



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105378100 B

(45)授权公告日 2019.05.28

(21)申请号 201480038969.6

B01L 3/00(2006.01)

(22)申请日 2014.07.10

C12M 1/00(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105378100 A

(56)对比文件

WO 2010056186 A1, 2010.05.20, 摘要, 权利要求1-23, 说明书第2页第10行-第3页第25行, 第6页第31行-第7页第10行, 第14页第5行-第15页第14行, 第19页第31行-第20页第19行, 第23页第13行-第24页第6行, 第26页第18行-第27页第9行, 第30页第9行-第20行, 图1-4.

WO 2010018499 A1, 2010.02.18, 摘要, 权利要求1-12, 说明书第7页第1行-第9页第8行, 图1-图6.

WO 2012050981 A1, 2012.04.19, 摘要, 说明书第15页第19行-第30行, 第33页第18行-第25行, 第39页第10行-第40页第8行, 图1-16.

WO 2009061392 A1, 2009.05.14, 全文.

Haessler U et al...An agarose-based microfluidic platform with a gradient buffer for 3D chemotaxis studies.《Biomedical microdevices》.2009, 第11卷(第4期), 第827-835页.

审查员 王胜佳

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/SE2014/050883 2014.07.10

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/005863 EN 2015.01.15

(73)专利权人 格瑞丁泰克公司

地址 瑞典, 乌普萨拉市

(72)发明人 J·克雷于格 S·索斯朗德

吴志刚

(74)专利代理机构 北京市铸成律师事务所

11313

代理人 孟锐

(51)Int.Cl.

C12Q 1/04(2006.01)

权利要求书4页 说明书17页 附图11页

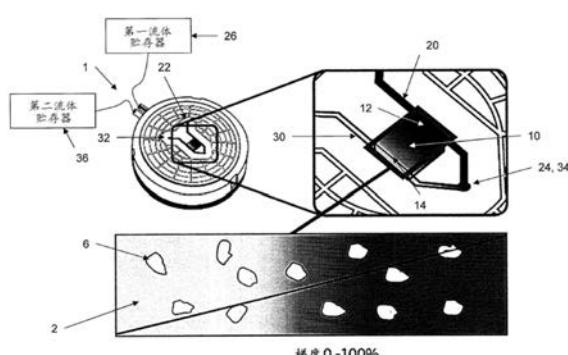
(54)发明名称

流体装置的新用途

(57)摘要

本发明公开一种流体装置(1), 其具有培养室(10), 所述培养室(10)被构造为容纳包含微生物(6)的培养物的3D培养基质(2)。通过在培养室(10)的不同末端部分(12, 14)处提供相应的流体流并且包含不同浓度的测检物来在所述3D培养基质(2)上确立所述测检物的浓度梯度。基于所述3D培养基质(2)中的边界区(5)的位置来测定所述微生物(6)对所述测检物的响应。

CN 105378100 B



1. 一种测定细菌 (6) 对杀菌剂或抑菌剂的响应的非诊断目的的方法, 所述方法包括:

(S1) 在三维3D培养基质 (2) 中提供所述细菌 (6) 的培养物, 所述3D培养基质 (2) 布置在流体装置 (1) 的培养室 (10) 中, 所述流体装置 (1) 具有侧接所述培养室 (10) 的第一末端部分 (12) 的第一流体通道 (20) 和侧接所述培养室 (10) 的第二不同末端部分 (14) 的第二流体通道 (30);

(S2) 将所述第一流体通道 (20) 的输入 (22) 连接至包含第一浓度的所述杀菌剂或抑菌剂的第一流体流;

(S3) 将所述第二流体通道 (30) 的输入 (32) 连接至不含所述杀菌剂或抑菌剂或包含第二浓度的所述杀菌剂或抑菌剂的第二流体流, 所述第二浓度低于所述第一浓度, 从而在所述3D培养基质 (2) 的至少一部分上形成所述杀菌剂或抑菌剂的浓度梯度;

(S4) 基于所述3D培养基质 (2) 中的任意边界区 (5) 相对于所述第一末端部分 (12) 和/或所述第二不同末端部分 (14) 的位置来测定所述细菌 (6) 对所述杀菌剂或抑菌剂的易感性, 所述任意边界区 (5) 在未生长所述细菌 (6) 的非生长区 (3) 与生长所述细菌 (6) 的生长区 (4) 之间; 以及

(S40) 基于所述边界区 (5) 的宽度来测定所述细菌 (6) 对所述杀菌剂或抑菌剂的抗性。

2. 根据权利要求1所述的方法, 其中 (S4) 测定所述易感性包括 (S4) 基于所述3D培养基质 (2) 中的所述任意边界区 (5) 相对于所述第一末端部分 (12) 和/或所述第二不同末端部分 (14) 的所述位置以及基于所述边界区 (5) 的形状来测定所述细菌 (6) 对所述杀菌剂或抑菌剂的所述易感性。

3. 根据权利要求1或2所述的方法, 其中 (S2) 连接所述第一流体通道 (20) 的所述输入 (22) 包括:

(S10) 将所述第一流体通道 (20) 的所述输入 (22) 连接至包含第一流体的第一流体贮存器 (26), 所述第一流体包含所述第一浓度的所述杀菌剂或抑菌剂; 以及

(S11) 将来自所述第一流体贮存器 (26) 的所述第一流体泵送到所述第一流体通道 (20) 的所述输入 (22) 中并通过所述第一流体通道 (20) 的输出 (24) 排出; 并且

(S3) 连接所述第二流体通道 (30) 的所述输入 (32) 包括:

(S12) 将所述第二流体通道 (30) 的所述输入 (32) 连接至包含第二流体的第二流体贮存器 (36), 所述第二流体不含所述杀菌剂或抑菌剂或包含所述第二浓度的所述杀菌剂或抑菌剂; 以及

(S13) 将来自所述第二流体贮存器 (36) 的所述第二流体泵送到所述第二流体通道 (30) 的所述输入 (32) 中并通过所述第二流体通道 (30) 的输出 (34) 排出。

4. 根据权利要求1或2所述的方法, 其还包括:

(S21) 获取所述3D培养基质 (2) 的至少一个图像;

(S22) 识别所述至少一个图像中的所述边界区 (5), 其中 (S4) 测定所述易感性包括 (S4) 基于所述至少一个图像中识别的所述边界区 (5) 相对于所述第一末端部分 (12) 和/或所述第二不同末端部分 (14) 的所述位置来测定所述细菌 (6) 对所述杀菌剂或抑菌剂的所述易感性; 以及

(S40) 测定所述抗性包括 (S40) 基于所述至少一个图像中识别的所述边界区 (5) 的所述宽度来测定所述细菌 (6) 对所述杀菌剂或抑菌剂的抗性。

5. 根据权利要求4所述的方法,其中

(S21) 获取所述至少一个图像包括(S21)使用亮视野显微镜或使用相差显微镜(68)来获取所述3D培养基质(2)的所述至少一个图像;以及

(S22) 识别所述边界区(5)包括通过计算机(62)来处理所述至少一个图像,所述计算机(62)被配置成基于所述至少一个图像中的检测到的光强度来识别所述边界区(5)。

6. 根据权利要求4所述的方法,其还包括(S20)向所述3D培养基质(2)中添加至少一种荧光标记,所述荧光标记被构造成结合所述细菌(6)或被所述细菌(6)吸收,其中

(S21) 获取所述至少一个图像包括(S21)使用荧光或共焦显微镜(68)来获取所述3D培养基质(2)的所述至少一个图像;以及

(S22) 识别所述边界区(5)包括通过计算机(62)来处理所述至少一个图像,所述计算机(62)被配置成基于所述至少一个图像中的检测到的荧光来识别所述边界区(5)。

7. 根据权利要求4所述的方法,其中(S21)获取所述至少一个图像包括(S21)在至少于含有所述细菌(6)的所述培养物的所述3D培养基质(2)的所述至少一部分上形成所述杀菌剂或抑菌剂的稳态浓度梯度之后获取所述3D培养基质(2)的所述至少一个图像。

8. 根据权利要求1或2所述的方法,其还包括:

(S30) 在所述第一流体或所述第二流体基本上未流动通过所述3D培养基质(2)的情况下,通过将来自所述第一流体流的所述杀菌剂或抑菌剂扩散到所述3D培养基质(2)中来在所述3D培养基质(2)的所述至少一部分上确立所述浓度梯度。

9. 根据权利要求1或2所述的方法,其中

(S2) 连接所述第一流体通道(20)的所述输入(22)包括(S2)将所述第一流体通道(20)的所述输入(22)连接至所述第一流体流,所述第一流体流包含所述第一浓度的第一杀菌剂或抑菌剂,并且所述第一流体流不含第二杀菌剂或抑菌剂或包含第三浓度的所述第二杀菌剂或抑菌剂;

(S3) 连接所述第二流体通道(30)的所述输入(32)包括(S3)将所述第二流体通道(30)的所述输入(32)连接至所述第二流体流,所述第二流体流不含所述第一杀菌剂或抑菌剂或包含所述第二浓度的所述第一杀菌剂或抑菌剂,并且所述第二流体流包含第四浓度的所述第二杀菌剂或抑菌剂,所述第四浓度高于所述第三浓度,从而在所述3D培养基质(2)的所述至少一部分上形成所述第一杀菌剂或抑菌剂的第一浓度梯度和所述第二杀菌剂或抑菌剂的第二浓度梯度;以及

(S4) 测定所述易感性包括(S4)基于所述3D培养基质(2)中的任意边界区(5)相对于所述第一末端部分(12)和/或所述第二不同末端部分(14)的相应位置来测定所述细菌(6)对所述第一杀菌剂或抑菌剂和所述第二杀菌剂或抑菌剂的易感性,所述任意边界区(5)在生长所述细菌(6)的生长区(4)与未生长所述细菌(6)的相应非生长区(3)之间。

10. 根据权利要求1或2所述的方法,其中

(S2) 连接所述第一流体通道(20)的所述输入(22)包括(S2)将所述第一流体通道(20)的所述输入(22)连接至所述第一流体流,所述第一流体流包含所述第一浓度的第一杀菌剂或抑菌剂,并且所述第一流体流包含第三浓度的第二杀菌剂或抑菌剂;

(S3) 连接所述第二流体通道(30)的所述输入(32)包括(S3)将所述第二流体通道(30)的所述输入(32)连接至所述第二流体流,所述第二流体流不含所述第一杀菌剂或抑菌剂或

包含所述第二浓度的所述第一杀菌剂或抑菌剂,并且所述第二流体流不含所述第二杀菌剂或抑菌剂或包含第四浓度的所述第二杀菌剂或抑菌剂,所述第四浓度低于所述第三浓度,从而在所述3D培养基质(2)的所述至少一部分上形成所述第一杀菌剂或抑菌剂的第一浓度梯度和所述第二杀菌剂或抑菌剂的第二浓度梯度;以及

(S4) 测定所述易感性包括(S4)基于所述3D培养基质(2)中的任意边界区(5)相对于所述第一末端部分(12)和/或所述第二不同末端部分(14)的位置来测定所述细菌(6)对所述第一杀菌剂或抑菌剂和所述第二杀菌剂或抑菌剂的混合物的易感性,所述任意边界区(5)在未生长所述细菌(6)的非生长区(3)与生长所述细菌(6)的生长区(4)之间。

11. 根据权利要求1或2所述的方法,其中所述培养室(10)具有侧接所述培养室(10)的第三末端部分(16)的第三流体通道(40)和侧接所述培养室(10)的第四不同末端部分(18)的第四流体通道(50),并且所述第一浓度的杀菌剂或抑菌剂或者所述第二浓度的杀菌剂或抑菌剂为第一杀菌剂或抑菌剂,所述方法还包括:

将所述第三流体通道(40)的输入连接至包含第三浓度的第二杀菌剂或抑菌剂的第三流体流;

将所述第四流体通道(50)的输入连接至不含所述第二杀菌剂或抑菌剂或包含第四浓度的所述第二杀菌剂或抑菌剂的第四流体流,所述第四浓度低于所述第三浓度,从而在所述3D培养基质(2)的至少一部分上形成所述第二杀菌剂或抑菌剂的浓度梯度;

基于所述3D培养基质(2)中的任意边界区(5)相对于所述第三末端部分和/或所述第四不同末端部分的位置来测定所述细菌(6)对所述第二杀菌剂或抑菌剂的易感性,所述任意边界区(5)在未生长所述细菌(6)的非生长区(3)与生长所述细菌(6)的生长区(4)之间;以及

基于所述边界区(5)的宽度来测定所述细菌(6)对所述杀菌剂或抑菌剂的抗性。

12. 根据权利要求1或2所述的方法,其还包括:

(S21) 获取所述3D培养基质(2)的至少一个图像;

(S22) 通过由计算机(62)处理所述至少一个图像来识别所述至少一个图像中的所述边界区(5),所述计算机(62)被配置成基于所述至少一个图像中的检测到的光强度来识别所述边界区(5);

(S50) 所述检测到的光强度相对于所述3D培养基质(2)中的所述第一末端部分(12)与所述第二不同末端部分(14)之间的位置的关系;以及

(S51) 基于所述关系来测定所述杀菌剂或抑菌剂针对所述细菌(6)的最小抑制浓度MIC。

13. 根据权利要求12所述的方法,其中(S51)测定所述MIC包括:

(S60) 识别表示所述关系的信号中存在扭结的位置;以及

(S61) 将包括基于所述3D培养基质(2)中限定浓度的预定梯度信息与位置的关系将所述位置转换成所述杀菌剂或抑菌剂的浓度。

14. 一种用于测定细菌(6)对杀菌剂或抑菌剂的响应的系统(60),所述系统(60)包括:

流体装置(1),其包括:

培养室(10),其被构造成将所述细菌(6)的培养物容纳在三维3D培养基质(2)中;

第一流体通道(20),其侧接所述培养室(10)的第一末端部分(12);和第二流体通道

(30), 其侧接所述培养室(10)的第二不同末端部分(14);

包含第一流体的第一流体贮存器(26), 所述第一流体包含第一浓度的所述杀菌剂或抑菌剂, 所述第一流体贮存器(26)被构造成连接至所述第一流体通道(20)的输入(22);

包含第二流体的第二流体贮存器(36), 所述第二流体不含所述杀菌剂或抑菌剂或包含第二浓度的所述杀菌剂或抑菌剂, 所述第二浓度低于所述第一浓度, 所述第二流体贮存器(36)被构造成连接至所述第二流体通道(30)的输入(32)以在所述3D培养基质(2)的至少一部分上形成所述杀菌剂或抑菌剂的浓度梯度; 以及

基于计算机的系统(62, 66), 其被配置成i) 获取所述3D培养基质(2)的至少一个图像, ii) 处理所述至少一个图像以识别所述3D培养基质(2)中的任意边界区(5)相对于所述第一末端部分(12)和/或所述第二不同末端部分(14)的位置, 所述任意边界区(5)在未生长所述细菌(6)的非生长区(3)与生长所述细菌(6)的生长区(4)之间, 和iii) 基于所述任意边界区(5)的所述位置来测定所述细菌(6)对所述杀菌剂或抑菌剂的易感性以及基于所述边界区(5)的宽度来测定所述细菌(6)对所述杀菌剂或抑菌剂的抗性。

15. 流体装置(1)用于测定细菌(6)对杀菌剂或抑菌剂的响应的非诊断目的的用途, 所述流体装置(1)包括:

培养室(10), 其被构造成将所述细菌(6)的培养物容纳在三维3D培养基质(2)中;

第一流体通道(20), 其侧接所述培养室(10)的第一末端部分(12)被构造成运载包含第一浓度的所述杀菌剂或抑菌剂的第一流体流; 以及

第二流体通道(30), 其侧接所述培养室(10)的第二不同末端部分(14)并且被构造成运载不含所述杀菌剂或抑菌剂或包含第二浓度的所述杀菌剂或抑菌剂的第二流体流, 所述第二浓度低于所述第一浓度, 从而在所述3D培养基质(2)的至少一部分上形成所述杀菌剂或抑菌剂的浓度梯度, 其中所述用途包括: 基于所述3D培养基质(2)中的任意边界区(5)相对于所述第一末端部分(12)和/或所述第二不同末端部分(14)的位置来测定所述细菌(6)对所述杀菌剂或抑菌剂的所述易感性, 所述任意边界区(5)在未生长所述细菌(6)的非生长区(3)与生长所述细菌(6)的生长区(4)之间; 以及基于所述边界区(5)的宽度来测定所述细菌(6)对所述杀菌剂或抑菌剂的抗性。

流体装置的新用途

技术领域

[0001] 各实施方案总体上涉及流体装置,具体涉及此类流体装置用于测定微生物对测检物的响应的用途。

[0002] 发明背景

[0003] 抗生素抗性细菌日渐成为全球性问题,因为抗生素无法杀灭这些细菌或使其停止分裂。细菌的传代时间在许多情况下可非常快(大约20分钟),并且由于细菌的短传代时间和相对的遗传不稳定性,细菌可快速获得对抗生素的抗性。抗生素抗性细菌感染的患病率在日益增加,这些细菌中的一些已经变得具有多重抗性,这有时意味着没有可用于终止这些细菌生长的有效抗生素。这些多重抗性细菌是严重的公共卫生问题,因为感染此类细菌的患者可由于其细菌感染无法被治疗而死亡。

[0004] 用于鉴定和研究微生物(包括但不限于细菌、真菌、寄生生物和病毒)及其对杀灭微生物或抑制微生物生长的抗生素的抗性的传统方法在细菌实例中主要受限于Luria肉汤(LB)琼脂平板。这些LB琼脂平板于是被制成包含限定浓度的杀菌和抑菌抗生素。针对抗生素易感性测试(AST)和抗生素或其他测检物对微生物的效应评价的此类二维(2D)培养法具有若干限制。例如,这些设置通常需要将微生物如细菌过夜培养以允许清楚的结果读出,该结果读出显示特定的细菌菌株对给定的抗生素是否具有抗性。此外,通常每个LB琼脂平板仅可测试单一抗生素浓度。

[0005] 另一种现有技术AST方法采用所谓的E试验。E试验基本上为琼脂扩散法并使用浸渍有不同浓度的测检物的矩形条,所述测检物作为抗生素的效应有待评价。在典型的方法中,在将E试验条置于琼脂平板的情况下,细菌在2D培养中在琼脂平板的顶部散布和生长。E试验条通过扩散来释放测检物,并且在孵育24小时后检测释放的测检物的生长抑制效应。除了很长的孵育时间之外,此方法的局限是仅可在数字步阶不同并且E试验条中使用选定浓度的情况下读出测检物的抑制浓度。

[0006] 另一传统的AST方法使用微量滴定板测定,其中不同的孔内具有不同浓度的测检物。通常将添加有细菌的微量滴定板孵育过夜,并且通过测量不同孔中的光学浊度来评价对细菌的抑制效应。此方法的缺点与使用E试验条时的缺点基本上相同。

[0007] 为了缩短AST时间,已开发出用于快速AST(RAST)的微流体通道系统。此类RAST方法包括液滴式微流体通道系统,在该液滴式微流体通道系统中,细菌被捕获在包含抗生素的液滴中[1-3]。液滴式系统的局限是仅可测试单一抗生素浓度。其他RAST方法包括使用气体可渗透聚二甲基硅氧烷(PDMS)微通道[4];将细菌介电电泳捕获在微流体电极结构中[5-6];含有抗生素的预载PDMS层[7];使细菌共价结合到微流体通道并使它们经受机械剪切应力[8];使用异步磁珠旋转(AMBR)生物传感器[9]或跟踪微流体琼脂糖通道系统内的单细胞生长[10],这些各种RAST方法的主要局限是它们仅可测试单一抗生素浓度或一组少量的选定抗生素浓度。

[0008] 还进一步提议使用用于分析细菌生物膜抗生素易感性的微流体系统[11],然而其微流体系统需要24小时的孵育并且待测试细菌含有能够表达绿荧光蛋白(GFP)的质粒。

[0009] 因此,仍然需要不具有现有技术缺点的响应微生物检验的快速方法和系统。

[0010] 发明概述

[0011] 总体目标是允许有效快速地测定微生物对测检物的响应。

[0012] 此目标和其他目标通过本文所定义的实施方案来满足。

[0013] 实施方案的一个方面涉及一种测定微生物对测检物的响应的方法。所述方法包括在三维(3D)培养基质中提供微生物的培养物,所述三维培养基质布置在流体装置的培养室中,所述流体装置具有侧接所述培养室的第一末端部分的第一流体通道和侧接所述培养室的第二不同末端部分的第二流体通道。所述方法还包括将第一流体通道的输入连接至包含第一浓度的测检物的第一流体流。所述方法还包括将第二流体通道的输入连接至不含测检物或包含第二浓度的测检物的第二流体流,所述第二浓度低于所述第一浓度,从而在3D培养基质的至少一部分上形成测检物的浓度梯度。所述方法另外包括基于3D培养基质中的任意边界区相对于第一末端部分和/或第二不同末端部分的位置来测定微生物对测检物的响应。所述边界区在微生物显示出对测检物的第一响应的第一响应区与微生物显示出对测检物的第二不同响应的第二响应区之间。

[0014] 实施方案的另一方面涉及一种用于测定微生物对测检物的响应的系统。所述系统包括流体装置,所述流体装置包括培养室,所述培养室被构造成将微生物的培养物容纳在3D培养基质中。所述流体装置还包括侧接所述培养室的第一末端部分的第一流体通道和侧接所述培养室的第二不同末端部分的第二流体通道。所述系统还包括第一流体贮存器,所述第一流体贮存器包含第一流体,所述第一流体包含第一浓度的测检物。所述第一流体贮存器被构造成连接至所述第一流体通道的输入。所述系统还包括第二流体贮存器,所述第二流体贮存器包含第二流体,所述第二流体不含测检物或包含低于第一浓度的第二浓度的测检物。所述第二流体贮存器被构造成连接至所述第二流体通道的输入以在3D培养基质的至少一部分上形成测检物的浓度梯度。所述系统另外包括基于计算机的系统,所述基于计算机的系统被配置成获取3D培养基质的至少一个图像并对所述至少一个图像进行处理以鉴定3D培养基质中的任意边界区相对于第一末端部分和/或第二不同末端部分的位置。所述边界区在微生物显示出对测检物的第一响应的第一响应区与微生物显示出对测检物的第二不同响应的第二响应区之间。所述基于计算机的系统还被配置成基于边界区的位置来测定微生物对测检物的响应。

[0015] 实施方案的另一方面涉及流体装置用于测定微生物对测检物的响应的用途。所述流体装置包括培养室,所述培养室被构造成将微生物的培养物容纳在3D培养基质中。所述流体装置还包括第一流体通道,所述第一流体通道侧接所述培养室的第一末端部分并且被构造成运载包含第一浓度的测检物的第一流体流。所述流体装置还包括第二流体通道,所述第二流体通道侧接所述培养室的第二不同末端部分并且被构造成运载不含测检物或包含第二浓度的测检物的第二流体流,所述第二浓度低于所述第一浓度,从而在3D培养基质的至少一部分上形成测检物的浓度梯度。所述用途包括基于3D培养基质中的任意边界区相对于第一末端部分和/或第二不同末端部分的位置来测定微生物对测检物的响应。所述边界区在微生物显示出对测检物的第一响应的第一响应区与微生物显示出对测检物的第二不同响应的第二响应区之间。

[0016] 实施方案的各方面允许快速有效地测定微生物对各种测检物的响应。可根据实施

方案测试微生物对连续范围的浓度的响应。

附图说明

[0017] 结合以下描述和附图可最佳地理解各实施方案以及其另外的目的和优点,在附图中:

- [0018] 图1为示出根据一个实施方案测定微生物对测检物的响应的方法的流程图;
- [0019] 图2为示出图1中的连接步骤的一个实施方案的流程图;
- [0020] 图3为示出根据一个实施方案的图1中的方法的附加任选步骤的流程图;
- [0021] 图4为示出根据一个实施方案的图1中的方法的附加任选步骤的流程图;
- [0022] 图5为示出根据一个实施方案的图1中的方法的附加任选步骤的流程图;
- [0023] 图6为示出根据一个实施方案的图3中的方法的附加任选步骤的流程图;
- [0024] 图7为示出图6中的测定MIC步骤的一个实施方案的流程图;
- [0025] 图8为根据一个实施方案的微流体装置和含有微生物的3D培养基质的示意性概览图;
- [0026] 图9为根据一个实施方案的微流体装置的培养室和流体通道的示意图;
- [0027] 图10为根据另一个实施方案的微流体装置的培养室和流体通道的示意图;
- [0028] 图11为根据另一个实施方案的微流体装置的培养室和流体通道的示意图;
- [0029] 图12为根据另一个实施方案的微流体装置的培养室和流体通道的示意图;
- [0030] 图13为根据另一个实施方案的微流体装置的培养室和流体通道的示意图;
- [0031] 图14为根据另一个实施方案的微流体装置的培养室和流体通道的示意图;
- [0032] 图15为根据另一个实施方案的微流体装置的培养室和流体通道的示意图;
- [0033] 图16示意性地示出根据一个实施方案的用于测定微生物对测检物的响应的系统以及示出3D培养基质中浓度梯度形成的时间序列;
- [0034] 图17A示出在贯穿含有大肠杆菌(E.coli)K12 MG1655的3D培养基质的氨苄青霉素的线性梯度(从左到右为20-0 μ g/ml)形成后获取的3D培养基质的图像(黑色框指示用于强度测量的选定区域);
- [0035] 图17B示出图17A中的选定区域的强度分布曲线,其中5 μ g/ml的强度增加指示大肠杆菌K12 MG1655对氨苄青霉素的最小抑制浓度;
- [0036] 图17C示意性地示出贯穿图17A的3D培养基质的氨苄青霉素的线性梯度(20-0 μ g/ml);
- [0037] 图18A示出在贯穿含有大肠杆菌K12 MG1655的3D基质的壮观霉素的线性梯度(从左到右为50-0 μ g/ml)形成后获取的3D培养基质的图像(黑色框指示用于强度测量的选定区域);
- [0038] 图18B示出图18A中的选定区域的强度分布曲线;
- [0039] 图18C示意性地示出贯穿图18A的3D培养基质的壮观霉素的线性梯度(从左到右为50-0 μ g/ml);
- [0040] 图19为暴露于各种浓度的壮观霉素的大肠杆菌K12 MG1655随时间推移的生长曲线的图;以及
- [0041] 图20示意性地示出在微流体装置中用稳定和连续梯度的抗微生物剂培养细胞的

结果。

[0042] 发明详述

[0043] 在整个附图中,相同的附图标号针对相似或对应的元件使用。

[0044] 本发明的实施方案总体上涉及流体装置,具体地涉及此类流体装置在测定微生物对测检物的响应中的用途。已得出的结论是诸如微流体装置的流体装置可被设计为特别适合于监测或测定微生物对各种测检物的响应。更详细地讲,此类流体装置提供了快速测定微生物对测检物或实际上对多种测检物的任意组合的响应的有效工具,所述流体装置具有含有三维(3D)培养基质的培养室,所述三维培养基质包含相关微生物的培养物。

[0045] 此类流体装置具有使其成为非常有效的工具的关键特征。首先,可在3D培养基质的至少一部分上快速准确地确立相关测检物的稳态梯度。这意味着连续范围的测检物浓度是从3D培养基质的其中一个末端部分或侧面的高浓度降至3D培养基质的另一末端部分或侧面的低浓度或零浓度来确立。因此,可用单一流体装置来测试测检物的连续范围的浓度。这与其中可测试一种或少量预定浓度但不能测试任何连续范围的浓度的现有技术形成鲜明对比。因此,可对例如抗生素的最小抑制浓度进行更精确的测定。

[0046] 其次,将微生物在3D培养基质中进行培养。因此,使得微生物以三维形式生长。这继而在3D培养基质的存在活的和生长的微生物的区域与细胞死亡或低生长的区域之间提供更佳显著的差异。因此,实施方案提供了增强的信噪比。因此,与微生物以生物膜的形式在二维(2D)表面(较少的微生物可在该二维表面上生长,因此产生较低的检测信号)上生长相比,更易于在3D培养基质中的不同区域或区之间进行区分。

[0047] 可在3D培养基质的至少一部分上快速地确立测检物的梯度。这连同微生物三维生长的可能性允许在非常短的时间内(通常在一小时或最多几小时内)读取微生物对测检物的响应。这应与通常需要孵育过夜的若干现有技术形成对比。

[0048] 所述流体装置有利地以小型装置,即微流体装置或甚至纳米流体装置的形式提供。因此,需要少量的测检物和微生物即可成功地运行试验。

[0049] 可使用常用显微镜法或实际上甚至通过人眼来测定或监测微生物对测检物的响应。因此,通常不需要复杂的和专门设计的检测设备来测定微生物对测检物的响应。

[0050] 实施方案在监测和测定微生物对各种测检物的响应中使用流体装置。流体装置(在本文中也称为流体培养装置)意味着流体流存在于所述流体装置的通道中以将测检物传送至培养室,并从而进一步到达存在于培养室内的3D培养基质中。

[0051] 所述流体装置有利地为所谓的微流体装置或微流体培养装置。微流体意味着微流体装置的流体通道为微小尺寸通道。一般来讲,对于尺寸在亚微米范围内的流体通道而言,常常使用表达纳米流体学。因此,实施方案的流体装置可为此类纳米流体装置或纳米流体培养装置。

[0052] 流体培养装置的流体通道被构造成运载相应的流体流。流体流优选地为流体通道中的液体的液体流。然而,还可能的是流体通道中具有气体流或实际上流化固体或颗粒。根据实施方案还可使用其中具有溶解气体的液体流。

[0053] 在通用实施方案中,流体装置1(参见图8)包括培养室10,培养室10被构造成将微生物6的培养物容纳在3D培养基质2中。流体装置1还包括侧接培养室10的第一末端部分或侧面12的第一流体通道20和侧接培养室10的第二不同末端部分或侧面14的第二流体通道

30. 第一流体通道20于是被构造成运载包含第一浓度的测检物的第一流体流。第二流体通道30相应地被构造成运载不含测检物或包含第二浓度的测检物的第二流体流, 所述第二浓度低于所述第一浓度, 从而在3D培养基质2的至少一部分上形成测检物的浓度梯度。

[0054] 为了在3D培养基质2的至少一部分上形成测检物的浓度梯度, 两种流体流应包含不同浓度的测检物。在本文中, 第一流体流被定义为包含最高浓度的测检物的流体流。

[0055] 这意味着第二流体流不含测检物或与第一流体流相比包含不同, 即较低浓度的测检物。

[0056] 除了一种或多种待测试的测检物之外, 两种流体流优选地具有相同德尔成分或组分。因此, 如果流体流为液体流, 则第一流体流和第二流体流优选地包含相同的液体或液体混合物, 测检物以选定的第一浓度或选定的第一浓度和第二浓度添加到所述液体或液体混合物中。相应地, 如果两种流体流为气体流, 则第一流体流和第二流体流优选地包含相同的气体或气体混合物, 测检物以选定的浓度添加到所述气体或气体混合物中。

[0057] 实施方案可通常使用具有培养室的任何流体装置, 所述培养室被构造成容纳3D培养基质并且在不同的末端部分侧接有相应的流体通道。本领域中可用若干此类流体通道。例如, 根据实施方案工作良好的微流体装置由Gradientech AB (Uppsala, Sweden) 以CELLDIRECTOR®Ruby市售。根据实施方案可使用的流体装置公开于例如下列参考文献[12-17, 19]中, 这些参考文献关于微流体装置的教导据此以引用方式并入。

[0058] 图20示意性地示出将凝胶和细胞混合物注入微流体装置的培养室中。细胞最初均匀分布在所形成的3D培养基质中。在示例性实例中, 通过提供包含抗微生物剂的第一流体流和不含抗微生物剂的第二流体流来提供稳定连续的梯度。从而在培养室和3D培养基质上确立梯度。下方的图示出在3D培养基质中培养细胞并将其暴露于抗微生物剂梯度的结果。

[0059] 图1为根据一个实施方案测定微生物对测检物的响应的方法的流程图。所述方法包括在步骤S1中在3D培养基质中提供微生物, 所述3D培养基质布置在流体装置的培养室中。此流体装置具有侧接培养室的第一末端部分或侧面的第一流体通道和侧接培养室的第二不同末端部分或侧面的第二流体通道。下一步骤S2包括将第一流体通道的输入连接至包含第一浓度的测检物的第一流体流。步骤S3相应地包括将第二流体通道的输入连接至不含测检物或包含第二浓度的测检物的第二流体流, 所述第二浓度低于所述第一浓度。因此, 在3D培养基质的至少一部分上由此形成测检物的浓度梯度。下一步骤S4基于3D培养基质中的任意边界区相对于第一末端部分或侧面和/或相对于第二不同末端部分或侧面的位置来测定微生物对测检物的响应。此边界区存在于微生物显示出对测检物的第一响应的第一响应区与微生物显示出对测检物的第二不同响应的第二响应区之间。

[0060] 两个步骤S2和S3可以任何顺序逐次进行, 即, 步骤S2在步骤S3之前或之后。或者, 两个步骤S2和S3可至少部分地并行进行。

[0061] 3D培养基质中的微生物对测检物的响应意味着将通常存在至少三个明显可见的区。这些区包括微生物显示出对测检物的第一响应的第一响应区。此第一响应区为最靠近第一末端部分或侧面和第一流体通道的区。因此, 第一响应区与3D培养基质的暴露于较高浓度测检物的一部分对应。这些区还包括微生物显示出对测检物的第二响应并且此第二响应不同于第一响应的第二响应区。第二响应区为最靠近第二末端部分或侧面和第二流体通道的区。因此, 第二响应区与3D培养基质的暴露于较低浓度测检物的一部分对应。

[0062] 边界区于是构成3D培养基质的存在于第一响应区与第二响应区之间的部分。此边界区5可为非常薄的,基本上为第一响应区3与第二响应区4之间的交界或边界,如图17A中所示。或者,边界区5在3D培养基质中在第一末端部分或侧面与第二末端部分或侧面之间具有较宽的延伸,如图18A中所示。

[0063] 边界区从而构成3D培养基质的部分,在所述部分中,测检物的局部浓度实现了对测检物的响应从第一响应区中的第一响应向第二响应区中的第二响应的转变或改变。

[0064] 例如,如果测检物为抗生素或另一种杀菌剂或抑菌剂,则第二响应区(其中以细菌为代表的微生物暴露于较低浓度的测检物)可为3D培养基质的含有活的和生长的细菌的部分。第一响应区于是优选地为3D培养基质的基本上无活的和生长的细菌的部分,因此第一响应区的特征在于相对缺乏细菌(由于细胞生长或无细胞生长)。边界区于是构成生长/活的部分与未生长/细胞死亡部分之间的边界或部分。

[0065] 图17A清楚地示出含有生长的细菌的第二响应区4(在图中看为白色信号)。在3D培养基质的此部分中,测检物(此处为氨苄青霉素)的浓度过低而不能在大肠杆菌K12 MG1655细菌间阻止细胞生长或诱导细胞生长。然而在第一响应区3中,氨苄青霉素的浓度足够高到阻止细胞生长或诱导细胞生长。因此,在3D培养基质的此部分中基本上看不到大肠杆菌K12 MG1655。在示出的实验中,边界区5基本上为限定针对此特定大肠杆菌菌株的氨苄青霉素的最小抑制浓度(MIC)的清楚边界或交界。

[0066] 在图18A中,情形有所不同,其中边界区5在含有活的和生长的大肠杆菌K12 MG1655的第二响应区4与作为测检物的壮观霉素的浓度足够高到杀灭细菌或至少阻止任何细菌生长的第一响应区3之间。在此实验中,大肠杆菌K12 MG1655中的一些显示出对抗生素壮观霉素的抗性,如边界区5中的一些活的和生长的细菌显示。然而,此边界区5中的细菌的量显著低于且不同于第二响应区4中的细菌的量,如图18A中清楚地显示。

[0067] 在待测试微生物的运动性响应的相应情景中,第二响应区可为3D培养基质的含有低运动性或无运动性的微生物的部分(如果测检物在以其他方式相当固定的微生物中诱导运动性)或含有高运动性的微生物的部分(如果微生物是能动性的,而测检物抑制此运动性)。第一响应区可于是为含有足够高浓度的测检物以诱导微生物间的运动性或抑制微生物的运动性的3D培养基质的部分。边界区于是为3D培养基质的介于第一响应区与第二响应区之间的部分并且特征在于运动性从边界区一个侧面上的固定/低运动性部分到边界区另一侧面上的能动性/高运动性部分转换或改变。边界区可于是为类似于图17A的清楚边界或交界或含有一些运动性中等的微生物的较宽部分。

[0068] 运动性和细胞生长仅为可根据实施方案监测和测定微生物的响应的实例。其他非限制性实例包括细胞生长、增殖、对各种形式的诱导应力的响应行为、基质粘附、可突变性等。

[0069] 待测定响应的微生物可为可在流体装置的3D培养基质中生长和培养的任何微生物。此类微生物的非限制性实例包括细菌、真菌、寄生生物、病毒以及细胞例如人类细胞或其他哺乳动物细胞。可对微生物的单一菌种或菌株进行测试并从而将其在3D培养基质中培养。或者,可测定多种,即至少两种微生物的综合响应。在此类方法中,将多种不同的微生物在3D培养基质中进行共培养。

[0070] 3D培养基质可由适于作为相关微生物培养基质的任何材料制成。此类材料可在传

统用于细胞培养物的材料中选择。材料的优选的但非限制性的实例包括琼脂；琼脂糖；胶原I；细胞外基质(ECM)凝胶，例如MATTRIGELTM；水凝胶，例如通过固相合成的苯丙氨酸(Phe)二肽(N末端上具有芴甲氧羰基(Fmoc)保护基)与Fmoc保护的赖氨酸(Lys)或仅苯丙氨酸的混合。

[0071] 在一个特定实施方案中，微生物属于一种细菌菌株并且测检物为抗生素，抗生素的MIC通过流体装置来测定。

[0072] 在图1的步骤S4中基于边界区相对于培养室的第一和/或第二末端部分或侧面来测定3D培养基质中的微生物对测检物的响应。边界区相对于培养室的末端部分或侧面的此位置与测检物的浓度或至少浓度范围关联。因此，边界区的位置或边界区与第一末端部分或侧面之间的距离和/或边界区与第二不同末端部分或侧面的距离对应于测检物的浓度或浓度范围。因此，可准确测定微生物的响应从第一响应区中的第一响应向第二响应区中的第二响应改变或转变的浓度或浓度范围。

[0073] 这进一步意味着边界区的位置可从而转化或转换成例如抗生素的MIC、抑制/诱导微生物运动性的测检物的运动性抑制/促进浓度、抑制/诱导微生物的基质粘附力的测检物的粘附力抑制/促进浓度等。

[0074] 在一个特定实施方案中，步骤S4包括基于3D培养基质中的边界区相对于第一末端部分和/或第二不同末端部分的位置以及基于边界区的宽度来测定微生物对测检物的响应。因此，在此特定实施方案中，在测定响应时不仅使用边界区的位置(即，边界区与培养室的第一和/或第二末端部分的距离)，而且使用边界区的宽度。例如，如果边界区的宽度基本上为零(参见图17A)，即，基本上为第一响应区与第二响应区之间的交界或边界，则微生物的响应在特定的测检物浓度下发生变化。然而，如果边界区具有非零宽度(参见图18A)，则微生物的响应在与边界区的响应末端对应的浓度范围下发生变化。

[0075] 具有非零宽度的边界区还可提供关于微生物对测检物的任何抗性的信息。因此，延伸的边界区可意味着测检物的抗性存在于微生物的一些中，例如由于这些微生物能够在测检物浓度下生长，否则会杀灭非抗性微生物或阻止其生长。这意味着可使用边界区的宽度来测定或检测微生物对测检物的任何给定时间的抗性。

[0076] 事实上，实际上可用实施方案的流体装置和方法来检测微生物的任何突变，所述突变诱导对测检物的抗性或实际上导致对测检物的抗性丧失。因此，当用3D培养基质中的微生物培养物和通过第一流体通道和第二流体通道的第一流体流和第二流体流来运行流体装置时，可监测边界区随时间推移的宽度。边界区的宽度随时间推移增加于是通常意味着在微生物的至少一些中对测检物的抗性增加。相应地，边界区的宽度减小通常意味着先前显示出对测检物的抗性的微生物丧失对测检物的抗性。

[0077] 因此，在一个特定实施方案中，优选的是在微生物对测检物的响应时不仅使用边界区的位置而且使用边界区的宽度。

[0078] 在使用多种测检物和梯度的流体装置的更复杂的设置和布置中，可相关的不仅仅是一个或多个边界区的宽度。在这些情况下，另外或替代地，边界区的实际形状可为对微生物对测检物的响应的描述。边界区的形状可于是涵盖诸如面积、曲率、不同方向的宽度等的参数。因此，在一个特定实施方案中，在测定微生物对测检物的响应时使用边界区的位置和边界区的形状。

[0079] 图2为示出根据一个特定实施方案的图1中的步骤S2和S3的流程图。下文将进一步参照图8和其中示出的流体装置1对此图进行进一步描述。所述方法从图1中的步骤S1继续。下一步骤S10包括将第一流体通道20的输入22连接至包含第一流体的第一流体贮存器26，所述第一流体包含第一浓度的测检物。下一步骤S11包括将来自第一流体贮存器26的第一流体泵送或以其他方式提供到第一流体通道20的输入22中并通过第一流体通道20的输出24排出。

[0080] 步骤S12包括将第二流体通道30的输入32连接至包含第二流体的第二流体贮存器36，所述第二流体不含测检物或包含第二浓度的测检物。接下来的步骤S13包括将来自第二流体贮存器36的第二流体泵送或以其他方式提供到第二流体通道30的输入32中并通过第二流体通道30的输出34排出。所述方法然后继续至图1的步骤S4。

[0081] 因此，在一个特定实施方案中，各流体通道20, 30连接至包含流体的流体贮存器26, 36，所述流体流动通过流体通道20, 30并将测检物传送至培养室10中的3D培养基质2。可使用能够确立通过流体通道20, 30的流体流的任何设备（未示出）将流体从流体贮存器26, 36抽出并进入流体通道20, 30。通常，流体泵或推进器布置在来自流体贮存器26, 36和流体通道20, 30的输入22, 32的流体路径中和/或连接至流体通道20, 30的输出24, 34。可能的是使用在两个流体路径上操作的单个泵或推进器。

[0082] 在图8中，流体通道20, 30具有共用输出24, 34。因此，第一流体通道20和第二流体通道30在培养室10下游的点处交汇。在替代方法中，各流体通道20, 30具有各自的输出24, 34。

[0083] 将流体从贮存器26, 36泵送至流体通道20, 30的输入22, 32中优选地贯穿流体装置1的使用或操作来进行以测定响应。因此，流体的泵送优选地至少进行到已测定出微生物6对测检物的响应为止。

[0084] 存在于两个流体贮存器26, 36中的流体优选地为相同的流体，不同之处在于具有各自的测检物浓度。

[0085] 提供通过流体通道20, 30的均匀非波动流体流意味着将在3D细胞基质2的至少一部分上确立测检物的梯度。这意味着当流体通道20, 30连接至流体贮存器26, 36并且刚开始将流体泵送通过通道时，在3D培养基质10上还未确立测检物的浓度梯度。形成鲜明对比的是，培养室10的第一末端部分或侧面12暴露于测检物的第一浓度并且培养室20的第二末端部分或侧面14暴露于测检物的第二浓度或完全未暴露于测检物。此刻，基本上无测检物扩散到3D培养基质2中，3D培养基质2于是通常具有零浓度的测检物。随时间推移，测检物从第一流体通道20中的第一流体扩散到3D培养基质2中。最终，在3D培养基质2的至少一部分上确立测检物的稳态浓度梯度，其中3D培养基质2的第一末端面向具有第一测检物浓度的第一流体通道20并且3D培养基质2的第二末端面向具有零或第二测检物浓度的第二流体通道20。

[0086] 在图2中，已展示具有两个流体通道20, 30的流体装置1。如果超过两个流体通道20, 30侧接培养室10的相应末端部分，则优选地对每个这样的流体通道进行相应的连接和泵送步骤。

[0087] 在图2中，已按逐次顺序展示所述步骤。步骤S10和S12可以任何顺序逐次进行或至少部分地并行进行。步骤S11和S13的泵送通常并行地并且贯穿流体装置1的全部使用或操

作进行。

[0088] 因此,在一个特定实施方案中,所述方法包括图4中所示的附加步骤S30。所述方法从图1的步骤S3或实际上从图2中的步骤S13继续。此附加步骤S30包括通过将来自第一流体流的测检物扩散到3D培养基质2中来在3D培养基质的至少一部分上确立浓度梯度。优选地在第一流体或第二流体流基本上未通过3D培养基质的情况下实现测检物的此扩散。

[0089] 因此,扩散是从所谓的源流体通道20开始,源流体通道20相对于另一流体通道(标示为宿流体通道30)在流体中具有较高的测检物浓度。在一个优选的实施方案中,由于之后不存在通过培养室10中的3D培养基质2的流体流,因此两个流体通道20,30中的流体流量优选地保持基本上相似。基本上相似指示两种流量优选地相同,但由于泵送系统的流量的固有偏差而略有不同。因此,两个流体通道20,30中的流量差优选地小于10%,更优选地小于5%如小于2.5%,更优选地小于1%。

[0090] 如果在3D培养基质2和具有矩形或方形底部区域的培养室10的流体通道20,30的部分上没有净流体流量,则3D培养基质2上的浓度梯度将为线性的。

[0091] 根据流体通道相对于培养室的位置以及培养室和布置于其中的3D培养基质的形状,可在整个3D培养基质上或在3D培养基质的一部分上确立测检物的浓度梯度。

[0092] 在一个实施方案中,两个流体流中的测检物的相应浓度在整个工序中是固定的。因此,在这种情况下,第一浓度和第二浓度(如果非零)优选地为固定的。在另一个实施方案中,可在工序期间改变或调节流体流的至少一者中的测检物浓度。此类浓度的改变可以一个或多个步骤实现,即,从初始浓度转变成新的测检物浓度。或者,浓度变化可为逐渐的和随时间推移的。

[0093] 流体流中的测检物的初始浓度不导致任何可检测效应,则可例如使用浓度变化。例如,两个流体流中的抗生素浓度过低并从而获得贯穿整个3D培养基质的微生物生长可为适于增加至少第一流体通道中的抗生素浓度的情况。

[0094] 流体流的至少一者的测检物浓度变化还可用于各种应力试验中。

[0095] 图3为示出根据各实施方案的方法的附加步骤的流程图。在一个实施方案中,所述方法从图1的步骤S3(或从图2中的步骤S13或图4中的步骤S30)继续。此实施方案中,下一步骤S21包括获取3D培养基质的至少一个图像或照片。然后在步骤S22中在至少一个图像中识别边界区。所述方法然后继续至图1的步骤S4,在该步骤中,基于边界区相对于3D培养基质的第一和/或第二末端部分或侧面的位置来测定微生物对测检物的响应并且在至少一个图像中识别此位置。

[0096] 因此,获取3D培养基质的一个或多个图像,然后在这些图像的至少一者中识别边界区。然后可通过图像以手动方式或通过使用合适设备的图像处理来测定边界区的位置以及任选的边界区的宽度和/或形状,如本文中进一步所公开。

[0097] 在一个特定实施方案中,在步骤S21中使用亮视野显微镜或使用相差显微镜来获取3D培养基质的至少一个图像。在这种情况下,可基于在至少一个图像中检测到的光强度来识别边界区的位置和任选的宽度和/或形状。在一个实施方案中,步骤S22因此包括通过计算机来处理至少一个图像,所述计算机被配置成基于在至少一个图像中检测到的光强度来识别边界区。

[0098] 因此,在大多数实施方案中,在使用亮视野显微镜或相差显微镜获取的3D培养基

质的图像中的第一响应区与第二响应之间存在明显的视觉差异。因此,可以手动方式或使用具有合适图像处理程序或软件的计算机通过图像中检测到的光强度来识别图像中边界区的位置和任选的宽度和/或形状。这意味着在大多数实际的实施方案中无需对微生物进行染色或标记。

[0099] 然而,可具有附加的任选步骤S20,其包括向3D培养基质中添加荧光标记。此荧光标记于是被构造成结合微生物或被微生物吸收。在这种情况下,优选地在步骤S21中使用荧光或共焦显微镜来获取3D培养基质的至少一个图像。然后在步骤S22中通过计算机处理至少一个图像来识别边界区,所述计算机被配置成基于在至少一个图像中检测到的荧光来识别边界区。或者,至少一个图像的手动检测可用来基于至少图像中的荧光来识别边界区(位置和任选的宽度和/或形状)。

[0100] 在上述实施方案中,向3D培养基质中添加至少一个荧光标记。在替代方法中,微生物本身可表达至少一种可在图像中检测到的物质例如荧光物质,所述图像使用荧光或共焦显微镜或实际上任何其他成像技术来检测。或者,可例如通过转染编码此类物质的工程化表达载体来使微生物表达此类物质。因此,在此类方法中,可在步骤S20中省略荧光标记。

[0101] 在一个优选的实施方案中,步骤S21包括在至少于3D培养基质的至少一部分上形成测检物的稳态浓度梯度之后获取3D培养基质的至少一个图像。因此,在特定方法中,优选的是首先确立稳态浓度梯度,然后测定微生物对测检物的响应。因此,为了识别边界区而待获取和分析或处理的至少一个图像优选地在形成此类稳态浓度梯度后进行获取。

[0102] 另外,在达到稳态之前,梯度的形成是可预计的并且在一些情况下可使用例如荧光化合物来直接可视化,从而允许早在实现稳态梯度之前就读取与已知测检物浓度有关的微生物响应。

[0103] 可在步骤S21中获取3D培养基质的单个图像。或者,通过将流体通道的输入连接至相应流体流来在例如0至12小时的间隔内周期性获取3D培养基质的图像。在一个特定实施方案中,通过将流体通道连接至相应流体流来周期性获取图像的时间间隔在开始监测后优选地为0至6小时,或0至4小时,或0至3小时,或更优选地为0至2小时或0至1小时。

[0104] 在上述中,讨论主要针对在流体装置中测定对单一测检物的响应。然而,还可同时测定对多种测检物的响应、测定对多种测检物的混合物的响应或实际上测定对多种测检物或其混合物的不同响应。

[0105] 在一个实施方案中,图1的步骤S2从而包括将第一流体通道的输入连接至第一流体流,所述第一流体流包含第一浓度的第一测检物并且不含第二测检物或包含第三浓度的第二测检物,步骤S3于是包括将第二流体通道的输入连接至第二流体流,所述第二流体流不含第一测检物或包含第二浓度(所述第二浓度低于所述第一浓度)的第一测检物并且包含第四浓度的第二测检物,所述第四浓度高于所述第三浓度。从而在3D培养基质的至少一部分上形成第一测检物的第一浓度梯度和第二测检物的第二浓度梯度。

[0106] 在此实施方案中,步骤S4包括基于3D培养基质中的任意边界区相对于培养室的第一和/或第二末端部分或侧面的相应位置来测定微生物对第一测检物和第二测检物的响应。所述边界区在微生物显示出对第一测检物和第二测检物的第一响应的第一响应区与微生物显示出对第一测检物和第二测检物的第二不同响应的相应第二响应区之间。

[0107] 因此,在此实施方案中,第一测检物的浓度梯度是在3D培养基质的至少一部分上

从第一流体通道(第一测检物的高浓度)到第二流体通道(第一测检物的低浓度)进行确立。相应地,第二测检物的浓度梯度是在3D培养基质的至少一部分上从第二流体通道(第二测检物的高浓度)到第一流体通道(第二测检物的低浓度)进行确立。

[0108] 如果测检物例如为不同的抗生素,则可存在两个边界区。在一种情况下,当从第一流体通道向第二流体通道移动时,3D培养基质可潜入下列各区:不含活的或生长的微生物的第一“死”区、第一边界区、含有活的和生长的微生物的生长区、第二边界区和第二“死”区。相应区的位置和宽度(形状)取决于特定的抗生素、抗生素浓度(第一浓度和第四浓度以及任选的第二浓度和第三浓度)和特定的微生物。

[0109] 在另一种方法中,步骤S2包括将第一流体通道的输入连接至第一流体流,所述第一流体流包含第一浓度的第一测检物并且包含第三浓度的第二测检物。步骤S3于是包括将第二流体通道的输入连接至第二流体流,所述第二流体流不含第一测检物或包含第二浓度(所述第二浓度低于所述第一浓度)的第一测检物并且不含第二测检物或包含第四浓度的第二测检物,所述第四浓度低于所述第三浓度。从而在3D培养基质的至少一部分上形成第一测检物的第一浓度梯度和第二测检物的第二浓度梯度。

[0110] 在此实施方案中,步骤S4包括基于3D培养基质中的任意边界区相对于培养室的第一和/或第二末端部分或侧面的位置来测定微生物对第一测检物和第二测检物的混合物的响应。所述边界区在微生物显示出对混合物的第一响应的第一响应区与微生物显示出对混合物的第二不同响应的第二响应区之间。

[0111] 因此,在此实施方案中,第一测检物的浓度梯度是在3D培养基质的至少一部分上从第一流体通道(第一测检物的高浓度)到第二流体通道(第一测检物的低浓度)进行确立。相应地,第二测检物的浓度梯度是在3D培养基质的至少一部分上从第一流体通道(第二测检物的高浓度)到第二流体通道(第二测检物的低浓度)进行确立。

[0112] 此实施方案与前一实施方案的不同之处在于第一流体流包含最高浓度的两种测检物,而在前一实施方案中,第一流体流具有最高浓度的第一测检物,而第二流体流具有最高浓度的第二测检物。

[0113] 本实施方案从而更适于测定微生物对测检物的混合物或掺混物的响应。形成鲜明对比的前一实施方案允许使用单一流体装置和单一培养室对两种测检物进行平行测试。

[0114] 在一个实施方案中,流体装置的培养室具有至少四个可连接至相应流体流的末端部分或侧面。因此,培养室于是另外具有侧接培养室的第三末端部分或侧面的第三流体通道和侧接培养室的第四不同末端部分或侧面的第四通道。在此实施方案中,测检物为第一测检物。

[0115] 所述方法于是包括将下列附加步骤:将第三流体通道的输入连接至第三流体流的,所述第三流体流包含第三浓度的第二测检物;和将第四流体通道的输入连接至第四流体流,所述第四流体流不含第二测检物或包含第四浓度的第二测检物,所述第四浓度低于所述第三浓度。因此,在3D培养基质的至少一部分上形成第二测检物的浓度梯度。在此实施方案中,所述方法还包括基于3D培养基质中的任意边界区相对于第三和/或第四末端部分或侧面的位置来测定微生物对第二测检物的响应。此边界区在微生物显示出对第二测检物的第一响应的第一响应区与微生物显示出对第二测检物的第二不同响应的第二响应区之间。

[0116] 在此实施方案中,可对两种测检物进行并行测试。例如,如果培养室和3D培养基质具有矩形或方形横截面,则第一测检物的浓度梯度可沿着第一流体通道与第二流体通道之间的X方向确立,而第二测检物的浓度梯度则沿着第三流体通道与第四流体通道之间的Y方向确立。

[0117] 在下文中,将结合测检物对所述方法的特定用途进行进一步描述,所述测检物为抗生素或其他形式的杀菌剂和/或抑菌剂。在此实施方案中,图1的步骤S4包括基于3D培养基质中的边界区相对于培养室的第一和/或第二末端部分或侧面的位置来测定微生物对测检物的易感性。此边界区于是在生长微生物的生长区与未生长微生物的非生长区之间。

[0118] 在此实施方案中,可进行图5中所示的附加步骤。所述方法从图1中的步骤S4继续。接下来的步骤S40基于边界区的宽度来测定微生物对测检物的抗性。因此,如果边界区具有非零宽度,则对测检物具有抗性的微生物能够在对应于边界区的浓度范围内生长。步骤S40的变型包括基于边界区的形状来测定微生物对测检物的抗性。

[0119] 图6为图1的步骤S4的一个实施方案的流程图,所述实施方案可根据在图3的步骤S21中例如使用亮视野显微镜或使用相差显微镜获取的3D培养基质的图像来测定测检物的MIC。所述方法于是从图3中的步骤S22继续并继续至步骤S50。此步骤S50包括测定检测到的光强度相对于3D培养基质在培养室的第一末端部分或侧面与第二不同末端部分或侧面之间的位置的关系。因此,此步骤S50基本上相当于测定第一末端部分或侧面与第二末端部分或侧面之间的不同距离下的检测到的光强度。此关系可例如呈坐标图或曲线图的形式,所述坐标图或曲线图示出检测到的光强度如何与培养室的第一末端部分和第二末端部分之间的距离相关,参见图17B和18B。

[0120] 例如,3D培养基质可被视为由具有检测到的光强度值的行和列构成的矩阵。在这种情况下,行可表示从3D培养基质的第一侧面朝3D培养基质的第二相对侧面(就矩形或方形3D培养基质而言)移动时所检测到的光强度值。这样的行于是与浓度梯度方向平行。在一个实施方案中,通过对所有行的检测到的光强度值求和并且用相应的求和值除以行数,得到具有检测到的光强度值平均值的平均值行(average row)。或者,通过对与浓度梯度方向垂直的方向上的所有行的检测到的光强度值进行求和来计算总和值行(sum row)。然后可在平均值行或总和值行上对不同距离下的检测到的光强度进行测定。

[0121] 接下来的步骤S51于是包括基于所述关系来测定针对微生物的MIC。

[0122] 图7为更详细地示出可如何进行此MIC测定的流程图。所述方法从步骤S50继续。下一步骤S60包括识别表示检测到的光强度与位置之间的关系的信号中存在扭结的位置。此信号因此可展示为图17B和18B中所示的图。因此,步骤S60探查信号并识别信号中存在扭结的位置。

[0123] 下一步骤S61包括基于3D培养基质中限定浓度的预定梯度信息与位置的关系将步骤S60中识别到的对应于扭结的位置转换成测检物的浓度。因此,在此方法中,3D培养基质中的测检物的浓度与相对于末端部分之一的位置之间存在预定关系。

[0124] 一般来讲,浓度梯度为处于稳态的线性浓度梯度,即,范围从第一末端部分或侧面的第一浓度到第二末端部分或侧面的第二浓度或零浓度。在这种情况下,测检物的浓度与相对于末端位置之一的距离或位置之间存在简单的关系。

[0125] 还可例如使用放射性标记来标记测检物或使用具有基本上类似扩散特性的易检

测(例如荧光)检测物质,所述扩散特性取决于通过作为测检物的3D培养基质的分子的大小。在这种情况下,可容易地测量放射性标记的测检物或检测物质的浓度梯度,并且可通过此类实验来测定3D培养基质中的限定浓度的预定梯度信息与位置的关系。

[0126] 在任一种情况下,预定梯度信息允许将步骤S60中测定的位置转换成与步骤S61中的测检物的MIC对应的浓度值。

[0127] 在3D培养基质内确立稳态梯度的时间取决于两个流体通道之间的3D培养基质的宽度和测检物的扩散常数。扩散常数又取决于温度、3D培养基质的粘度和测检物分子的半径。例如,琼脂糖基质中的氨苄青霉素的扩散常数为 $D=0.016 \text{ cm}^2/\text{h}$ [18]。

[0128] 图9至15示出根据不同实施方案的流体装置的部分,其中示出流体通道的各种编号和位置以及培养室的不同构型。然而,所示出的图应仅视为实施方案的少数示例性实例,另外的变型和改型也是可能的并且在实施方案的范围内。

[0129] 图9示出具有矩形或方形培养室10的流体装置的一个实施方案,培养室10具有侧接培养室10的第一侧面12的第一流体通道20和侧接第二相对侧面14的第二流体通道30。在此实施方案中,将在稳态期间在存在于培养室10的整个3D培养基质上确立线性浓度梯度。

[0130] 两个流体通道不一定必须如图9中所示侧接培养室的相对的侧面。图10示出具有第一流体通道20和第二流体通道30的培养室10,第一流体通道20和第二流体通道30侧接培养室10的两个相邻侧面12,16。在此实施方案中,将在这两个相邻侧面12,16之间确立浓度梯度。

[0131] 如上文所述,可使用两个以上的流体通道。图11示出培养室10的各个侧面12,14,16,18被相应的流体通道20,30,40,50侧接的实施方案。在此方法中,可测试两种不同的测检物以在3D培养基质上从第一流体通道20到第二相对流体通道30(X方向)确立第一测检物的第一线性浓度梯度。于是可在3D培养基质上从第三流体通道40到第四相对流体通道50(Y方向)确立第二测检物的第二线性浓度梯度。

[0132] 在图9-11中,公开了矩形或方形培养室10。然而,实施方案并不限于此。图12示出具有三角形构型的培养室10,培养室10具有侧接培养室10的第一侧面12的第一流体通道20、侧接第二相邻侧面14的第二流体通道30以及任选的侧接第三相邻侧面16的第三流体通道40。

[0133] 另外,具有五个、六个、七个或甚至更多个侧面的更复杂的培养室构型也是可能的。图13示出具有六个侧面12,14和多达六个流体通道20,30(其中仅有两个在图中以参考标号标出)的六边形培养室10。因此,在此实施方案中,可确立三种不同的线性浓度梯度,并从而在单一流体装置中测试三种不同的测检物。

[0134] 流体装置还包括圆形或椭圆形培养室10,如图14中示意性地示出。在这种情况下,流体通道20,30侧接培养室10的相应末端部分12,14。这些末端部分12,14对应于培养室10的周围的不同部分,并从而对应于待布置在培养室10的3D培养基质的侧表面的不同部分。

[0135] 在图9-14中,流体通道一直侧接形式为培养室周围的侧面或部分的末端部分。另外或替代地可使流体通道20,30侧接形式为培养室10的顶侧或上侧或顶部12以及底侧或下侧14的末端部分12,14,如图15中所示。

[0136] 本发明的实施方案可用于测定各种微生物的身份以及监测各种微生物、测检物和响应。因此,各实施方案可在医院诊所、实验室、诊断实验室、医疗设施等中具有许多不同的

用途。

[0137] 例如,各实施方案可用于鉴定生物活性化合物对任何给定微生物(关于微生物的生长、增殖、死亡或存活)具有效应或不具有效应的MIC或其他浓度阈值,以鉴定生物活性化合物对所述给定微生物具有效应的最小浓度。

[0138] 此外,通过对一组不同的测检物确立MIC,可在例如诊断试验中确立经测试微生物的表型身份。表型分析可导致对微生物菌株的充分鉴定或导致对微生物(关于对各种测检物的响应)的通用分类。

[0139] 各实施方案可用于追查受试化合物对微生物的生长、增殖、生存力或其他行为方面的MIC随时间推移的变化。此方法允许监测微生物随时间推移经过数代的抗性(例如抗生素抗性)发展和丧失,从而改变微生物代谢或抵抗测检物效应的能力。此类实验可用于提供测检物的合适临床剂量和/或给药频次的指示。因此,各实施方案可用于研究任何给定类型的微生物中的任何测检物或测检物组合的药效动力学和药代动力学。

[0140] 各实施方案还可用于评价和鉴定测检物如抗生素的组合(所述测检物组合在一起比单个物质更加有效),或评价测检物对微生物的例如生长、增殖、生存力或其他行为方面是否具有协同效应,或它们组合在一起是否对所述方面不具有效应。

[0141] 各实施方案可用于筛选新颖药物或化合物对微生物生长、增殖、生存力、死亡、散布能力或微生物的其他行为方面的效应。

[0142] 各实施方案还可用于快速获取任何给定微生物对临床实践中所用物质的响应的第一分布。目的是可为鉴定适于患有微生物感染的患者的抗微生物治疗的物质。这甚至可在患者的生命取决于快速鉴定引起感染的微生物的情况下使用以设计正确的治疗。

[0143] 各实施方案还可用于研究药物或测检物对已感染病毒的宿主细胞的效应,对细胞行为、细胞存活、细胞增殖、细胞生长和/或细胞分化的效应被用作对宿主细胞的病毒和测检物的量和效应的读出。在此应用中,病毒优选地与已知能被感染的细胞放置在一起。因此,对病毒颗粒以及对被感染宿主细胞的直接效应(例如细胞病变效应)可用于研究不同浓度下的测检物的效应。

[0144] 作为研究药物对寄生生物的效应的一个实例,可使用感染寄生生物并且在流体装置的3D培养基质中培养的人或小鼠红血细胞来研究疟疾寄生生物。于是可测试寄生生物和红血细胞对一个或多个药物梯度的响应。

[0145] 在流体装置的培养室中的3D培养基质中培养微生物允许将微生物保持在至少部分封闭的培养室的内部。这提供了对抗潜在有害微生物的保护并且保护3D培养基质中的试验样本免于污染。

[0146] 实施方案的另一方面涉及(参见图16)测定微生物对测检物的响应的系统60。系统60包括由图中的培养室10和侧接通道表示的流体装置。流体装置包括培养室10,培养室10被构造成将微生物的培养物容纳在3D培养基质中。流体装置还包括侧接培养室10的第一末端部分或侧面的第一流体通道和侧接培养室10的第二不同末端部分或侧面的第二流体通道。系统60还包括第一流体贮存器(参见图8),所述第一流体贮存器包含第一流体,所述第一流体包含第一浓度的测检物。所述第一流体贮存器被构造成连接至所述第一流体通道的输入。系统60还包括第二流体贮存器,所述第二流体贮存器包含第二流体,所述第二流体不含测检物或包含低于第一浓度的第二浓度的测检物。所述第二流体贮存器被构造成连接至

所述第二流体通道的输入以在3D培养基质的至少一部分上形成测检物的浓度梯度。

[0147] 系统60还包括基于计算机的系统62,66,所述基于计算机的系统62,66被配置成获取3D培养基质的至少一个图像并对所述至少一个图像进行处理以鉴定3D培养基质中的任意边界区相对于第一末端部分和/或第二不同末端部分的位置。此边界区在微生物显示出对测检物的第一响应的第一响应区与微生物显示出对测检物的第二不同响应的第二响应区之间。基于计算机的系统62,66还被配置成基于边界区的位置来测定微生物对测检物的响应。

[0148] 在图16中,基于计算机的系统62,66已通过照相机或其他图像或信号捕获设备或检测器66所例示。此照相机或检测器66优选地但非必须地连接至图中所示的显微镜68或关于显微镜68布置以获取3D培养基质的照片。照相机66优选地连接至包括存储器的计算机62,所述存储器被配置成存储图像数据和待被计算机62的处理单元执行的包含编码方式的计算机程序。计算机程序于是被配置成例如基于检测到的光强度或检测到的荧光来识别图像中边界区的位置以及任选的宽度和/或形状。计算机程序优选地还被配置成将边界区的位置转换成本文先前所公开的测检物的浓度值或浓度值范围。

[0149] 系统60的任选屏幕64连接至计算机62以显示捕获图像(图17A或18A),所述捕获图像为经处理的图,其示出检测到的光强度或检测到的荧光与3D培养基质中的位置或与测检物沿着浓度梯度(图17B或18B)和/或测定浓度或浓度范围的浓度的关系。

[0150] 实施方案的另一方面涉及流体装置用于测定微生物对测检物的响应的用途。流体装置包括培养室,培养室被构造成将微生物的培养物容纳在3D培养基质中。所述流体装置还包括第一流体通道,所述第一流体通道侧接所述培养室的第一末端部分并且被构造成运载包含第一浓度的测检物的第一流体流。所述流体装置还包括第二流体通道,所述第二流体通道侧接所述培养室的第二不同末端部分并且被构造成运载不含测检物或包含第二浓度的测检物的第二流体流,所述第二浓度低于所述第一浓度,从而在3D培养基质的至少一部分上形成测检物的浓度梯度。所述用途包括基于3D培养基质中的任意边界区相对于第一末端部分和/或第二不同末端部分的位置来测定微生物对测检物的响应。所述边界区在微生物显示出对测检物的第一响应的第一响应区与微生物显示出对测检物的第二不同响应的第二响应区之间。

[0151] 实验

[0152] 实验1-氨苄青霉素

[0153] 在Luria肉汤(LB)平板上培养细菌菌株大肠杆菌K12 MG 1655。将大肠杆菌细胞用磷酸盐缓冲盐水(PBS)稀释至 $OD_{600}=0.1$,如通过MULTISKAN® FC微孔板光度计(Thermo Scientific)所测量。将相同体积的含有 $OD_{600}=0.1$ 细胞的PBS与低熔点琼脂糖混合在一起。用具有白色尖端的吸管吸取 $8\mu l$ 混合物并将该混合物注入微流体装置CELLDIRECTOR® Ruby(Gradientech AB)的培养室中,参见图20中的上部图块。将微流体装置的流体通道输入连接至流体贮存器,所述流体贮存器包含Mueller-Hinton培养基并且贮存器之一还包含 $20\mu g/ml$ 氨苄青霉素。将培养基抽吸到流体通道中的推进器的速度设定为 $5\mu l/min$ 并保持30分钟,然后设定为 $2\mu l/min$ 并保持剩余的时间。

[0154] 将微流体装置放置在连接至电荷耦合器件(CCD)照相机的Eclipse TE2000 Nikon倒置显微镜系统上。将微流体装置连接至恒温器,以将实验期间3D培养基质中的温度保持

在37°C。在本实验中使用2x物镜镜头,使得整个培养室在显微镜的视野中。在亮度和焦距调整后,打开CCD照相机支持软件(1张照片/30秒)的慢速摄影。

[0155] 对照片进行裁剪以匹配培养室的选定的中央部分,参见图17A和18A中的黑色框。使用图像处理软件从照片提取检测到的光强度数据。使用空间生长情况分布图来汇总灰度值,即,与梯度方向垂直的所有线条的检测到的光强度值,其中梯度方向作为Y轴,浓度梯度作为X轴。

[0156] 表示氨苄青霉素的MIC的显著点可见于此图表中。由光学强度表示的细胞生长速率的图也如图17B中所示进行绘制。

[0157] 图17A示出接近其中氨苄青霉素浓度较低的宿流体通道的显著细胞生长。大肠杆菌细胞对应于图中所看到的白色带。图17B示出细胞生长与氨苄青霉素浓度梯度的关系。在此实验中MIC被测定为5 μ g/ml。图17C示出3D培养基质中形成的氨苄青霉素的浓度梯度。

[0158] 请注意:在图17B中在10 μ g/ml附近观察到的顶点是由于3D培养基质中的撕裂。

[0159] 实验2-壮观霉素

[0160] 此实验按照实验1进行,不同之处在于将50 μ g/ml壮观霉素而非氨苄青霉素加入流体贮存器之一中。结果在图18A-18C中示出。

[0161] 图18A和18B清楚地展示出与实验1(图17A和17B)相比更宽的边界。因此,此实验表明壮观霉素在大肠杆菌细胞中存在抗性,而在实验1中未检测到对应的氨苄青霉素抗性。

[0162] 图19示出3D培养基质中的不同位置随时间推移的平均灰度值,即,检测到的强度以及从而细胞密度。这些不同的位置对应于0、12.5、25、37.5和50 μ g/ml壮观霉素的浓度。

[0163] 上述实施方案应被理解为本发明的少数示例性实例。本领域的技术人员将理解,可在不脱离本发明的范围的情况下对实施方案作出各种修改、组合和改变。具体地讲,不同实施方案中的不同部件方案可以其它构型组合,只要技术上可行即可。然而,本发明的范围则由所附的权利要求书来限定。

[0164] 参考文献

- [0165] [1]Boedicker et al.,Lab on a Chip,2008,8:1265-1272
- [0166] [2]Churski et al.,Lab on a Chip,2012,12:1629-1637
- [0167] [3]Eun et al.,ACS Chemical Biology,2010,6:260-266
- [0168] [4]Chen et al.,Analytical Chemistry,2010,82:1012-1019
- [0169] [5]Peitz and van Leeuwen,Lab on a Chip,2010,10:2944-2951
- [0170] [6]Chung et al.,Biomicrofluidics,2011,5:021102
- [0171] [7]Cira et al.,Lab on a Chip,2012,12:1052-1059
- [0172] [8]Kalashnikow et al.,Lab on a Chip,2012,12:4523-4532
- [0173] [9]Kinnunen et al.,Small,2012,8:2477-2482
- [0174] [10]Choi et al.,Lab on a Chip,2013,13:280-287
- [0175] [11]Kim et al.,Lab on a Chip,2010,10:3296-3299
- [0176] [12]Haessier et al.,Biomed Microdevices,2009,11:827-835
- [0177] [13]Kim et al.,Lab on a Chip,2012,12:2255-2264
- [0178] [14]Nguyen et al.,PNAS,2013,110:6712-6717
- [0179] [15]Frisk et al.,Electrophoresis,2007,28:4705-4712

- [0180] [16]WO 2010/056186
- [0181] [17]WO 2012/033439
- [0182] [18]Humphrejy et al., J Gen Mircrobiol, 1952, 7:28-143
- [0183] [19]Hou et al., Lab on a Chip, 2014, Accepted manuscript, DOI:10.1039/C4LC00451E

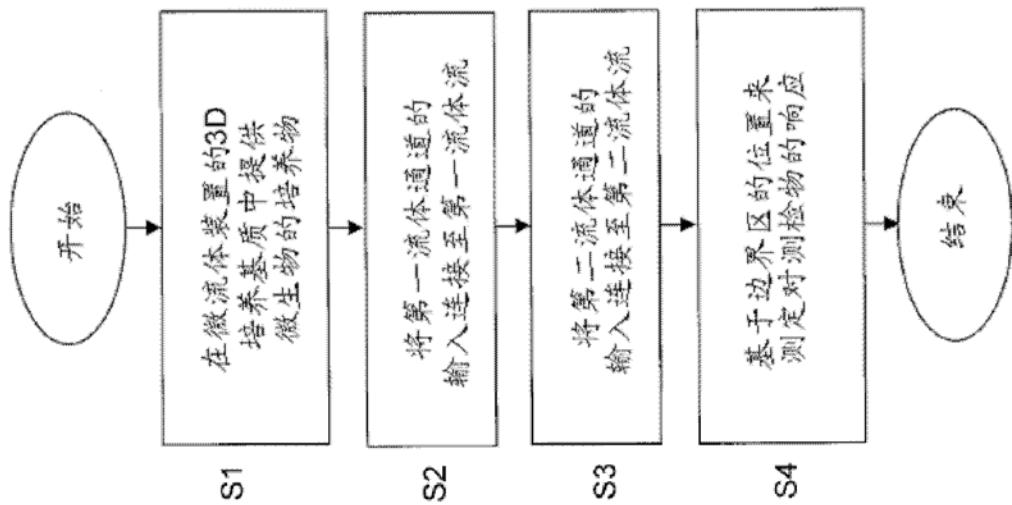


图1

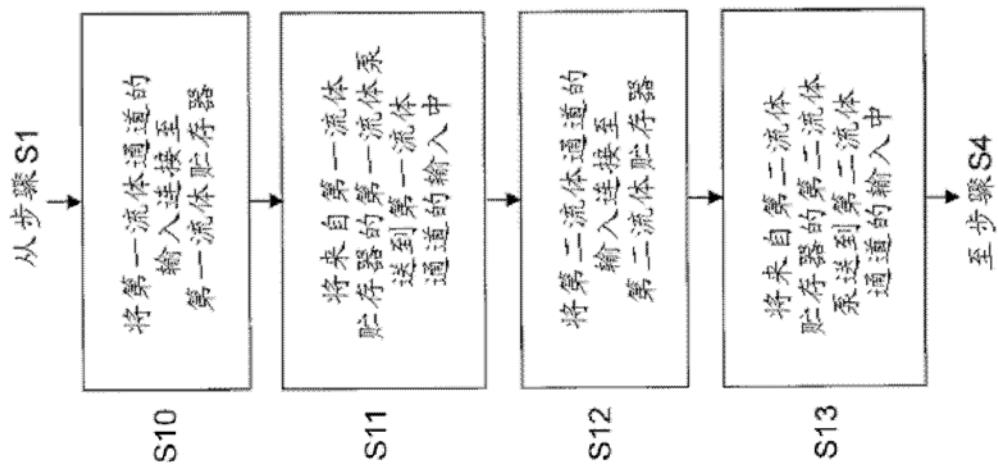


图2

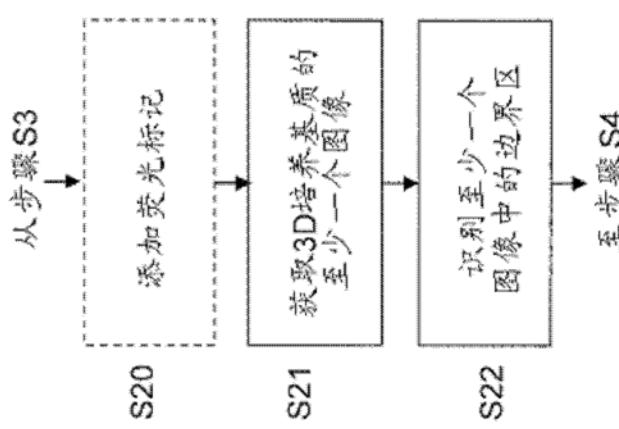


图3

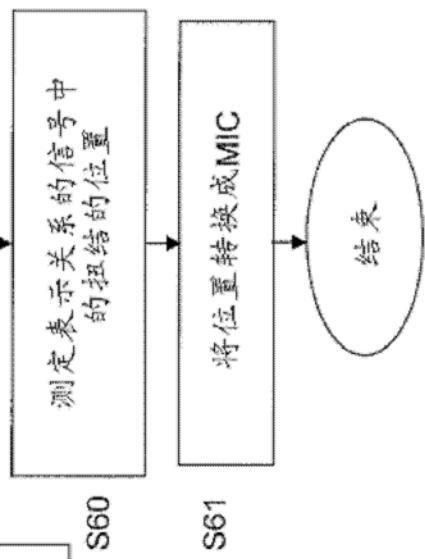
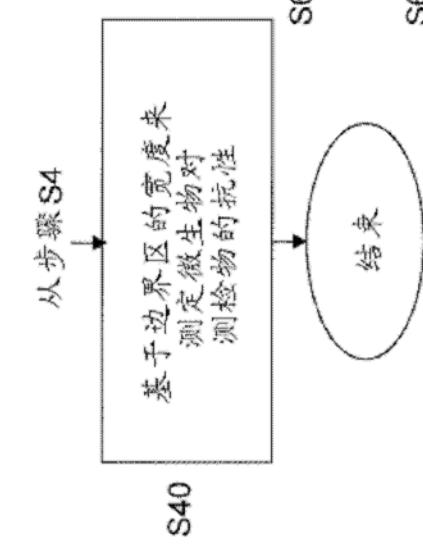
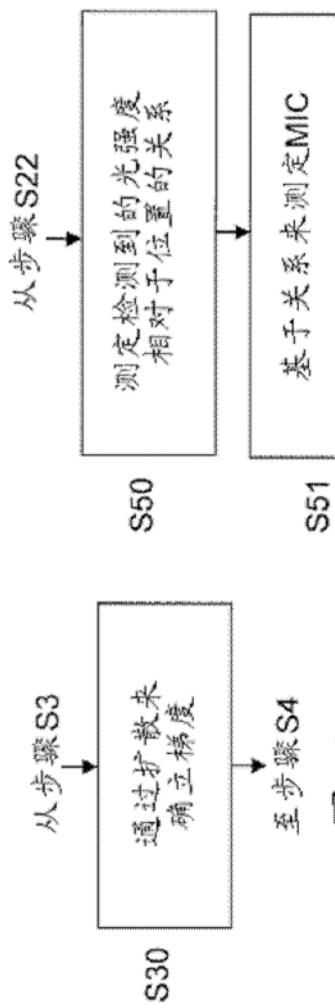


图 7

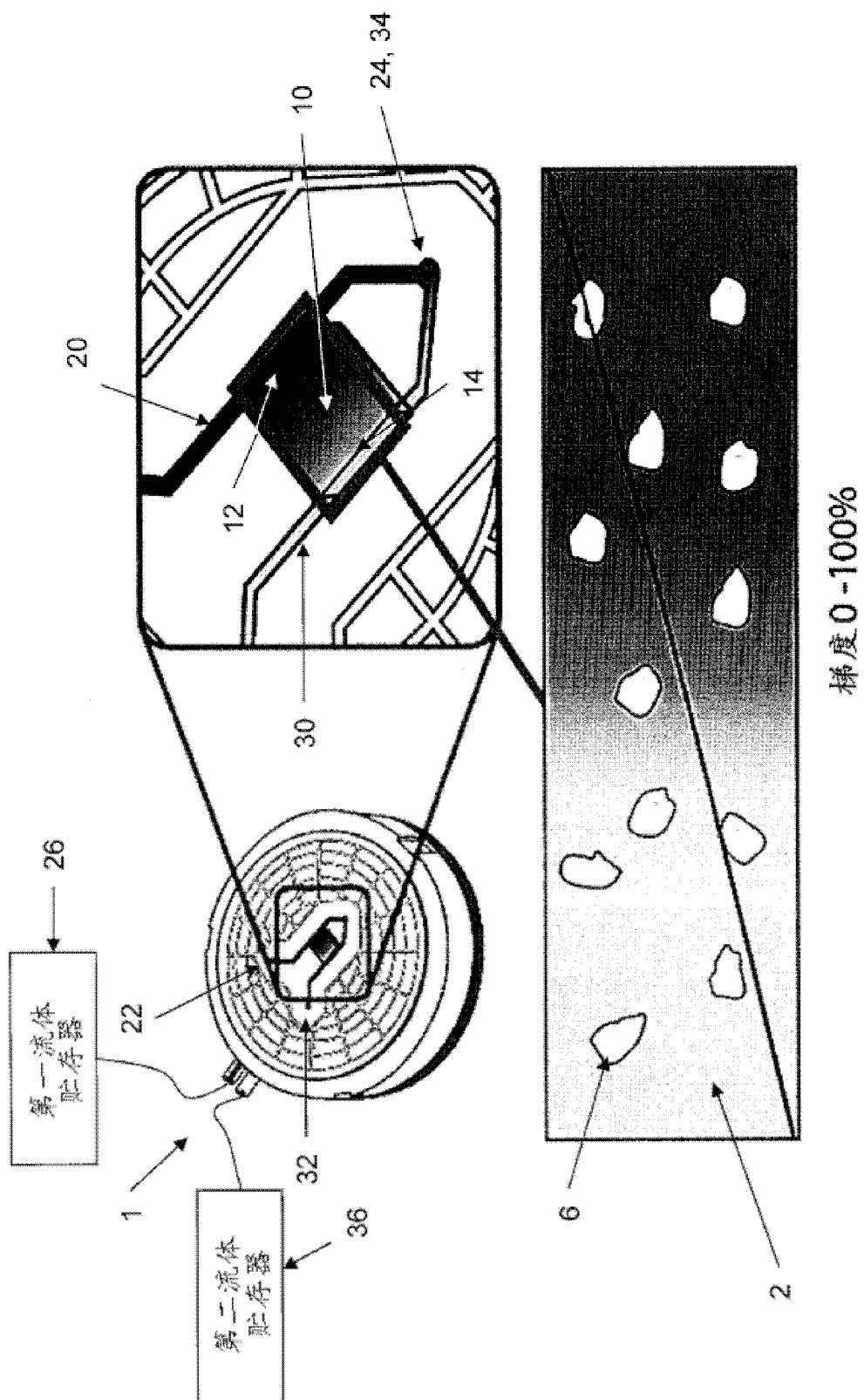


图8

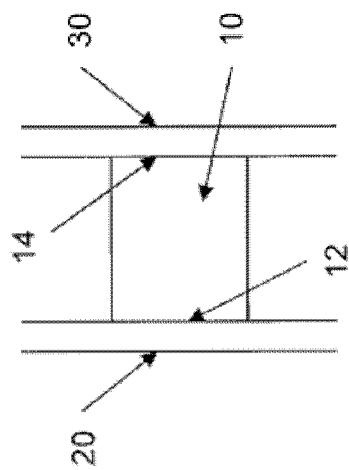


图9

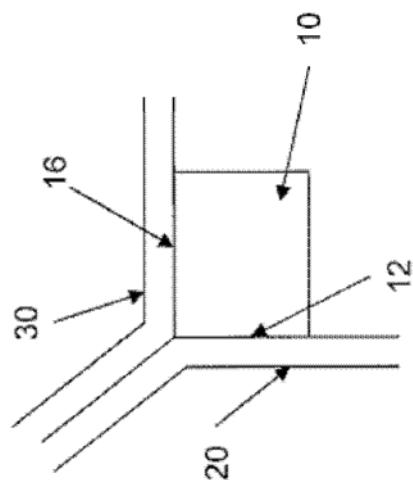


图10

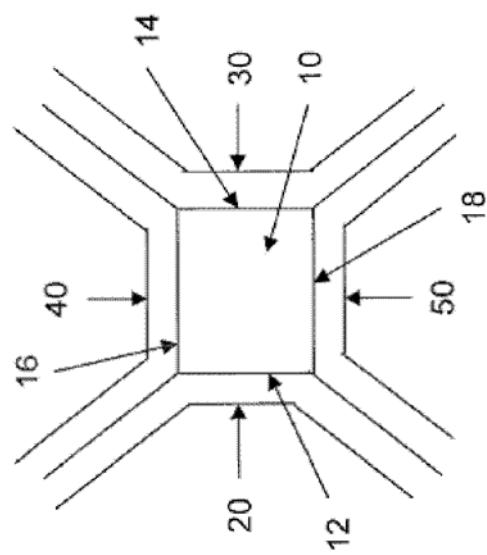


图11

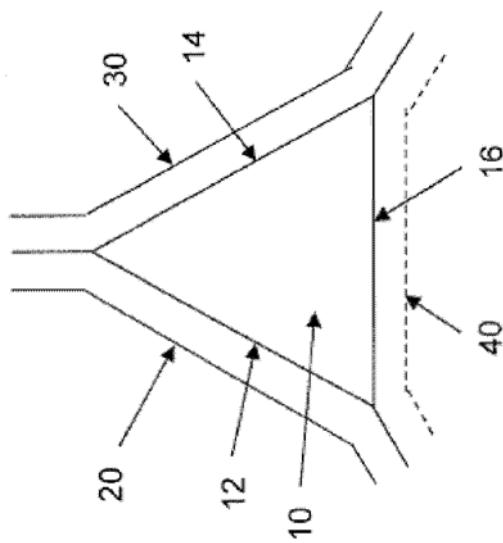


图12

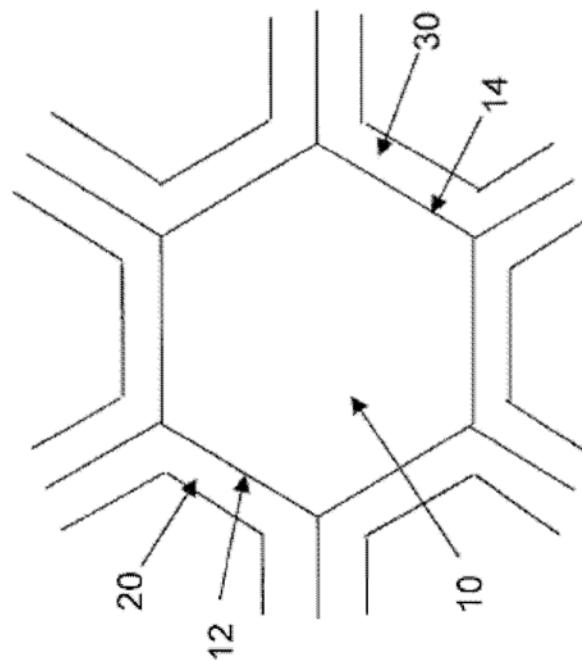


图13

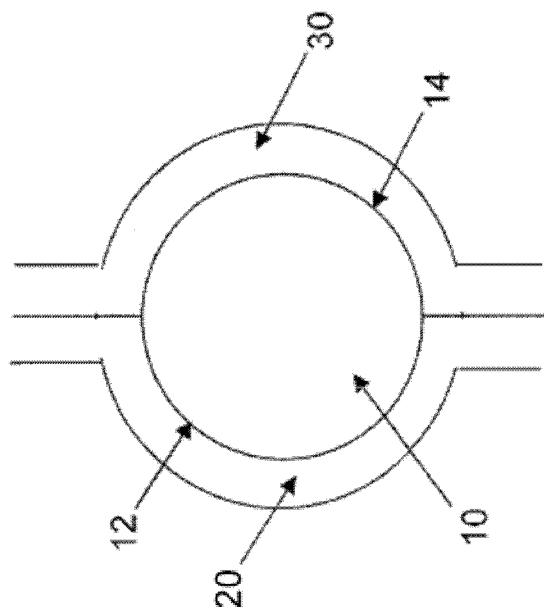


图14

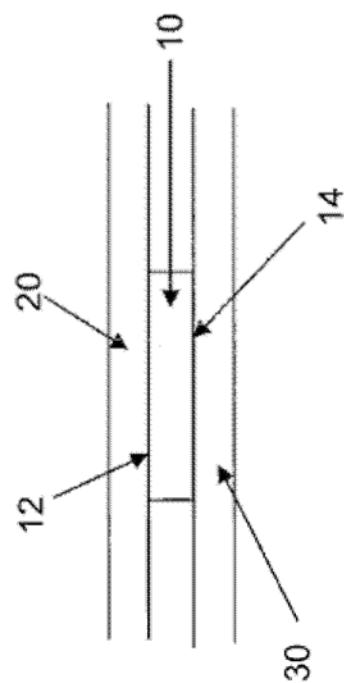


图15

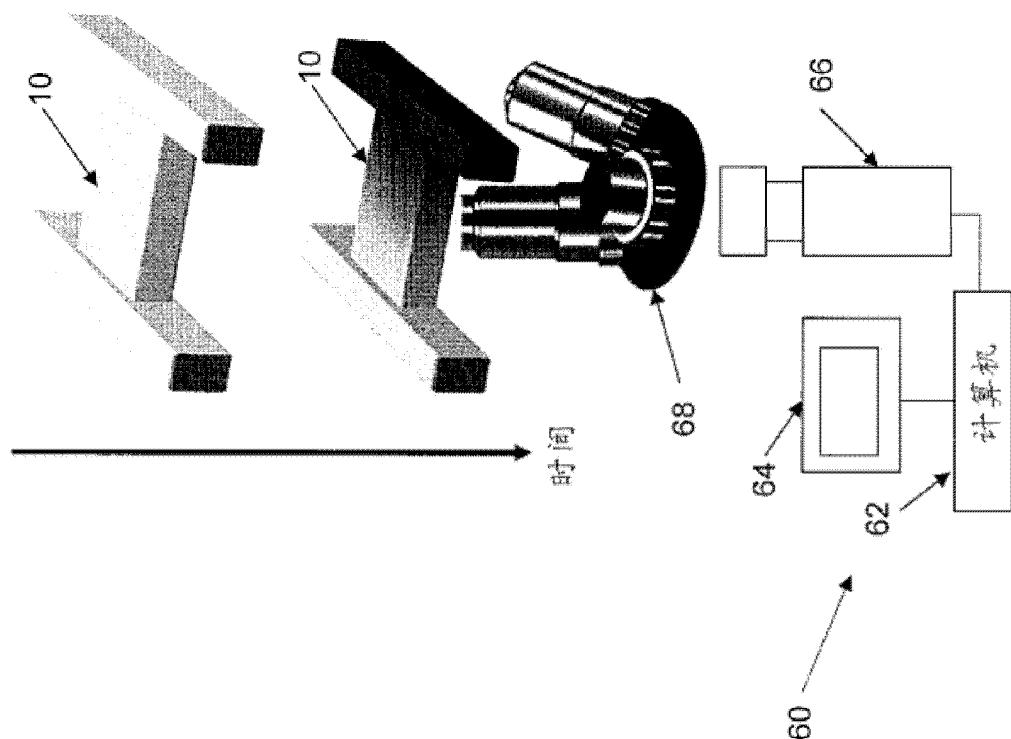


图16

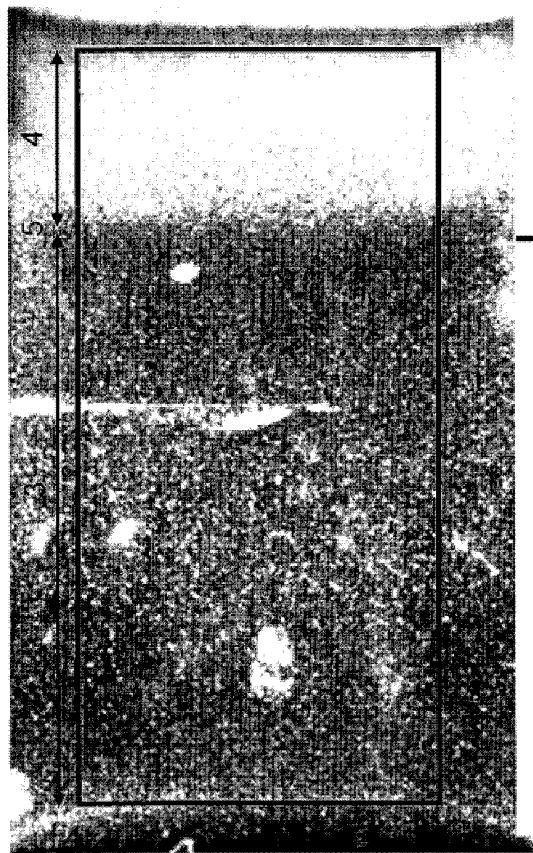


图 17A

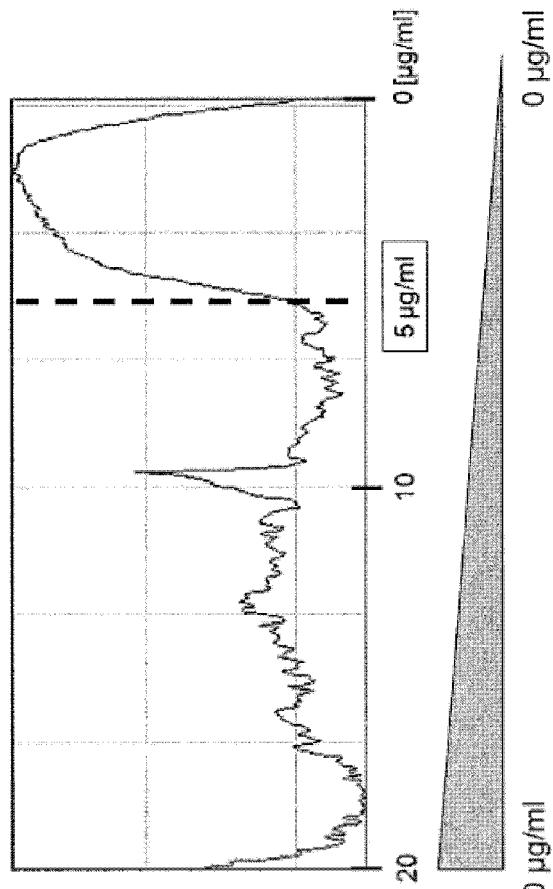


图 17B

图 17C



图 18A

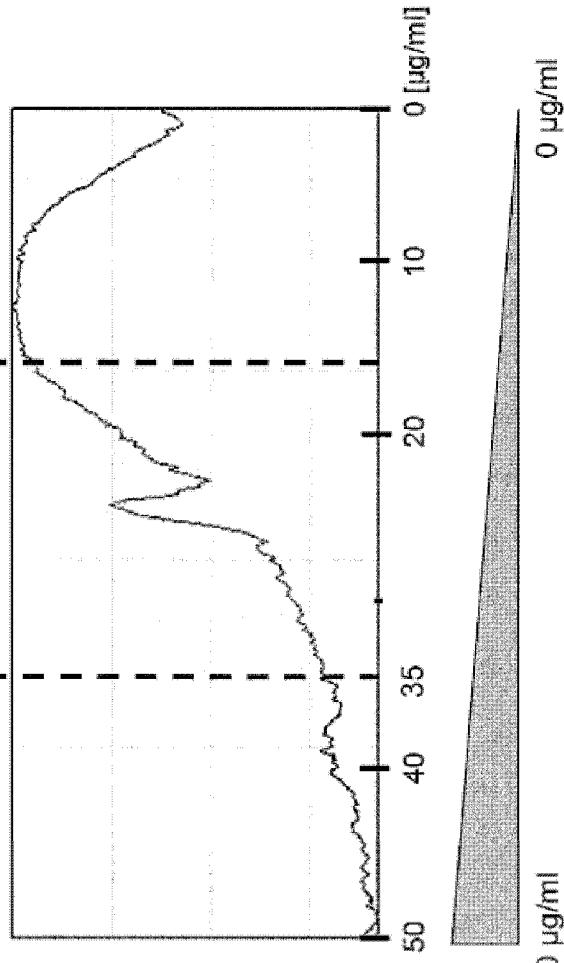


图 18B

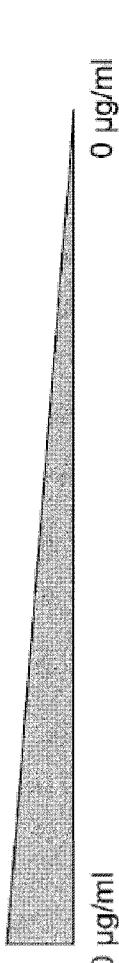


图 18C

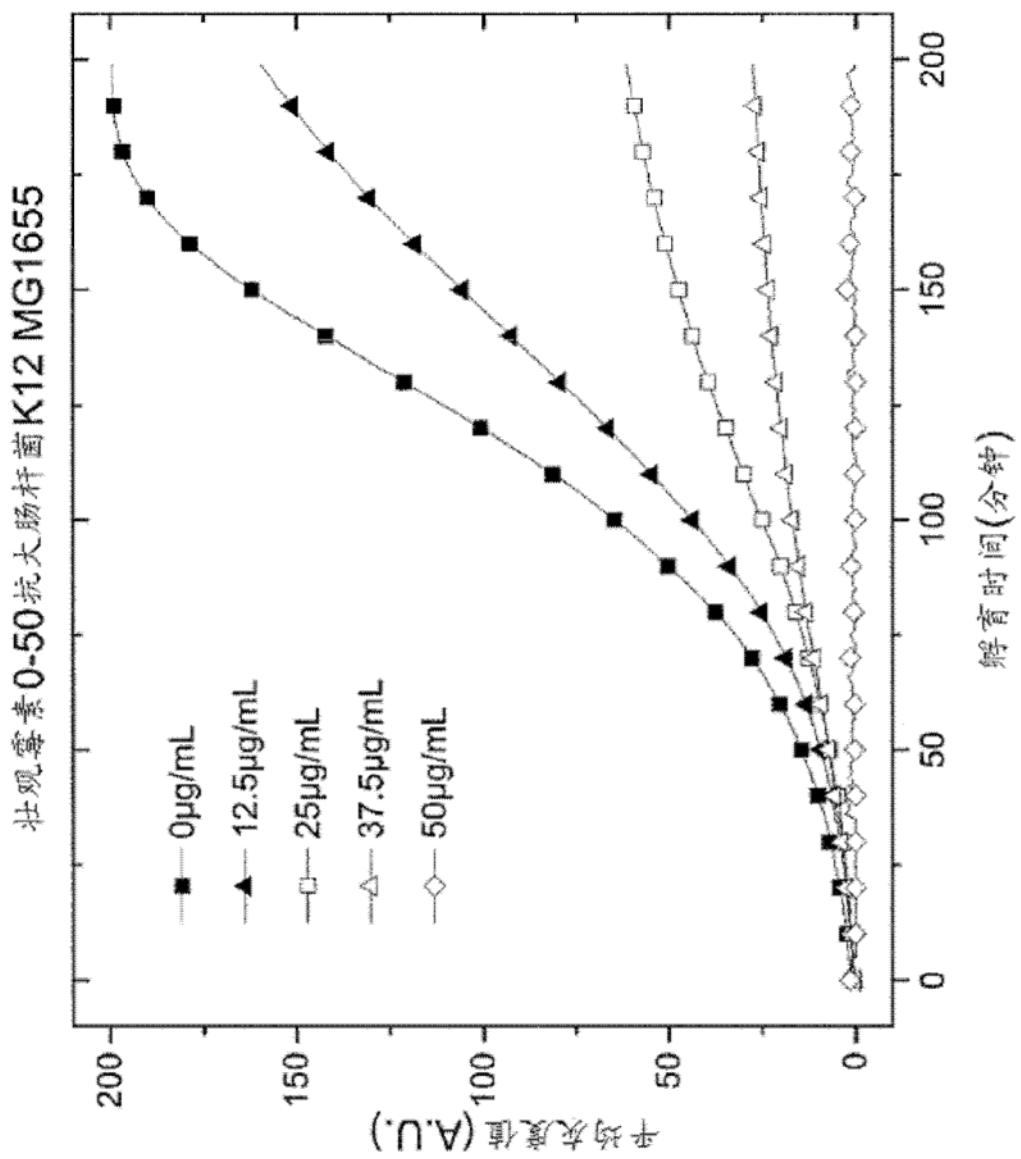


图19

