



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108700521 B

(45) 授权公告日 2022. 02. 25

(21) 申请号 201680080179.3

(22) 申请日 2016.11.25

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 108700521 A

(43) 申请公布日 2018.10.23

(30) 优先权数据
1561446 2015.11.27 FR

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2018.07.26

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/FR2016/053100 2016.11.25

(87) PCT国际申请的公布数据
W02017/089727 FR 2017.06.01

(73) 专利权人 拜奥默里克斯公司
地址 法国玛西-勒托勒
专利权人 委员会原子能和替代能源

(72) 发明人 阿梅勒·诺韦利·卢梭

伊莎贝尔·埃斯帕格依
昆汀·约索 爱丽丝·杜埃特
弗雷德里克·马拉尔德
奥利维尔·加尔

(74) 专利代理机构 北京市万慧达律师事务所
11111

代理人 王蕊 李轶

(51) Int.Cl.
G01N 21/65 (2006.01)
G12Q 1/02 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)
G12Q 1/18 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 102655855 A, 2012.09.05
CN 103411955 A, 2013.11.27
CN 101484002 A, 2009.07.15

审查员 李佩

权利要求书2页 说明书14页 附图6页

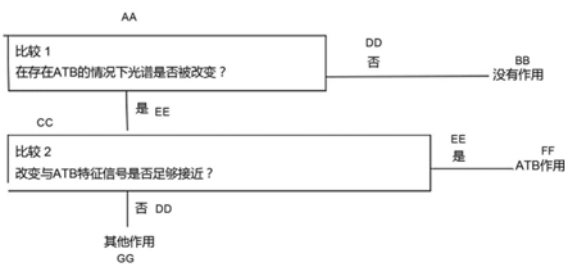
(54) 发明名称

测定微生物对其暴露于化合物的反应的方法

(57) 摘要

本发明涉及一种用于测定至少一种目的细菌对其暴露于抗生素的反应的方法,所述方法通过拉曼光谱法进行分析并且包括以下步骤:提供易于包含所述目的细菌的生物样本;制备所述样本的至少两个级分,每一个级分包含一种或多种活的目的细菌;在每一个级分中,使用结合配偶体捕获至少一种活的目的细菌;将至少一个所述级分暴露于至少一种浓度的至少一种给定的抗生素,另一个所述级分为对照级分;对所述级分中包含的一种或多种目的细菌进行入射光处理,并且通过拉曼光谱法分析经一种或多种目的细菌的拉曼散射而获得的所产生的光,以得到与细菌一样多的拉曼光谱;处理所述光谱以获得所述或每一种目的细菌对暴露于所述抗生素而作出

的反应的特征信号,以及对照的特征信号;比较因此获得的每种目的细菌的特征信号与在与上述条件相同的条件下,对于不同细菌和至少一种所述抗生素所定义的参考基准;以及定义所述目的细菌对所述抗生素的敏感性的临床特征。



AA - 比较1 在存在ATB的情况下光谱是否被改变?
BB - 没有作用
CC - 比较2 改变与ATB特征信号是否足够接近?
DD - 否
EE - 是
FF - ATB作用
GG - 其他作用

1. 一种测定至少一种目的细菌对其暴露于抗生素的反应的方法,所述方法通过拉曼光谱法分析进行并且包括以下步骤:

具有可包含所述目的细菌的生物样本,

制备所述样本的至少两个级分,每一个级分包含一种或多种活的目的细菌,

通过使用结合配偶体在每一个级分中捕获至少一种活的目的细菌,

将至少一个所述级分暴露于至少一种浓度的至少一种给定的抗生素中,另一个所述级分为对照级分,

对所述级分中包含的目的细菌进行入射光处理,并且通过拉曼光谱法分析经一种或多种目的细菌的拉曼散射而获得的所产生的光,以得到与细菌一样多的拉曼光谱,

处理所述光谱以获得所述每一种目的细菌对暴露于所述抗生素而作出的反应的特征信号,以及对照的特征信号,

比较因此获得的每种目的细菌的信号与在与上述条件相同的条件下,对于不同细菌和至少一种所述抗生素所定义的参考基准,以及

定义所述目的细菌对所述抗生素的敏感性的临床特征,

所述方法的特征在于其还包括:

为了获得所述特征信号,处理每个拉曼光谱以最大限度地提取目的光谱,以及

对每个目的光谱应用分类器,所述分类器被先前调试以识别两个类别,一个是“没有抗生素作用”,另一个是“抗生素作用”,所述分类器的先前调试采用在没有抗生素作用的条件下、以及在其中所述浓度高于参考基准中使用的细菌菌株的最小抑制浓度的条件下的参考基准的光谱进行。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于制备所述样本的两个以上的级分,并且将至少两个级分分别暴露于浓度渐增的所述抗生素。

3. 根据权利要求2所述的方法,其特征在于用于所述级分分别暴露的抗生素的浓度包含在一个数值的区间内,其包括至少一个所选数值或形成至少一个区间的数值,所述区间包括至少一个选自一对抗生物/物种的特征性数值的数值构架,所述特征性数值包括流行病学的截止值,临床折点,或者参考方法中所用的浓度组。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的方法,其特征在于通过直接或间接地固定在载体上的结合配偶体捕获存在于所述级分中的一种或多种细菌。

5. 根据权利要求4所述的方法,其特征在于所述结合配偶体能够与目的细菌进行特异性相互作用,并且选自蛋白质、抗体、抗原、适体、噬菌体、噬菌体蛋白质。

6. 根据权利要求1至3中任一项所述的方法,其特征在于通过成像或分光光度法对所捕获的细菌进行标记和分类。

7. 根据权利要求1至3中任一项所述的方法,其特征在于,在对所述目的细菌进行入射光处理之前,清除尚未被捕获的细菌。

8. 根据权利要求7所述的方法,其特征在于在暴露于抗生素的步骤之前或之后,清除所述细菌。

9. 根据权利要求1至3中任一项所述的方法,其特征在于,在将所述级分的暴露的步骤之后,将所述级分和所述对照级分浓缩,然后进行捕获步骤。

10. 根据权利要求1至3中任一项所述的方法,其特征在于所述抗生素处于至少能使目

的细菌存活的生理培养基中。

11. 根据权利要求1至3中任一项所述的方法, 其特征在于, 暴露于抗生素是在至少18℃且至多40℃下进行。

12. 根据权利要求1至3中任一项所述的方法, 其特征在于, 暴露于抗生素持续至少10分钟且至多4小时的时间, 称作孵育时间。

13. 根据权利要求1至3中任一项所述的方法, 其特征在于, 为获得所述特征信号, 对于暴露于抗生素的每一个级分, 分别从所述样品的拉曼光谱中减去所述对照样品的拉曼光谱。

14. 根据权利要求1所述的方法, 其特征在于, 确定所述目的菌株对于所述抗生素的敏感性、中性或抗性状态。

15. 根据权利要求14所述的方法, 其特征在于确定对于所述抗生素来说, 所述菌株的最小抑制浓度(MIC)。

16. 根据权利要求14或15所述的方法, 其特征在于每一个级分均包含至少2种目的细菌, 以获得至少2种信号。

17. 根据权利要求14或15所述的方法, 其特征在于每一个级分均包含至少5种目的细菌, 以获得至少5种信号。

测定微生物对其暴露于化合物的反应的方法

[0001] 本发明落入微生物对抗生素的敏感性表型的分析的范围。其涉及通过进行拉曼光谱法分析而测定至少一种目的微生物对其暴露于抗生素的反应,以及它的应用。

[0002] 术语“微生物”包括针对其暴露于抗生素中而能够作出反应的任何微生物,例如细菌或酵母。尽管在下文中将参考细菌对本发明进行更详细的描述,但是这并不表示本发明将受限于此。

[0003] 这一测定在健康、农业食品、环境领域中的微生物学诊断具有重大意义,并且在药理学,新分子(特别是抗生素)的筛选,或寻找存在于食品产品(例如牛奶)中的细胞毒性化合物中也同样重要。这种应用的选择并不是穷举性的,通常本发明可应用于任何领域中,当涉及细胞对暴露于化学或生物化合物的反应的问题时。

[0004] 拉曼效应是适用于绝大多数分子的光散射(light diffusion)现象。其在光谱学中的观察现象使得可以表征分子、微生物、介质,这是一种简单的实施方式,它快速且经济,而且在生物学中具有显著性优势:不会受到水的强烈干扰以及不需要标记或造影剂。

[0005] 因此,根据文献AIM Athamneh et al. (2014) Antimicrob Agents Chemother 58: 1302-1314,作者使用拉曼光谱来表征大肠杆菌培养物对于代表5个抗生素家族的15种已知抗生素的敏感性,来构建基线。为此,所记载的方法包括以下步骤:制备大肠杆菌培养物;使该培养物的样本暴露于浓度为最小抑制浓度(MIC)的三倍的抗生素中;使所述细胞与抗生素保持接触至少30分钟;收集并清洗细菌细胞;收集细胞悬浮液并处理以通过拉曼光谱法分析细胞层。分析的结果得自针对每个样本所获得的多个光谱的平均值,所述样本包含大量细胞,并且将这些分析结果整合成参考基准。一旦构建完成,该参考基准可被利用以将未知的抗生素分配于所述5个家族之一,这取决于大肠杆菌培养物对于该抗生素的敏感性。由此获得的分类性能允许得到关于未知分子类别的要素,这可用于药理学研究中。然而,所获得的结果并未提供与所研究细菌的敏感性表型有关的信息或有助于临床应用的信息。

[0006] 文献W02013/093913A1记载了一种使用特别地拉曼光谱法来鉴定生物流体中的细菌的方法。对所述生物液体的细菌培养物的样本进行入射光处理,并且通过拉曼光谱法分析经散射得到的所生成的光。然后借助于列出在相同条件下定义的不同微生物的光谱特征信号的参考基准来解释读数信号。该方法还可包括使所述细菌暴露于抗生素的步骤,此时的读数信号为所述抗生素对这些细菌的作用。所测得的抗生素的作用特别地表现在细菌细胞的生存力或培养物的发育方面。这种方法的缺点在于所应用的培养步骤不但延长了获得响应的过程,而且还需要掌握获得预期响应所需的额外步骤。

[0007] 虽然使用拉曼光谱法使得可以容易地测定目的细菌对于抗生素的敏感性临床特征(clinical profile),但是仍然存在这一事实,根据现有技术,其适用于18至24小时内获得的细菌培养物,不允许进行快速测定方法。在诊断中,这构成了有效护理患者的主要障碍。

[0008] 根据文献U.Münchberg et al. (2014) Anal Bioanal Chem 406:3041-3050,作者提出了在患者中快速建立适合的抗生素治疗的问题,以及在患者已经接受抗生素治疗时通过使用细胞培养的技术所遇到的困难。作者随后省略了培养步骤并将拉曼光谱应用于单个

细菌。因此该工作解决了鉴定在先前已暴露于抗生素的细菌的问题(可能的误诊来源)。为解决该问题,作者构建了参考基准,其包括针对未暴露于抗生素中的单个细胞所作的拉曼分析的结果,以及针对暴露于低于最小抑制浓度(MIC)的不同浓度下的抗生素的细胞所作的拉曼分析的结果。该研究的结论是在这些条件下鉴定细菌没有太大的困难。作者并没有注意到抗生素对于细菌光谱的任何明显的影响,并且得出结论可能的变化是在高可变性区域内观察到的,因此是无用的。

[0009] 这些解决方案都不能够考虑到一种可靠方法,用于在可以允许在一天内完成诊断的几小时范围内于短时间内测定目的细菌对抗生素的敏感性临床特征,尤其是用于测定其对于抗生素的抗性或敏感性。在患者已经接受治疗时,这种缺陷将导致无效的抗生素治疗,使患者的感染恶化的风险,以及难以建立准确的诊断。这种缺陷总是在多重抗生素抗性细菌的出现和蔓延时更为明显。

[0010] 本发明针对该需求提供了答案:一种测定目的细菌菌株对其暴露于抗生素的反应的方法,同时不需要培养,该方法的结果可在约2小时内得到,因此相较于现有技术的方法(36h-72h)是非常快速的,并且也是可靠的。

[0011] 本发明涉及通过进行拉曼光谱法分析测定至少一种目的微生物(例如目的细菌)对其暴露于抗生素的反应的方法,其包括以下步骤:

[0012] 具有可包含所述目的细菌的生物样本,

[0013] 制备所述样本的至少两个级分,每一个级分包含一种或多种活的目的细菌,

[0014] 通过使用结合配偶体在每一个级分中捕获至少一种活的目的细菌,

[0015] 将至少一个所述级分暴露于至少一种浓度的至少一种给定的抗生素中,另一个级分为对照级分,

[0016] 对所述级分中包含的目的细菌进行入射光处理,并且通过拉曼光谱法分析经所述目的细菌的拉曼散射(Raman diffusion)而获得的所产生的光,以得到与细菌一样多的拉曼光谱,

[0017] 对构成所述级分中的载体的材料进行入射光处理,并且通过拉曼光谱法分析经所述载体的拉曼散射而获得的所产生的光,以获得该载体的一些拉曼光谱,

[0018] 处理所述光谱以获得所述或每一种目的细菌对暴露于所述抗生素而作出的反应的特征信号,以及对照的特征信号,

[0019] 比较因此获得的每种目的细菌的特征信号与在与上述条件相同的条件下对于不同细菌和至少一种所述抗生素所定义的参考基准,以及

[0020] 定义所述目的细菌对所述抗生素的敏感性临床特征。

[0021] 与前述的现有技术比较,本发明的方法的优点在于对于单个细胞,允许使用拉曼光谱测定法获得与微生物响应于其暴露于测试化合物而产生的化学变化相关联的有关信号。这不仅省略了细胞培养步骤,也提供了每个经分析的细胞的信息。与已知方法不同,所述信息并不是通过计算分析结果的平均值得到的,也不是通过获得物理平均测量值得到的。其表达为按每种细胞计的结果,其因为允许检测可变性而能够产生更相关的信息,这与从掩盖任何非均匀性结果的平均值所得到的结果基本不同。当然,根据所考虑的应用,所述信息可以从几种单个细胞的结果中获得。

[0022] 根据本发明,提供了通过拉曼光谱法测定细菌对其暴露于抗生素的反应的方法,

所述方法适用于上述所考虑的全部应用。它实际上旨在表征在生物样本中的目的细菌对抗生素的敏感性临床特征,也可以用于筛选抗生素分子。由于它不使用培养步骤,因此它还适用于分析不可培养的细胞。

[0023] 在更详细地描述本发明的方法之前,下文对于一些所用的术语进行了定义。

[0024] “生物样本”意指组织、流体以及所述组织和流体的组分。根据该方法的应用领域,并且作为非限制性实例,样本可以是人类或动物来源的,例如血液、尿液、唾液、母乳;其可以是植物来源的,食物提取物,土壤提取物.....

[0025] “目的微生物(例如目的细菌)对其暴露于抗生素(ATB)的反应”意指相对于未暴露于抗生素的相同细菌,可以通过拉曼光谱法检测到的任何改变,包括代谢改变。

[0026] 用于给定细菌的抗生素的最小抑制浓度(MIC),以 $\mu\text{g/ml}$ 表示,为能够使细菌生长停止的所述抗生素的一系列稀释的最小浓度。

[0027] 临床折点是由EUCAST(欧洲委员会关于抗微生物药物敏感性试验(European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing))基于微生物标准和药代动力学和药效学数据确定的,针对物种定义的抗生素的给定浓度。通常,确定被称作阈值的两个不同的折点,从而确定浓度的区间。当测试菌株的MIC小于该区间时,测试菌株被描述为敏感的,也就是说在体内它能够被抑制,因此这暗示治疗成功的可能性高;如果在这个区间内,则细菌被称作中性细菌,以及如果高于这个区间,则细菌被称作抗性细菌,也就是说,它可以承受比体内可接受的抗生素浓度更高的浓度,因此存在较高的治疗失败的可能性。

[0028] “目的微生物对其暴露于化合物的反应的特征信号”意指任何变化(例如代谢性或构成变化),其由所述微生物具体地响应于其与所述化合物的接触而表达,并且该变化可以通过拉曼光谱测定法检测。为了更容易地突出这些变化,也可以将由用于进行该测试的信号产生的拉曼数据进行一步或多步处理的结果称作特征信号。例如,我们可以选择从暴露的细菌获得的光谱中减去目的细菌尚未暴露于测试化合物的初始状态或状况。

[0029] 本发明方法的优选的变化方案如下文所示,必须单独或组合地考虑它们。这些变化方案更适用于诊断应用,更精确地,适合于测定生物样本中细菌对于抗生素的敏感性临床特征,但如前所述,本发明的方法并不限于此类应用。

[0030] 测定细菌对于抗生素的敏感性临床特征,首先包括鉴定细菌对于抗生素的敏感性表型。因此,优选地制备所述样本的两个以上的级分,并且将至少两个级分分别暴露于浓度渐增的抗生素中。根据本发明方法的变化方案,将所述样本的至少三个级分,或至少四个或五个以上的级分分别暴露在浓度渐增的抗生素中。

[0031] 有利地,所述抗生素的浓度是在反映体外测试常规浓度的数值的区间内进行选择,从而能与当前参考数据(例如微稀释测试)进行比较。根据优选的变化方案,所述级分分别暴露的抗生素的浓度包含在一个数值的区间内,其包括至少一个选自配对的物种/测试抗生素的通常MIC和临床折点的阈值的数值,或者在参考方法中所用的浓度组(concentration panels)。在本发明方法的诊断应用中,因此这些浓度是根据所考虑的细菌/抗生素的对进行具体选择。例如,对于大肠杆菌/庆大霉素(E.coli/Gentamicin)的对,其中通常MIC或所述物种的流行病学截止值为 $2\mu\text{g/mL}$,两个临床折点为2和 $4\mu\text{g/mL}$,它们可以包含在一个数值的区间内,其包括至少一个选自1、2、4、8和 $16\mu\text{g/ml}$ 中的数值,优选这些数值中的两个或甚至三个或四个,甚至是这五个数值。

[0032] 本发明的方法包括借助结合配偶体来捕获目的细菌的步骤。本发明的结合配偶体特异性或非特异性识别需捕获的目的细菌以进行分析。在其与细菌相互作用的过程中,结合配偶体可在培养基中以自由状态存在,或者可预先固定在载体上。如果细菌在结合配偶体上的粘附发生于培养基中,那么接下来就可以将该结合配偶体固定在载体上。“固定在载体上”是指通过本领域技术人员所熟知的任何方式将所述结合配偶体直接或间接地固定在所述载体上。本发明的结合配偶体可具有生物和/或化学性质。因此,例如,在非特异性或一般性细胞捕获的情况下,它可以由化合物构成或带有与细胞相互作用的化学官能。以壳聚糖、聚-L-赖氨酸、聚乙烯亚胺和聚苯胺类型的聚合物为例。它可以由生物分子组成,例如选自蛋白质、抗体、抗原、适配体、噬菌体、噬菌体蛋白质;这通常是对细胞的特异性捕获。在本发明的一个有利的变化方案中,结合配偶体被固定在载体上,然后由所述固定的结合配偶体捕获细菌。

[0033] 在将所述级分浓缩之后,可对暴露于抗生素中的一种或多种细菌的级分以及对照级分进行捕获步骤。例如,离心浓缩所述级分,然后回收已经过捕获步骤的沉淀物。有利地,所述捕获直接在生物样本中进行,而无需单独的沉淀物浓缩步骤。

[0034] 捕获步骤之后,标记和分类经捕获的细菌。该步骤是例如通过成像或分光光度法来进行的。然后可以清除未捕获的细菌。

[0035] 细菌暴露于抗生素的优选条件是下文所提及的:

[0036] 抗生素处于生理培养基中,所述培养基至少允许保持目的细菌存活。

[0037] 对于临床目的菌株而言,暴露于抗生素中是在所考虑的菌株的约18℃至约40℃的培养温度下进行,通常在28℃至37℃。

[0038] 暴露于抗生素中持续的时间(称作孵育时间)比参考方法所需的时间短得多。根据本发明,孵育时间有利地为至少10分钟且至多4小时。

[0039] 暴露于抗生素中的每一个级分的特征信号的获得将在实施例中进行举例说明。

[0040] 通常,可以使用几种方法来处理得到的数据以得到结果。为了使其尽可能地相关,优选地进行用于处理个体水平上的光谱的完整方法。其分为两个主要步骤,预处理步骤包括处理光谱以最大限度地提取目的信号,以及分类步骤以允许进行实际的目的测试并实现目的结果。

[0041] 预处理步骤包括下文所提及的操作中的至少一个,优选两个,更优选全部的操作:

[0042] ——移除饱和光谱。

[0043] 移除饱和光谱是预处理光谱的第一步。它是从所得原始光谱中进行的。其中目的区域中大于20%的通道具有大于最大强度的99%的强度的光谱被认为是饱和的。

[0044] ——移除宇宙射线

[0045] 被称为“宇宙射线”的射线是高能量的荷电粒子,源自太阳、银河系或银河系外,它们不断地轰击CCD检测器(电荷耦合装置、电荷转移装置)。它们产生光谱中随机出现的非常尖锐的信号峰。首先通过计算原始光谱的二阶导数进行峰的搜索。然后将该二阶导数和光滑的原始光谱的二阶导数进行比较,就可以识别出平滑可以显著降低该峰的高度的非常尖锐的峰,也就是宇宙射线。与宇宙射线有关的峰被直线替代。

[0046] ——重排(realignment)

[0047] 已经注意到,在不同日期所采集的一系列光谱之间存在细微的偏移。该偏移量在

整个光谱内是常数。优选地对它进行校正。

[0048] 所述方法包括使所有光谱相对于由两个峰 1001cm^{-1} 和 1126cm^{-1} 的位置构成的“参考”重排。待重排的峰的位置是通过由在仿射背景上的高斯函数组成的模型对峰进行调整来确定的。

[0049] 单个细菌的光谱通常不允许通过光谱(太嘈杂的光谱)进行重排。因此,优选地重排是根据细菌的平均光谱(通过SNIP切算法移除背景后)进行。将待重排的平均净谱中的2个峰的位置与相同的2个峰的参考值进行比较,以测量偏移量。将从细菌光谱中发现的校正应用于在构成载体的材料上采集的相同日期的环境光谱中。

[0050] ——提取特定的细菌信号。

[0051] 背景的减法分为两个步骤。将由构成载体的材料的平均光谱组成的第一个背景进行调整,例如对于玻璃载体情况下的细菌光谱,调整到 450 到 650cm^{-1} ,因为这是一个仅只有玻璃产生的光谱的区域。这种调整是在保持低于该区域的细菌光谱的限制下进行的。第二步是通过SNIP算法减去背景。

[0052] ——移除异常(deviants)

[0053] 已经开发出用于异常光谱的自动移除模块。将用于异常物搜索的光谱归一化为在随后分析中使用的净光谱。将异常物搜索应用于与菌株、给定的抗生素浓度和给定的日期相对应的光谱组中。该方法是基于计算每个光谱和光谱组的平均光谱之间的欧几里得距离。连续进行两次异常物的移除。第一轮允许移除对平均光谱具有显著影响的非常异常的光谱。

[0054] ——目的区域和信号的归一化

[0055] 选择目的区域是重要的,因为在这个区域,将要进行光谱的相互比较。在 400 至 3080cm^{-1} 的能量偏移下测量光谱。留存的目的区域为 $[650-1750]\text{cm}^{-1}$ 和/或 $[2800-3050]\text{cm}^{-1}$ 。归一化净信号是必要的,以便使得能够对它们直接进行相互比较。使用的归一化区间为 $[650-1750]\text{cm}^{-1}$ 或 $[2800-3050]\text{cm}^{-1}$ 。净信号除以这个区间内的净信号平均值。在一个有利的实施例中,从单个细菌中获得的所有光谱中减去细菌的参考状态是有用的。所使用的参考状态是由来自 S_0 的光谱构成的状态。该操作可以克服生长条件的变化、界面I的变化(参见图2),并且允许提取与暴露于不同抗生素浓度相关的称作特征信号的信号。

[0056] 如上所述,该方法在确定目的细菌的临床表型性能,尤其是确定其对抗生素的敏感性或抗性,以及有利地确定所述细菌对所述抗生素的MIC方面的应用中具有重要价值。

[0057] 在这种情况下,为了得到相关的结果,优选地每一个级分包含至少2种、优选至少5种目的细菌,以获得至少2种、优选至少5种信号。

[0058] 根据本发明的变化方案,所比较的细菌基本上处于同一生长阶段。

[0059] 通常,本发明的方法可在包括以下元件的系统中实现:

[0060] ——可以对样本进行拉曼分析的光谱仪:

[0061] 所用的拉曼光谱仪在本领域中通常称作共焦拉曼微型光谱仪,它是由在受激光器(拉曼光谱仪)激发之后,能够从拉曼散射得到的光中产生光谱的这一分析平台(stage)而构成的,允许该分析平台与共焦显微镜平台偶联以允许使用显微镜镜头来测量拉曼光谱,并且将分析体积限制在空间上受限的体积(共焦体积)。微型光谱仪的显微镜平台通常也允许通过设备中存在的照相机获得图像,或者更简单地使用集成或未集成到微型光谱仪中的

光源通过目镜直接观察而获取图像；

[0062] ——调节微生物以进行光谱分析的装置；以及

[0063] ——计算机，允许驱动微型光谱仪、储存收集到的数据并使用专用软件分析这些数据，以进行下述方法。

[0064] 将如上所述调节微生物的装置，任选地连接到光谱仪并且连接到用于进行本发明方法的计算机上，也是本发明的对象。

[0065] 允许进行本发明的方法的如上所述的系统在图1举例说明，并且投入到以下实施例中进行的实践中。下文将更详细地进行描述：

[0066] 所述系统包括拉曼微型光谱仪，其允许对微生物大小的物体 (0.5-100 μ m) 所散射的光进行共焦分析，例如HORIBA品牌的Aramis光谱仪，其配备有参考号 (reference) 44 080 的100x Plan-Neofluar型的ZEISS显微镜镜头。将该微型色谱仪配备手动 (目镜) 数字 (CCD) 照相机，例如品牌IDS型号eye UI-1240ML) 观察装置，以允许在测量位置观察样本。对于研究对象，适当地选择拉曼测量参数。在以下实施例中，将共焦体积调整为接近细菌的尺寸 (在所用的ARAMIS模型上通常为300 μ m共焦孔)，以限制未被搜索的光谱的贡献。

[0067] ——系统还包括调节装置，该调节装置是本发明的对象，其中优选的实施方案D如图2所示。该装置包括：部件P，包含对应于一组腔室 (从 C_1 到 C_N) 的凹槽，N至少等于2，所述腔室任选是流体可隔离的，

[0068] ——一组可选的端口 P_1 到 P_{2N} ，允许流体腔室连接到液体管理系统，

[0069] ——与微生物的光谱测量兼容的功能化或非功能化光学界面I；以及

[0070] ——可选的J部分，确保部件I和P之间的装配。

[0071] 根据本发明的调节装置的简单变型，它可以是标准的显微镜载玻片I (25mm x 75mm x 1mm，例如来自VWR的参考号631-1551) 构成的部件P，用作流体腔室的两个双面胶 (例如来自Thermo Scientific的通常称作“Gene Frame”的参考号AB-0577) 构成的密封J和盖玻片 (例如来自Marienfeld的参考号0107052) 构成的界面I。

[0072] 可将界面I功能化，这通过基于溶液中的微生物中通常出现的性质的称作“通用性”捕获化学的捕获化学来实现，或通过称作“特异性”捕获化学并基于所研究的物种的特定性质的捕获化学来实现。例如，“通用性”捕获化学可以通过将多阳离子分子 (例如聚乙烯亚胺、聚-L-赖氨酸或壳聚糖…) 吸附在盖玻片上来实现，并且特异性捕获化学可以通过将生物分子 (如蛋白质、抗体、抗原、适配体、噬菌体或噬菌体蛋白质) 吸附或偶联在玻璃表面来实现，以能够捕获目的微生物。

[0073] 调节装置确保了使目的细菌具有代谢活性的物理化学条件 (温度、气体…)。

[0074] 装置D的变型当然是可以的，落入本发明的范围内。

[0075] 在优选实施方式中，进行以下步骤：

[0076] ——利用各自的流体连接端口 P_1 至 P_N ，将含有目的微生物的溶液引入 C_1 至 C_N 中，

[0077] ——等待一段时间 (称作等待时间 (latency time))，以通过功能化的相互作用，使目的微生物附着在界面I上。

[0078] ——分别引入一系列浓度渐增的测试化合物 (C_2 到 C_N) 的液体溶液，并将预定量的生理培养基引入到每个流体腔室 C_1 到 C_N 中，

[0079] ——观察一段时间 (称作孵育时间)，在此期间，将每个腔室的微生物暴露于化合

物,但 C_1 腔室的微生物除外(对照),

[0080] ——确保对于在表面I上捕获的微生物进行标记和分类,

[0081] ——对于在前一步骤中分离的微生物进行拉曼光谱测量,直到获得一组光谱 S_1 到 S_N ,这些光谱是针对每个流体腔室 C_1 到 C_N 的微生物而获得的光谱组成的,然后

[0082] ——直接分析所获得的光谱,通过将 C_1 到 C_N 的光谱的演变与先前构建的数据库进行比较,或通过经由确定具有明显演变的一组光谱 S_i 来研究光谱特征信号,

[0083] ——分析结果由浓度 C_i 、 C_i 与参考阈值的比较或光谱 S_i 某些特征随浓度变化的演变表达构成;它可以描述所分析的微生物相对于被测化合物的表型行为。

[0084] 如上所述,根据测量的预期目标,可以做出若干调整(测试浓度的数量、孵育时间…),一般原则保持相同。

[0085] 本发明的细节和优点将在下面的实施例中示出,支持以下附图:

[0086] 图1示出能够进行本发明方法的安装完整的系统的框图,所述系统集成如图2所示的本发明的装置。

[0087] 图2示出属于图1所示系统的用于调节微生物的装置的框图。

[0088] 图3示出将样本置于如图2所示的调节装置的载玻片上。

[0089] 图4示出根据本发明的方法获得的,参考号ATCC 25922的大肠杆菌菌株(称作“EC10”)对于庆大霉素的反应的表达。

[0090] 图5示出根据本发明的方法获得的,参考号ATCC 35421的大肠杆菌菌株(称作“EC21”)对于庆大霉素($N=5$)的反应的表达。

[0091] 图6示出在阿莫西林($MIC=6\mu g/mL$)存在下,其中 $N=11$,对于参考号ATCC 25922的大肠杆菌的敏感性菌株(称作“EC10”)所获得的混淆矩阵。

[0092] 图7示出在阿莫西林($MIC=6\mu g/mL$)存在下,其中 $N=11$,对于参考号ATCC 35421的大肠杆菌的敏感性菌株(称作“EC21”)所获得的混淆矩阵。

[0093] 图8示出在被测试的阿西莫林存在下,利用暴露于庆大霉素的细菌($N=11$)而调试的分类器(classifier),对于参考号ATCC 34521的大肠杆菌的敏感性菌株(称作“EC21”)所获得的混淆矩阵。

[0094] 图9示出对于 $0\mu g/mL$ 、 $2\mu g/mL$ 和 $8\mu g/mL$ 的庆大霉素浓度下获得的特征信号。

[0095] 图10示出实施例4中所提供的简化框图。

[0096] 图11示出根据本发明方法获得的暴露于不同浓度的环丙沙星(ciprofloxacin)的细菌菌株的反应的表达。

[0097] 图12示出在两个实验中,在苯唑西林(oxacillin) ($MIC=0.25\mu g/mL$)存在下, $N=9$,对于参考号ATCC 25923金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的敏感性菌株(称作“SA44”)所获得的混淆矩阵,所述细菌由液体培养基中的培养物获得。

[0098] 图13示出在苯唑西林(oxacillin) ($MIC=0.25\mu g/mL$)存在下, $N=9$,对于参考号ATCC 25923金黄色葡萄球菌的敏感性菌株(称作“SA44”)所获得的混淆矩阵,所述细菌由培养皿中的琼脂培养基中的培养物获得。

[0099] 实施例1:本发明方法在确定参考号ATCC 25922的大肠杆菌菌株(称作“EC10”)对于庆大霉素的敏感性表型方面的应用

[0100] 保留的调节装置由两个流体腔室构成,并且测试两种抗生素浓度: c_0 :“无抗生素”

和 c_1 :“抗性测试”。

[0101] 设 c_1 为庆大霉素的浓度: $c_1=8\mu\text{g/mL}$,这相当于如EUCAST定义的对应于临床折点的浓度 $4\mu\text{g/mL}$ 的两倍。本试验的目的是根据EUCAST提供的定义,确定所述细菌是否被认为具有抗性。

[0102] 将含有待测细菌的溶液用作测试样本。该溶液是通过悬浮 5.10^7CFU/mL 获得,以便具有在临床样本(如尿液收集品)中可能出现的浓度。将该细菌溶液与通过吸附聚乙烯亚胺(PEI)而功能化的装置的界面I接触(通用性捕获)。在使细菌接触到功能化部分(functionalization)的10分钟的捕获时间之后,用水溶液清洗界面I,这是一个可以清除残留在溶液中的未捕获的多余的细菌的可选的步骤。实施例中所保留的生理培养基由1:9比率的Bouillon TSB-T Trypcase大豆肉汤(Bouillon TSB-T Trypcase Soy broth)(例如bioMérieux的参考号42100)和PBS $10\times$ (例如由AppliChem品牌的参考号A9162,0100的PBS片剂而获得)的富集较差的混合物组成。在将该生理培养基分成两个级分后,向这些级分中的每一个中分别加入一定量的庆大霉素(例如来自Sigma-Aldrich的参考号G1397-10ML),以得到不同浓度的庆大霉素 c_0 或 c_1 。将由此得到的浓度 c_0 和 c_1 的溶液分别引入腔室 C_0 或 C_1 中。因此,将由表面I上的样本直接捕获的细菌在合适的培养基中暴露在不同的抗生素浓度下,所述抗生素浓度取决于它们所处的腔室。

[0103] 然后将装置加热以达到 37°C 温度,持续两小时,接着将该装置放置在微型光谱仪的测量位置上。通过基于图像分析的自动程序,通过检测颗粒的常规程序对于所捕获的细菌进行标记,需要借助微型光谱仪照相机以及合适的光源。该标记能够自动获得一系列拉曼光谱(分别为 S_0 和 S_1),这些拉曼光谱是基于每个腔室 C_0 和 C_1 中存在的每种细菌而获得的。构成数据集所需采集的光谱的数量取决于对将要进行的测试的性能要求的水平。

[0104] 如前所述,可以使用几种方法来处理获得的数据以得到结果。在本实施例中,为了最大限度地提取目的信号和分类,使用了一种完整的方法来单独处理光谱,该方法包括包含上述所有阶段的预处理步骤。

[0105] 在该实施例中,使用从所获得的光谱的总组M中提取的至少2N个光谱的组:来自 S_0 的N个光谱和来自 S_1 的N个光谱。绘制这些光谱而不在现有的M个光谱中进行替换。从来自 S_1 的N个光谱和 S_0 的N个光谱中的每一个中减去来自 S_0 的N个光谱的平均值,这两批光谱构成了“对照测试样本”和“抗性测试样本”。

[0106] 出于分类的目的,在本实施例中使用从先前在不同日期以及在不同培养物中进行的类似实验获得的参考数据集,以调试(train)使用带有径向核心的支持向量机(SVM)获得的分类器。这个分类器被调试以识别两个类别,一个是“没有抗生素作用”,其来自没有抗生素的条件下的光谱;另一个是“抗生素作用”,其来自先前在其中所述浓度高于参考基准中使用的菌株的MIC的条件下获得的光谱。对于每一个由N个不同光谱构成的测试样本,就分类器而言,这些不同的光谱被分别进行测试,多个组中的要素的大多数类别被分配到N个光谱组中。这种大多数分配法是以由此得到的结果与参考方法的良好相关性为基础的,但是为了考虑测试的其他一些参数,该分配法也可以被很好地改变。例如,对于与大多数不同的阈值的表决,只要没有作用的细菌数量超过30%,那么就保守地分配为“没有抗生素作用”的结果。这个阈值也可以被调整以考虑孵育时间:因此,例如,如果明显减少暴露于抗生素的时间,或者如果测试微生物具有较慢的典型倍增时间,则必须考虑较低的阈值以将“抗生

素作用”的结果分配给这组光谱。最后,可以采用一种更详尽的系统,在这个系统中,每种细菌都将以完全独立的方式来考虑。如果将本发明的方法用于研究目的,则最后的这个实施方案可能是有利的。

[0107] 为了说明由此获得的性能,图4示出对于全部结果得到的平均得分,所述结果是采用294个光谱的总采集光谱的整个集合($M=294$)中的每一种浓度的5个光谱($N=5$)的组合而获得。在该矩阵中,列中为“没有ATB作用”和“ATB作用”的状态,行中为测试抗生素的两种浓度。所述得分表示由上述分类器分配给给定类别的测试样本的百分比。因此,发现“对照试验样本”中99%的细菌($N=5$)样本被归类为“没有抗生素作用”,由暴露于试验浓度的细菌组成的“敏感性试验样本”中的97.1%被归类为“ATB作用”。因此,根据本发明,基于仅几种单独的细菌分析,该菌株就可被非常可靠地被描述为敏感性的。所述结果与参考方法[BioMérieux产品**ETEST**[®] GM 256 (ref.412368)和**VITEK**[®] 卡号N233 (ref.413117)]给出的结果($MIC=1\mu\text{g/mL}$)的一致,所述结果还证实了根据EUCAST,所述细菌不具有抗性,其MIC未严格地高于该生物所限定的阈值。

[0108] 实施例2:本发明方法在确定参考号ATCC 35421的大肠杆菌菌株(称作“EC21”)对于庆大霉素的敏感性表型方面的应用

[0109] 对另一种大肠杆菌菌株进行与实施例1的测试相同的测试,这种称作“EC21”的ATCC 35421菌株允许确认所述测量的鉴别性质。

[0110] 结果如图5所示。

[0111] 参考方法将 $MIC>256\mu\text{g/mL}$ 分配给该菌株,因此根据EUCAST该菌株具有抗性。

[0112] 本发明的方法证实了这一结果,因为在 $N=5$ 和 $M=133$ 的情况下,可以看出所进行的试验全部(100%)都没有显示出抗生素药剂的特性作用特征。

[0113] 实施例3:测定两种大肠杆菌菌株对阿莫西林的最小抑制浓度(MIC)。

[0114] 在该实施例中,目的是测定敏感性表型,并说明称作“EC10”的参考号ATCC 25922的大肠杆菌菌株对于抗生素阿莫西林的最小抑制浓度范围,所述抗生素具有与实施例1和2中提供的作用方式不同的作用方式。

[0115] 为了说明该方法的鉴别能力,还示出对于称作“EC21”的抗阿莫西林的大肠杆菌ATCC 35421菌株所进行的相同测试。

[0116] 测试以下浓度的阿莫西林。

[0117] EC10敏感性菌株($MIC_{REF}=6\mu\text{g/mL}$):

[0118] $0\mu\text{g/mL}$; $2\mu\text{g/mL}$; $4\mu\text{g/mL}$; $8\mu\text{g/mL}$ 和 $16\mu\text{g/mL}$

[0119] EC21抗性菌株($MIC_{REF}=256\mu\text{g/mL}$):

[0120] $0\mu\text{g/mL}$; $4\mu\text{g/mL}$ 和 $8\mu\text{g/mL}$ 。

[0121] 在该实施例中,举例说明了对应于所述替代方法的所提供的测试的另一个实施方案。

[0122] 将含有待测细菌EC10或EC21的溶液用作测试样本。这种溶液是通过在水中悬浮 $5 \times 10^7 \text{CFU/mL}$ 来获得,以便具有在临床样本(如尿液收集品)中可能出现的浓度。将该细菌溶液以每管 $150\mu\text{L}$ 的速率分装于5支过滤管(例如来自Millipore的Microcon YM100)。向这些管中的每一个中加入足以用于最终的 $250\mu\text{L}$ 的生理培养基中生长的量,在该实施例中其包含最终浓度为 $1 \times$ (由AppliChem品牌的参考号A9162,0100的PBS片剂获得)的PBS、 $0.1 \times$ 营养培

培养基TSB(例如由bioMérieux的参考号42100的TSB-T Trypcase大豆肉汤获得)以及一定量的阿莫西林(例如Sigma-Aldrich的参考号A8523-10ML)的混合物,可以实现以下阿莫西林的各自最终浓度 C_0 到 C_4

[0123] • $C_0=0\mu\text{g/mL}$

[0124] • $C_1=2\mu\text{g/mL}$

[0125] • $C_2=4\mu\text{g/mL}$

[0126] • $C_3=8\mu\text{g/mL}$

[0127] • $C_4=16\mu\text{g/mL}$

[0128] 在搅拌下,将由此获得的5支管在 37°C 下孵育2小时。然后,使用适合于所用容器的离心机(例如Eppendorf品牌的8415C型号),以 1200g 离心8分钟,可以在每支试管的过滤部分上回收细菌沉淀物,并清除该培养基。将这些细菌沉淀物再分别悬浮于水中以进行洗涤,然后通过离心再次沉淀(1200g ,10分钟),总是在所述管的过滤部分上。在标有 C_0 到 C_4 的对应的腔室中,通过拭子将这些沉淀物分布在构成界面I(在该构造中未进行功能化)的Marienfield类型的载玻片上。在该构造中,以物理的观点来看这些腔室不必隔离,因为在不同的条件下不可能进行交换。因此可使用如图3所示的具有对于每一浓度都有清晰标记的虚拟隔室的载玻片。将虚拟隔室定义为,在本实施例中通过先前在细菌沉积的玻片的相对侧上的作标记而实现的限界。然后,将载玻片放置在构成上述的调节装置中的密封J的“基因框架”上。

[0129] 在本实施例中,通过手动程序对捕获的细菌的进行标记,该程序基于由操作人员对通过微型光谱仪的照相机和由实验人员调整的光源而获得的图像进行的视觉分析。该标记使得可以获得一系列在分别存于 C_0 到 C_4 每个腔室中的单个细菌上获得的至少N个拉曼光谱。为构成数据集而获取的光谱的数量取决于待进行的测试的性能要求的水平。

[0130] 此处提出的数据处理模式与实施例1和2中的相同:第一预处理步骤,接着是使用先前调试好的分类器对所采集的光谱进行分类的步骤。在下文提供的实施例中,所述分类器将采用参考基准进行调试,所述参考基准包含先前在没有阿莫西林($0\mu\text{g/mL}$)的条件下采集的EC10细菌的“没有抗生素作用”的光谱,以及在 $8\mu\text{g/mL}$ 的阿莫西林存在下的EC10细菌的“抗生素作用”光谱。所得的结果示于图6中提供的混淆矩阵中。如前所述,该矩阵允许通过给出大量测试的结果来证明该方法的稳健性(robustness)。

[0131] 在 $4\mu\text{g/mL}$ 至 $8\mu\text{g/mL}$ 的浓度中,可观察到“没有ATB作用”类别的光谱组向“抗生素作用”类别的光谱组的分配的转变。因此根据测试可将包含 $4\mu\text{g/mL}$ 至 $8\mu\text{g/mL}$ 的MIC分配给这种菌株。稀释因子的这种可变性在这种类型的测定中很常见,例如EUCAST指出的,在MIC盘扩散测试的质量控制期间,对于这种菌株ATCC 25922的MIC改变范围为 $[2-8]\mu\text{g/mL}$,因此符合预期结果。由参考方法[BioMérieux产品**ETEST**[®] AM 256(ref.412253)和**VITEK**[®] 卡N233(ref.413117)]得到的该菌株的结果为 $6\mu\text{g/mL}$,这也与这个结果一致。

[0132] 针对阿莫西林抗性菌株“EC21”进行了相同类型的实验,结果如图7所示。没有观察到转变,绝大多数测试组被分配为“没有ATB作用”类别。使用该测试可将 $\text{MIC}>8\mu\text{g/mL}$ 分配给该菌株,其也与通过参考方法得到的结果一致。

[0133] 如图8所示,通过参考基准调试分类器获得了相同的结果,所述参考基准再次包含尚未暴露于抗生素中的细菌的光谱以识别“没有ATB作用”类别,以及暴露于浓度大于MIC的

属于不同家族的另一抗生素分子(例如先前实施例中的庆大霉素)的细菌的“抗生素作用”光谱。

[0134] 发现与之前暴露的那些具有相似的结果。该实施例证明可以以这种方式来研究未知物质对于测试细菌菌株的抗生素作用,因此可以应用于分子筛选。

[0135] 实施例4:测定未知物质对细菌菌株的作用

[0136] 在该实施例中,目的是测定细菌菌株的敏感性表型,并精确确定细菌菌株(例如参考号ATCC 25922的大肠杆菌菌株,称作“EC10”)对于认为是未知的物质的最低抑制浓度的范围。

[0137] 出于测试的需要,使用了已知的但不属于之前所用过的抗生素家族的抗生素分子,使用的是氟喹诺酮(fluoroquinolones)家族的环丙沙星(ciprofloxacin)。

[0138] 将先前实施例的实施方案用于该实施例中。

[0139] 将明确说明仅前4种浓度所获得的结果,因为可以快速检测到这种分子的抗生素作用。在从 C_0 到 C_3 的每个腔室中都获得了一系列的N个拉曼光谱。所用的浓度 C_0 到 C_3 如下:

[0140] • $C_0 = 0\mu\text{g/mL}$

[0141] • $C_1 = 0.005\mu\text{g/mL}$

[0142] • $C_2 = 0.015\mu\text{g/mL}$

[0143] • $C_3 = 0.064\mu\text{g/mL}$

[0144] 如前所述,用于进行光谱的预处理的步骤如下:

[0145] • 移除饱和光谱

[0146] • 移除宇宙射线

[0147] • 重排

[0148] • 提取特定的细菌信号

[0149] • 移除异常

[0150] • 目的区域和信号归一化

[0151] 为了进行测试,将对于每个测试浓度所采集的N个光谱进行平均,并从结果中减去浓度 C_0 的N个光谱的平均值。对于浓度 C_0 ,选择与用来减去参考状态的N个光谱不同的N个光谱。该操作旨在克服在测量条件下,与暴露于抗生素无关的所有改变。由此获得一系列的代表每个浓度的4个测试光谱。

[0152] 在该实施例中,在研究和至少使用一种抗生素作用特征性的光谱特征信号的基础上,使用无监督分类方法。为了确定该特征信号,使用先前采集的庆大霉素和EC10菌株数据集,其对于该抗生素的MIC ($1\mu\text{g/mL}$) 是已知的。使用由暴露于高于MIC的一种(或更多种)浓度的细菌所采集的N个预处理光谱组成的数据集以提取特征性效应。将数据集的N(或 $n*N$)个光谱的组取平均值,并从结果中减去在没有抗生素的情况下采集的N个光谱的平均值。将该结果描述为参考特征信号。正是该参考特征信号被保留以描述通过使细菌暴露于环丙沙星而采集的数据,在这种情况下,认为环丙沙星是未知的。

[0153] 由此构建的特征信号组示于图9。对于浓度 C_1 和 C_3 所获得的两组特征信号是相似的:相同的峰有所改变,但此处的强度与浓度相关。应该指出的是,这种强度的差异可以用来量化给定浓度的影响,但仅限于某些菌株/抗生素的配置。

[0154] 将从 $8\mu\text{g/mL}$ 浓度的庆大霉素中提取的特征信号用于分析3组测试光谱。为此,评估

每个测试光谱与所选特征信号的接近度。在该实施例中,将使用光谱空间中的简单的欧几里德(Euclidean)距离对测试光谱到信号的距离进行评估,但是许多其他距离能够评估这种接近度(Mahalanobis, L1...)。阈值是相对于先前进行的其他相同的参考实验而根据经验限定,该阈值的选择可以通过常规方法(ROC...),按照所需的在各应用(IVD诊断、药物筛选...)中存在显著差异的结果水平进行优化。然后将所获得的距离测量值与阈值进行比较,以定义所保留的特征信号与在不同浓度的被视为未知的分子的存在下所获得的不同光谱之间的接近度。如果距离低于阈值,则测试为阳性,并检测到抗生素分子的作用。如果距离超过该阈值,则未检测到任何作用。

[0155] 在有利的实施方案中,可以建立几个越来越严格的检测阈值。在该实施例中,根据该原则使用两个阈值:第一个,较不严格,允许检测到测试光谱的显著变化,而第二个,更加严格,描述变化与特征信号的大的接近度。因此,相对于第一个阈值,进行测试光谱到特征信号的距离的测试。如果测试没有通过,则未检测到作用。如果测试通过,则测量距离低于第一个阈值,那么检测到作用。然后使用第二个阈值进行第二个测试,如果该测试通过,则将“抗生素作用”结果分配给整个测试。如果第二个测试没有通过,那么将“其他的作用”结果分配给整个测试。这种配置使得可以容易地检测到达到给定的浓度,但与参考特征信号没有足够的相似性的光谱改变。因此,这种配置允许简单地克服在测试过程中可能出现的一部分危险(捕获表面的强的不均匀性,寄生颗粒的存在...)。简化图如图10所示。

[0156] 进行等价测试的另一种方法将是通过直接使用欧几里德(Euclidean)标准或测试光谱的其他标准进行测试,并将其与所选的重要阈值比较,以便不考虑与测试模式相关的常规改变(传感器噪声水平、生物变异性...),然后在单一的严格阈值下进行测试。如果标准超过某一阈值,则光谱与接近于零的差异光谱存在显著性差异,假使浓度不变,则所述光谱可以与参考特征信号进行严格比较,例如通过根据所用的标准测量其与特征信号的距离。

[0157] 得到的结果如图11所示。由此观察到浓度大于 $0.005\mu\text{g/mL}$ 下的效果的检测。因此将环丙沙星的抗生素作用分配给浓度大于 $0.005\mu\text{g/mL}$ 的测试菌株。由此该测试将定义 $0.005\mu\text{g/mL}$ 浓度作为MIC。如果必要,可增加0至 $0.005\mu\text{g/mL}$ 的最低浓度进行新的测试。该菌株的EUCAST数据表明已知的MIC为 $0.008\mu\text{g/mL}$,且可接受的变化范围为 $0.004\mu\text{g/mL}$ 到 $0.016\mu\text{g/mL}$ 。采用合适的基线测试(etest)(bioMérieux)进行的测试可以测得MIC为 $0.008\mu\text{g/mL}$,这证实所得的结果是符合参考方法[BioMérieux产品**ETEST**® CI 32(ref.412311)和**VITEK**®卡N233(ref.413117)]。

[0158] 实施例5:本发明方法用于确定参考号ATCC 25923的金黄色葡萄球菌(称作“SA44”)对苯唑西林的敏感性表型方面的应用

[0159] 保留的调节装置由两个流体腔室构成,并且测试两种抗生素浓度: c_0 :“无抗生素”和 c_1 :“抗性测试”。

[0160] 设 c_1 为苯唑西林的浓度: $c_1=8\mu\text{g/mL}$,这相当于如EUCAST定义的临床折点的浓度 $0.25\mu\text{g/mL}$ 乘以32。本试验的目的是根据EUCAST提供的定义,确定所述细菌菌株是否被认为具有抗性。

[0161] 将含有待测细菌的溶液作为测试样本。该溶液是通过悬浮 5.10^7CFU/mL 获得,以便具有在临床样本(如尿液收集品)中可能出现的浓度。所述细菌来自液体培养基中的培养物,或培养皿(Petri dish)中琼脂培养基中的培养物。将该细菌溶液与通过吸附聚乙烯亚

胺 (PEI) 而功能化的装置的界面 I 接触 (通用性捕获)。在使细菌接触到功能化部分 (functionalization) 的 10 分钟的捕获时间之后,用水溶液清洗界面 I,这是一个可以清除残留在溶液中的未捕获的多余的细菌的可选的步骤。该实施例中所保留的生理培养基由 1:9 比率的 BHI Brain Heart Infusion Bouillon (例如 bioMérieux 的参考号 42081) 和 PBS 10x 的富集较差的混合物组成。在将该生理培养基分成两个级分后,向这些级分中的每一个分别加入一定量的苯唑西林 (例如来自 TCI Europe 的参考号 00353),以得到不同浓度的庆大霉素 c_0 或 c_1 。将由此得到的浓度为 c_0 和 c_1 的溶液分别引入腔室 C_0 或 C_1 中。因此,将由表面 I 上的样本直接捕获的细菌于合适的培养基中暴露在不同的抗生素浓度下,所述浓度取决于它们所处的腔室。

[0162] 然后将装置加热以达到 37°C 温度,持续两小时,接着将该装置放置在微型光谱仪的测量位置上。通过基于图像分析的自动程序,通过检测颗粒的常规程序对于所捕获的细菌进行标记,借助微型光谱仪照相机以及合适的光源。该标记允许自动获得一系列拉曼光谱 (分别为 S_0 和 S_1),这些拉曼光谱是基于每个腔室 C_0 和 C_1 中存在的每种细菌而获得的。构成数据集所需采集的光谱的数量取决于对将要进行的测试的性能要求的水平。

[0163] 如前所述,可以使用几种方法来处理获得的数据以得到结果。在本实施例中,为了最大限度地提取目的信号和分类,使用了一种完整的方法来在单独的水平上处理光谱,该方法包括包含上述所有阶段的预处理步骤。

[0164] 在该实施例中,使用从所获得的光谱的总组 M 中提取的至少 2N 个光谱的组:来自 S_0 的 N 个光谱和来自 S_1 的 N 个光谱。绘制这些光谱而不在现有的 M 个光谱中进行替换。从来自 S_1 的 N 个光谱和 S_0 的 N 个光谱中的每一个中减去来自 S_0 的 N 个光谱的平均值,这两批光谱构成了“对照测试样本”和“抗性测试样本”。

[0165] 出于分类的目的,在本实施例中使用先前在不同日期以及在不同培养物中进行的类似实验获得的参考数据集,以调试使用带有径向核心的支持向量机 (SVM) 获得的分类器。这个分类器被调试以识别两个类别,一个是“没有抗生素作用”,其来自没有抗生素的条件下的光谱;另一个是“抗生素作用”,其来自先前在其中所述浓度高于参考基准中使用的菌株的 MIC 的条件下获得的光谱。对于每一个由 N 个不同光谱构成的测试样本,就分类器而言,这些不同的光谱被分别进行测试,多个组中的要素的大多数类别被分配到该组中。这种大多数分配法是以由此得到的结果与参考方法的良好相关性为基础的,但是为了考虑测试的其他一些参数,该分配法也可以被很好地改变。例如,对于与大多数不同的阈值的表决,只要没有作用的细菌数量超过 30%,那么就保守地分配为“没有抗生素作用”的结果。这个阈值也可以被调整以考虑孵育时间:因此,例如,如果明显减少暴露于抗生素的时间,或者如果测试微生物具有较慢的典型倍增时间,则必须考虑较低的阈值以将“抗生素作用”的结果分配给这组光谱。最后,可以采用一种更详尽的系统,在这个系统中,每种细菌都将以完全独立的方式来考虑。如果将本发明的方法用于研究目的,则最后的这种实施方案可能是有利的。

[0166] 为了说明由此获得的性能,图 12 和 13 示出对于全部结果得到的平均得分,所述结果采用 337 个光谱的总采集光谱的整个集合 ($M=337$) 的每一种浓度的 9 个光谱 ($N=9$) 的组合而获得。在这些矩阵中,列中为“没有 ATB 作用”和“ATB 作用”的状态,行中为测试抗生素的两种浓度。所述得分表示由上述分类器被分配给给定类别的测试样本的百分比。因此,在图

12中,发现“对照试验样本”中100%的细菌(N=9)样本被归类为“没有抗生素作用”,由暴露于试验浓度的细菌组成的“敏感性试验样本”中97%以上被归类为“ATB作用”。因此,根据本发明,基于仅几种单独的细菌分析,该菌株就可被非常可靠地被描述为敏感性的。在这些图 中所观察到的结果与参考方法[BioMérieux产品 **ETEST**[®] 0X 256 (ref.412432) 或 **VITEK**[®] 卡P631 (ref.414961)]给出的结果(MIC=0.25µg/mL)的一致,所述结果还证实了 根据EUCAST,所述细菌菌株不具有抗性,其MIC未严格地高于该生物限定的阈值。

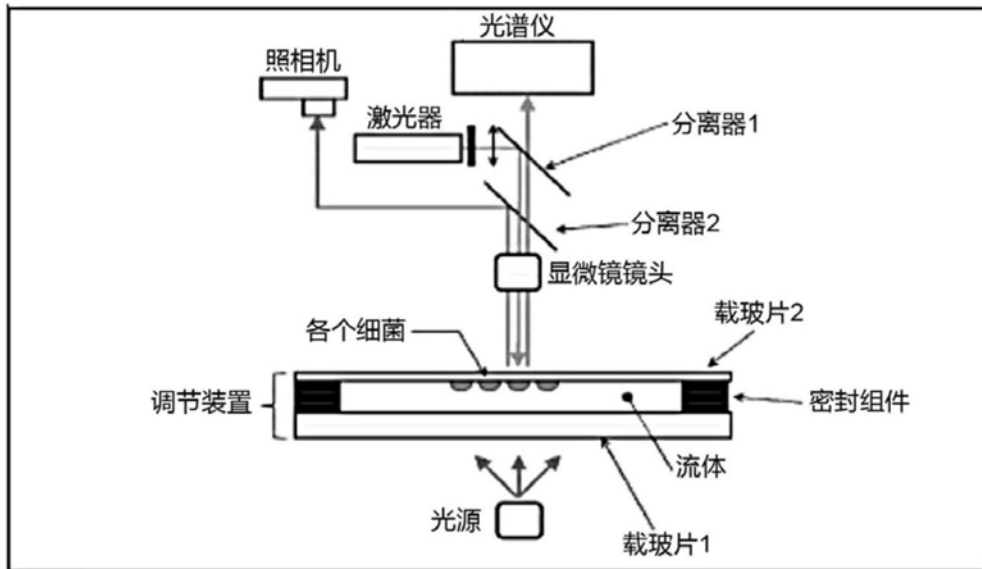


图1

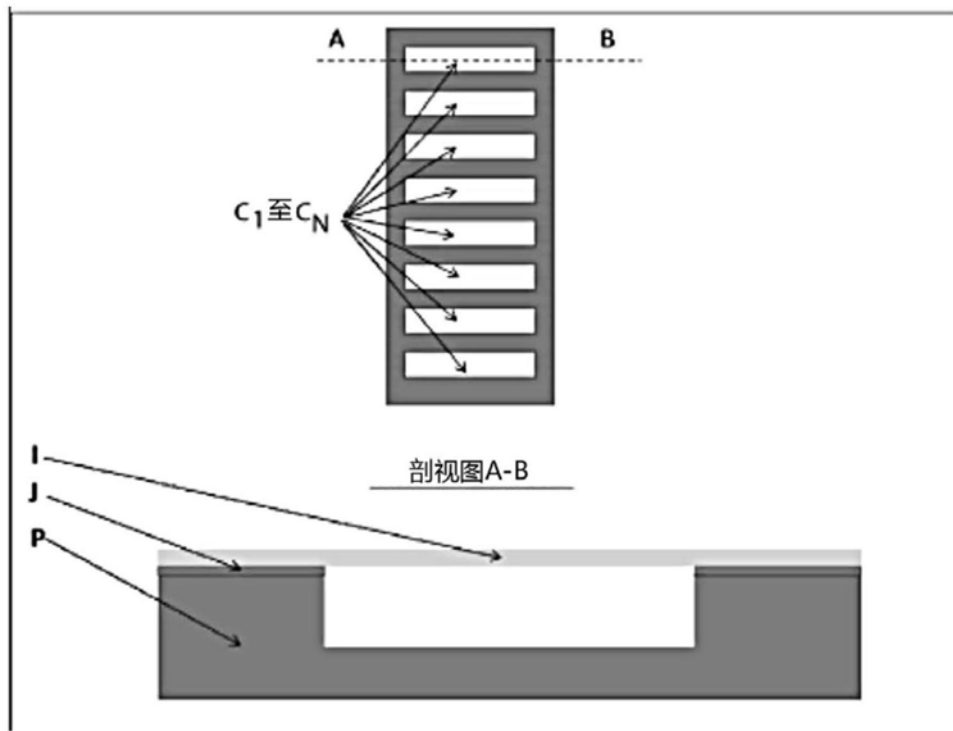


图2

C ₀	C ₁
C ₂	C ₃
C ₄	C ₅

图3

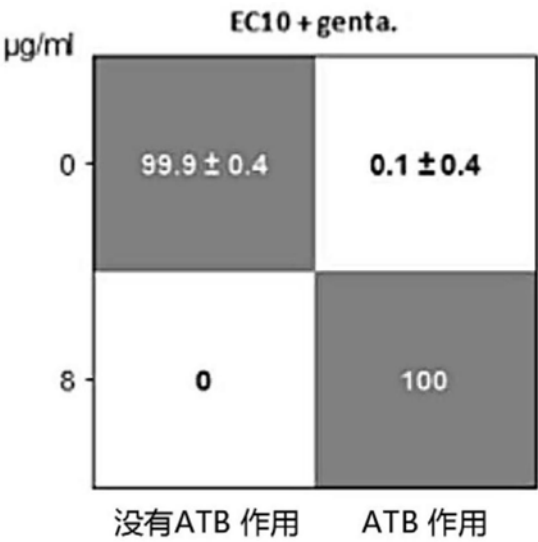


图4

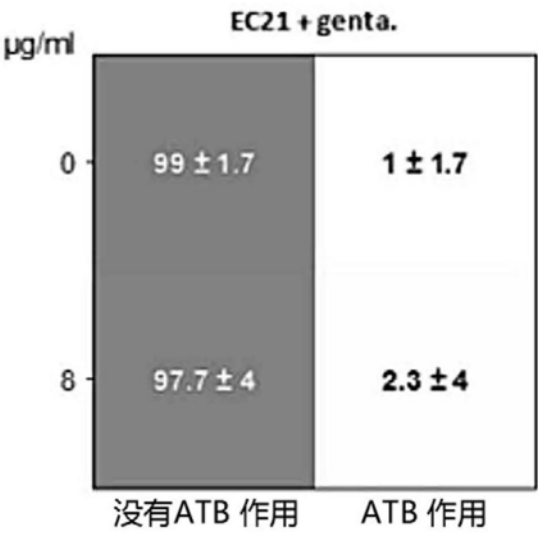


图5

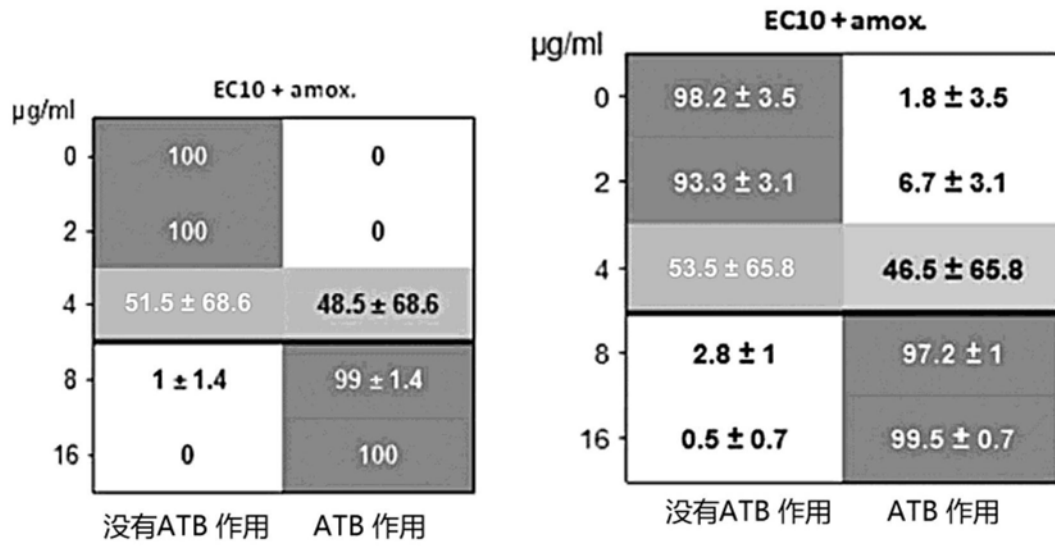


图6

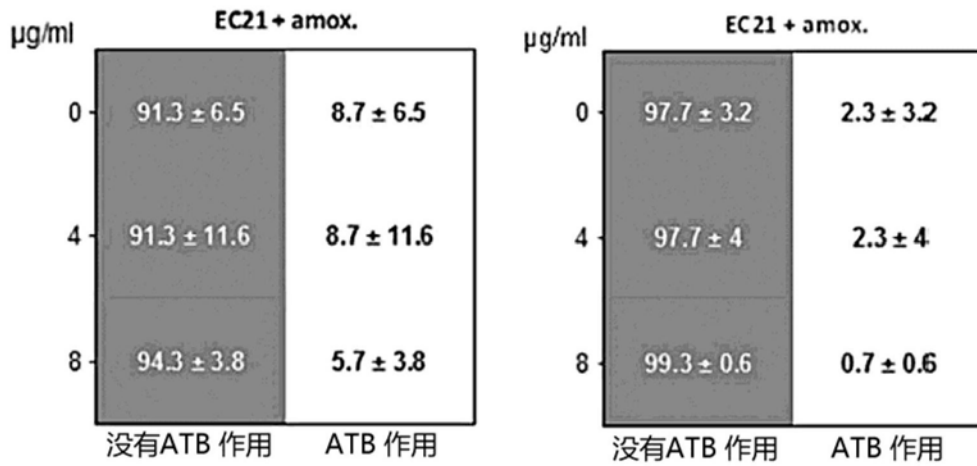


图7

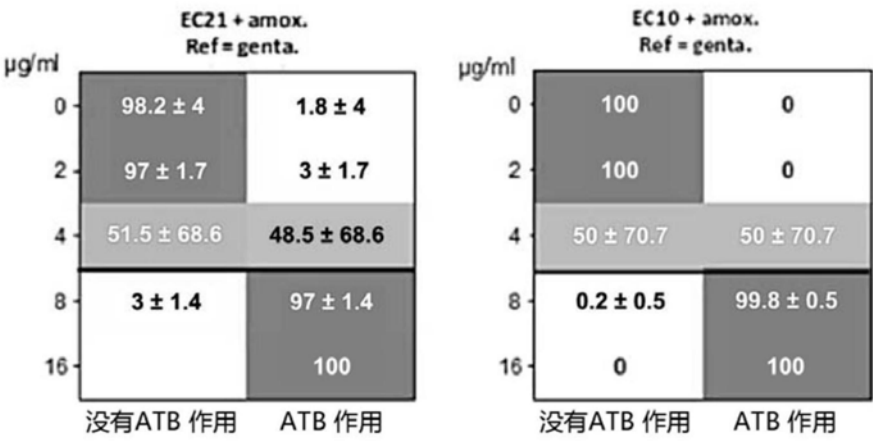


图8

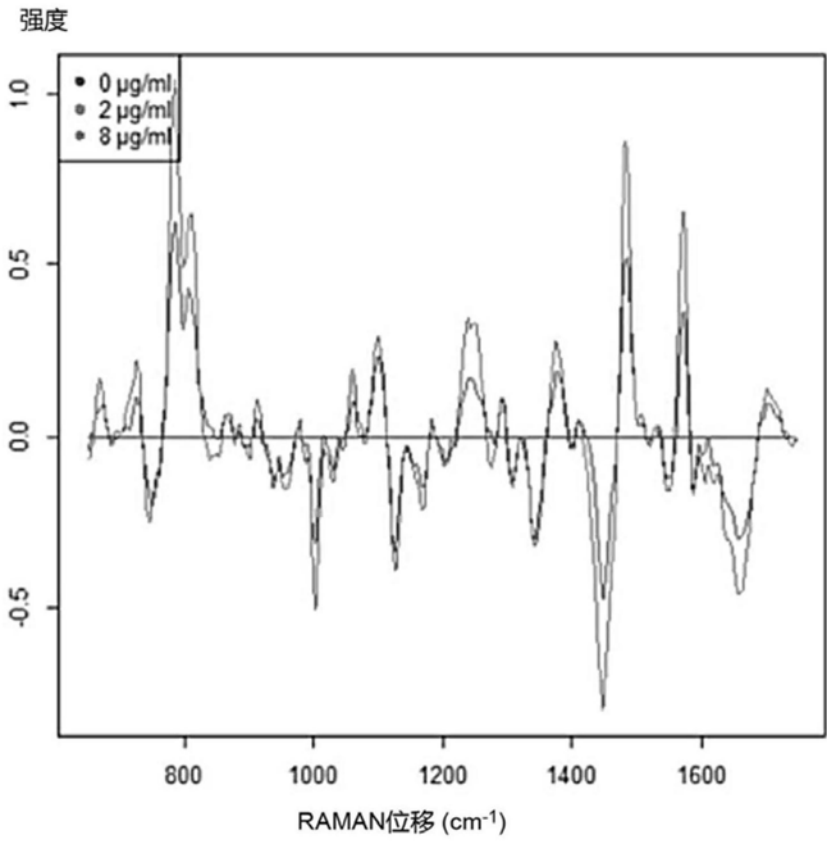


图9

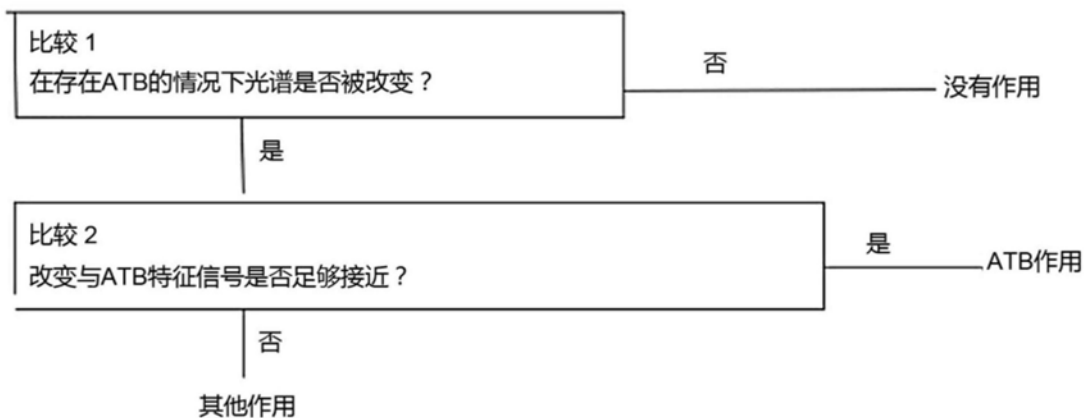


图10

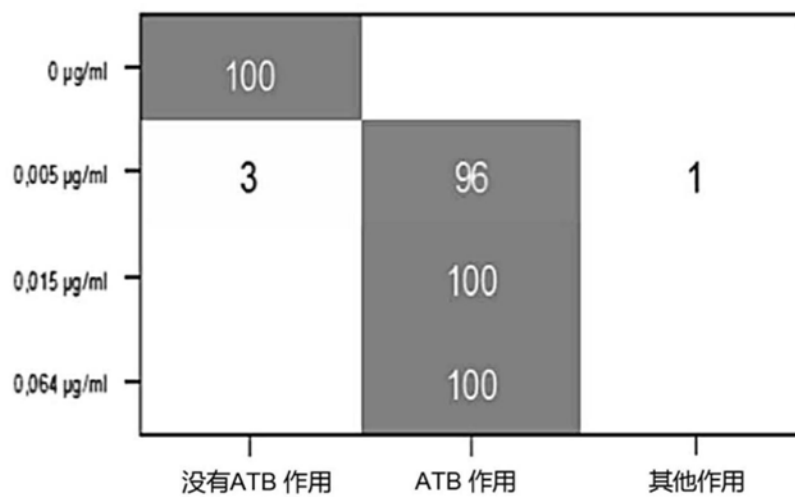


图11

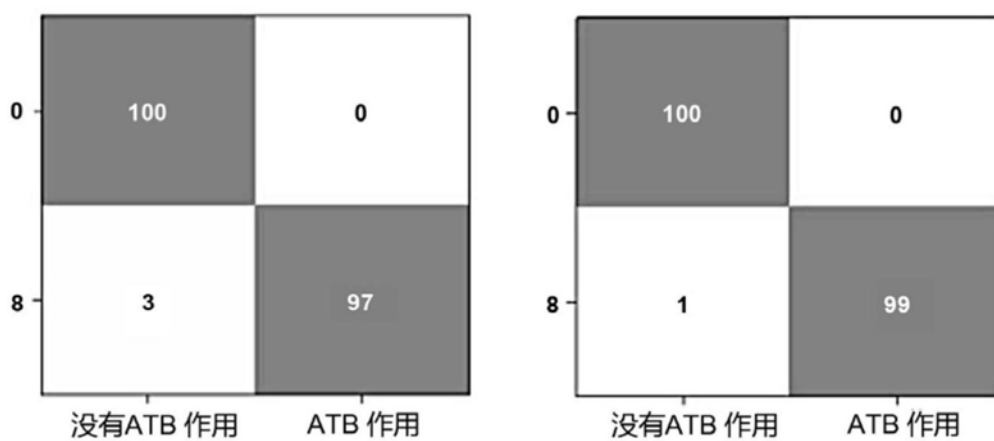


图12

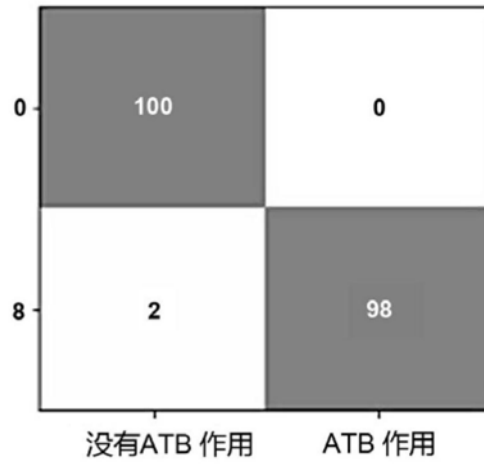


图13