或预定浓度。因此,它可以是至少0、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 5×10^{10} 或 10^{11} CFU/ml。样品中微生物细胞的浓度优选为 10 - 10^{11} 、 10^2 - 10^{11} 、 10^3 - 10^{11} 、 10^4 - 10^{11} CFU/ml、 10^5 - 10^{11} CFU/ml、 10^6 - 10^{11} CFU/ml、 10^7 - 10^{11} CFU/ml、 5×10^6 - 10^{11} CFU/ml、 2×10^6 - 10^{11} CFU/ml、 10^6 - 10^{11} CFU/ml、 5×10^6 - 5×10^{10} CFU/ml、 2×10^6 - 5×10^{10} CFU/ml、或 10^6 - 5×10^{10} CFU/ml。

[0189] 使用具有低浓度微生物的接种物进行的AST测定的统计可靠性可能比其中包含较高浓度的微生物的接种物的实施方案差。因此,在某些实施方案中,如果确定样品中微生物的浓度特别低,则可能希望或有利的是在该阶段不继续进行AST测定。因此,在某些实施例中,当样品中微生物的浓度低于 1×10^3 CFU/ml,或更优选低于 1×10^4 、 1×10^5 或 1×10^6 CFU/ml,AST测定可以不对样品进行检测(即,在步骤(ii)之后不进行AST方法)。可选地,可以在重复进行浓度测定方法之前(例如,在培养一段时间后)增加样品中微生物的浓度,并且如果样品在此后期阶段包含足够高的微生物浓度,则可能然后进行AST分析。

[0190] 如果样品中微生物细胞的浓度低于标准浓度,则本发明的允许非标准浓度用于AST测试的AST方法具有特殊的用途,因为它可以避免将其孵育一段时间以使样品中微生物细胞的浓度增加(例如达到高于标准浓度的水平)的需求。

[0191] 本文介绍的AST方法可视为通过调整使用非标准微生物培养物进行AST分析而获得的MIC值来确定微生物的“标准”抗微生物敏感性的方法。从另一个角度来看,这提供了一种理论方法来调节用于接种AST试验中所用的测试培养物的微生物细胞的浓度,从而计算微生物的抗微生物敏感性。

[0192] 尽管可以使用非标准样品来接种用于本发明的测试培养物,但是在另一个实施方案中,本发明提供了物理上调节样品和/或测试微生物培养物中存在的微生物细胞浓度的方法。为了测试可以进行标准AST测定,测试微生物培养物中微生物细胞的浓度对应于标准或标准化浓度(例如约 5×10^5 CFU/ml)。

[0193] 样品或由其制备的接种物用于接种测试微生物培养物。如上所述,可以在建立测试微生物培养物的阶段(AST方法的步骤(iii))将样品添加到培养基中,即将样品稀释或进一步稀释。因此,可以在这一点上调节测试微生物的培养物以包含任何期望的或预定

的浓度。因此,测试微生物培养物将包含至少 10 、 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 或 10^9 CFU/ml,优选 10^2 – 10^8 、 10^3 – 10^7 或 10^4 – 10^6 CFU/ml。如上所述,因此,可以将测试微生物培养物的最终浓度设置为 $5 \times 10^4 \pm 80\%$ 、 $1 \times 10^4 \pm 80\%$ 、 $4 \times 10^5 \pm 80\%$ 、 $4.5 \times 10^5 \pm 80\%$ 或 $5 \times 10^5 \pm 80\%$ 。

[0194] 然而,应注意,构成“标准”样品的成分可以根据微生物的类别而变化,即,样品中存在的微生物细胞的浓度可以取决于微生物的类别。样品中微生物细胞的浓度优选为 10 – 10^{11} 、 10 – 10^{10} 、 10 – 10^9 、 10^2 – 10^9 、 10^3 – 10^9 、 10^4 – 10^9 CFU/ml、 10^5 – 10^9 CFU/ml、 10^6 – 10^9 CFU/ml、 10^7 – 10^9 CFU/ml。

[0195] 存在公认的和规定的AST分析条件,可以遵循这些条件,以便可以轻松获得可比的结果,这些结果可与其他实验室进行的测试相比较或对比。

[0196] 例如,这可能涉及使用规定的培养基和培养条件。在某些实施方案中,用于微生物培养的培养基可以是液体培养基,即,培养基可以是液体。

[0197] 在某些实施方案中,并行建立具有不同培养基以供不同微生物生长的测试微生物培养物可能是有利或期望的。例如,如果样品中的微生物的类别未知,或者尚未完全表征其生长方式或要求,这可能是有用的。因此,例如,可以建立在AST方法中的平行微生物测试培养物,其在生长培养基中包含或不包含苛养补充剂,或者换句话说,在苛养或非苛养性培养基中平行测试微生物培养物。苛养培养基(Fastidious media)在本领域中是众所周知的,并且预先制备的苛养培养基和苛养补充物都是可广泛购得的。苛养补充剂包括例如溶血制剂(例如溶马血)、血清、各种维生素和/或矿物质、辅因子等,例如 β -烟酰胺。方便地,可将苛养补充剂作为稀释方案的一部分添加至培养基。此外,是否使用苛养培养基或补充剂可能取决于为样品确定的微生物细胞浓度。例如,如果浓度低,例如如果样品中的微生物细胞少于 2×10^6 CFU/ml,则可以从AST方法中省去使用带有苛养培养基/补充物的微生物测试培养物。

[0198] 在某些实施方案中,并行建立测试微生物培养物也可能是有利的,所述测试微生物培养物具有优化用于测试对特定抗微生物剂的敏感性的不同培养基。测试微生物培养物中可能包含特定抗生素必需的添加剂。例如,可以包括聚山梨酯80,和/或可以在某些测试微生物培养物中提供增加的钙浓度。

[0199] 微生物可以在多种抗微生物剂的存在下生长,以确定它们对给定抗微生物剂的敏感性。可以基于微生物的类型(如果已知)来选择抗微生物剂,并且优选地还可以基于在微生物内鉴定的任何遗传抗微生物抗性标记的性质来选择抗微生物剂。还可根据当前的临床实践,例如,抗微生物剂和使用的量来选择。根据实际中当前使用哪种抗微生物剂来处理所鉴定的微生物,以便可以评估微生物对当前接受或公认的所选抗微生物剂治疗的敏感性。

[0200] 因此,可以基于已知对所鉴定的微生物有效的抗微生物剂或目前实际用于治疗微生物的抗微生物剂进行选择,并且排除基于抗性标记物的存在而可能预期产生抗性的任何药物,或此类药物尽管存在抗性标志物,但可能包括在内并且可能选择使用的量以允许确定可能有效的抗微生物剂的量或浓度。将抗微生物剂以一定的最终浓度或量添加到培养基中。在本发明的一个实施方案中,可以进行抗微生物剂的稀释。在本发明的优选形式中,将预定量的抗微生物剂预先溶解在孔中,以在溶解后产生预定浓度,所述孔中在AST之前添加具有细菌的培养基。预先沉积的抗微生物剂优选为冻干制剂。

[0201] 在AST测定法中从中生长或培养样品/微生物的步骤可以通过任何已知或方便的方式进行。可以使用固相或液相培养。

[0202] 因此,例如,在一个优选的实施方案中,可以在平板或其他固体培养基上或平板或其他固体培养基中或在包含液体培养基的容器(例如平板的孔)中培养微生物,所述液体培养基含有抗微生物剂并且微生物的生长可以通过可视化(例如成像)微生物(即成像平板等)来确定。因此,可以将培养物直接可视化或成像,以作为监测或评估生长的手段。因此,在一个优选的实施方案中,直接分析培养物以监测/评估生长。例如,培养物可以在平板的孔中生长,或者可以在载体底物的隔室中生长,并且可以对孔/隔室成像。

[0203] 备选地,可以间隔地或在不同的时间点从AST测试培养物中去除(或取出)样品(或等分试样),并且可以分析去除的样品(等分试样)的微生物生长。这可以通过任何手段来完成,包括例如通过分子测试,例如基于核酸的测试。因此,可以使用与微生物细胞或与微生物细胞释放或分离的组分结合的检测探针和/或引物。这可以包括例如可以与微生物DNA杂交的核酸探针或引物。在其他实施方案中,可以直接检测微生物细胞,例如按下面更详细描述的进行染色检测。

[0204] 除在其中不存在任何抗微生物剂的情况下允许微生物生长的阳性对照以及在不添加测试等分试样的情况下培养的至少一个阴性对照之外,每种抗微生物剂均以至少两种浓度使用。例如,使用2、3、4、5、6、7或8种或更多种浓度的抗微生物剂。稀释系列中使用的浓度在各个浓度之间可能相差两倍。

[0205] 术语抗微生物剂包括杀死微生物或抑制其生长的任何试剂。本发明的抗微生物剂可以特别包括抗生素和抗真菌剂。抗菌剂可以是杀微生物的或抑菌的。已知各种不同类型的抗生素,包括对真菌或者特别是真菌类具有活性的抗生素,并且可以使用任何或所有这些。抗生素可包括 β -内酰胺类抗生素、头孢菌素、多粘菌素、利福霉素、脂环霉素、喹诺酮、磺酰胺、大环内酯、林可酰胺、四环素、氨基糖苷、环脂肽、糖基环素、恶唑烷酮、脂环霉素或碳青霉烯。本发明的优选的抗真菌剂可以包括多烯、咪唑、三唑和噻唑、烯丙胺或棘霉素。抗菌剂正在不断开发中,并且应当理解,将来的抗菌剂也可以用本发明进行分析。

[0206] 优选地,至少一种测试微生物培养物包含苛养培养基。更优选地,至少两种测试微生物培养物,例如至少两种包含不同浓度的相同抗微生物剂的不同生长条件可以包含苛养培养基,以获得在苛养生长条件下微生物对特定抗微生物剂的抗微生物敏感性。

[0207] 抗微生物敏感性可通过培养样品中的微生物并在一定时间范围内分析AST培养物来确定。

[0208] 可以在多个时间点分析AST培养物,以监测微生物的生长。例如,可以在开始培养的0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23或24小时的时间点分析培养物。培养开始后可立即分析培养物,其中 $t=0$ 。在培养开始后的24小时后,还可以对培养物进行分析。通常,可以在培养开始后的0、1、2、3、4、6和24小时分析培养物。然而,在下面的实施例中获得和报道的结果表明,短的孵育时间足以检测不同的微生物生长,例如,4个小时。因此,也可以使用较短的总孵育时间,例如最多8、7、6、5、4、3或2小时。每小时或每2个小时或90分钟进行一次分析。如上所述,通常在两个或多个时间点分析培养物,例如在高达4、5或6小时的两个或更多个时间点。在某些实施方案中,可以在更频繁的时间点分析AST培养物。可以在 $t=0$ 时分析培养物,并且随后可以以1、2、3、4、5、10、15、20、25或30

分钟的间隔进行分析。因此,还可以有利地减少使用这种短分析间隔时所需的总孵育时间,因此可以使用长达10、15、20、25、30或60分钟的较短孵育时间。

[0209] AST分析中微生物生长的监测或评估可以通过连续或一段时间内(例如最多10、15、20、25或30分钟或最多1、2、3、4、5、6、7或8小时),或者通过比较AST生长培养(测试微生物培养)开始时的微生物细胞数量(t_0)与以后某个时间点的微生物细胞数量(例如最多10、15、20、25或30分钟或最多1、2、3、4、5、6、7或8小时),即在这段时间内发生的生长。或者,可以在两个或更多个不同的时间点确定微生物细胞物质的量(例如,在1、2、3、4、5、10、15、20、25或30分钟或1、2、3或4小时后进行第一个时间点的测量,并且在第一个时间点后的1、2、3、4、5、10、15、20、25或30分钟或1、2、3、4、5、6或7小时后或者在开始培养的2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50或55分钟或2、3、4、5、6、7或8小时后进行第二个时间点的测量)并且可以确定生长的量。在优选的实施方案中,可以在一个以上的时间点,即至少两个时间点,确定微生物的生长程度。

[0210] 在另一个实施方案中,仅在一个时间点,例如在1、2、3、4、5、6、7或8小时在抗微生物剂存在下生长的测试微生物培养物中和在不存在抗生素的情况下生长的测试微生物培养物(例如阳性对照)中评估生长。在AST生长培养开始后的一个时间点(或两个或更多个时间点)监测生长情况,可以避免在微生物生长的滞后期测量生长,从而通过避免微生物生长之间的任何差异而有利于获得更准确的结果,因为在此期间不同条件下的体积将很小并且难以检测。可以在30分钟或1、2、3或4小时后根据此方法进行第一次测量,并且可以在第一个时间点之后的1、2、3、4、5、6、7或8小时进行第二次测量)。

[0211] 然而,显而易见的是,对于某些微生物(例如某些厌氧菌),分枝杆菌或真菌的微生物生长可能较慢,因此AST分析可能需要更长的时间。因此,根据本发明的某些实施方案,通过测量8、9、10、11或12小时或更长时间(如12、18或24小时)的微生物生长来进行AST测定可能是必要的或期望的。可以相应地在一个或多个时间点进行合适的测量。

[0212] 在一个优选的实施方案中,相对于每种生长条件中微生物细胞的初始数量(量或浓度),可以在至少两种生长条件(例如每种生长条件)中测量生长。

[0213] 待测微生物培养物的培养可以在任何促进微生物生长的温度下进行,例如:约20℃至40℃、或20至37℃,优选约25℃至37℃,更优选约30℃至37℃或30至35℃。在一个实施方案中,AST培养物可以在约35℃下培养。

[0214] 已知许多监测或评估微生物生长的方法,这些方法已用于AST分析中,例如测量抗生素或微生物的降解产物、测量核酸含量或测量气体(例如CO₂)产物的浊度测量、比色测定、光检测、光散射、pH测量、光谱测量、荧光检测。可以使用这些中的任何一种。然而,根据本发明的优选实施方式,可以通过确定或评估微生物细胞的数量和/或量和/或大小和/或面积来检测和评估生长。如上所述,微生物细胞可以包括菌落和/或聚集物中的细胞。这可以通过用已知的测量或检测微生物的任何方法评估或确定在抗微生物剂存在下生长之前和/或之后存在的微生物的数量或量来实现。这样的确定可以涉及确定微生物细胞、聚集体和/或集落的数量和/或大小。同样,用于此目的的技术是已知和可用的。因此,可以通过随时间监测微生物和/或微生物细胞和/或菌落和/或聚集体的数量和/或量和/或大小来测量生长。这可以直接或间接地测量。微生物的数量或量可以直接通过血细胞计数、流式细胞术或自动显微镜检查来测量。在检测之前,微生物可以被固定和/或渗透。或者,可以在体内条

件下检测微生物。

[0215] 通过使用流式细胞术的细菌细胞计数监测来进行AST分析的方法在Broeren等, 2013, Clin. Microbiol. Infect. 19. 286-291中进行了描述。其中通过自动显微镜在多通道流体盒中生长和计数细菌的AST测定的方法描述于Price等, 2014, J. Microbiol. Met. 98, 50-58以及Metzger等, 2014, J. Microbiol. Met. 79, 160-165, 以及Accelerate Diagnostics (参见例如W0 2014/040088 A1、US 2014/0278136 A1和US 8,460,887 B2)。在这些方法中, 细菌被固定并在表面上生长, 并且通过在两个或更多个时间点对表面成像来评估单个细菌和/或菌落的生存力和/或生长(包括测量菌落的生长)。根据本发明可以使用这样的方法。已知的其他方法如Fredborg等, J Clin Microbiol. 2013 Jul; 51 (7) : 2047-53以及Unisensor (US 8780181), 其中使用明场显微镜通过对溶液进行一系列堆叠的图像(对象平面)并对存在于样品的细菌进行计数而对溶液中的细菌进行成像。

[0216] 尽管可以使用基于使用成像来监测微生物生长的任何方法, 但是在AST测试步骤(AST方法的步骤(iv))中的本发明的方法优选地不依赖于对单个细胞的计数或不依赖监测单个细胞或克隆的生长(例如依赖于根据Accelerate Diagnostics Inc.的方法监测单个细胞或菌落大小的增加)。因此, 本发明不限于(并且在优选实施例中不涉及)使用用于对AST培养物或AST培养样品成像的固定位置。而是, 根据本发明, 优选监测AST培养物中细胞的大量生长, 例如通过在视场中对大细胞成像。视场中的微生物细胞物质(生物物质)的量(例如面积)可以通过成像来确定。细胞/微生物生物物质可以直接(例如通过显微镜或照相机等)检测, 例如使用明场显微镜或微生物细胞可染色以进行检测, 例如通过在预定或所需的生长时间后通过向AST培养物或培养物样品中添加染色剂来实现。

[0217] 因此, 在评估微生物测试培养物中的生长的步骤(iv)中, 这优选地通过将测试培养物成像在可用于成像的培养物的大(显著或实质的)部分上来进行。此外, 在步骤(iv)中, 可以在不预先选择用于成像的测试培养物的种群或部分的情况下进行成像。可能会生成液体(肉汤)培养物的延时图像。

[0218] 在另一个特定的实施方案中, 可以在不固定微生物细胞或不驱动或不主动将其转运至例如表面的情况下直接对AST培养物成像或可视化。无需施加力(例如电泳), 即可将细胞定位到成像的检测位置或表面。

[0219] 在这样的成像方法中, 可以应用算法来根据本领域众所周知的方法和原理从图像确定微生物生长量的值。因此, 可以基于图像中微生物细胞物质/生物物质的数量、大小和/或面积(例如, 在视图的图像/场中所有微生物细胞物质的量, 例如成像的总细胞物质)将统计方法应用于微生物细胞图像。基于存在于培养物中的微生物和抗微生物剂的类别, 可以编写算法以考虑不同的生长模式和/或形态。在我们共同待审的申请W0 2017/216312中描述了一种用于测量样品中微生物生物物质的量以及由此得到微生物生长的示例性图像分析算法, 该算法结合阈值和纹理过滤, 并且这样的方法也可用于评估在本发明的AST方法中微生物的生长。这种计数或成像方法允许在AST测定中对微生物进行数字表型分析。已经获得的数据表明, 这种数字表型测定提供的MIC值与参考技术(例如微量肉汤稀释法)相似。

[0220] 使用这样的方法的一个特别的优点是可以对包含多种浓度或数量范围的微生物的测试微生物培养物进行抗微生物敏感性测试, 并且在进行抗微生物敏感性测试之前不必使用标准化的微生物滴度。本发明的有用特征是使用不同浓度的微生物的能力。包含至少

10³CFU/ml的测试微生物培养物或样品可以用于本发明的方法,例如可以使用包含至少10³、10⁴、10⁵、10⁶、10⁷、10⁸、10⁹、10¹⁰或10¹¹CFU/ml的样品(AST测试样品)。备选地,可以使用包含小于10³CFU/ml(例如至少10²CFU/ml)的测试微生物培养物或样品。包含小于10²CFU/ml的测试微生物培养物或样品也可以用于本发明的方法。

[0221] 尽管明场成像代表了一种用于测定测试微生物培养物中微生物细胞浓度的格式,但是在本发明的一个实施方案中,可以在确定AST测试培养物的微生物数量或量特征之前通过添加对微生物进行染色的标记物(即染色剂或染料)或通过利用微生物固有特性的方法(例如相差)或本领域已知的用于量化样品中细菌数量的任何其他方法来检测微生物。合适的染色剂可以包括有色或荧光染色剂,例如革兰氏染色或用于肽聚糖或DNA染色的其他染色,作为可视化微生物的手段。在本发明的一个特定实施方案中,可以使用Vybrant® DyeCycle™对微生物内的DNA进行染色。其他DNA染色剂是众所周知的且可用。实际上,在本领域中可用于细菌染色的染色剂的数量是巨大的,并且包括标准参考文献在内已经记录了大量的此类染色剂,并且可商购获得,例如从Life Technologies获得。通过染色直接标记微生物容易进行,方便且具有成本效益,因此代表了优选的实施方案。

[0222] 因此,例如,可以在微量滴定板的孔中培养微生物以进行AST分析(即,每个测试微生物培养物都可以在板的孔中),并且可以在生长期结束时添加染色剂或染料,并且通过由计数或成像确定而微生物细胞、聚集体或菌落的数量和/或大小可以对板孔进行成像并评估微生物或微生物细胞的数量或量。或者,可使用流式细胞仪或类似类型的仪器,例如来自Q-linea AB(瑞典)的Aquila 400仪器,如美国专利申请61/979319中所描述的。

[0223] 用于图像分析的算法在本领域中是众所周知的和可用的,以便能够分析图像并得出或获得微生物生物量等的值。如上所述,在WO 2017/216312中描述了一种这样的图像分析技术,这代表了在AST测试中评估和确定微生物生长的优选方式。

[0224] 可以使用其他算法来得出样品中微生物的一种或多种抗生素的MIC值。在这方面,尽管鉴定微生物可以帮助建立AST测试,但它不是该方法的先决条件,并且在执行或设置该方法时不需要知道微生物ID。因此,就测试结果的速度而言,当样品中微生物的类别(ID)未知时,可以启动AST方法,但是该ID可用于结果的解释,例如AST微生物时对测试培养物进行成像,和/或在分析成像结果时进行成像。无需微生物ID即可获得MIC值,但是ID信息对于确定或解释微生物的SIR(敏感/中间/耐药)信息很重要。从成像分析获得的生长数据中获得或获得MIC和/或SIR信息的数据处理技术是众所周知的,并且对于本领域技术人员而言是可用的。

[0225] 在另一个实施方案中,可以通过微生物内部或之上的生物学特征对微生物进行特异性标记。“生物学特征”可以例如是微生物中或上的分子,例如在细胞表面表达或定位的蛋白质或其他生物分子。例如标签,例如可将有色或荧光标记物与特异性结合特定生物学特征的蛋白质或其他亲和结合分子偶联。在一个实施方案中,蛋白质可以是凝集素、亲和体或抗体、或抗体片段。可以检测以这种方式标记的微生物,例如如前所述的枚举。

[0226] 在另一个实施方案中,可以使用邻近探针来检测微生物内或微生物上的特定生物学特征。

[0227] 在本发明的另一替代实施例中,可以使用挂锁探针和基于RCA的扩增单分子检测(ASMD)方法检测并枚举测试微生物培养物中的微生物。这样的方法使得能够检测和计数单

个微生物细胞。因此,可以通过挂锁探针的结合来检测微生物,并且可以通过经由环化的挂锁探针的RCA产生的放大信号间接地测量微生物的数量。每个RCA产物(斑点)可能表示单个微生物。可以裂解微生物,并且可以使用设计成与微生物的一个或多个核苷酸序列杂交的挂锁探针。这可以包括分离DNA的步骤,并且优选地包括选择性分离或富集微生物DNA的步骤。由于在AST分析中测试微生物培养物通常不如在初始样品中复杂,因此可以使用简化的方案来分离或富集微生物DNA,包括例如过滤以分离微生物和微生物细胞裂解或简单地直接进行微生物细胞裂解。

[0228] 或者,可以使用与存在于微生物上或裂解的微生物内的一个或多个分子结合的亲和力结合分子,这种亲和力探针带有核酸标记或标签,挂锁探针可以与之杂交,即类似于免疫RCA检测程序。类似地,邻近探针可用于结合至微生物中或微生物上的靶标,并且邻近探针的核酸结构域可用于模板化挂锁探针的连接,并且还任选地通过RCA引发其扩增。该方法是众所周知的,并在文献中有描述。例如Dahl等,2004,PNAS USA,101,4548-4553和WO 03/012199 Dahl等,2004,PNAS USA,101,4548-4553和WO 03/012199中描述的环至环的扩增(C2CA)可用于信号扩增。因此,可以通过计数斑点的数量来估计样品中微生物的数量,所述斑点可以被如上所述的标记(例如荧光标记)为样品中的“斑点”。因此,这提供了获得数字表型敏感性读数的另一便利手段。

[0229] 一般而言,在进行AST测定时,对于待测微生物培养物是纯的,即对于单一微生物而言,是有利的。但是,这不是必不可少的特征,可以使用基于可视化或成像的微生物检测方法来进行AST分析,例如Accelerate Diagnostics提供的方法,该方法使用表面而非溶液中细菌的成像,或实际上是在流体系统中检测标记微生物的方法,例如如上所述的Price等,2014,J.Microbiol.Met.98,50-58和Metzger,2014.J.Microbiol.Met.79,160-165。任何细胞间检测或形状识别和/或鉴定方法都可以用于AST分析包含一种以上微生物的样品。进一步已知,相同的抗生素可能会对不同的微生物有不同影响,因此,在使用特定抗生素处理后,生物的外观可用于共培养中每种微生物的鉴定和AST测定。

[0230] 方便地,本发明的方法可以是自动化的。多个步骤中的任何一个可以是自动化的,优选地,步骤(a)至(e)中的任何一个或全部是自动化的。上面讨论的各种特定或优选步骤非常适合自动化,例如使等分试样与染色剂接触和/或稀释试样的等分试样,和/或在本发明的浓度测定方法中对等分试样/染色混合物进行成像,以及AST测定和从样品中回收微生物。已经开发了包括血培养方法在内的自动培养方法,并且这些方法可以与例如根据本发明使用的自动浓度确定和/或AST测定法相结合。自动化将带来速度和操作简便性以及多路复用能力的优势,这在临床实验室环境中非常重要,在败血症的诊断中尤其重要。

[0231] 本发明还扩展到用于执行本文描述的方法的设备。因此,根据另一方面,本发明提供了一种用于确定样品中完整微生物的浓度的设备,所述设备包括:

[0232] a. 用于接收含有微生物的样品的容器;

[0233] b. 样品等分装置,用于从所述样品中取出样品等分试样;

[0234] c. 包含第一染色剂和第二染色剂的染色剂储存器,或包含第一染色剂的第一染色剂储存器和包含第二染色剂的第二染色剂储存器,其中所述第一染色剂是荧光染色剂,是可渗透细胞的,并具有第一发射波长,并且所述第二染色剂是不可渗透细胞的,并且能够在FRET对中充当受体分子,而所述第一染色剂充当供体分子;

[0235] d. 第一成像装置,其可操作用来在第一发射波长下对所述样品等分试样和所述第一和第二染色剂的混合物进行成像;以及

[0236] e. 处理器,其可操作用来确定与成像的混合物中的完整微生物对应的对象的数量图像分析值,并将所述图像分析值与预定校准曲线进行比较,从而确定所述样品中完整微生物的浓度。

[0237] 上面描述的设备可以被配置为执行本文描述的如本发明方面的方法,可选地包括那些方法的一些或全部优选特征。该设备可以具有如结合上述方法所描述的特征,并且这些特征可以出于上述目的并且提供类似的优点。

[0238] 该设备可以包括:含有稀释剂的稀释剂储存器,以及用于从所述稀释剂储存器中取出稀释剂等分试样的稀释剂等分装置。该设备被配置为使所述样品等分试样与所述稀释剂等分试样接触以提供处于稀释值的稀释等分试样,并且优选地该设备包括用于接收该稀释的等分试样的容器,并且可以任选地使样品等分试样与稀释等分试样在这样的容器中接触。

[0239] 该设备可以被配置为以不同的稀释值从样品中提供两个或更多个稀释等分试样。因此,在某些实施方案中,该装置可以包括另外两个容器,用于接收两个或更多个稀释等分试样中的每一个。所述设备可以进一步被配置为在第一容器中以第一稀释值从样品中提供第一稀释等分试样,并且使所述稀释等分试样的一个等分试样与第二容器中的其他稀释等分试样接触,从而制备第二稀释值的第二稀释等分试样。

[0240] 可选地,该设备可以被配置为在制备稀释的等分试样之前,同时或之后将第一和第二染色剂引入到用于接收稀释的等分试样的容器中。

[0241] 处理器优选地被配置为确定图像分析值是否落在预定校准曲线的范围内。

[0242] 优选地,第二染色剂具有第二发射波长,并且第一成像装置可操作以在第二发射波长对等分试样以及第一和第二染色剂的混合物成像,可选地与在第一发射波长成像同时进行。

[0243] 样品可以包含生长培养基中包含的微生物。

[0244] 在一个优选的实施方案中,第二染色剂具有比第一染色剂更高的DNA结合亲和力,使得第二染色剂能够从DNA置换第一染色剂。第二染色剂可以是荧光染色剂,可选地是红色荧光染色剂,并且优选是碘化丙啶。

[0245] 当染色剂与核酸结合时,优选地增强在所述第一发射波长处的第一荧光染色剂的荧光强度。

[0246] 第一荧光染色剂可以具有在350-700nm的波长范围内的激发波长和发射波长。第一荧光染色剂可以是绿色荧光染色剂。第一荧光染色剂可以是不对称花菁染料。

[0247] 第一成像装置可以是显微镜。该显微镜可以配置为使用一种或多种显微镜技术,包括:明场、斜场、暗场、色散染色、相差、微分干涉差、荧光、共焦、单平面照明、光片和宽视场多光子显微镜。

[0248] 优选地,该设备包括用于成像的孔,其中该孔用于容纳样品等分试样和第一和第二染色剂或稀释等分试样和第一和第二染色剂的混合物的至少一部分。成像装置优选地被配置为穿过孔的深度在一个或多个焦平面上获得图像。成像装置可以被配置为沿着成像装置的光轴获得一系列2-D图像,其中,每个图像是沿着光轴在不同位置处获得。

[0249] 优选地,处理器可操作来分析图像以检测与完整微生物或其聚集相对应的对象。处理器可以被配置为通过对每个对象中包含的连续像素的数量进行计数来确定每个对象的面积,并且可选地被配置为对具有低于预定面积阈值的面积的对象不计数。处理器可以被配置为确定每个对象的形态,例如每个对象的圆形度和/或对象中荧光强度的均匀度。处理器可以进一步被配置为确定每个对象的最大荧光强度和/或平均或中值荧光强度,并且可选地被配置为对具有低于预定最大荧光强度阈值的最大荧光强度的对象或具有低于预定阈值的模态或中值荧光强度的对象不计数。处理器可以被配置为确定每个对象的对象分析值,所述对象分析值对应于所述对象面积与所述对象的最大荧光强度或模态荧光强度的乘积,并且被配置为计算与所述对象的对象分析值之和相对应的图像分析值。

[0250] 在某些实施例中,处理器可操作以针对以上概述的任何一个或所有因素来确定成像对象的种群的参数。因此,处理器可以被配置为针对每个成像对象分配因素的值,并确定对象群的所述因子的中值或平均值,和/或确定一个或多个所述成像对象群的因素方差或标准差。

[0251] 在一个优选实施例中,处理器可操作以确定(优选地基于图像的分析来确定)微生物是聚集的还是非聚集的,并且基于该确定,可操作地根据情况使用(即选择)适合于聚集或非聚集微生物的预定校准曲线。

[0252] 上述设备可用于抗生素敏感性测试(AST)中,以确定至少一种抗微生物剂的至少一个最小抑制浓度(MIC)值。

[0253] 该设备可以包括用于测试微生物培养物的多个孔。在那种情况下,该设备优选地被配置为使用样品在所述孔中接种一系列测试微生物培养物,其中一系列测试微生物培养物可以包含至少两种不同的生长条件,其中不同的生长条件可以包含一种或多种不同的抗微生物剂,以及两种或更多种不同浓度的抗微生物剂,任选地其中多个孔包括所述至少两种不同的生长条件。

[0254] 该设备优选地包括用于评估每种生长条件下微生物生长程度的成像装置。在一实施例中,成像设备是线照相机。

[0255] 处理器优选地被配置为基于每种生长条件下微生物的生长程度从至少一种抗微生物剂确定至少一个MIC值。

[0256] 该设备可以被配置为基于所确定的样品中完整微生物的浓度来调节样品的至少一部分的浓度,以接种一系列测试微生物培养物。优选地,该设备被配置为通过稀释至少一部分样品或通过培养或进一步培养样品来调节至少一部分样品的浓度。

[0257] 在一些实施方案中,至少一种测试微生物培养物包含苛养培养基。

[0258] 该设备可以包括一种或多种消耗物。例如,该设备可以包括第一消耗物,在该第一消耗物中提供了染色剂储存器。样品等分试样和第一和第二染色剂的混合物可以在第一消耗物中成像。可替代地,样品等分试样和第一和第二染色剂的混合物可以在第二消耗物中成像。

[0259] 用于测试微生物培养物的上述多个孔可以设置在第一消耗物中,或在第二消耗物中,或在第三消耗物中。

[0260] 该设备优选地被配置为从样品中回收微生物,从而提供回收的微生物样品。在那种情况下,该设备可包括裂解缓冲液储存器,其包含用于选择性裂解样品中非微生物细胞

的缓冲液和用于从样品中回收完整微生物的回收工具。裂解缓冲液储存器和回收工具可以设置在第一消耗物中。回收装置优选是过滤器。

[0261] 该设备优选是自动化的。

[0262] 本发明还扩展到使用该设备(即,前述方面的设备,可选地并入上述一些或所有可选特征)来确定样品中完整微生物的浓度,以用于抗生素敏感性试验(AST),以确定至少一种抗微生物剂的至少一个最小抑菌浓度(MIC)值。

[0263] 在另一方面,本发明提供了一种浓度测定消耗物,包括:染色剂储存器,其包含第一染色剂和第二染色剂,或包含含有第一染色剂的第一染色剂储存器和含有第二染色剂的第二染色剂储存器,其中所述第一染色剂是荧光染色剂,是可渗透细胞的,并具有第一发射波长,并且所述第二染色剂是不可渗透细胞的,并且能够在FRET对中充当受体分子,而所述第一染色剂充当供体分子;以及用于成像的孔,用于成像的孔,其中所述孔用于容纳样品等分试样和第一和第二染色剂的混合物的至少一部分,或稀释等分试样和第一和第二染色剂的混合物的至少一部分。

[0264] 浓度确定消耗物可包括裂解缓冲液储存器,其包含用于选择性裂解样品中非微生物细胞的缓冲液。

[0265] 浓度确定消耗物可包括用于从样品中回收完整微生物的回收装置,其中该回收装置优选为过滤器。

[0266] 浓度确定消耗物可以可替代地或另外地包括含有稀释剂的稀释剂容器。浓度确定消耗物优选地进一步包括一个或多个容器,用于接收样品的稀释等分试样。

[0267] 在最后一个方面,本发明提供了一种浓度测定试剂盒,包括:包含染色剂储存器的第一消耗物,所述染色剂储存器包含第一染色剂和第二染色剂,或所述染色剂储存器包含含有第一染色剂的第一染色剂储存器和含有第二染色剂的第二染色剂储存器,其中所述第一染色剂是荧光染色剂,是可渗透细胞的,并具有第一发射波长,并且所述第二染色剂是不可渗透细胞的,并且能够在FRET对中充当受体分子,而所述第一染色剂充当供体分子;以及包含用于成像的孔的第二消耗物,其中所述孔用于容纳样品等分试样和第一和第二稀释剂的混合物的至少一部分,或用于容纳稀释等分试样和第一和第二染色剂的混合物的至少一部分。

[0268] 第一消耗物可进一步包括裂解缓冲液储存器,其包含用于选择性裂解样品中非微生物细胞的缓冲液;和/或用于从样品中回收完整的微生物的回收工具,其中所述回收工具优选为过滤器;和/或稀释剂储存器,其包含稀释剂,并且优选地是用于接收所述样品的稀释等分试样的容器。

[0269] 图1显示了从血液培养物中回收的流感嗜血杆菌(A)或铜绿假单胞菌(B)样品中测得的完整微生物的数量,并在4℃、室温和35℃下与染色液一起孵育。

[0270] 图2显示了针对一系列不同微生物的样品中完整微生物的浓度与通过成像确定的对象数量之间的关系的组合数据。数据显示出良好的线性,在不同微生物之间的分布约为一个量级或等级。此外,金黄色葡萄球菌(聚集微生物)偏离主要数据。

[0271] 图3显示了针对所有非聚集微生物的来自于图2(轴反转)的组合数据,根据EUCAST的建议,回归线适应于最大程度地减少落在最佳拟合线的 $\pm 60\%$ 边界之外的实验点的数量。

[0272] 图4显示了针对单个微生物的来自图3的数据。(A-肺炎克雷伯菌;B-流感嗜血杆菌;C-铜绿假单胞菌;D-奇异变形杆菌;E-粪肠球菌;F-肺炎链球菌)。发现相同的校准曲线适用于所有测试的非聚集微生物。

[0273] 图5显示了金黄色葡萄球菌的数据和校准曲线。金黄色葡萄球菌需要单独的校准曲线,因为这是在这些实验中测试的唯一聚集微生物。

[0274] 图6显示了针对所有非聚集微生物的来自于图2(轴反转)的组合数据,回归线适应于最大程度地减少落在最佳拟合线 $\pm 80\%$ 界线之外的实验点的数量。除流感嗜血杆菌外,所有高于检测限的数据点均在这些范围之内。

[0275] 图7显示了针对单个微生物A-肺炎克雷伯菌;B-流感嗜血杆菌;C-铜绿假单胞菌;D-奇异变形杆菌;E-粪肠球菌;F-肺炎链球菌)的来自图6的数据,边界为 $\pm 80\%$ 。相应地调整了最佳拟合曲线。发现相同的校准曲线适用于所有测试的非聚集微生物。

[0276] 图8显示了金黄色葡萄球菌在 $\pm 80\%$ 边界处的数据和校准曲线。

[0277] 图9显示了根据本发明的实施例的适合于接收细胞培养物的第一AST设备的示意性的简化图。

[0278] 图10显示了根据本发明的实施例的适合于接收细胞培养物的第二AST设备的示意性的简化图。

[0279] 图11显示了根据本发明的实施例的适合于接收细胞培养物的第三AST设备的示意性的简化图。

[0280] 图12显示了根据本发明的实施例的适合于接收细胞培养物的第四AST设备的示意性的简化图。

[0281] 图13显示了根据本发明的实施例的适合于接收细胞培养物的第五AST设备的示意性的简化图。

[0282] 图14显示了根据本发明的实施例的适合于接收细胞培养物的第六AST设备的示意性的简化图。

[0283] 图15显示了根据本发明的实施例的适合于接收细胞培养物的浓度确定设备的示意性的简化图。

[0284] 图16显示了适用于图9至图14的AST设备或图15的浓度确定设备的消耗物。

[0285] 实施例1-浓度测定以及建立AST分析

[0286] 将样品的第一等分试样(20 μ l)在80 μ l PBS中稀释,并将15 μ l的稀释混合物的等分试样添加至含有10 μ M SYTO BC和3 μ M碘化丙啶的15 μ l染色剂的溶液中,以提供第一稀释等分试样/染色剂混合物。将等分试样的样品/PBS混合物(20 μ l)在180 μ l PBS中进一步稀释,然后将15 μ l等分试样在15 μ l染色液中稀释,以提供第二稀释等分试样/染色剂混合物。

[0287] 将第一和第二稀释等分试样/染色剂混合物转移到单独的成像孔中,深度约为2mm。使用在502-561nm处的发射滤光片检测在509nm处的SYTO BC发射峰,在光轴方向上相距30 μ m,获得了每个孔的悬浮液中的微生物的50个图像。对获得的图像进行阈值处理并进行分析,以确定与完整微生物相对应的每个对象的大小、荧光强度和可选的形态,以获得每个稀释等分试样的图像分析值。样品中微生物的特征用于选择预定的校准曲线以用于浓度确定步骤(例如,确定样品是聚集微生物还是非聚集微生物)。识别出图像分析值在预定校准曲线范围内的稀释等分试样之一。通过将所选稀释等分试样的图像分析值与预定校准曲

线进行比较,可以确定样品中完整微生物的浓度。

[0288] 如果需要,通过使用合适的生长培养基(例如阳离子调节的Mueller Hinton肉汤(CAMHB))进行稀释来调节样品的至少一部分的浓度,可以制备用于接种一系列抗微生物敏感性试验(AST)分析用的测试微生物培养物的接种物。将接种物(或接种体)制备为浓度为 5×10^5 CFU/ml,并将其添加到一系列含有冷冻干燥抗微生物剂的孔中,以制备在AST分析中的至少两种不同的生长条件下的一系列测试微生物培养物。

[0289] 实施例2-染色剂孵育温度对浓度确定的影响

[0290] 将加有流感嗜血杆菌或铜绿假单胞菌的10ml血液添加到Bactec烧瓶(BD)中,孵育过夜,直到获得阳性培养结果。使用裂解缓冲液对血液培养瓶中存在的非微生物细胞进行选择裂解,并使用0.2 μ m尼龙网状过滤器过滤样品。过滤后,用阳离子调节的Mueller Hinton肉汤(CAMHB)洗涤样品,并通过反冲洗CAMHB使其通过滤膜而重新悬浮。

[0291] 如实施例1所述,将回收的微生物样品的稀释等分试样进一步稀释并与染色剂溶液接触。将稀释等分试样/染色剂混合物用箔纸覆盖,并在4℃、室温或35℃下孵育5分钟。如实施例1中概述的对每个等分试样成像并分析图像,以确定对应于完整微生物的对象数目的图像分析值。在每个温度下对每个稀释的等分试样进行重复。还确定了对照样品的图像分析值。比较在每个温度下制备后确定的图像分析值,发现流感嗜血杆菌的所有温度都相似。发现铜绿假单胞菌的室温和35℃的制备是相似的。在所有温度下,对于对照样品也确定了相似的值。

[0292] 将回收的微生物样品的等分试样在PBS中稀释为 1×10^{-4} 、 1×10^{-5} 和 1×10^{-6} 的因数,并铺板以确认微生物的存活力。

[0293] 实施例3-准备预定校准曲线

[0294] 收集了许多不同浓度的不同微生物的数据,并在图表上绘制了计数对象数与完整微生物浓度之间的关系(图2)。这些数据表明,对于大多数微生物物种的计数对象数与完整微生物的浓度之间存在线性关系(尽管在测量的不同种的对于给定浓度的计数对象的数量分布接近一个数量级的级别)。

[0295] 将来自非集群微生物的运行汇总数据合并,以计算出最佳拟合线(图3)。生成最佳拟合线并不是为了提供数学上的最佳拟合线,而是根据EUCAST指南进行了准备,以使落入 $\pm 60\%$ 限制范围之外的数据点数量最少。将单个微生物的数据与生成的最佳拟合线进行比较。低于检测极限的计数显示在阴影区域。因此,相同的最佳拟合线可用于确定样品中革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌的浓度。

[0296] 计算了金黄色葡萄球菌(一种聚集的微生物)的单独的最佳拟合线(图5)。

[0297] 流感嗜血杆菌的大部分数据点都超出了用于最佳拟合的初始 $\pm 60\%$ 的界限。对于非聚集(图6和7)和聚集(图8)微生物,生成了基于 $\pm 80\%$ 边界的新的最佳拟合曲线。除流感嗜血杆菌外,所有高于检出限的数据点均在新的范围之内。

[0298] 图9示出了适用于分析细胞培养物样品的第一AST设备1的示意性简化图。第一AST设备1包括可操作的以控制第一AST设备1内的子系统的处理器10,所述子系统包括样品移液管12(即样品等分装置)、稀释液移液管14(即稀释剂等分装置)、显微镜16(即第一成像装置16)和线相机18(即第二成像装置)。

[0299] 第一AST设备1接收第一消耗物30a,其中提供有样品容器31(即,用于接收样品的

容器)、稀释剂储存器35、稀释等分试样容器36(即,用于接收稀释等分试样的容器)、包括第一和第二染色剂染色剂储存器37,以及成像孔38。成像孔38具有至少2mm×2mm的可视区域,以及足以允许至少2mm的液体深度的深度(例如3mm)。

[0300] 设备1还接收第二消耗物40a,其包括用于测试微生物培养的多个孔42,其中孔42包含多种不同的抗微生物剂,并且每种抗微生物剂以多种浓度提供。

[0301] 在使用中,用户将样品(未示出)装载到第一消耗物30a中的样品容器31中,并将第一消耗物30a装载到第一AST设备1中。

[0302] 在使用中,处理器10被配置为:

[0303] -使用稀释剂稀释在稀释等分试样容器36中的细胞培养物样品,该稀释剂转移自稀释剂储存器35;

[0304] -将稀释等分试样从稀释等分试样容器36转移到成像孔38;

[0305] -将第一和第二染色剂从染色剂容器37转移到成像孔38;

[0306] -使用显微镜16对成像孔38成像,以确定细胞浓度;

[0307] -将稀释等分试样从稀释等分试样容器36转移到孔42;

[0308] -控制线相机18对孔42成像以评估每个孔中的微生物生长程度;以及

[0309] -分析图像以确定抗微生物剂的MIC值,以确定样品中微生物的抗微生物敏感性。

[0310] 第一和第二染色剂能够与DNA结合以提供样品-染色剂混合物。第一染色剂是荧光染色剂,是可渗透细胞的,并且具有第一发射波长,第二染色剂是不可渗透细胞的,并且能够在FRET对中充当受体分子,而第一染色剂充当供体分子。在此实施例中,第一个染色剂是SYTO9,第二个染色剂是碘化丙啶。

[0311] 处理器10可操作以控制显微镜16以在第一发射波长对成像孔38成像。在使用中,显微镜16聚焦在成像孔38内的平面上,例如平行于底部,并与底部间隔一定距离(在该实施例中,距底部0.2mm)被移除,并且被配置为在成像期间穿过液体连续移动焦平面,例如在图像采集期间(例如20-30秒)总计1.5mm。

[0312] 处理器10可操作以分析由显微镜16获得的图像,以确定与成像的混合物中的完整微生物对应的对象数量的图像分析值。处理器10被配置为将图像分析值与预定校准曲线进行比较,从而确定样品中完整微生物的浓度。

[0313] 图10和11中显示了两个类似的AST设备。两者也都适用于分析细胞培养样品。这些设备的组件与第一AST设备1的组件大致相似,并且在此不再重复对相应特征的讨论。相反,讨论集中在与图9所示的第一AST设备1相比的差异上。特别地,差异涉及成像孔38的位置。

[0314] 图10显示了第二AST设备2的示意性简化图。在第一AST设备1中,成像孔38位于第一消耗物30a中,而从第二AST设备2的第一消耗物30b中省略了成像孔,而是将其设置在第二消耗物40b中。

[0315] 图11显示了第三AST设备3的示意性简化图。第三AST设备3接收第一消耗物30b(如参考图10所述)和第二消耗物40a(如参考图9所述),并且还接收第三消耗物50。成像孔38提供在第三消耗物50中。

[0316] 图12至图14显示了三个进一步的AST装置4、5、6的示意性简化图,它们适合于接收患者样品(例如,来自血液培养瓶的血液样品)。图12至图14分别大致类似于图9至图11。每种情况的区别在于,第一消耗物30c(包括成像孔)和30d(不包括成像孔)包括其他组件,以

便准备患者样品进行分析。第一消耗物30c和30d包括裂解缓冲液储存器32、过滤器33(即回收装置)和重悬的细胞容器34(即用于接收样品的容器)。

[0317] 图12至图14所示的进一步AST设备4、5、6的处理器10还被配置为:

[0318] -使样品移液管12将样品的等分试样从样品容器31转移到注射器(未示出),以与来自裂解储存器32的裂解缓冲液混合;

[0319] -通过过滤器33过滤裂解的样品;

[0320] -通过使用培养基(来自培养基储存器,未显示)将微生物细胞从过滤器33重悬从而从过滤器33中回收微生物细胞;

[0321] 图15示出了浓度确定设备7,其与图11所示的第三AST设备3类似,不同之处在于浓度确定设备7不包括使图11的AST设备3适合于执行AST分析的组件。浓度确定装置7适合于仅执行浓度确定分析。与图11所示的第三AST设备3相比,图15的浓度确定装置7省略了第二消耗物40a和线照相机18。在该实施例中,浓度确定设备7包括如以上参考图10所述的第一消耗物30b和如以上参考图11所述的第三消耗物50。即,成像孔38设置在与第一消耗物30b分开的消耗物中。浓度确定装置7适合于接收细胞培养样品。在另一实施例中(未显示),其中浓度确定设备适于接收患者样品(例如,来自血液培养瓶的血液样品),第一消耗物30b被第一消耗物30d代替,使得浓度确定设备包括裂解缓冲液储存器32、过滤器33(即回收装置)和重悬细胞容器34(即用于接收样品的容器)。

[0322] 在类似的实施例中(未示出),浓度确定设备7可以替代地使用第一消耗物30a(如以上参考图9所述)或第一消耗物30c(如以上参考图12所述)。这两个都包括成像孔38,在这种情况下,可以省去第三消耗物50。在使用第一消耗物30a的情况下,浓度确定设备适合于接收细胞培养样品。在使用第一消耗物30c的情况下,浓度确定设备适合于接收患者样品(例如,来自血液培养瓶的血液样品),因为该设备包括裂解缓冲液储存器32、过滤器33和重悬浮细胞容器34。

[0323] 图16显示了适合用作第二消耗物40a或40b或第三消耗物50的消耗物100。该消耗物在W0 2017/216314中详细描述。如图16所示,消耗物100具有三层。光学上平坦的第一层110形成基础层。第二层114放置在第一层110的顶部,并且形成有用于将流体保持在经由通道118连接的孔116(对应于孔42)中的容积。第一层110封闭孔116的底部。第三层120覆盖孔116和通道118的顶部。第三层120在每个通道118的一端包括开口122,以允许将流体分配到每个通道118中,然后沿着通道118分配以填充所有孔116。第三层120还在每个通道118的另一端包括排气孔124,以允许气体在其充满样品流体时离开通道118。排气孔124以及可选地开口122可以被透气膜覆盖。

[0324] 所有层10、14、20均具有中心孔126,该中心孔126用于将样品架100装载到设备2中。在该实施例中,样品架100具有圆形几何形状,并且可以类似于CD的方式固定,因此被支撑在主轴盘上并被保持与在样品架100上方和/或下方的成像元件一起旋转。中心孔126形成将样品架100连接至设备1、2、3、4、5、6中的主轴盘的安装。第一层110和第三层120对用于使样品成像的波长的光是透明的,并且通常对可见光是透明的。

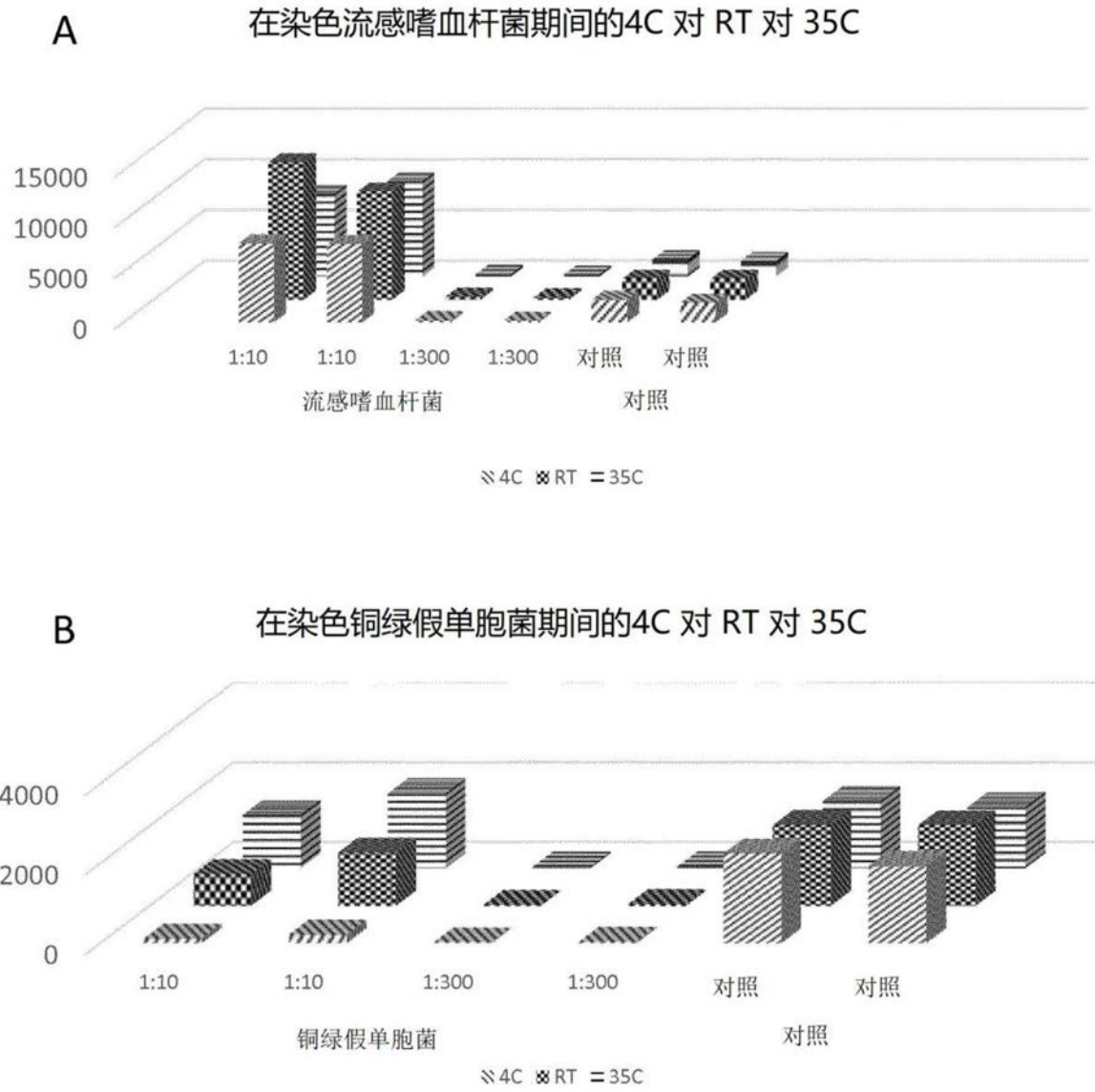


图1

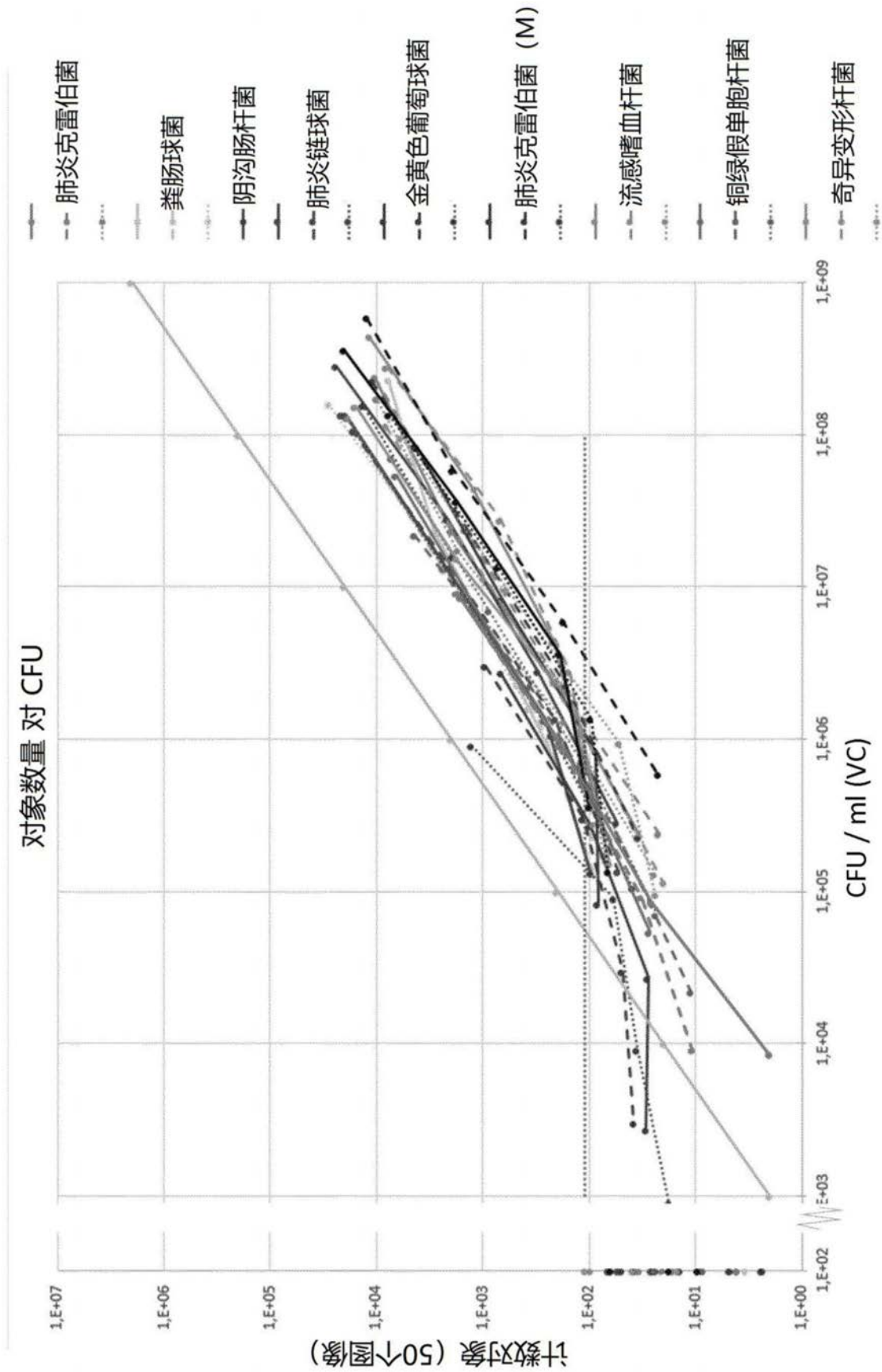


图2

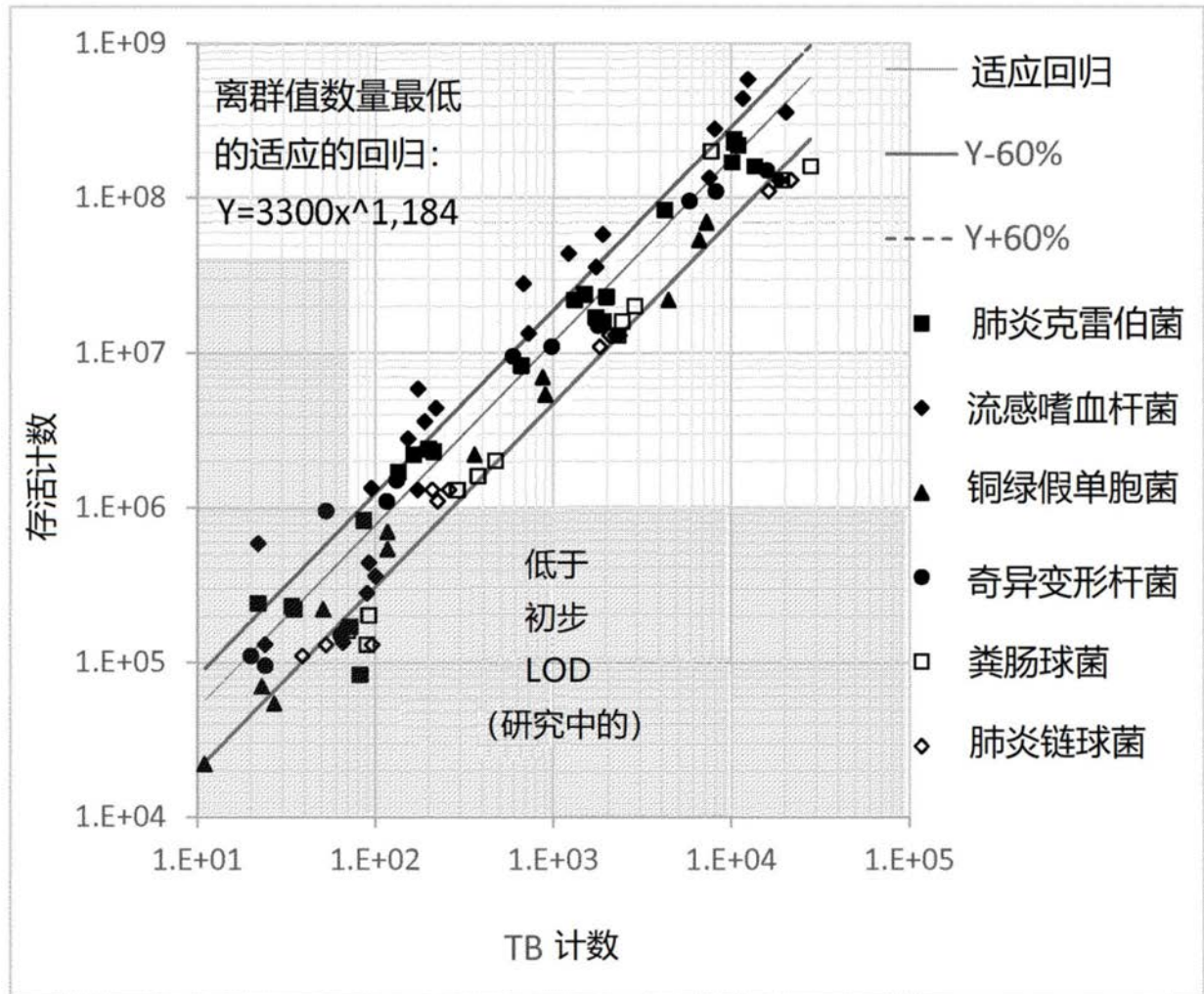


图3

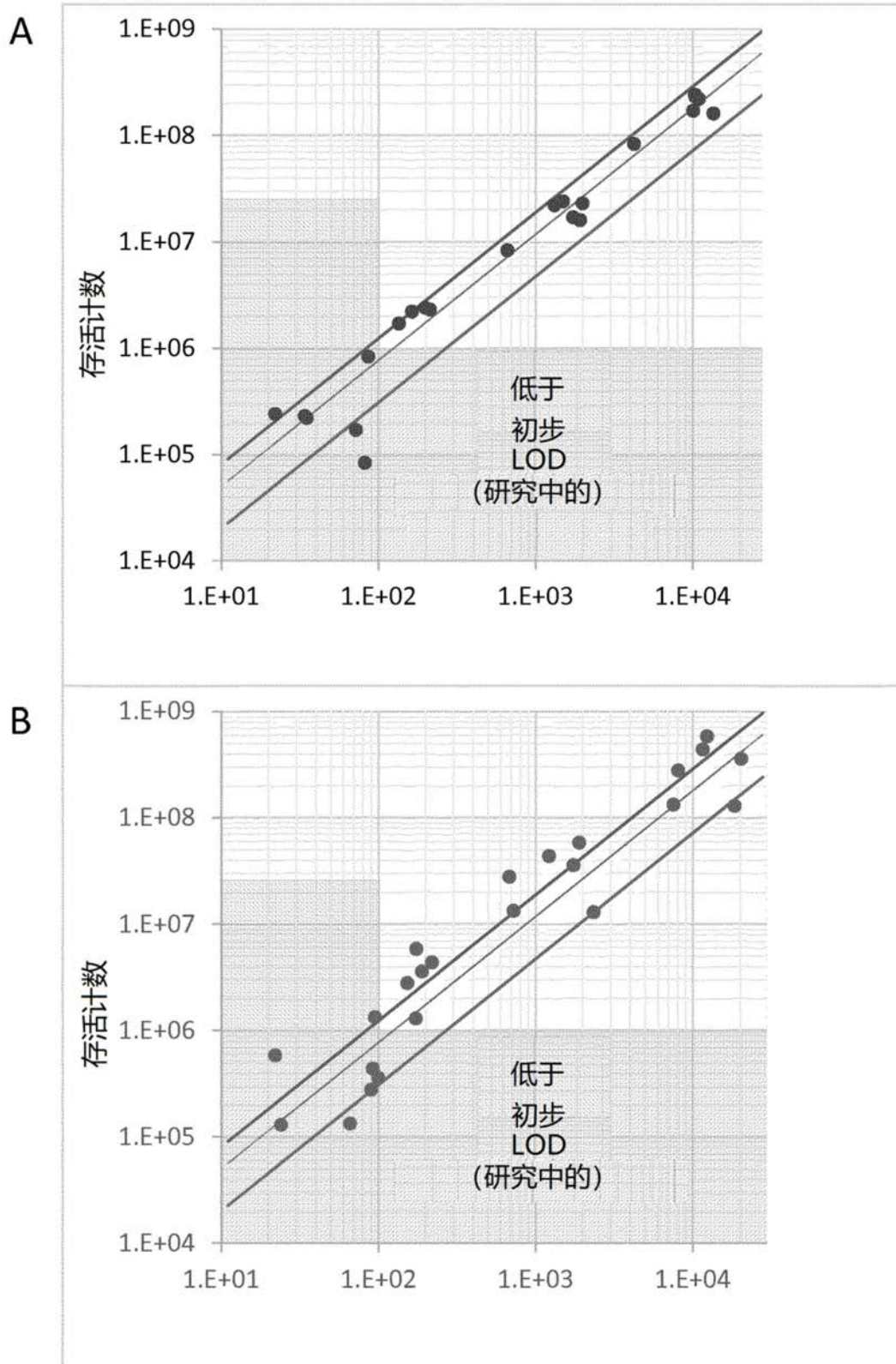


图4

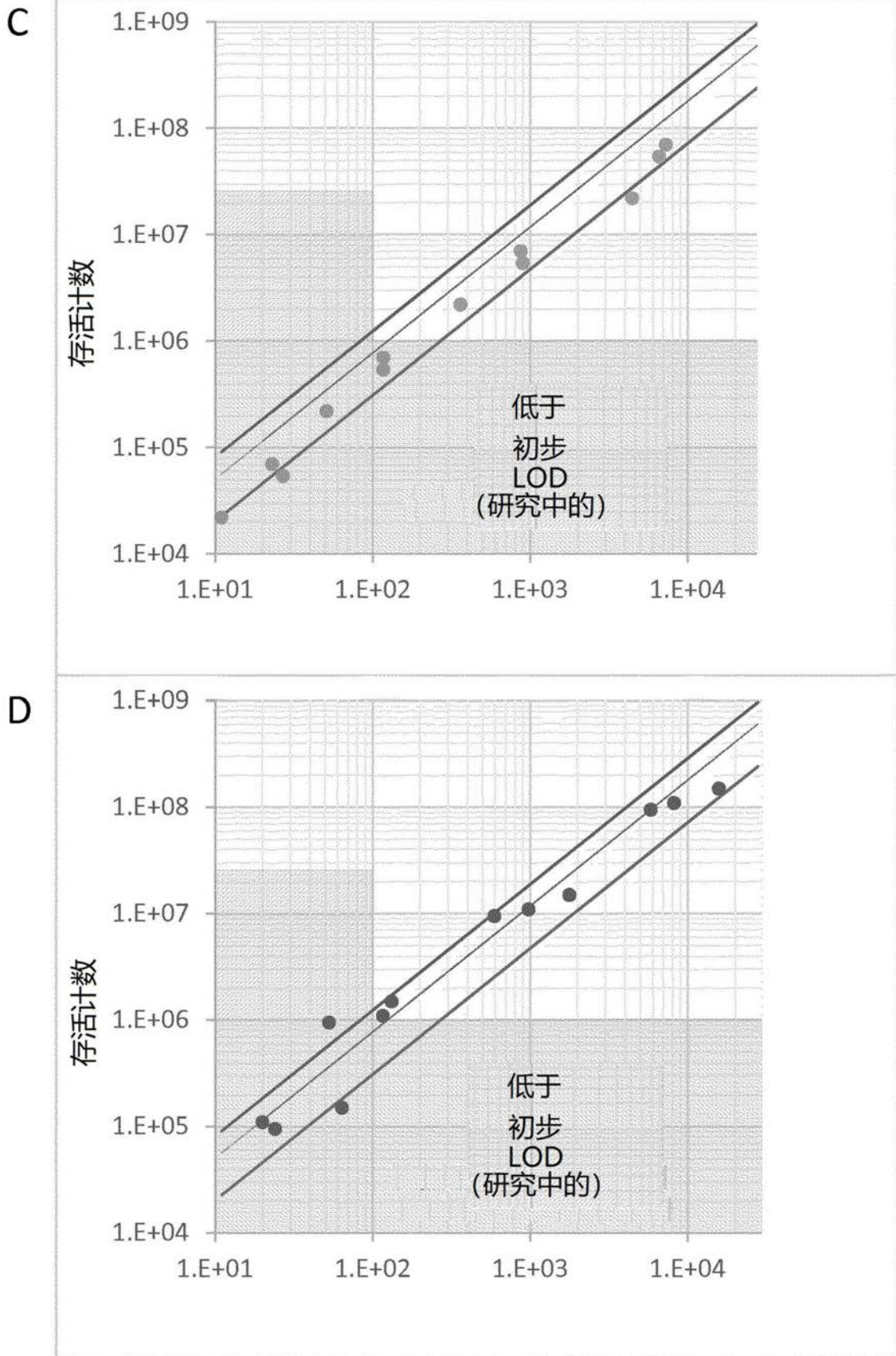


图4(续)

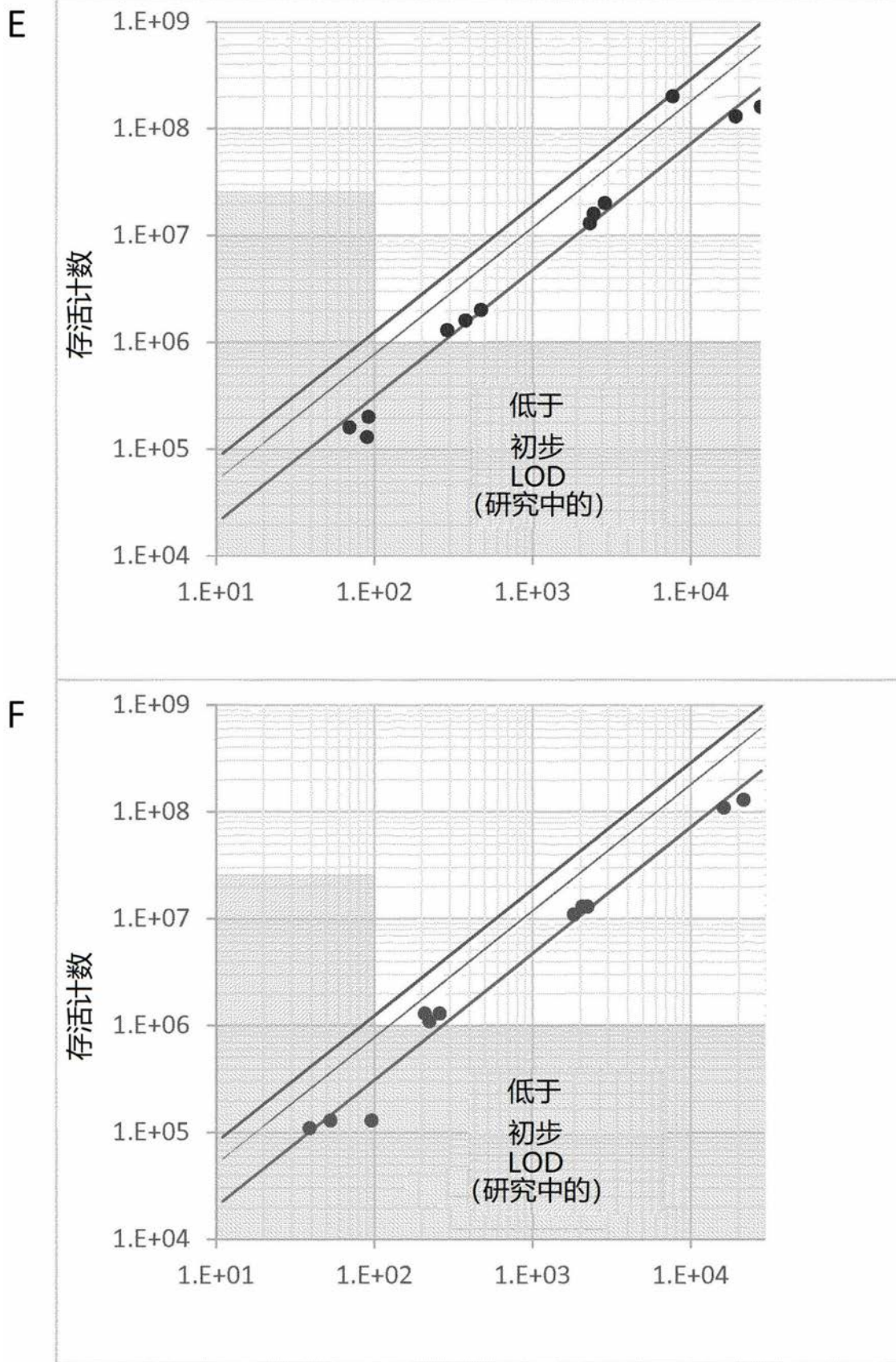


图4(续)

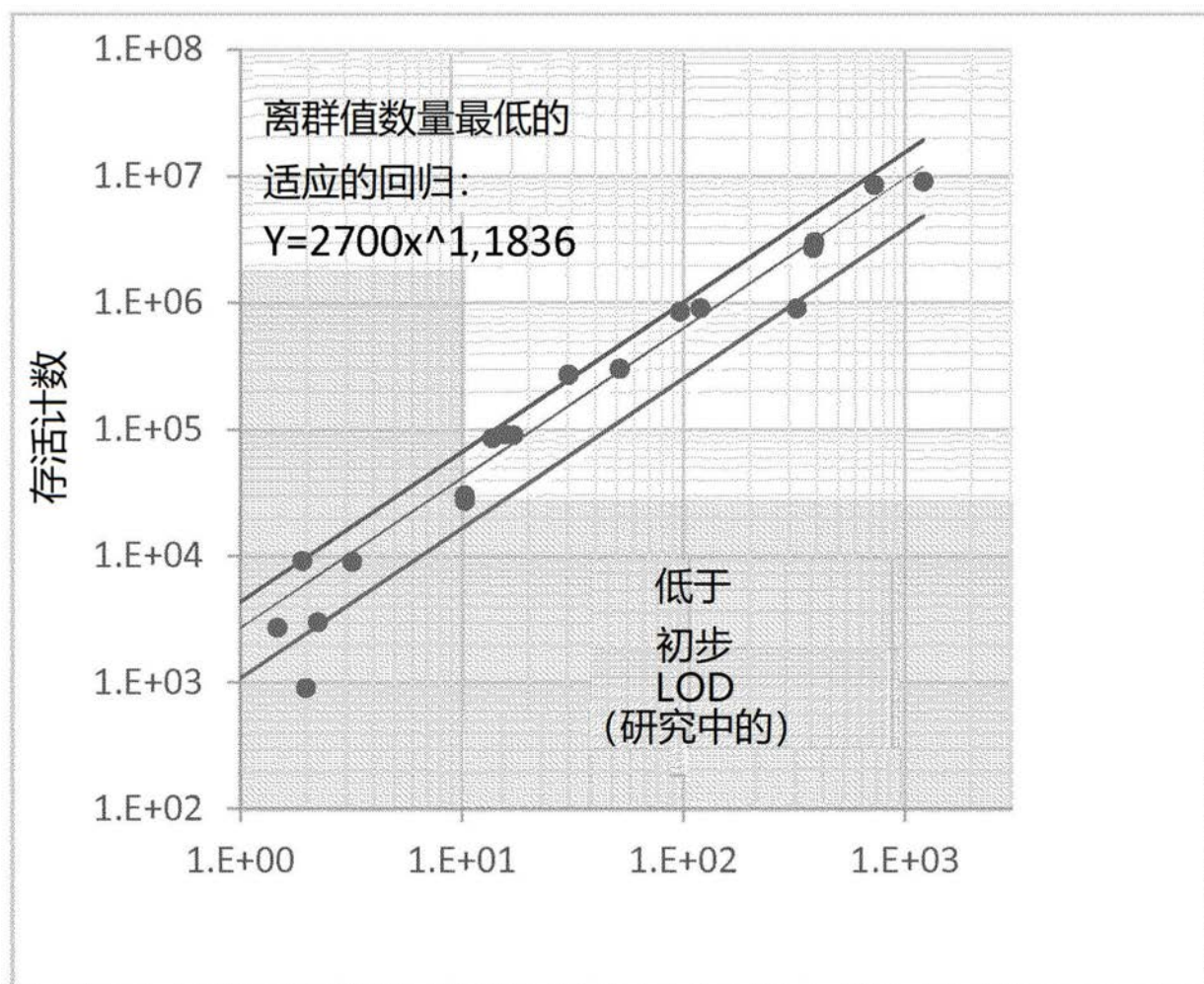


图5

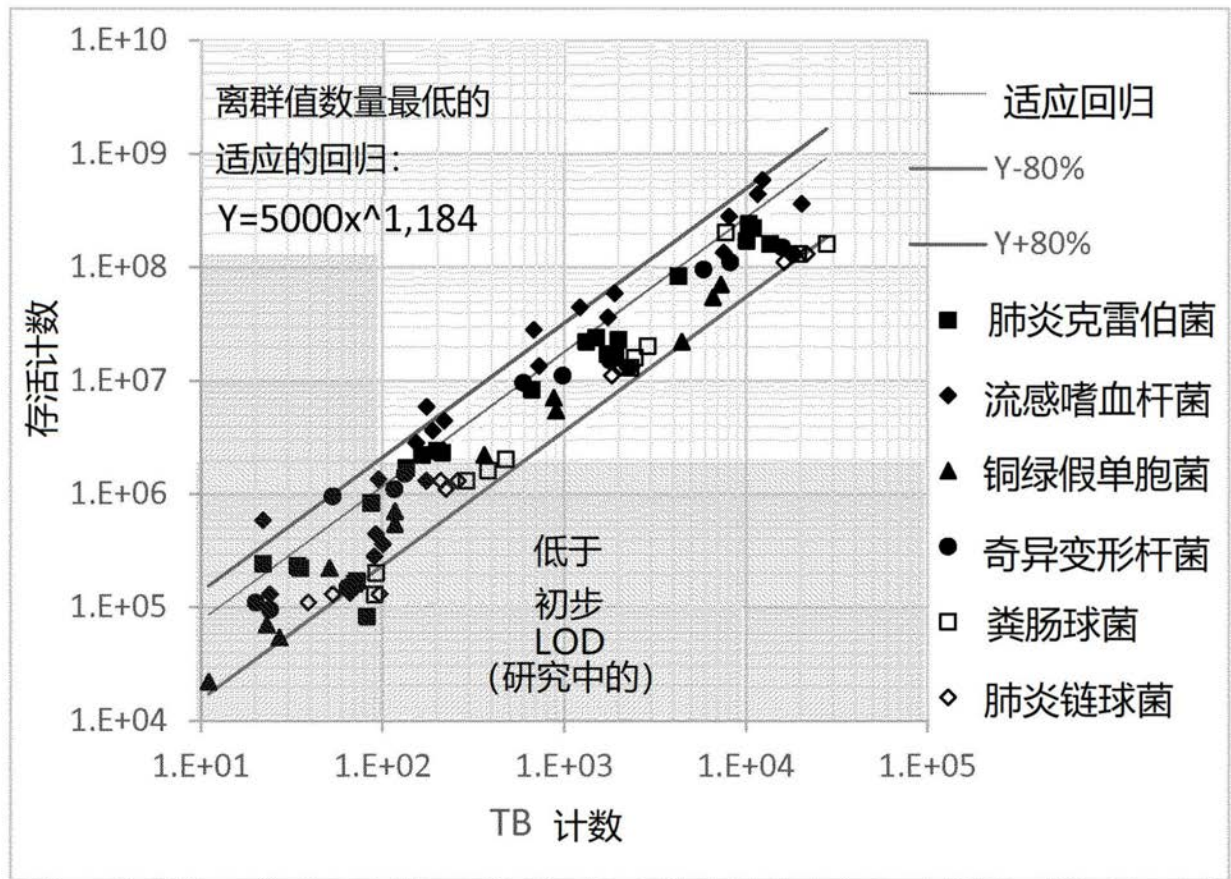


图6

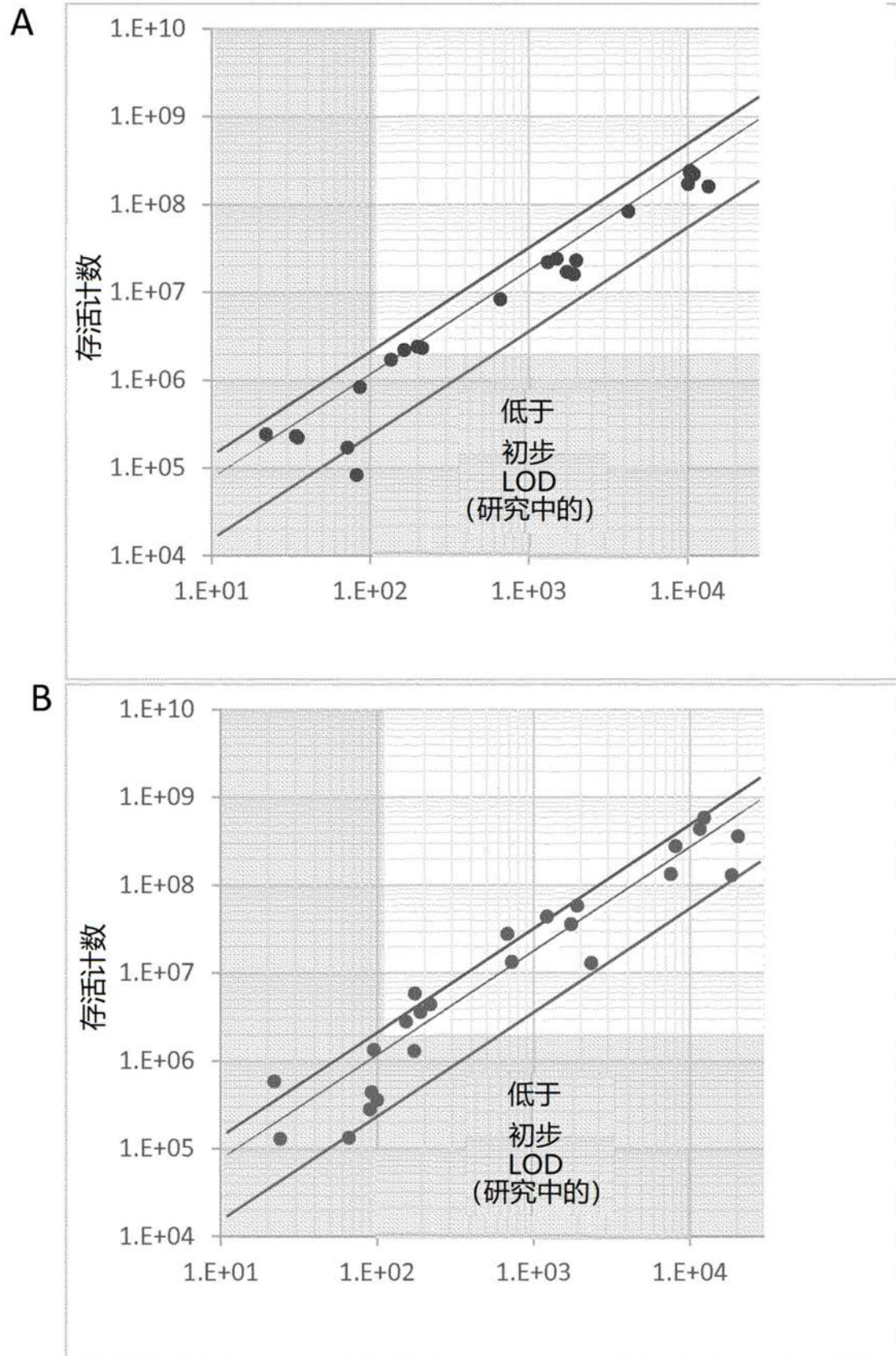


图7

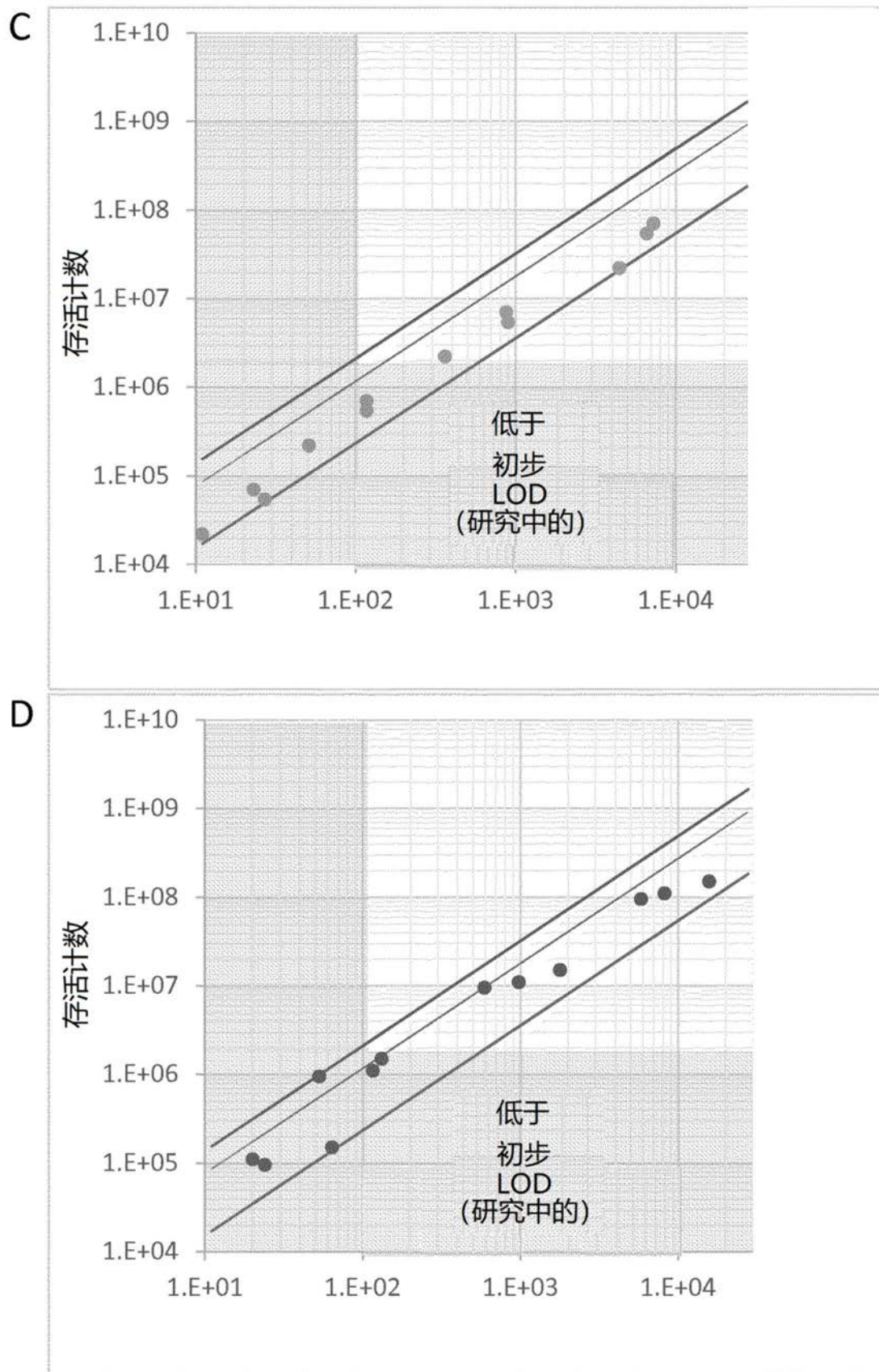
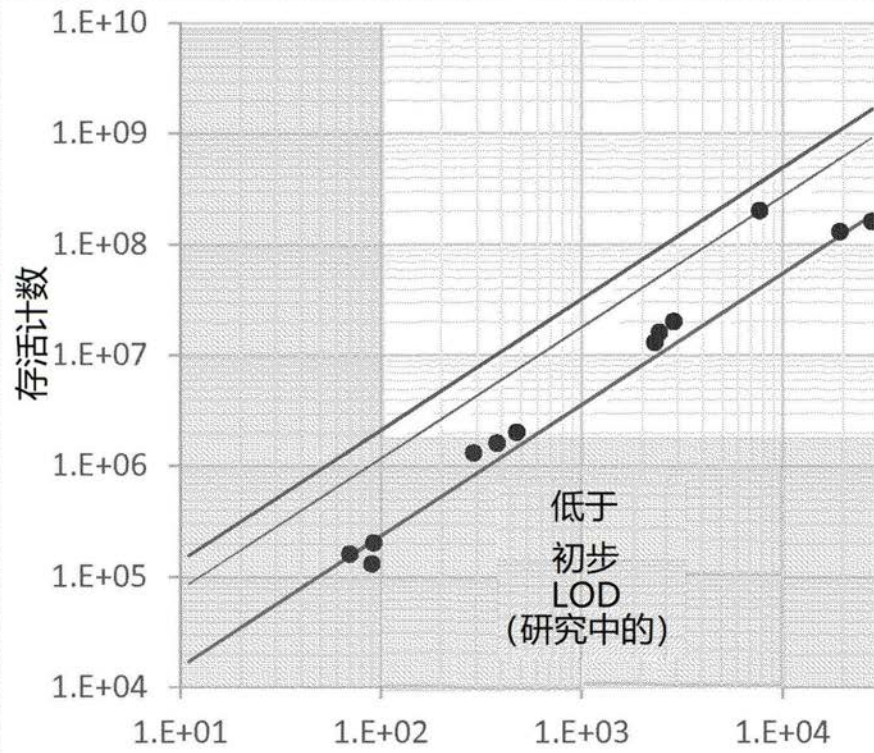


图7(续)

E



F

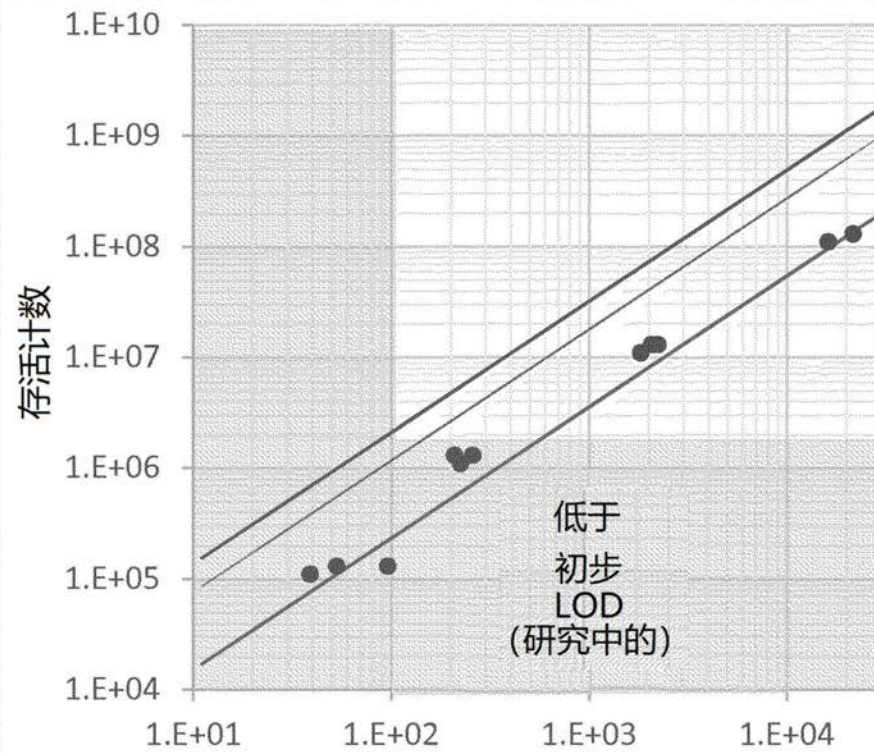


图7(续)

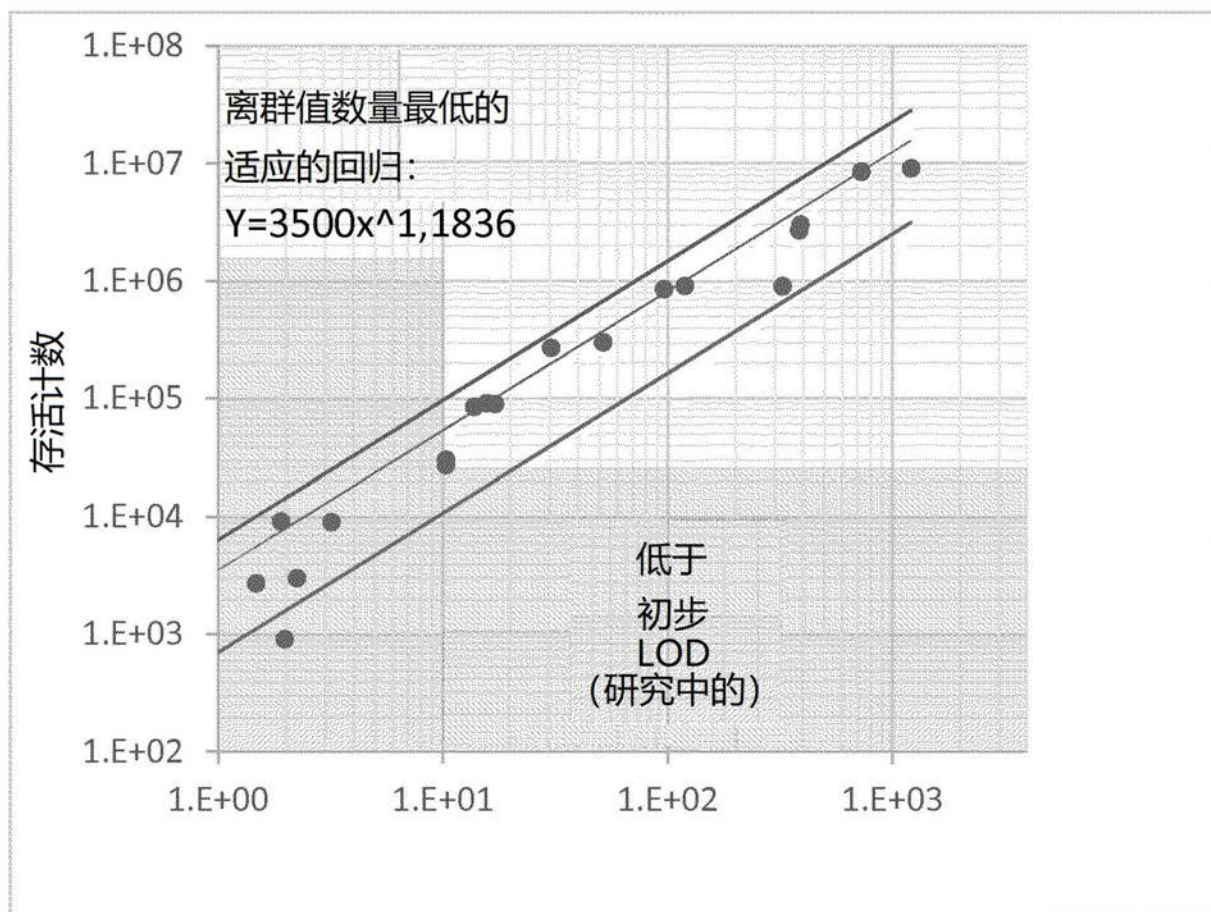


图8

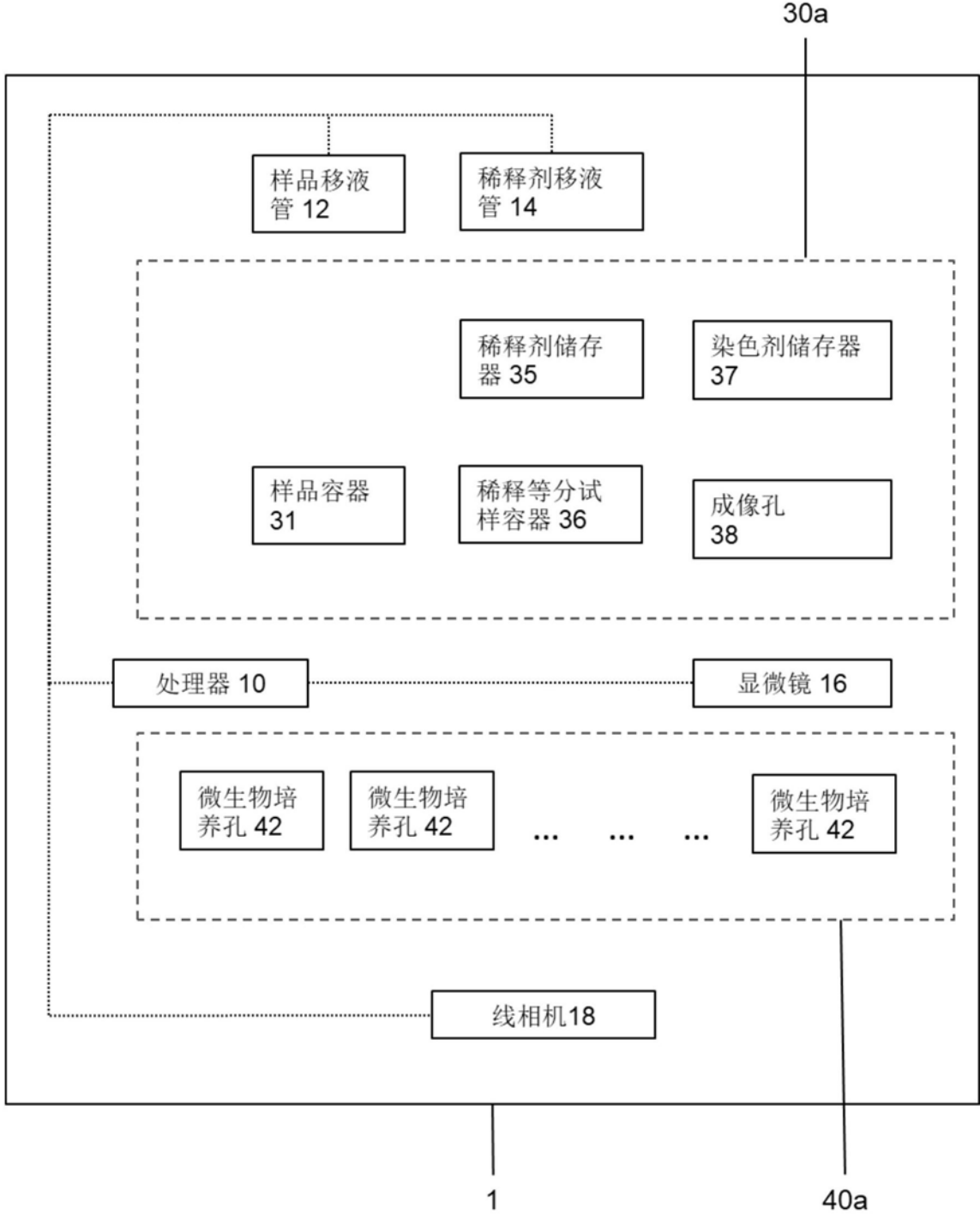


图9

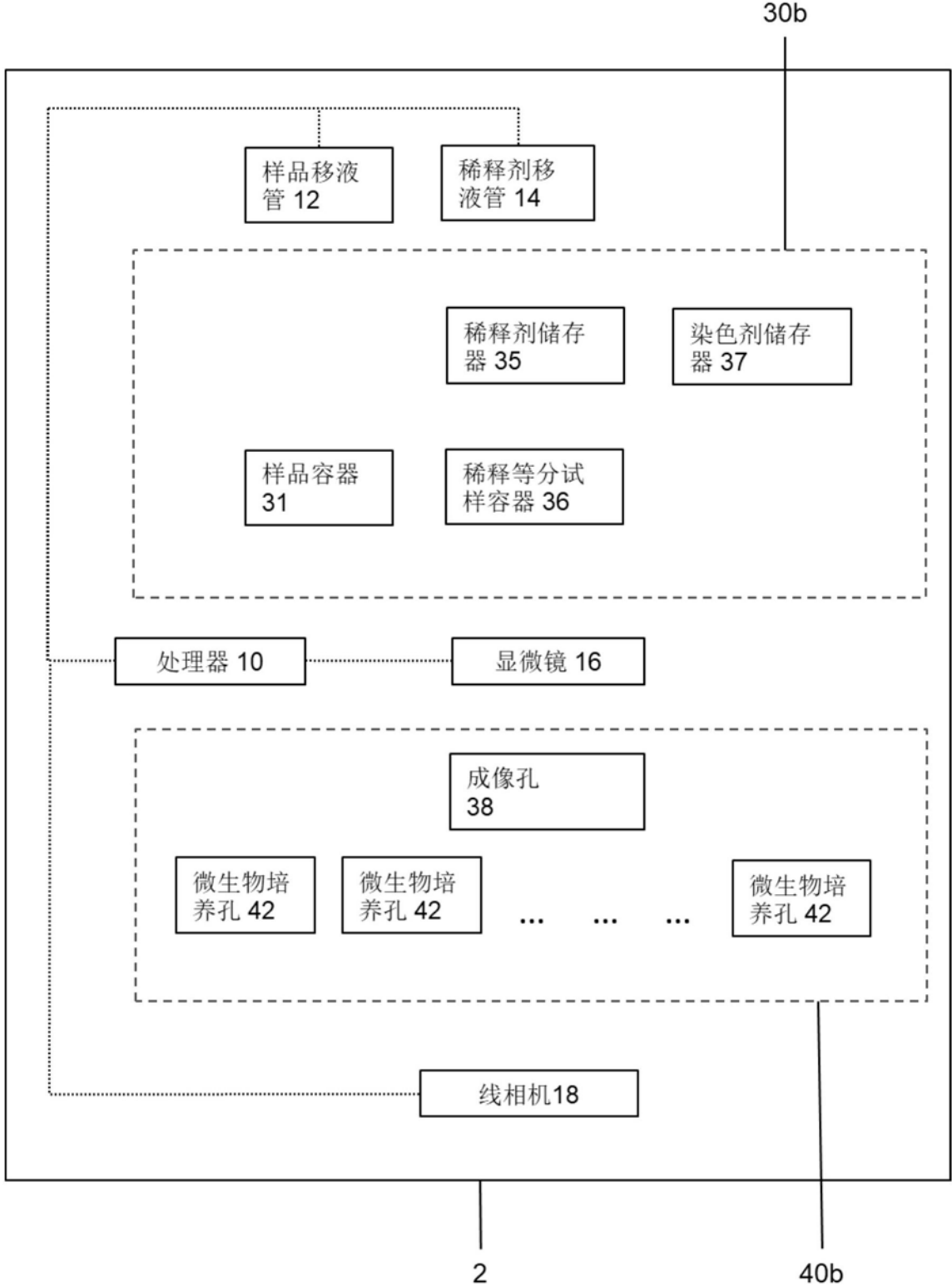


图10

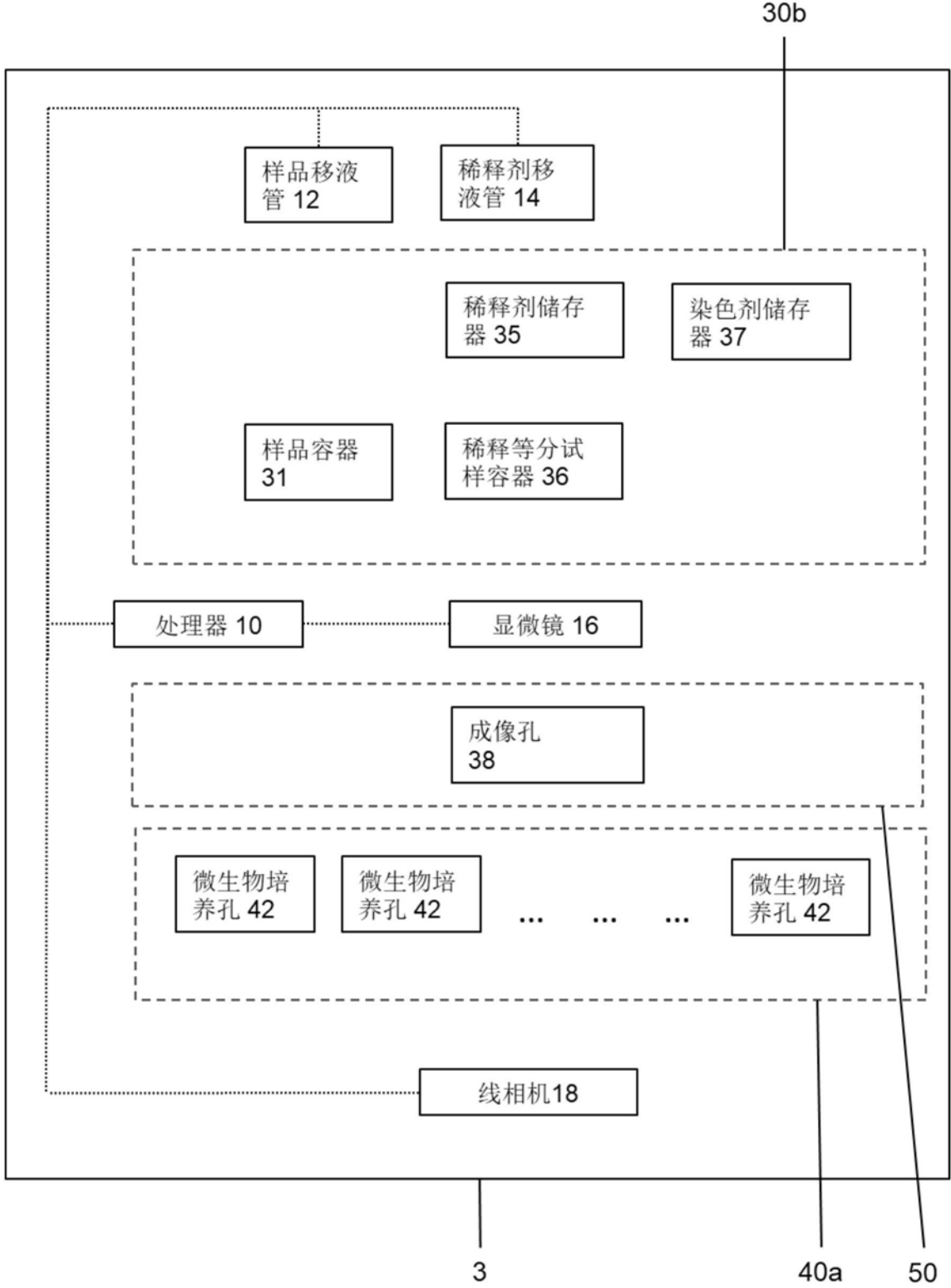


图11

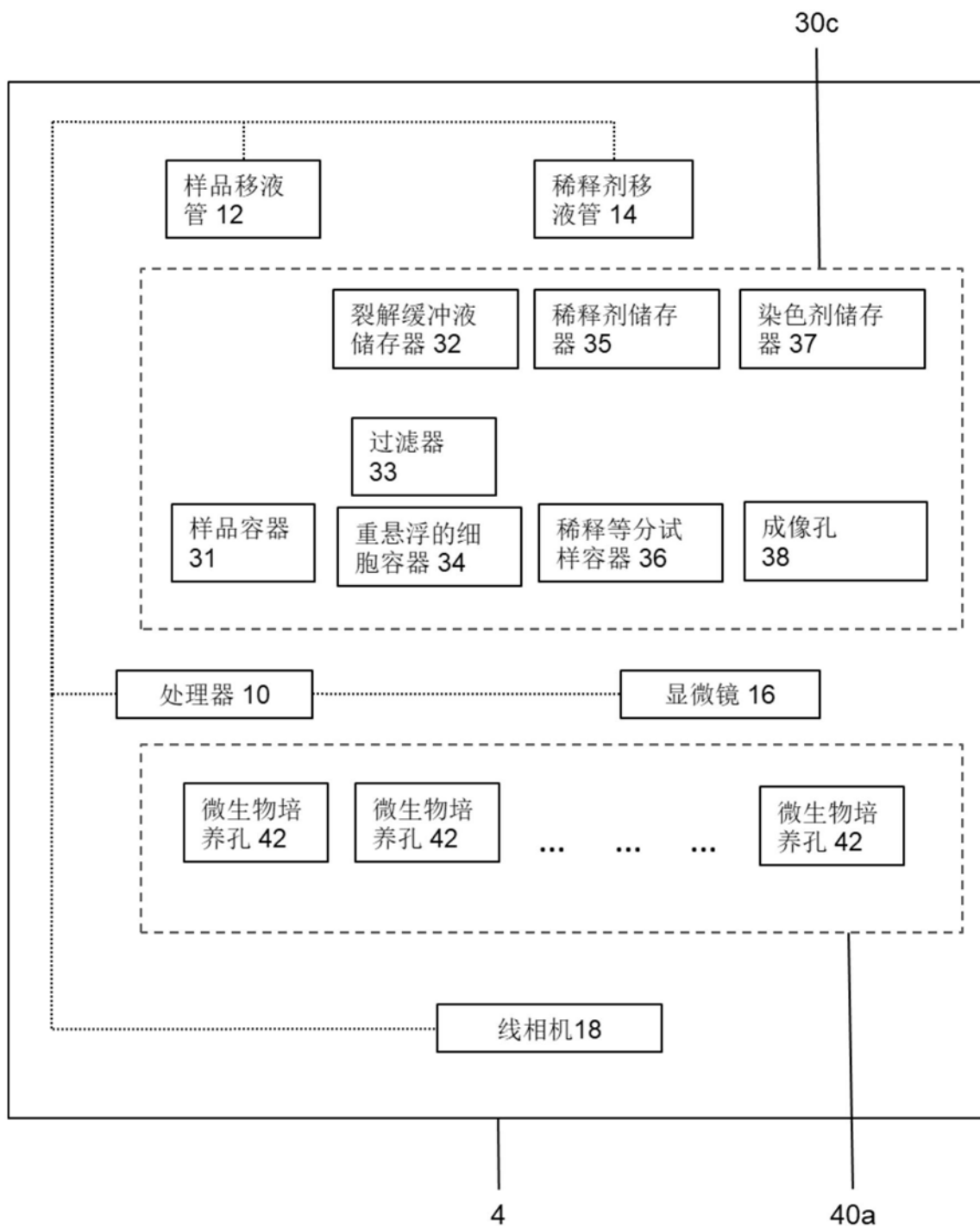


图12

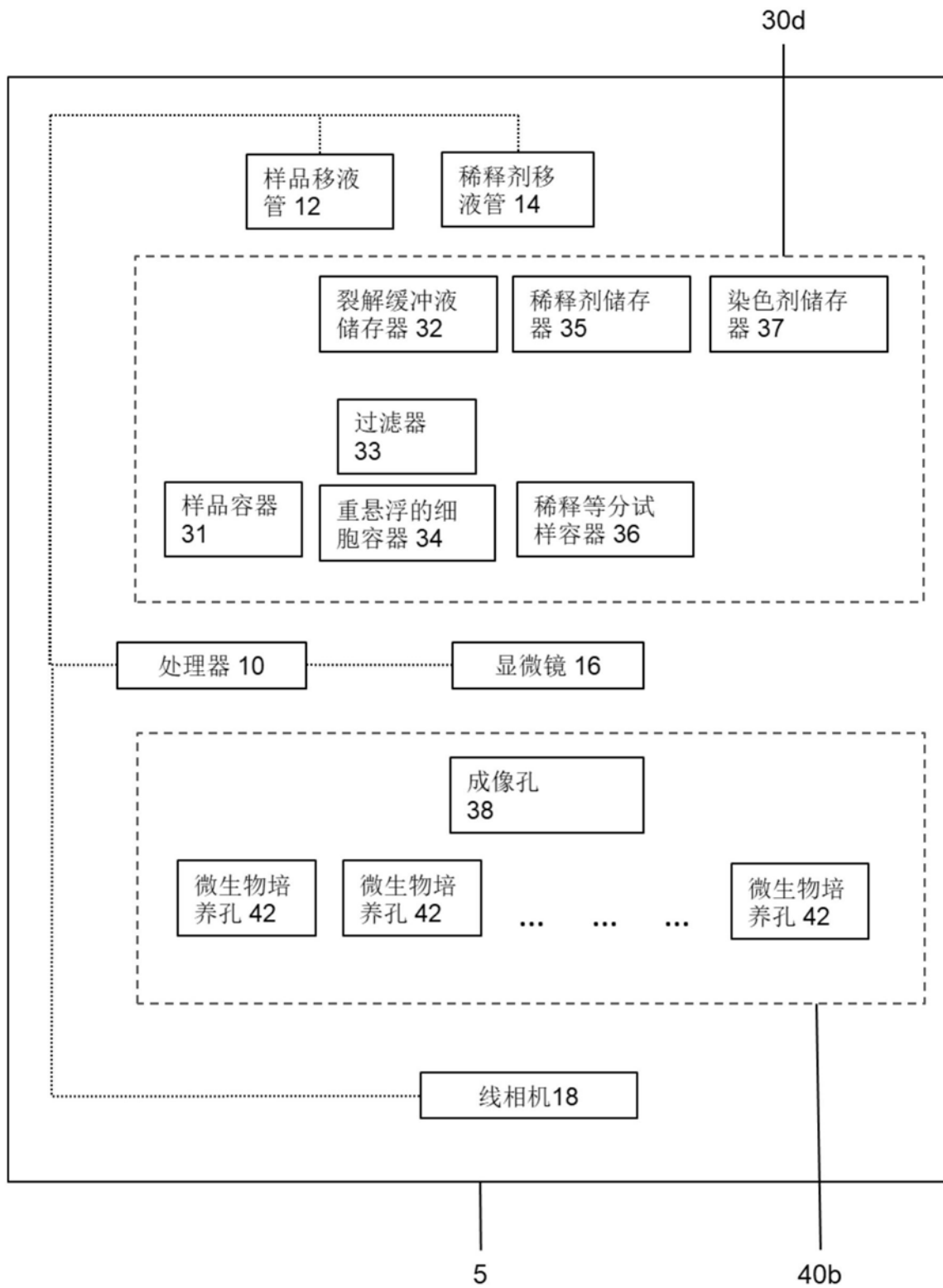


图13

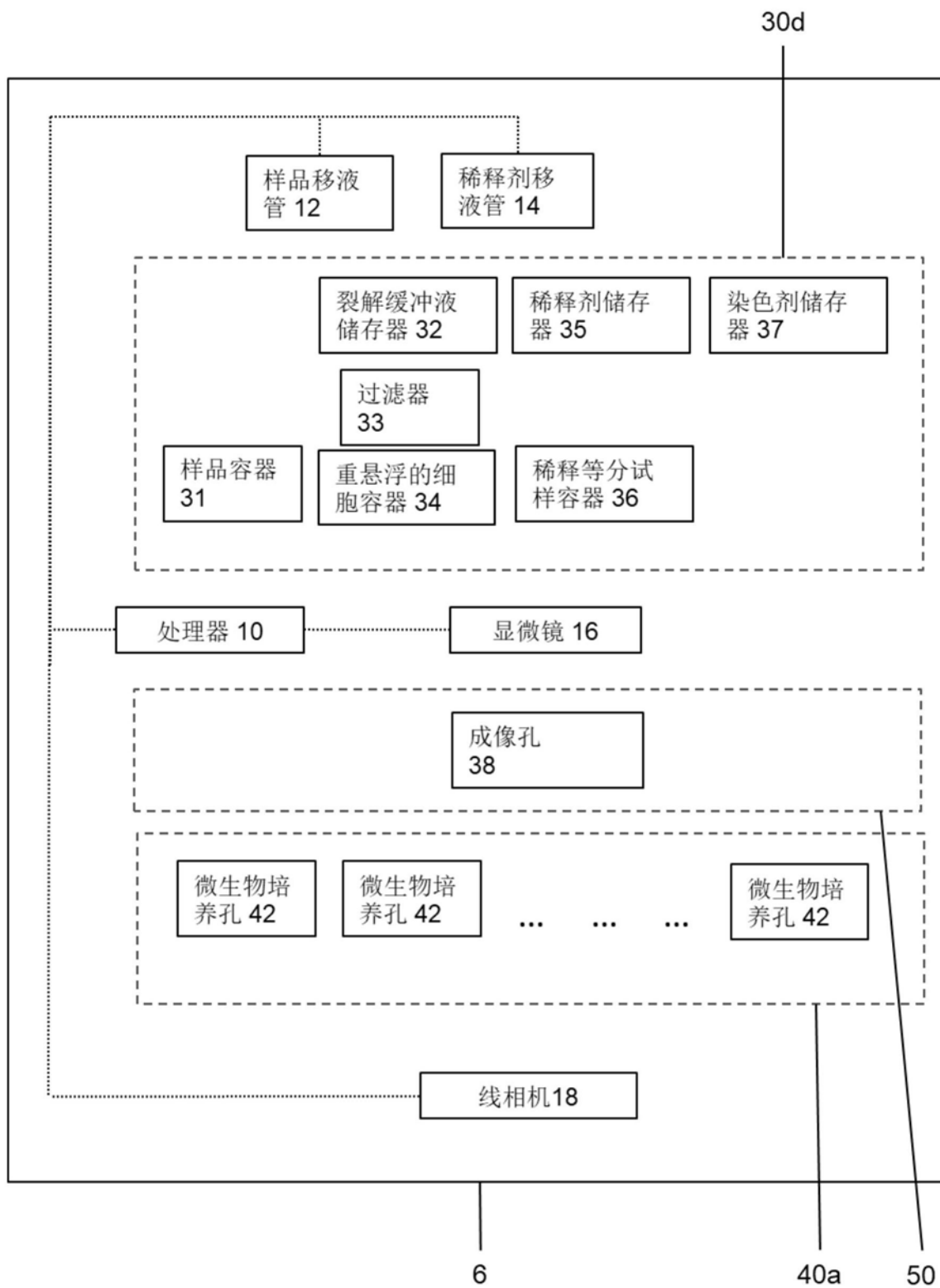


图14

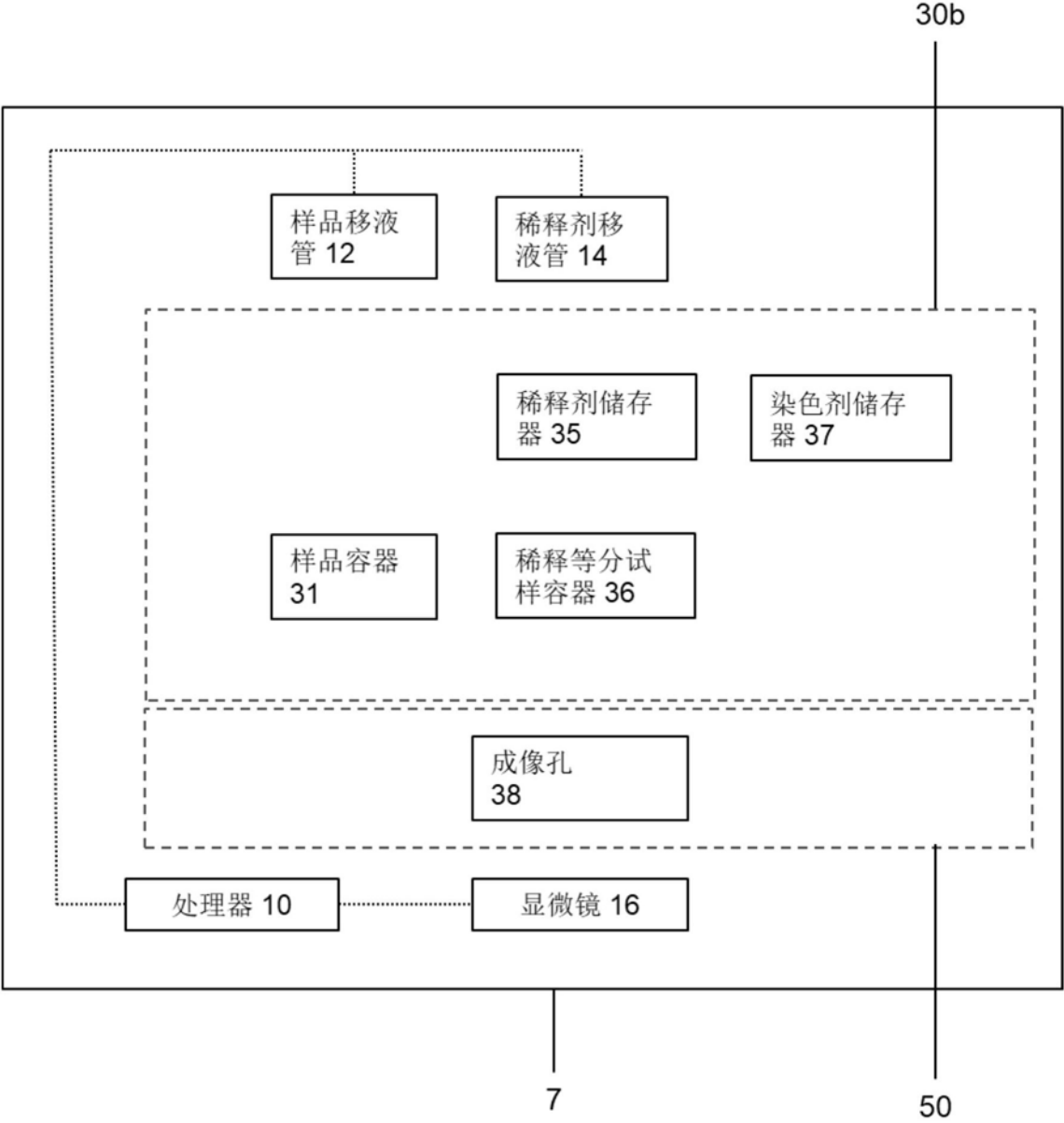


图15

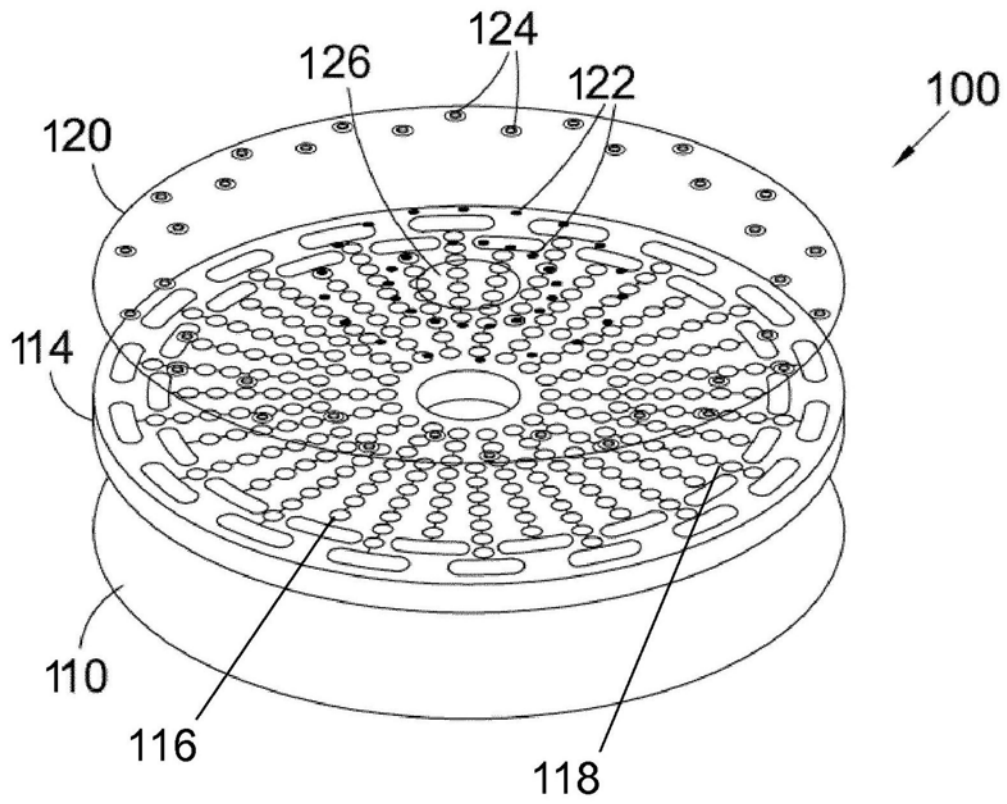


图16