



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109072280 B

(45) 授权公告日 2022.10.14

(21) 申请号 201780019958.7

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

(22) 申请日 2017.01.20

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 109072280 A

专利代理人 温宏艳 周齐宏

(43) 申请公布日 2018.12.21

(51) Int.CI.

C12Q 1/18 (2006.01)

(30) 优先权数据

G01N 33/569 (2006.01)

62/281698 2016.01.21 US

(56) 对比文件

62/298821 2016.02.23 US

CN 104284984 A, 2015.01.14

62/326545 2016.04.22 US

CN 102460172 A, 2012.05.16

62/338376 2016.05.18 US

US 2007020715 A1, 2007.01.25

62/370579 2016.08.03 US

US 2005233396 A1, 2005.10.20

62/383198 2016.09.02 US

Flentie K et al.. Microplate-based

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

surface area assay for rapid phenotypic
antibiotic susceptibility testing.

2018.09.19

《Scientific reports》.2019, 第9卷(第1期), 第
1-9页.

(86) PCT国际申请的申请数据

Zwier J M et al.. Luminescent

PCT/US2017/014343 2017.01.20

lanthanide cryptates: from the bench to
the bedside.《Inorganic chemistry》.2014, 第
53卷(第4期), 第1854-1866页. (续)

(87) PCT国际申请的公布数据

审查员 杨大鹏

W02017/127684 EN 2017.07.27

(73) 专利权人 赛录科试诊断公司

权利要求书3页 说明书62页 附图45页

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 E. 斯特恩 A. 瓦西奇 B. 斯皮尔斯

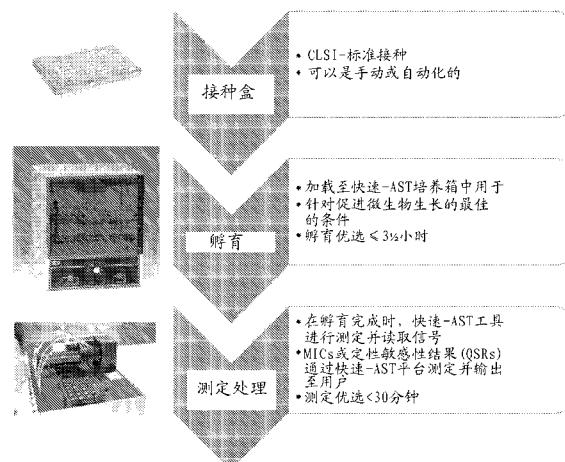
K. 弗伦蒂 A. 弗莱尔

(54) 发明名称

用于快速抗微生物剂敏感性测试的方法

(57) 摘要

本发明部分地涉及用于快速确定微生物的抗微生物剂敏感性的方法和试剂盒。所述方法和试剂盒使用特异性或非特异性结合至微生物的表面的信号传导剂。优选地，所述信号传导剂具有放大器基团，诸如铕配位络合物。



[接上页]

(56) 对比文件

Alpha B et al..Energy transfer
luminescence of europium (III) and
terbium (III) cryptates of macrobicyclic

polypyridine ligands.《Angewandte Chemie
International Edition in English》.1987,第
26卷(第3期),第266-267页.

1. 用于确定微生物的抗微生物剂敏感性的方法,其包括:

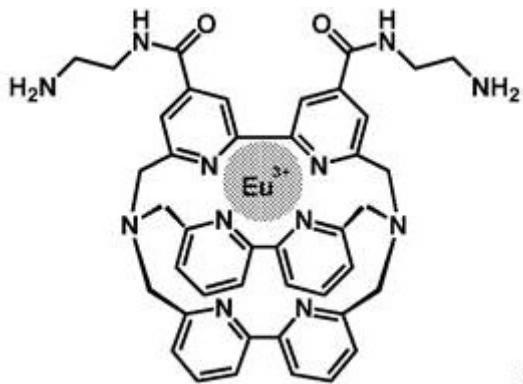
在促进微生物生长的条件下,在抗微生物剂存在的情况下孵育微生物的液体悬浮液;

添加能够结合至微生物的表面的信号传导剂;

将由所述信号传导剂结合的微生物与未结合的信号传导剂分开;和

与一种或多种对照相比,确定与微生物相关的信号水平,由此确定微生物的抗微生物剂敏感性;

其中所述信号传导剂包括如下结构:



其中所述微生物是细菌。

2. 权利要求1的方法,其中所述微生物的抗微生物剂敏感性在少于5小时内测定。

3. 权利要求1的方法,其中添加所述信号传导剂发生在所述孵育步骤之后。

4. 权利要求1的方法,其中所述信号传导剂与所述微生物的表面形成非共价键。

5. 权利要求1的方法,其中所述信号传导剂在一种或多种促进偶联的试剂存在的情况下与所述微生物的表面形成共价键,所述试剂选自戊二醛、甲醛、多聚甲醛、EDC、DCC、CMC、DIC、HATU、伍德沃德氏试剂、N,N'-羰基二咪唑、丙烯酸酯、酰胺、酰亚胺、酸酐、氯三嗪类、环氧类、异氰酸酯、异硫氰酸酯、有机酸、单体、聚合物、硅烷、硅酸酯、NHS和磺基-NHS或其组合。

6. 权利要求5的方法,其中所述促进偶联的试剂是戊二醛。

7. 权利要求1的方法,其中并行测试多种抗微生物剂。

8. 权利要求1的方法,其中所述确定信号水平包含测量与微生物相关的信号水平。

9. 权利要求8的方法,其中所述方法进一步包含以下步骤:确定微生物是否对一种或多种抗微生物剂具有抗性、中等抗性或敏感性和/或基于与完整微生物相关的信号水平测定一种或多种抗微生物剂对微生物的最小抑制浓度(MIC)。

10. 权利要求1的方法,其中所述方法不涉及在孵育之前或期间将微生物捕获在固体表面上的步骤和/或不包括在孵育步骤之前或之后使微生物在固体表面上生长的步骤。

11. 权利要求1的方法,其中通过离心、磁性分离、过滤、电泳、双向电泳、沉淀、凝集或其组合进行微生物的分离。

12. 权利要求1的方法,其中所述一种或多种对照包含在另外相同、但没有抗微生物剂或具有一种或多种微生物对其不敏感的抗微生物剂的条件下从微生物测量的阳性对照。

13. 权利要求1的方法,其中所述微生物获得自来自具有所述微生物的感染的受试者的生物样品和/或获得自源自所述生物样品的培养物。

14. 权利要求13的方法,其中所述生物样品选自血液或血液组分、支气管肺泡灌洗液、脑脊液、鼻拭子、痰液、粪便、咽喉拭子、阴道拭子、尿液和伤口拭子或其组合。

15. 权利要求1的方法,其中所述孵育微生物的液体悬浮液和添加信号传导剂的步骤在包含多个室的盒中发生并且所述确定与微生物相关的信号水平的步骤包括确定多个室中的信号传导水平。

16. 权利要求15的方法,其中所述盒进一步包含一个或多个对照室,所述对照室不含抗微生物剂或一种或多种微生物对其不敏感的抗微生物剂。

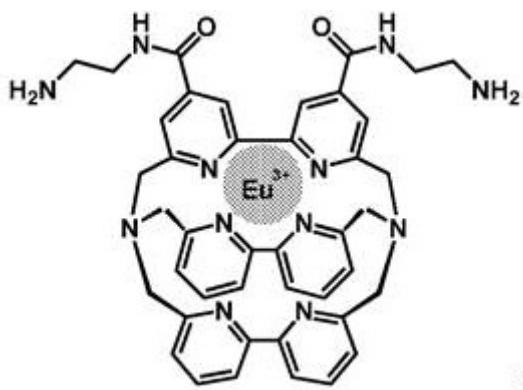
17. 用于确定微生物的抗微生物剂敏感性的方法,其包括:

在促进微生物生长的条件下,在抗微生物剂和信号传导剂存在的情况下孵育微生物的液体悬浮液,其中所述信号传导剂能够结合至微生物的表面;

将由所述信号传导剂结合的微生物与未结合的信号传导剂分开;和

与一种或多种对照相比,确定与微生物相关的信号水平,由此确定微生物的抗微生物剂敏感性;

其中所述信号传导剂包括如下结构:



其中所述微生物是细菌。

18. 权利要求17的方法,其中所述微生物的抗微生物剂敏感性在少于5小时内测定。

19. 权利要求17的方法,其中所述一种或多种对照包含在另外相同、但没有抗微生物剂或具有一种或多种微生物对其不敏感的抗微生物剂的条件下从微生物测量的阳性对照。

20. 权利要求17的方法,其中所述信号传导剂与所述微生物的表面形成非共价键。

21. 权利要求17的方法,其中所述信号传导剂在一种或多种促进偶联的试剂存在的情况下与所述微生物的表面形成共价键,所述试剂选自戊二醛、甲醛、多聚甲醛、EDC、DCC、CMC、DIC、HATU、伍德沃德氏试剂、N,N'-碳基二咪唑、丙烯酸酯、酰胺、酰亚胺、酸酐、氯三嗪类、环氧化物、异氰酸酯、异硫氰酸酯、有机酸、单体、聚合物、硅烷、硅酸酯、NHS和磺基-NHS或其组合。

22. 权利要求21的方法,其中所述促进偶联的试剂是戊二醛。

23. 权利要求17的方法,其中所述微生物获得自来自具有所述微生物的感染的受试者的生物样品和/或获得自源自所述生物样品的培养物;和其中所述生物样品选自血液或血液组分、支气管肺泡灌洗液、脑脊液、鼻拭子、痰液、粪便、咽喉拭子、阴道拭子、尿液和伤口拭子或其组合。

24. 用于确定微生物的抗微生物剂敏感性的方法,其包括:

在促进微生物生长的条件下,在包含多个室的盒中孵育微生物的液体悬浮液,每个室

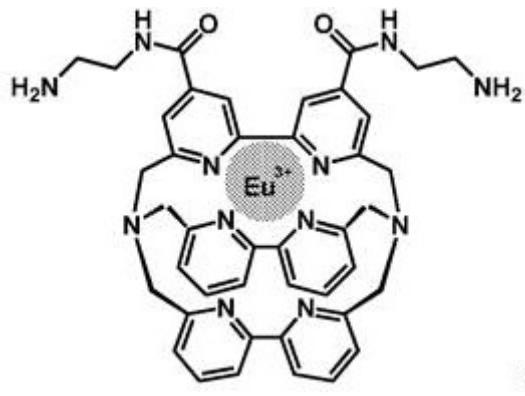
含有一种或多种抗微生物剂；

将信号传导剂加入多个室中,其中所述信号传导剂能够结合至微生物的表面；

移除未结合的信号传导剂;和

与一种或多种对照相比,确定多个室中的信号传导水平,由此确定微生物对一种或多种抗微生物剂的敏感性；

其中所述信号传导剂包括如下结构：



其中所述微生物是细菌。

25. 权利要求24的方法,其中所述微生物的抗微生物剂敏感性在少于5小时内测定。

26. 权利要求24的方法,其中所述盒进一步包含一个或多个对照室,所述对照室不含抗微生物剂或一种或多种微生物对其不敏感的抗微生物剂。

27. 权利要求24的方法,其中所述信号传导剂在一种或多种促进偶联的试剂存在的情况下与所述微生物的表面形成共价键,所述试剂选自戊二醛、甲醛、多聚甲醛、EDC、DCC、CMC、DIC、HATU、伍德沃德氏试剂、N,N'-羰基二咪唑、丙烯酸酯、酰胺、酰亚胺、酸酐、氯三嗪类、环氧化物、异氰酸酯、异硫氰酸酯、有机酸、单体、聚合物、硅烷、硅酸酯、NHS和磺基-NHS或其组合。

28. 权利要求24的方法,其中所述微生物获得自来自具有所述微生物的感染的受试者的生物样品和/或获得自源自所述生物样品的培养物;和其中所述生物样品选自血液或血液组分、支气管肺泡灌洗液、脑脊液、鼻拭子、痰液、粪便、咽喉拭子、阴道拭子、尿液和伤口拭子或其组合。

用于快速抗微生物剂敏感性测试的方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2016年1月21日提交的美国临时专利申请号62/281,698;2016年2月23日提交的美国临时专利申请号62/298,821;2016年4月22日提交的美国临时专利申请号62/326,545;2016年5月18日提交的美国临时专利申请号62/338,376;2016年8月3日提交的美国临时专利申请号62/370,579;和2016年9月2日提交的美国临时专利申请号62/383,198的优先权和权益。前述专利申请的内容通过引用以其整体并入本文。

[0003] 发明背景

[0004] 抗微生物剂抗性的微生物感染与不良临床结果(包括受感染患者中的发病率、死亡率和健康护理成本增加)相关。在过去的30年,美国的此类设施中这些生物体的流行率稳步增加。微生物的表型抗微生物剂敏感性测试(AST)对于告知医师适当的治疗方案至关重要。使用现有方法,AST测定通常需要最小八小时,由于许多临床微生物学实验室中的轮换工作而使其成为过夜过程。在等待从目前AST方法测定的同时,经常向患者给药广谱抗微生物剂,其经常对患者健康具有显著的不利影响和/或有助于正在增加的抗微生物剂抗性流行。此外,获得准确的抗微生物治疗信息的这种时间延迟增加了患者在医院中的停留,由此增加患者的成本和不便。

[0005] 因此,对于快速确定微生物感染的抗微生物剂敏感性的方法存在需求。此处描述的方法是进一步有利的,因为其以成本有效的方式解决了这种需要,因为其与现有的测定硬件组件兼容。

[0006] 发明概述

[0007] 本发明允许快速确定微生物感染的抗生素敏感性。本发明部分地基于非特异性表面结合测定的令人惊讶的发现,所述非特异性表面结合测定在少于十二小时-且具体地,在4小时内提供准确且快速的抗微生物剂敏感性测试(AST)测定。本发明(“Fast-AST”)提供了与当用多种抗微生物剂和多种微生物进行测试时使用临床实验室标准研究所(CLSI)参考方法获得的结果一致的准确结果;然而,与CLSI方法相比,本发明获得结果花费显著更少的时间。此外,本发明准确地区分对一种或多种抗微生物剂具有抗性的临床相关微生物菌株的抗微生物MIC和对抗微生物剂敏感的相同微生物的菌株的抗微生物MIC。此外,本发明可以包括与微生物非特异性而不是特异性结合(例如,经由化学保守基团或微生物上的生物化学保守结合位点)的信号传导剂(例如,铕化合物),由此将本发明的概括扩展至任何微生物并允许开始适当的治疗而无需首先鉴定特定的感染性微生物。而且,本发明允许信号放大,使得可以在较低浓度下例如从微生物的稀释培养物或经由患者的生物样品快速检测微生物。此外,本发明可以使用铕制剂作为化学部分,由此扩展所述方法的动态范围并允许从一系列微生物样品进行更准确的测定。最后,本发明与现有设备兼容,由此使得能够在目前的临床实验室中快速采用。因此,相对于标准方法,本发明可以在大大减少量的时间和费用上为患者提供适当的治疗方案,即特定的抗微生物剂和以特定的剂量。因此,本发明将改善患者结果,降低医院成本,并帮助减少抗微生物剂抗性的微生物的进一步进化;因此,本发明代表了AST领域的重大突破。

[0008] 本发明的一个方面是用于确定微生物的抗微生物剂敏感性的方法。所述方法包括以下步骤：在促进微生物生长的条件下，在抗微生物剂和能够结合至微生物的表面的信号传导剂存在的情况下孵育微生物的液体悬浮液；将由所述信号传导剂结合的微生物与未结合的信号传导剂分开；和与一种或多种对照相比，确定与微生物相关的信号水平。

[0009] 本发明的另一个方面是用于确定微生物的抗微生物剂敏感性的方法。所述方法包括以下步骤：在促进微生物生长的条件下，在抗微生物剂存在的情况下孵育微生物的液体悬浮液；添加能够结合至微生物的表面的信号传导剂；将由所述信号传导剂结合的微生物与未结合的信号传导剂分开；和与一种或多种对照相比，确定与微生物相关的信号水平。

[0010] 本发明的又另一个方面是用于确定微生物的抗微生物剂敏感性的方法。所述方法包括以下步骤：在促进微生物生长的条件下，在包括多个室的盒中孵育微生物的液体悬浮液，每个室含有一种或多种抗微生物剂；将能够结合至微生物的表面的信号传导剂加入到多个室中；移除未结合的信号传导剂；和与一种或多种对照相比，确定多个室中的信号传导水平。

[0011] 本发明的一个方面是用于确定微生物的抗微生物剂敏感性的方法。该方法包括

[0012] 在促进微生物生长的条件下，在抗微生物剂和信号传导剂存在的情况下孵育微生物，所述信号传导剂包括信号放大器和一个或多个能够非特异性结合至微生物的表面的化学部分；将由所述信号传导剂结合的微生物与未结合的信号传导剂分开；和与一种或多种对照相比，确定与微生物相关的信号水平。

[0013] 本发明的另一个方面是用于确定微生物的抗微生物剂敏感性的方法。该方法包括在促进微生物生长的条件下，在抗微生物剂存在的情况下孵育微生物；添加包括信号放大器和一个或多个能够非特异性结合至微生物的表面的化学部分的信号传导剂；将由所述信号传导剂结合的微生物与未结合的信号传导剂分开；和与一种或多种对照相比，确定与微生物相关的信号水平。

[0014] 本发明的又另一个方面是用于确定微生物的抗微生物剂敏感性的试剂盒。所述试剂盒包括能够结合至完整目标微生物的表面的信号传导剂；用于孵育含有微生物的样品的溶液；和一种或多种用于从信号传导剂生成信号的试剂。

[0015] 本文描述的任何方面或实施方案可以与如本文公开的任何其它方面或实施方案组合。尽管本公开已经结合其详述进行了描述，但前述描述旨在说明而不是限制本公开的范围，所述本公开的范围由所附权利要求书的范围所定义。其它方面、优点和修改在以下权利要求书的范围之内。

[0016] 本文提及的专利和科学文献建立了本领域技术人员可获得的知识。本文引用的所有美国专利和公开或未公开的美国专利申请通过引用并入。本文引用的所有公开的外国专利和专利申请都在此通过引用并入。本文引用的所有其它公开的参考文献、文件、手稿和科学文献在此通过引用并入。

[0017] 本发明的其它特征和优点从附图和以下详述和权利要求书中将是显而易见的。

[0018] 附图简述

[0019] 当结合附图进行时，上述和进一步的特征将从以下详述更清楚地理解。然而，附图仅用于说明目的；不是用于限制。

[0020] 图1是显示本发明的概况步骤的示意图。

- [0021] 图2A至图2D是显示本发明 (“快速-AST”) 的方面的关键特征的图和说明。
- [0022] 图3是比较目前使用的抗微生物剂敏感性测试 (AST) 系统和本发明的方面中所需的步骤的示意图。
- [0023] 图4是显示使用目前使用的AST系统 (即BioMerieux的Vitek2) 获得结果所需的时间延迟的图。
- [0024] 图5是显示使用本发明 (“快速-AST” 技术) 和标准的过夜生长、随后在600 nm下读取光密度 (OD) 的克林霉素对金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) (ATCC菌株29213) 的最小抑制浓度 (MIC) 测定的比较的图。对于 “快速-AST” 显示的数据来自与检测溶液孵育开始后的5分钟点，并代表4个孔的平均值和标准偏差，其中值为每种测定类型相对于无抗微生物剂的对照。
- [0025] 图6是显示使用本发明 (“快速-AST” 技术) 和标准的过夜生长、随后在600 nm下读取光密度 (OD) 的头孢他啶对铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) (ATCC菌株27853) 的MIC测定的比较的图。所示数据代表四个孔的平均值和标准偏差，其中值为每种测定类型相对于无抗微生物剂的对照。
- [0026] 图7是显示对于两种铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 菌株：敏感菌株 (ATCC菌株27853) 和抗性菌株 (ATCC菌株BAA-2108) 使用本发明 (“快速-AST”) 的MIC测定比较的图。所示数据代表四个孔的平均值，其中值为每种测定相对于无抗微生物剂的对照。
- [0027] 图8是概述来自实施例2的数据的表。其比较通过 “快速-AST” 技术的MIC调用 (call) 与标准过夜OD₆₀₀程序的那些。所示数据代表四个孔的平均值，其中值为每种测定类型相对于无抗微生物剂的对照。
- [0028] 图9是显示两种技术：本发明 (“快速-AST” 放大技术) 和标准的在600 nm处的光密度技术 (OD₆₀₀) 的原始光信号vs. 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 浓度 (以CFU/ml计) 的比较的图。
- [0029] 图10是显示对于七种致病性细菌物种的与临床实验室标准研究所 (CLSI) 参考方法相比的本发明 (“快速-AST” 方法) 的MIC结果的图。
- [0030] 图11是鉴定实施例4中使用的细菌、抗微生物剂和信号传导剂/化学部分的表。
- [0031] 图12A至图12C是显示金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*) (图12A) 和肺炎克雷伯氏菌 (*K. pneumonia*) (图12B) 的代表性SensiTitre ® 结果的表。没有呈现对于呋喃妥因 (nitrofurantoin) 金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*) 实验的使用本发明的数据，因为只有两个孔专用于该抗微生物剂。
- [0032] 图13A至图13C是显示对于抗微生物剂苯唑西林 (图13A)、万古霉素 (图13B) 和左氧氟沙星 (图13C) 对金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*) 临床菌株的通过本发明和CLSI参考方法获得的MIC结果之间的比较的图。
- [0033] 图14A至图14D是显示对于抗微生物剂氨苄青霉素 (图14A)、环丙沙星 (图14B)、亚胺培南 (图14C) 和庆大霉素 (图14D) 对大肠杆菌 (*E. coli*) 临床菌株的通过本发明和CLSI参考方法获得的MIC结果之间的比较的图。
- [0034] 图15是显示本发明 (“快速-AST”) 在金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*) 的相同临床物种上经一个月的过程一致地产生类似于通过CLSI标准参考方法获得的那些MIC结果的MIC结果的图。

[0035] 图16至图23是比较多种抗微生物剂对化学敏感的大肠杆菌 (*E. coli*) 菌株 (“QC 25922”) 和临床相关的抗微生物剂抗性菌株 (“临床”) 的敏感性的图。使用的抗微生物剂是亚胺培南 (图16) ; 氨苄青霉素 (图17) ; 头孢他啶 (图18) ; 庆大霉素 (图19) ; 左氧氟沙星 (图20) ; 三甲氧苄/磺胺甲噁唑 (SXT) (图21) ; 环丙沙星 (图22) ; 和头孢曲松 (图23)。

[0036] 图24至图26是比较多种抗微生物剂对化学敏感的金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*) (“QC 菌株29213”) 菌株的敏感性的图。使用的抗微生物剂是万古霉素 (图24) ; 青霉素 (图25) ; 和替考拉宁 (图26)。

[0037] 图27和图28是显示在临床样品上直接使用本发明的方法且与用Beckman-Coulter MicroScan Walkaway (其中在过夜生长之前进行亚培养步骤) 获得的临床结果相比的MIC结果的图。

[0038] 图29是显示相对于溶液中细菌浓度的革兰氏阳性细菌溶液的检测的荧光 (经由包含铕的信号传导剂和使用特异性结合革兰氏阳性细菌的小麦胚芽凝集素) 的图。

[0039] 图30是显示相对于溶液中细菌浓度的革兰氏阴性细菌溶液的检测的荧光 (经由包含铕的信号传导剂和使用特异性结合革兰氏阴性细菌的多粘菌素B) 的图。

[0040] 图31是比较当使用抗体结合的铕制剂作为信号传导剂时获得的MIC值与当使用抗体-辣根过氧化物酶 (HRP) 作为信号传导剂时获得的MIC值的图。通过CLSI过夜方法, SXT对于该临床金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*) 菌株的MIC为 $\leq 0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 。

[0041] 图32是显示对于与细菌表面非特异性结合的两种铕制剂的特定细菌浓度获得的相对荧光单位 (RFU) 的图。

[0042] 图33是显示对于与细菌表面非特异性结合的两种铕制剂的两种细菌物种的特定细菌浓度获得的RFU的图。

[0043] 图34和图35是显示对于与细菌表面非特异性结合的铕制剂的各种细菌物种的特定细菌浓度所获得的RFU的图。

[0044] 图36A至图36C是显示当使用包含戊二醛的各种洗涤时对于与细菌表面非特异性结合的铕制剂的各种细菌物种的特定细菌浓度所获得的RFU的图。

[0045] 图37是显示使用包含NH2-PEG-生物素、随后链霉抗生物素蛋白-铕 (Eu-SAv) 的两步方法的对于与细菌表面非特异性结合的铕制剂的大肠杆菌 (*E. coli*) 的特定细菌浓度所获得的RFU的图。

[0046] 图38是显示使用包含NHS-LC-LC-生物素、随后Eu-SAv的两步方法的对于与细菌表面非特异性结合的铕制剂的大肠杆菌 (*E. coli*) 的特定细菌浓度所获得的RFU的图。

[0047] 图39是说明丝状生长对微生物的抗微生物剂敏感性的基于体积的测定具有的混杂效应的示意图。进入丝状生长的敏感细菌由于其体积增加而可能呈现错误的抗性。

[0048] 图40是说明使AST测定中的丝状微生物的干扰最小化的方法的示意图。

[0049] 图41是显示对于用和不用100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 氨苄青霉素 (远高于MIC的浓度) 处理的大肠杆菌 (*E. coli*) 和氨苄青霉素抗性的大肠杆菌 (*E. coli*) 的使用包含荧光纳米颗粒的信号传导剂的测定结果的图。

[0050] 图42是显示使用用于大肠杆菌的包含荧光纳米颗粒的信号传导剂且具有不同氨苄青霉素浓度的测定结果的图。误差条显示三次重复的标准偏差。

[0051] 图43是显示大肠杆菌 (*E. coli*) 官能化磁珠能够从溶液中结合和分离完整细菌的

能力的图。

[0052] 图44是显示通过官能化磁珠从包含不同量的抗微生物剂的溶液分离的完整细菌数的图。

[0053] 图45包括比较通过离心vs官能化磁珠从包含不同量的抗微生物剂(此处为万古霉素“VAN”)的溶液分离的完整细菌数的图。通过CLSI过夜方法,VAN对于该临床金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)菌株的MIC为8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

[0054] 图46A至图46C显示四氨基金属有机配体(TAML®)纳米标记物的设计和性能。图46A是显示纳米标记物成分的示意图。图46B是显示HRP和TAML的催化比较的图(插图);虚线是每个数据集的线性最佳拟合,其中HRP的R2为0.997,且TAML的R2为0.987。图46C是显示对于艰难梭状芽孢杆菌(*C. difficile*)毒素A免疫测定的TAML纳米标记物 vs. HRP比较的图。在图46B和图46C中,信号在零浓度下均一化为“1”,传播误差,且误差条代表 ± 1 标准偏差。实验一式三份重复三次,具有结果类似。

[0055] 定义

[0056] 为了更容易地理解本发明,下面首先定义某些术语。在整个说明书中阐述了对于以下术语和其它术语的额外定义。

[0057] 如在本说明书和随附权利要求书中所用,单数形式“一(a)”、“一(an)”和“该(the)”包括复数指示对象,除非上下文另有清楚指明。

[0058] 除非特别说明或从上下文显而易见,否则如本文所使用,术语“或”被理解为是包括性的并覆盖“或”和“和”两者。

[0059] 如本文所用,术语“例如”和“即”仅仅通过实例而非意在限制的方式使用,且不应被解释为仅指本说明书中明确列举的那些项。

[0060] 术语“一个或多个”、“至少一个”、“多于一个”等被理解为包括但不限于

[0061] 至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149或150、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、2000、3000、4000、5000或更多和两者之间的任何数字。

[0062] 相反,术语“不超过”包括小于所述值的每个值。例如,“不超过100个核苷酸”包括100、99、98、97、96、95、94、93、92、91、90、89、88、87、86、85、84、83、82、81、80、79、78、77、76、75、74、73、72、71、70、69、68、67、66、65、64、63、62、61、60、59、58、57、56、55、54、53、52、51、50、49、48、47、46、45、44、43、42、41、40、39、38、37、36、35、34、33、32、31、30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1和0个核苷酸。

[0063] 术语“多个”、“至少两个”、“两个或更多个”、“至少第二个”等被理解为包括但不限于至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、

78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149或150、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、2000、3000、4000、5000或更多和两者之间的任何数字。

[0064] 在整个说明书中,词语“包含 (comprising)”或变型诸如“包含 (comprises)”或“包含 (comprising)”将被理解为暗示包括所述要素、整数或步骤,或要素、整数或步骤的组,但不排除任何其它要素、整数或步骤,或要素、整数或步骤的组。

[0065] 除非特别说明或从上下文显而易见,如本文所使用,术语“约”被理解为在本领域中的正常公差的范围内,例如在平均值的2个标准偏差内。“约”可以被理解为在所示值的10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、0.05%、0.01%或0.001%内。除非从上下文另外清楚,否则本文提供的所有数值都通过术语“约”进行修饰。

[0066] 表面可以是细胞壁、细胞包膜、质膜或细胞囊的外表面;细胞壁、细胞包膜、质膜或细胞囊的内表面;或在细胞壁、细胞包膜、质膜或细胞囊内。所述表面可以包括细胞外伸出的细胞结构,包括但不限于纤毛、菌毛和鞭毛。所述表面可以包括细胞器。所述表面可以包括跨膜蛋白、细胞壁蛋白、细胞外蛋白、细胞内蛋白、细胞外相关多糖、细胞内相关多糖、细胞外脂质、细胞内脂质、膜脂质、细胞壁脂质、蛋白质、多糖和/或与细胞包膜整合或相关的脂质。所述表面可以包括核酸。

[0067] 所述表面可以包括信号传导剂结合或缔合的生物分子。示例性生物分子包括肽聚糖、胞壁质、甘露糖蛋白、孔蛋白、 β -葡聚糖、几丁质、糖蛋白、多糖、脂多糖、脂寡糖、脂蛋白、内毒素、脂磷壁酸类、磷壁酸类、脂质A、碳水化合物结合结构域、外排泵、其它细胞壁和/或细胞膜相关蛋白、其它阴离子磷脂及其组合。

[0068] 生长,如在微生物的生长中,包括微生物的数量的增殖,长度的增加,体积的增加,和/或核酸和/或蛋白含量的增加。

[0069] 对照可以包括微生物对其不敏感的抗微生物剂。例如,如果使用该测定法来确定革兰氏阳性细菌的敏感性,则对照(和测试孵育物)可以包括一种或多种靶向革兰氏阴性细菌的抗微生物剂,并且如果该测定法用于确定真核微生物的敏感性,则对照(和测试孵育物)可以包括一种或多种抗细菌抗微生物剂。

[0070] 对照可以是在另外相同、但没有抗微生物剂或具有一种或多种微生物对其不敏感的抗微生物剂的条件下从微生物测量的阳性对照。

[0071] 可以在另外相同、但没有营养物的条件下从微生物测量对照。

[0072] 可以在另外相同、具有一种或多种已知抑制微生物的生长的毒素的条件下从微生物测量对照。

[0073] 对照可以是历史对照。这里,可以在已进行对照孵育之后进行测试孵育。

[0074] 或者,可以在与包含测试孵育物的盒不同的盒中进行对照。

[0075] “处理的”意指从生物样品分离微生物的步骤,增加获得自生物样品的微生物的浓度的步骤,和/或增加获得自生物样品的微生物的数量的步骤,例如通过在促进微生物的增殖的条件下培养微生物。

[0076] 本发明的化合物包括本文一般描述的那些,并且通过本文公开的类别、亚类和种

类进一步说明。如本文所用,应适用以下定义,除非另有指明。出于本发明的目的,化学元素根据元素周期表,CAS版,Handbook of Chemistry and Physics,第75版进行鉴定。此外,有机化学的一般原理描述于“Organic Chemistry”, Thomas Sorrell, University Science Books, Sausalito: 1999和“March’s Advanced Organic Chemistry”, 第5版, 编辑: Smith, M.B. 和 March, J., John Wiley & Sons, New York: 2001, 其整个内容在此通过引用并入。

[0077] 如本文所用的术语“杂环(heterocycle)”、“杂环基(heterocycl1)”或“杂环的(heterocyclic)”意指非芳族、单环、双环或三环环体系,其中一个或多个环成员是独立选择的杂原子。在一些实施方案中,“杂环(heterocycle)”、“杂环基(heterocycl1)”或“杂环的(heterocyclic)”基团具有三至十四个环成员,其中一个或多个环成员是独立地选自氧、硫、氮或磷的杂原子,并且该体系中的每个环含有3至7个环成员。

[0078] 术语“杂原子”是指氧、硫、氮、磷和硅(包括氮、硫、磷或硅的任何氧化形式;任何碱性氮的季铵化形式或;杂环的可取代的氮,例如N(如在3,4-二氢-2H-吡咯基中)、NH(如在吡咯烷基中)或NR⁺(如在N-取代的吡咯烷基中))中的一种或多种。

[0079] 如本文所用的术语“烷氧基”或“硫代烷基”(thioalkyl)是指烷基基团,如先前定义,其通过氧(“烷氧基”)或硫(“硫代烷基”)原子连接。

[0080] 术语“卤代烷基”、“卤代烯基”、“卤代脂族基”和“卤代烷氧基”意指烷基、烯基或烷氧基,可视情况而定,其被一个或多个卤素原子取代。该术语包括全氟化的烷基基团,诸如-CF₃和-CF₂CF₃。

[0081] 术语“卤素”、“卤代”和“卤”意指F、Cl、Br或I。

[0082] 单独使用或作为较大部分(例如“芳烷基”、“芳烷氧基”或“芳氧基烷基”)的一部分使用的术语“芳基”和“芳-”是指包含一至三个芳族环的任选取代的C₆-14芳族烃部分。例如,芳基基团是C₆-10芳基基团(即苯基和萘基)。芳基基团包括但不限于任选取代的苯基、萘基或蒽基。如本文所用的术语“芳基”和“芳-”还包括其中芳基环与一个或多个环脂族环稠合以形成任选取代的环状结构诸如四氢萘基、茚基或茚满基环的基团。术语“芳基”可以与术语“芳基基团”、“芳基环”和“芳族环”互换使用。

[0083] 本发明的化合物可以以游离形式存在用于治疗,或在适当的情况下,作为药学上可接受的盐存在。

[0084] 如本文所用,术语“芳族”包括如下文和本文中一般描述的芳基和杂芳基基团。

[0085] 如本文所用的术语“脂族”或“脂族基团”意指任选取代的直链或支链C₁-12烃,其完全饱和或其含有一个或多个不饱和单元。例如,合适的脂族基团包括任选取代的直链或支链烷基、烯基和炔基基团。除非另有指明,否则在各个实施方案中,脂族基团具有1-12、1-10、1-8、1-6、1-4、1-3或1-2个碳原子。对于本领域技术人员显而易见的是,在一些实施方案中,本文所述的“脂族”基团可以是二价的。

[0086] 单独使用或作为较大部分的一部分使用的术语“烷基”是指具有1-12、1-10、1-8、1-6、1-4、1-3或1-2个碳原子的饱和的、任选取代的直链或支链烃基团。

[0087] 单独使用或作为较大部分的一部分使用的术语“烯基”是指具有至少一个双键且具有2-12、2-10、2-8、2-6、2-4或2-3个碳原子的任选取代的直链或支链烃基团。

[0088] 单独使用或作为较大部分的一部分使用的术语“炔基”是指具有至少一个三键且

具有2-12、2-10、2-8、2-6、2-4或2-3个碳原子的任选取代的直链或支链烃基团。

[0089] 除非另有指明,否则本文描绘的结构也意在包括该结构的所有异构(例如,对映异构、非对映异构和几何(或构象)形式;例如,每个不对称中心的R和S构型,(Z)和(E)双键异构体,和(Z)和(E)构象异构体。因此,单一立体化学异构体以及本发明化合物的对映异构、非对映异构和几何(或构象)混合物都在本发明的范围内。除非另有说明,否则本发明的化合物的所有互变异构形式都在本发明的范围内。此外,除非另有说明,否则本文描绘的结构也意在包括差异仅在于一个或多个同位素富集的原子的存在的化合物。例如,具有本结构的化合物(其中存在通过氘或氚替代氢,或用¹³C-或¹⁴C-富集的碳替代碳)都在本发明的范围内。作为非限制性实例,此类化合物可用作生物测定中的分析工具或探针。

[0090] 应理解,当所公开的化合物具有至少一个手性中心时,本发明涵盖一种不含相应的光学异构体的抑制剂的对映异构体,该抑制剂的外消旋混合物和相对于其相应的光学异构体富含一种对映异构体的混合物。当混合物相对于其光学异构体富含一种对映异构体时,该混合物含有例如至少50%、75%、90%、95%、99%或99.5%的对映异构过量。

[0091] 除非另外定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本申请所属领域的普通技术人员通常理解且与本申请所属领域中通常使用的相同的含义,这种领域(art)通过引用以其整体并入。在冲突的情况下,将以本说明书,包括定义,为准。

[0092] 发明详述

[0093] 本发明允许快速确定微生物感染的抗生素敏感性。本发明部分地基于非特异性表面结合测定的令人惊讶的发现,所述非特异性表面结合测定在少于十二小时 - 且具体地,在4小时内提供准确且快速的抗微生物剂敏感性测试(AST)测定。本发明(“fast-AST”)提供了与使用临床实验室标准研究所(CLSI)参考方法所获得的结果一致的且当用多种抗微生物剂和在多种微生物上进行测试时的准确结果;然而,与CLSI方法相比,本发明获得结果花费显著更少的时间。此外,本发明准确地区分对一种或多种抗微生物剂具有抗性的临床相关微生物菌株的抗微生物MIC和对抗微生物剂敏感的相同微生物的菌株的抗微生物MIC。此外,本发明可以包括与微生物非特异性而不是特异性结合(例如,经由化学保守基团或微生物上的生物化学保守结合位点)的信号传导剂(例如,铕化合物),由此将本发明的概括扩展至任何微生物并允许开始适当的治疗而无需首先鉴定特定的感染性微生物。而且,本发明允许信号放大,使得可以在较低浓度下例如从微生物的稀释培养物或经由患者的生物样品快速检测微生物。此外,本发明可以使用铕制剂作为化学部分,由此扩展所述方法的动态范围并允许从一系列微生物样品进行更准确的测定。最后,本发明与现有设备兼容,由此使得能够在目前的临床实验室中快速采用。因此,相对于标准方法,本发明可以在大大减少量的时间和费用上为患者提供适当的治疗方案,即特定的抗微生物剂和以特定的剂量。因此,本发明将改善患者的结果,降低医院成本,并帮助减少抗微生物剂抗性的微生物的进一步进化;因此,本发明代表了在AST领域中的重大突破。

[0094] 本发明的方面通过化学扩增微生物表面而提供准确、低成本的表型AST结果。这种新型方法相对于目前使用的方法提供了两个主要进步:1)通过确定相对表面面积来定量微生物生长,这克服了目前平台关于丝状生长方式的限制,这是本领域技术人员众所周知的;和2)使用标准光学检测设备以 1×10^3 至 1×10^8 CFU/m¹范围内的最佳灵敏度的微生物扩增。

[0095] 如本文(例如,在实施例中)所公开,本发明已经显示对于广泛范围的微生物物种,

包括所有六种(屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)、鲍氏不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)和肠杆菌种(*Enterobacter species*)("ESKAPE")病原体提供等同的结果至金标准。由于本发明的普遍性,它是灵活的,因为它可以容易且廉价地适用于新的微生物物种菌株和诊断测试。

[0096] 本发明提供了在少于8小时、优选少于5小时内来自标准微生物菌落分离物或来自直接来自阳性血液样品的低成本表型AST。这允许标准临床微生物学实验室同移、表型AST结果。以下工作实施例表明微生物表面的化学扩增在少于四小时内产生准确的最小抑制浓度(MIC)和断点调用(breakpoint calls)。这将使目前的等待时间缩短超过20个小时,并将与目前接近FDA试验的直接来自阳性血液培养MALDI-TOF鉴定以及已经获得FDA批准的直接来自阳性血液培养多重PCR鉴定平台相匹配。该设计使得本发明("快速-AST"平台)能够打破传统速度vs.成本的权衡。本发明与标准微孔板形式(例如,具有6、12、24、48、96、384或1536个孔)和常规光学检测器两者兼容。

[0097] 具有速度和准确性的入侵病原体的鉴定和抗微生物剂敏感性测试(AST)允许及时给药最有效的治疗剂。这种治疗改善了感染,减少了住院患者的住院时间,并缩短了患者经受广谱抗微生物剂的时间,后者有助于抗微生物剂抗性的全球流行。相比之下,目前接受的对于微生物鉴定和敏感性结果的超过30小时的等待需要过度使用广谱抗微生物剂并且比必要的患者停留更长。出于该原因,抗击抗生素抗性细菌的总统咨询委员会最近使得开发和使用快速诊断用于检测抗生素抗性细菌是其主要目标之一。

[0098] 本发明(其产生更快速和准确的AST确定)可以为每个患者提供超过2,000美元的实际成本效益。这些价值点包括更容易地可定量(减少停留时间长度和昂贵的治疗)以及更无形,难以估价(患者死亡率和来自改善的抗微生物剂管理工作的社会影响)。这些无形价值中的一些,诸如抗微生物剂管理工作的价值,可以变得更加定量,因为监管机构开始对医院施加成本,因为他们没有采用更严格的抗微生物剂管理工作计划。在2014年9月,加州参议院法案1311被签署成为法律,进一步要求医院根据联邦政府和专业组织制定的指南采取和实施抗微生物剂管理政策,并建立具有至少一个已经历与管理有关的特定训练的医生或药剂师的医生监督的多学科抗微生物剂管理委员会。在2016年6月,医疗护理和医疗补助系统中心(CMS)使用了促进医院中的抗微生物剂管理的建议角色,其中许多行业专家预计未来两年内将实施财政激励措施。本发明将进一步推动政府和健康护理行业的更好的抗微生物剂管理的目标。

[0099] 图1中显示本发明的各方面的一般步骤。图1中的图像显示具有不同处理步骤的方面;然而,本发明的各方面可以是自动化的。

[0100] 图2A至图2D显示本发明的各方面的特征。图2A显示三种代表性病原体的检测灵敏度范围。虚线显示零浓度信号水平。图2B显示可用于本发明中的"Crocodile"(Titertek-Berthold)自动化快速-AST原型平台。图2C是显示与阳离子纳米标记物和聚合物相互作用的阴离子细菌的示意图。所得中性复合物的溶解度降低使得磁珠结合。图2D显示具有SensiTitre®革兰氏阳性组(GPALL3F)的金黄色葡萄球菌的数据,其显示相对于高生长和"冷冻时间(FIT)"对照的抑菌(克林霉素)和杀细菌(青霉素)抗微生物剂结果。

[0101] 如本领域技术人员已知,AST平台可以为测试的每种抗微生物剂产生最小抑制浓

度(MIC)结果和/或定性敏感性结果(QSR)。通常已知MIC是抑制微生物生长且为医师提供剂量信息的抗微生物剂的最低浓度。QSR还可以为医师提供类似的剂量信息,但可能不提供数字MIC。AST测定主要配置为对于每种获得的生物样品平行测试多种抗微生物剂。为了产生MIC或QSR结果,对于每种抗微生物剂都需要稀释系列。因此,对于CLSI称为“液体培养基微量稀释”的基于液体的AST,通常在药筒和/或微孔板中进行测定,这使得能够以不同浓度平行测试不同的抗微生物剂。

[0102] 获得AST测定结果的长时间导致不完整信息被传递给医师。这些长时间经常阻止鉴定抗微生物剂效力的速率或杀伤动力学。这种额外信息对于告知治疗可能是重要的。目前的AST(其直到治疗开始后超过6小时(且通常超过12小时)才确定)经常失去辨别在抗微生物剂效力的速率之间的差异的能力:杀死微生物的抗微生物剂在12小时后立即看起来与在四小时内杀死它的抗微生物剂相同。

[0103] 表1估计2小时孵育后的不同处理对细菌数量的影响。假设倍增时间为30分钟,未处理的对照应当增加16倍。具有高于MIC的“有效”抗微生物剂(定义为针对例如细菌具有效力的抗微生物剂)的治疗组,应当导致微生物生长最小,并且在杀细菌抗微生物剂的情况下,导致微生物死亡。因此,预期比起始浓度更少的细菌。具有低于其MIC的“有效”抗微生物剂的治疗组应当导致微生物生长等于或小于无抗微生物剂的对照。缓慢作用的抗微生物剂,在这种情况下定义为需要超过两小时来杀死细菌的那些(例如,对于抑菌抗微生物剂的情况)将产生在起始浓度与16倍增加之间的信号。

[0104] 表 1

步骤	无抗微生物剂	在以下浓度下的有效抗微生物剂	步骤	无抗微生物剂
起始细菌浓度	5×10^5	5×10^5	5×10^5	5×10^5
在2小时后的估计的细菌浓度,其中倍增时间为30分钟	8×10^6	$\leq 8 \times 10^6$	$< 5 \times 10^5$	5×10^5 至 $< 8 \times 10^6$

[0106] 对于液体培养基微量稀释技术, 5×10^5 CFU/ml的细菌的起始浓度在美国微生物学会在2005年的“Manual of Antimicrobial Susceptibility Testing”(其中Marie B. Coyle作为协调编辑)中给出。由于每个孔含有近似100 μ L,每个孔存在近似 5×10^4 个细菌。标准荧光染料开始在近似0.1 nM浓度(其对应于近似 1.2×10^{10} 个分子)可定量。因此,对于在两小时后可见的30分钟倍增时间细菌,每个个别细菌必须用 1.5×10^4 个荧光分子标记。实际考量,诸如荧光背景和非特异性结合,可以将该数量增加数个数量级。为了使得能够与标准光学检测器兼容,因此使用能够以较低浓度产生可检测信号的化学和/或生物化学放大器可能是有利的。

[0107] 不希望受理论所束缚,本发明部分地基于液体培养基微量稀释的原理。将待评价的培养物稀释,最优选稀释至 $1-10 \times 10^5$ CFU/ml,并引入含有不同浓度的不同抗微生物剂的孔中,使得可以测定适当的抗微生物剂组的MIC。然后将板在适当的温度(最优选31-37 °C)且在适当的条件(最优选需氧)下引入培养箱中,用于使细菌生长。在该时间期间,微生物可以生长。

[0108] 液体培养基可以是阳离子调节的Mueller Hinton液体培养基,并且可以含有本领域技术人员已知的有利于微生物生长(例如裂解的马血液)和/或用于测定抗微生物剂效力(例如高氯化钠浓度)的额外补充剂。可以将微孔板在该生长期间摇动,这可有利于在每个孔中分散营养物和/或气体交换和/或抗微生物剂和/或减少生物膜形成。

[0109] 在AST起始的0至8小时(最优选0至4小时)内,向每个孔中加入已知量的信号传导

剂。添加试剂(包括信号生成剂)可以由自动化仪器或半自动化仪器进行,或者可以手动进行。

[0110] 信号传导剂(其可以称为“粘性-amps”)包含能够结合微生物的部分(例如,结合至微生物表面的抗体和/或凝集素,非特异性结合至微生物表面的带电荷部分和/或功能部分)和能够提供信号或有助于产生信号的化学部分(例如,酶化学发光团和镧系元素螯合物)。示例性酶包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、乙酰胆碱酯酶、葡萄糖氧化酶、 β -D-半乳糖苷酶、 β -内酰胺酶及其组合。

[0111] 如本文所用,信号生成剂可以包括与一种或多种“微生物受体”缀合的一种或多种化学部分(即“信号生成剂”)。信号生成剂包括但不限于一种或多种催化剂(包括酶、金属氧化物纳米颗粒、有机金属催化剂、设计用于信号放大的纳米颗粒(诸如本申请要求优先权且通过引用以其整体并入的美国临时申请中描述的那些),包含信号生成元件的噬菌体,荧光团(包括有机荧光团、铕或钐(II)、铼(I)、钯(II)、含铂(II)的有机金属化合物)和/或比色染料(包括有机“染料”)。可以使用上述的组合,诸如纳米颗粒、树枝状大分子和/或具有酶、荧光团和/或有机金属分子的其它纳米级结构。

[0112] 在使信号传导剂与微生物接触之前,信号传导剂最初与微生物接触的同时,或在信号传导剂已接触微生物之后,化学部分可以与信号传导剂缀合。

[0113] 当将信号传导剂加入到含有微生物的AST稀释液中时,信号传导剂受体(例如,可以特异性或非特异性结合微生物的部分)与微生物表面缔合。因此,微生物越完整,例如,在溶液中,将与这些细菌缔合的信号传导剂的数量越多。因此,在完整细菌的数量和溶液中“游离”的信号传导剂的数量(如未与完整细菌结合的细胞所定义)之间存在反比关系。注意,如果例如微生物响应于抗微生物剂处理而裂解,则游离的信号传导剂可以与可溶性微生物组分结合。

[0114] 与微生物表面缔合和/或插入微生物表面的信号传导剂的数量与微生物表面面积成正比。微生物表面面积与真实的抗性微生物密切相关。具体而言,在响应于MIC和亚MIC浓度的抗微生物剂而膨胀或伸长的微生物(例如,形成长丝的细菌)的情况下,已知代谢和/或体积鉴定给出对于“快速”AST时间点(定义为小于6小时的那些)的假敏感性概况。为了克服这种限制,本发明将微生物表面面积(而不是体积)转化为可测量的信号,最优先光学信号。本方法能够在小于6小时内准确地确定微生物抗性概况。

[0115] 为了将与微生物缔合和/或插入微生物的信号传导剂与游离的信号传导剂分开,进行一个或多个分离和/或竞争性结合步骤是必要的。此类步骤包括但不限于离心(例如,以 g -力 $>500 \times g$),过滤(例如,经由具有小于或等于0.45微米、且优选小于或等于0.2微米的孔的过滤器),电泳和/或磁性捕获;此类步骤是本领域技术人员所众所周知的。

[0116] 为了促进信号传导剂结合和/或减少背景,在添加信号传导剂之前将微生物与其在孵育期间悬浮于其中的液体分离可能是进一步有利的。此类分离可以包括但不限于离心、过滤、电泳和/或磁性捕获。

[0117] 当在治疗组间比较这些数据时,可以使用与目前使用的AST测定类似的步骤确定微生物抗性概况。此外,这些数据可以使得能够测定抗微生物剂效力的速率或杀伤动力学。

[0118] 信号传导剂可以与微生物和/或抗微生物剂一起添加,使得它们在整个AST孵育期间存在。该总时段可以最长达二十四小时,但优选在八小时内,且更优选在五小时内。或者,

可以在规定的孵育期之后将信号传导剂添加至微生物和抗微生物剂中。该时段可以最长达二十四小时,但优选在八小时内,且更优选在四小时内。

[0119] 信号传导剂被设计成与微生物表面(包括壁和/或膜)结合和/或嵌入微生物表面(包括壁和/或膜)。设计用于结合的信号传导剂包含结合部分,包括但不限于一种或多种抗体、凝集素、其它蛋白、具有一个或多个带电化学基团的小分子、具有一个或多个功能性化学基团的小分子、噬菌体、糖蛋白、肽、适体、带电小分子、具有固定电荷的小分子、带电聚合物、具有固定电荷的带电聚合物、疏水性小分子、带电肽、具有固定电荷的带电肽、具有交替亲水和疏水区域的肽和/或小分子配体,其可能是或也可能不是有机金属络合物。设计用于微生物结合的分子是本领域技术人员众所周知的。信号传导剂可以保持与微生物结合和/或可以内化,因此包括所有结合。设计用于插入的信号传导剂可以包括但不限于小疏水分子、疏水肽和/或具有交替的疏水和亲水区域的肽。设计用于微生物插入的分子是本领域技术人员众所周知的。信号传导剂可以进一步是对于一种或多种类型的微生物特异性的。信号传导剂可以具有多种受体。这些可以增强结合和/或使得能够同时结合两种或更多种微生物,其可以进一步用于“凝集”细菌。在添加信号传导剂之前或同时,调节溶液pH可以是有利的。这可能有利于增强微生物和信号传导剂之间的电荷-电荷相互作用。通过将溶液pH滴定至高于中性(更碱性),可以增加微生物的阴离子电荷。因此,使用具有一种或多种固定阳离子电荷的部分可以是有利的。

[0120] 值得注意的是,信号传导剂可以特异性结合微生物(例如,特异性结合微生物物种或微生物菌株的抗体)或可以非特异性结合微生物(例如,通过通用的共价或非共价键形成和本领域已知的另一种非特异性化学结合)。

[0121] 优选信号传导剂结合天然微生物表面。

[0122] 或者,可以将能够与信号传导剂结合的化学品和/或生物化学品添加至微生物在生长期间悬浮于其中的液体中,使得化学品和/或生物化学品在孵育期间并入微生物中。这可以用于增强信号传导剂与微生物的结合。在替代实施方案中,信号传导剂本身可以存在于微生物在孵育期间悬浮于其中的液体中,并且可以在生长期间并入微生物中。

[0123] 优选地,信号传导剂包含放大器信号生成剂,使得来自每个完整微生物的信号可以被放大超过与每种微生物结合的信号传导剂的数量。例如,已知酶辣根过氧化物酶(HRP)能够放大信号 $>1 \times 10^4$ 倍。因此,如果100个HRP分子与每个微生物表面结合,则可以实现 10^6 的放大。这可以增加通过使得能够区分无法以其它方式区分的微生物浓度来进行AST测定的速度。铕制剂的使用类似地提供信号放大。

[0124] 或者,信号传导剂可以包含本领域技术人员已知为“膜染料”的光学染料前体,其被设计成在插入疏水区域(诸如细胞膜)时大大增加荧光发射。用这些信号传导剂设计的测定可能需要将微生物浓缩成较小的体积,接近平面,以产生足够的信号以容易地进行光学测量。干扰物质可能需要使用近-IR荧光团。

[0125] 潜在的分离技术包括但不限于过滤(例如,经由具有小于或等于0.45微米、优选小于或等于0.2微米的孔的过滤器),离心(例如,以 g -力 $>500 \times g$),电泳,双向电泳和磁性捕获。这些技术用于从溶液中游离的那些中分离与微生物结合的信号传导剂,所述微生物粘附于过滤器中,沉淀于离心机中,和/或电泳和/或磁性分离。游离的信号传导剂通过过滤器(“滤液”),在离心或磁力分离后保留在溶液中(“上清液”),和/或分别电泳运行。离心可以

是标准的,密度梯度或差速离心。磁性分离可能需要添加一种或多种特异性靶向与微生物缔合或结合的磁性颗粒。这些可以在添加信号传导剂之前或同时添加。

[0126] 此类分离技术还可以分离响应于抗微生物剂处理而改变形态的微生物,并且可以混淆测定。这种微生物的一个示例是丝状细菌,其最初响应于抗微生物处理而伸长。该生长方式是本领域技术人员已知的。使用本文所述的分离技术从测定中分离和排除丝状细菌将增加获得的结果的准确性。

[0127] 可以通过颗粒与微生物物种的缔合增强微生物分离。例如,在磁性分离的情况下,磁珠可以与微生物(特异性或非特异性)缔合。存在于磁珠表面上的部分可以与信号传导剂结合微生物的相同的表面(或其生物分子)或不同的表面(或其生物分子)。磁珠可以具有与信号传导剂相同和/或不同的部分。例如,如果信号传导剂包含结合大肠杆菌(*E. coli*)的抗体,则磁珠可以用相同的抗体官能化。在其它实例中,信号传导剂可以包括结合微生物的基序,并且磁珠被官能化以非特异性结合微生物。

[0128] 一个或多个与磁珠缔合的结合部分可以与和信号传导剂缔合的化学部分或信号传导剂的化学部分相同或不同。

[0129] 一个或多个与磁珠缔合的结合部分可以在信号传导剂与微生物结合之前、同时或之后结合微生物。

[0130] 一个或多个与磁珠缔合的结合部分可以与一种或多种沉淀微生物的聚合物缔合。一种或多种沉淀微生物的聚合物可以是阳离子的。一种或多种沉淀微生物的聚合物可以是聚(乙二醇)。

[0131] 如本领域技术人员已知的磁珠可以是尺寸范围为20nm至20微米。

[0132] 分离后,可以进行一种或多种测定以测定微生物分离后剩余的信号传导剂的数量和/或在微生物分离期间除去的信号传导剂(“游离”的信号传导剂)的数量。进行游离的信号传导剂的测定提供了与微生物浓度成反比的信号。在这种情况下,与微生物缔合的信号传导剂可以与微生物结合或由微生物内化。或者,可以针对与微生物缔合的信号传导剂进行测定。在该情况下,除非特异性裂解微生物,否则仅结合的信号传导剂将对信号有贡献。

[0133] 为了使分离效率最大化,即使剩余的游离信号传导剂的数量最小化,可以进行一个或多个洗涤步骤。这些可以是连续的,如在过滤、磁性捕获或电泳的情况下,和/或离散的,如在离心或磁性捕获的情况下。

[0134] 在替代实施方案中,信号传导剂可以不需要洗涤。当使用“膜染料”信号传导剂时,可能是这种情况。未插入微生物膜的分子具有比插入物质显著更低的光学活性,因此可能不需要洗涤。

[0135] 可以在将信号传导剂加入微生物中之前进行一次或多次洗涤。例如,这些洗涤可以移除微生物在孵育期间悬浮于其中的液体中所存在的干扰物质。

[0136] 在实施方案中,不进行洗涤。

[0137] 信号显色可能需要添加“显色溶液”。对于包含催化剂的信号传导剂,显色溶液可以包含一种或多种信号前体,其可以转化为光学和/或电活性信号传导分子。对于(诸如在纳米颗粒内)包含包封的分子的信号传导剂,显色溶液可以包含一种或多种试剂以释放包封的物质。在添加显色溶液后的指定时间,可以测量比色和/或电化学信号。此类信号包括但不限于吸光度、荧光、时间分辨的荧光、化学发光、电化学发光、电流分析、伏安、阻抗和/

或阻抗光谱。然后可以比较数据以测定ASTs和MICs,其类似于目前的AST方案。

[0138] 在实施方案中,测定信号水平包括测量与完整微生物相关的信号水平。或者或另外,测定信号水平包括测量不与完整微生物相关的信号水平。

[0139] 这些过程可以直接从培养物、亚培养物、阳性血液培养物、样品进行。可以在AST之前或在添加信号传导剂之前进行处理以浓缩微生物和/或移除潜在的干扰物质。

[0140] 信号传导剂也可以与基于板的方法一起用于AST测定,诸如梯度扩散。它们可以在将微生物加入板后或在设定孵育期后同时添加。在这些情况下,光学和/或电信号的空间信息是重要的。利用这种方法,针对完整微生物结合的信号传导剂的测定可以优选以便保留空间信息。在这种情况下,可以在添加显色溶液之前进行一个或多个洗涤步骤,以便移除游离的信号传导剂。

[0141] 在实施方案中,不进行洗涤。

[0142] 或者,信号传导剂可以设计成由细菌摄取,例如,其可以通过使用噬菌体来实现。在此类方法中,进行针对游离的信号传导剂的测定。

[0143] 或者,印迹转移方法,诸如用硝酸纤维素纸是标准的那样,可用于转移细菌或游离信号传导剂,且然后在印迹纸上进行空间测定。

[0144] 如果信号传导剂在结合时产生信号,则可能不需要分离步骤(诸分离步骤)。或者,如果信号传导剂在结合时变得对特定显色剂溶液成分敏感或抗性,则可以实现无分离步骤的过程。

[0145] 最终的MIC和/或QSR输出数据可以由用户直接从由本文所述的测定所产生的数据解释。或者,可以通过一种或多种算法处理这些数据以得到MICs和/或QSRs。所报告的MIC和/或QSR值可以源自本文描述的一种或多种测定,或者可以源自本文描述的一种或多种测定连同一种或多种用于微生物生长的已知测定,包括但不限于代谢染料指示剂测定、pH指示剂测定、核酸测定和ATP测定。

[0146] 本发明的方法

[0147] 本发明的一个方面是用于确定微生物的抗微生物剂敏感性的方法。所述方法包括以下步骤:在促进微生物生长的条件下,在抗微生物剂和信号传导剂存在的情况下孵育微生物的液体悬浮液,其中所述信号传导剂能够结合至微生物的表面;将由所述信号传导剂结合的微生物与未结合的信号传导剂分开;和与一种或多种对照相比,确定与微生物相关的信号水平,由此确定微生物的抗微生物剂敏感性。

[0148] 本发明的另一个方面是用于确定微生物的抗微生物剂敏感性的方法。所述方法包括以下步骤:在促进微生物生长的条件下,在抗微生物剂存在的情况下孵育微生物的液体悬浮液;添加能够结合至微生物的表面的信号传导剂;将由所述信号传导剂结合的微生物与未结合的信号传导剂分开;和与一种或多种对照相比,确定与微生物相关的信号水平,由此确定微生物的抗微生物剂敏感性。在实施方案中,添加所述信号传导剂发生在所述孵育步骤之前或期间,或添加所述信号传导剂发生在所述孵育步骤之后。

[0149] 本发明的另一个方面是用于确定微生物的抗微生物剂敏感性的方法。所述方法包括以下步骤:在促进微生物生长的条件下,在包含多个室的盒中孵育微生物的液体悬浮液,每个室含有一种或多种抗微生物剂;将信号传导剂加入多个室中,其中所述信号传导剂能够结合至微生物的表面;移除未结合的信号传导剂;和与一种或多种对照相比,确定多个室

中的信号传导水平,由此确定微生物对一种或多种抗微生物剂的敏感性。在实施方案中,所述盒进一步包括一个或多个对照室(例如,至少2、4、6、8、12、24、48、96、192、384、1536或更多个室),其不含抗微生物剂或一种或多种微生物对其不敏感的抗微生物剂。

[0150] 在上述方面的实施方案中,与微生物的表面的结合是非特异性的,例如,包含非共价相互作用和经由形成共价键。

[0151] 在上述方面的实施方案中,所述信号传导剂可以包括能够结合微生物的表面的化学和/或生物化学基团,其中所述表面包含膜、壁、蛋白、细胞器、糖、脂质、细胞包膜和/或核酸中的一种或多种。

[0152] 在上述方面的实施方案中,所述信号传导剂可以包括能够结合微生物的表面的生物分子的化学和/或生物化学基团,其中所述表面生物分子选自肽聚糖、胞壁质、甘露糖蛋白、孔蛋白、 β -葡聚糖、几丁质、糖蛋白、多糖、脂多糖、脂寡糖、脂蛋白、内毒素、脂磷壁酸类、磷壁酸类、脂质A、碳水化合物结合结构域、外排泵、其它细胞壁和/或细胞膜相关蛋白、其它阴离子磷脂及其组合。

[0153] 在上述方面的实施方案中,所述信号传导剂可以包括信号放大器和一个或多个能够非特异性结合至微生物的表面的化学部分。

[0154] 本发明的另一个方面是用于确定微生物的抗微生物剂敏感性的方法。该方法包括在促进微生物生长的条件下,在抗微生物剂和信号传导剂存在的情况下孵育微生物,其中所述信号传导剂包含信号放大器和一个或多个能够非特异性结合至微生物的表面的化学部分;将由所述信号传导剂结合的微生物与未结合的信号传导剂分开;和与一种或多种对照相比,确定与微生物相关的信号水平,由此确定微生物的抗微生物剂敏感性。

[0155] 本发明的另一个方面是用于确定微生物的抗微生物剂敏感性的方法。该方法包括在促进微生物生长的条件下,在抗微生物剂存在的情况下孵育微生物;添加包含信号放大器和一个或多个能够非特异性结合至微生物的表面的化学部分的信号传导剂;将由所述信号传导剂结合的微生物与未结合的信号传导剂分开;和与一种或多种对照相比,确定与微生物相关的信号水平,由此确定微生物的抗微生物剂敏感性。在实施方案中,所述信号传导剂发生在所述孵育步骤之前、开始时或期间,优选在孵育步骤期间。在实施方案中,将所述微生物在液体悬浮液中孵育。

[0156] 在上述方面的实施方案中,可以通过用从生物样品生长的微生物分离物接种液体培养基来制备液体悬浮液。

[0157] 在上述方面的实施方案中,微生物的液体悬浮液可以由未处理的生物样品制备,例如,未处理的生物样品没有经历培养步骤。

[0158] 在上述方面的实施方案中,微生物的液体悬浮液可以由培养或处理的生物样品制备。

[0159] 在上述方面的实施方案中,所述生物样品选自血液、脑脊液、尿液、粪便、阴道液、痰液、支气管肺泡灌洗液、咽喉、鼻/伤口拭子及其组合。

[0160] 在上述方面的实施方案中,所述方法不涉及在孵育之前或期间将微生物捕获在固体表面上的步骤。

[0161] 在上述方面的实施方案中,所述方法不包括在孵育步骤期间或之后使微生物在固体表面上生长的步骤。

- [0162] 在上述方面的实施方案中,所述孵育可以包括摇动所述微生物的液体悬浮液。
- [0163] 在上述方面的实施方案中,微生物的液体悬浮液可以在孵育期间通过机械、声学和/或磁力搅拌的方式连续或离散地摇动。
- [0164] 在上述方面的实施方案中,所述孵育发生在31-37°C。
- [0165] 本发明与目前使用的AST系统的比较
- [0166] 本发明优于目前使用的AST方法,部分原因是其在显著更小的时间内提供准确的AST结果。
- [0167] 目前在诊所中所使用的三种自动化AST系统是BioMérieux的Vitek2,Beckman Dickinson的Phoenix和Beckman-Coulter的MicroScan。在目前使用的AST系统和本发明中的步骤之间的比较显示于图3中。本发明中描述的过程可以以至少两种模式进行。第一种用于标准分离物,其中目前的实验室工作流程没有变化。第二种直接来自阳性血液培养物。
- [0168] 对于标准分离物处理,本发明与现有的临床实验室工作流程兼容,且因此不需要改变。如图3的“步骤8”中所示,在菌落分离(步骤6)和微生物浓度标准化(步骤7)之后进行目前的敏感性(AST)测试。在该工作流程中,本发明将在“步骤8”处替换目前系统。因为本发明的AST结果在健康护理人员的转变(<5小时)内是可用的,所以在实践中,效用可以使患者接受优化疗法(步骤9)的速度增加最多达一天。自动化可以被设计为包括“步骤7”,并且潜在地包括工作流程中的额外步骤。这种自动化是本领域技术人员已知的。注意,图3说明血液样品的工作流程。许多样品类型,诸如尿液和拭子,可以直接在板上划线(步骤4)。在这种情况下,可以在步骤6处进行革兰氏染色。
- [0169] 对于血液测试,目前使用的AST系统需要所获得的血液培养物变得可检测地阳性(其花费10小时或更长时间),随后进行亚培养步骤(至少12小时),且然后进行AST测试(其需要最少八小时):这总共超过四十八小时,这取决于病原体,并且在实践中经常需要大于三天。在大多数工作流程中,生物体的鉴定发生在亚培养步骤之后并且越来越多地通过质谱法进行。由于临床医生或药剂师需要鉴定和AST结果来开出适当的靶向的抗微生物剂的处方,因此这种AST结果的延迟直接延长了广谱抗微生物治疗的持续时间。此外,在许多临床微生物实验室中常见的一次移位操作经常使等待复杂化。
- [0170] 或者,本发明可以直接从阳性血液培养物使用。在抽血和孵育/培养的标准步骤1和步骤2之后,如果培养物是阳性的,则培养瓶将直接移至微生物分离(步骤3),且然后移入自动化系统(步骤4)。本发明可以是完全自动化的,需要技术人员仅用具有微生物稀释液的标准盒装载系统,且然后起始4小时“快速-AST”过程。然后,实验室技术人员将接受对于最小抑制浓度(“MIC”)的AST的相同的标准表型结果。然而,流线型的过程在理论上可以将至AST的时间减少超过二十四小时,并且可能在实践中减少两天,并简化实验室工作流程。
- [0171] 目前使用的AST系统进行临床实验室标准协会(CLSI)液体培养基微量稀释程序的变体。将细菌并行接种至多个孔中,每个孔含有一种(或多种)已知浓度的抗微生物剂和营养液体培养基。以 5×10^5 CFU/ml接种孔以确保细菌处于对数生长期,这对于检测对抗微生物剂的准确响应是重要的。然后视觉上进行微生物检测。
- [0172] 表型AST测试的缓慢速度部分是由于其依赖于微生物生长以产生可检测的光学信号。通过低于 $\sim 1 \times 10^8$ CFU/ml的浓度的光密度测量不能定量细菌,使得CLSI起始浓度持续最少八倍时间不可见。由于最慢生长孔中的微生物生长与非生长孔中的微生物生长的区

分对于最小抑制浓度(MIC)测定是关键的,因此需要显著更长的时间。如本领域技术人员所知,一些现有平台通过在孵育期间将微生物悬浮于其中的液体中包括代谢探针来克服这些生长问题。然而,包括这些探针可能错过生长方式,诸如丝状生长,并且可能影响结果的准确性。

[0173] 一旦AST特异性步骤已经开始,目前使用的AST系统通常仍需要超过8小时来报告对于简单的、高度敏感的细菌的结果,并且对于具有复杂的抗性概况或缓慢生长动力学的病原体需要超过10小时,参见图4。

[0174] 此外,目前使用的自动化AST系统受困于阻止在少于六小时内报告准确结果的两个缺点:1)非常主要的错误,对真实抗性菌株的不准确的“敏感”调用;和2)主要的错误,对真实敏感菌株的不准确的“抗性”调用。实际上,这些问题已经要求BioMerieux和BD修改他们对Vitek2®和Phoenix®的最初4小时速度要求。

[0175] 非常主要的错误的存在部分地由微生物在实现抗微生物剂抗性中消耗的代谢能量来解释。抗性微生物可以响应于抗微生物剂来改变能量消耗,混淆MIC周围的代谢探针的结果。这些也可以由生长介质中存在添加剂、诸如氧化还原指示剂所导致。主要错误的流行主要是由于某些细菌的丝状生长。这种生长方式是革兰氏阴性细菌中常见的抗微生物剂响应,特别是对细胞壁作用的抗微生物剂、诸如 β -内酰胺的响应。丝状细菌继续复制其内部内容物,但不会分膜。因此,代谢探针再次产生错误的近MIC结果。显示丝状细菌的去除显著减少AST方法的主要错误。

[0176] 如本发明中所使用的相对微生物表面面积的测量克服了代谢探针对AST的缺陷。首先,由于代谢活动的变化不会混淆相对表面面积,快速-AST能够实现快速、准确的抗性调用。其次,表面面积测量防止过度抗性调用。与用目前使用的AST系统的代谢探针获得的体积测量相比,表面面积测量使得能够准确区分真实抗性和丝状生长。如图39的示意图中所说明,难以区分抗性和敏感丝状细菌的体积。但缺乏分隔使丝状表面面积显著低于真实的抗性细菌的表面面积。因此,通过放大每个细菌的表面面积,本发明能够准确地调用大肠杆菌样品的4小时 β -内酰胺(氨苄青霉素)MIC(参见下面的实施例)。如图39中所说明,在伸长和“真实”电阻之间的表面面积差异接近2/3,这可以用放大的信号检测。

[0177] 患者

[0178] 如本文所用,术语“患者”(也可互换地称为“宿主”或“受试者”)是指可充当本文所讨论的一种或多种生物样品或样本的来源的任何宿主。在某些方面,供体将是脊椎动物,其意在表示任何动物物种(且优选地,哺乳动物物种,诸如人类)。在某些实施方案中,“患者”是指任何动物宿主,包括但不限于人和非人灵长类动物、禽类、爬行动物、两栖动物、牛、犬、山羊、cavities、乌鸦类(corvines)、epines、马、猫科动物、山羊类(hircines)、lapines、野兔类(leporines)、狼类(lupines)、羊类(ovines)、猪类(porcines)、racines、狐狸类(vulpines)等,包括但不限于驯养牲畜、放牧或迁徙动物或鸟类、外来物种或动物样本,以及伴侣动物、宠物和在兽医师护理下的任何动物。

[0179] 生物样品

[0180] 生物样品是含有微生物(例如细菌和真菌细胞)的任何样品。

[0181] 示例性生物样品包括但不限于全血、血浆、血清、痰液、尿液、粪便、白血细胞、红血细胞、血沉棕黄层、泪液、粘液、唾液、精液、阴道液、淋巴液、羊膜液、脊髓或脑脊液、腹膜渗

出物、胸腔渗出物、渗出液、点状物质、上皮涂片、活检样品、骨髓样品、来自囊肿或脓肿的液体、滑液、玻璃体或房水、洗眼液或抽吸物、支气管肺泡灌洗液、支气管灌洗液或肺灌洗液、肺吸出物,和器官和组织,包括但不限于肝、脾、肾、肺、肠、脑、心脏、肌肉、胰腺等,拭子(包括但不限于伤口拭子、口腔拭子、咽喉拭子、阴道拭子、尿道拭子、宫颈拭子、直肠拭子、病灶拭子、脓肿拭子、鼻咽拭子等)及其任何组合。还包括细菌培养物或细菌分离物、真菌培养物或真菌分离物。普通技术人员还将理解,从任何上述示例性生物样品获得的分离物、提取物或材料也在本发明的范围内。

[0182] 获得自生物样品的微生物可以如本领域常规进行的那样进行培养或以其它方式处理。

[0183] **示例性微生物**

[0184] 如本文所用,感染意在包括任何微生物来源的感染剂,例如细菌、真菌细胞、古生菌和原生动物。在优选的实例中,所述感染剂是细菌,例如革兰氏阳性细菌、革兰氏阴性细菌和非典型细菌。术语“抗微生物剂抗性微生物”是对一种或多种不同抗微生物剂(即抗细菌药物、抗真菌药物、抗古生菌药物和抗原生动物药物)具有抗性的微生物(例如,细菌、真菌、古生菌和原生动物)。

[0185] 微生物(例如,微生物的液体悬浮液)可以包括一种菌株的微生物。所述微生物可以包括一种物种的微生物。所述微生物可以包括多于一种菌株的微生物。所述微生物可以包括一种目的微生物。所述微生物可以包括一种类别的微生物。所述微生物可以包括一种科的微生物。所述微生物可以包括一种界的微生物。

[0186] 微生物(例如,微生物的液体悬浮液)可以包括多于一种菌株的微生物。所述微生物可以包括多于一种物种的微生物。所述微生物可以包括多于一种属的微生物。所述微生物可以包括多于一种目的微生物。所述微生物可以包括多于一种类别的微生物。所述微生物可以包括多于一种科的微生物。所述微生物可以包括多于一种界的微生物。

[0187] 所述微生物可以是细菌。细菌的实例包括且不限于金黄醋杆菌(*Acetobacter aurantius*),沥青不动杆菌(*Acinetobacter bitumen*),不动杆菌属(*Acinetobacter spp.*),以色列放线菌(*Actinomyces israelii*),放线菌属(*Actinomyces spp.*),气球菌属(*Aerococcus spp.*),放射农杆菌(*Agrobacterium radiobacter*),根瘤农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*),无形体(*Anaplasma*),嗜吞噬细胞无形体(*Anaplasma phagocytophilum*),茎瘤固氮根瘤菌(*Azorhizobium caulinodans*),维涅兰德固氮菌(*Azotobacter vinelandii*),芽孢杆菌(*Bacillus*),炭疽芽孢杆菌(*Bacillus anthracis*),短小芽孢杆菌(*Bacillus brevis*),蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*),梭状芽孢杆菌(*Bacillus fusiformis*),地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*),巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*),蕈状芽孢杆菌(*Bacillus mycoides*),芽孢杆菌属(*Bacillus spp.*),嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*),枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),苏云金芽孢杆菌(*Bacillus Thuringiensis*),拟杆菌属(*Bacteroides*),脆弱拟杆菌(*Bacteroides fragilis*),牙龈拟杆菌(*Bacteroides gingivalis*),产黑色素拟杆菌(*Bacteroides melaninogenicus*)(也称为产黑色素普雷沃菌(*Prevotella melaninogenica*)),巴尔通氏体(*Bartonella*),汉氏巴尔通氏体(*Bartonella henselae*),五日热巴尔通氏体(*Bartonella quintana*),巴尔通氏体属(*Bartonella spp.*),博德特氏

菌 (*Bordetella*) , 支气管炎博德特氏菌 (*Bordetella bronchiseptica*) , 百日咳博德特氏菌 (*Bordetella pertussis*) , 博德特氏菌属 (*Bordetella spp.*) , 伯氏疏螺旋体 (*Borrelia burgdorferi*) , 布鲁氏菌 (*Brucella*) , 流产布鲁氏菌 (*Brucella abortus*) , 羊布鲁氏菌 (*Brucella melitensis*) , 布鲁氏菌属 (*Brucella spp.*) , 猪布鲁氏菌 (*Brucella suis*) , 伯克霍尔德氏菌 (*Burkholderia*) , 洋葱伯克霍尔德氏菌 (*Burkholderia cepacia*) , 鼻疽伯克霍尔德氏菌 (*Burkholderia mallei*) , 假鼻疽伯克霍尔德氏菌 (*Burkholderia pseudomallei*) , 肉芽肿鞘杆菌 (*Calymmatobacterium granulomatis*) , 弯曲杆菌 (*Campylobacter*) , 结肠弯曲杆菌 (*Campylobacter coli*) , 胎儿弯曲杆菌 (*Campylobacter fetus*) , 空肠弯曲杆菌 (*Campylobacter jejuni*) , 幽门弯曲杆菌 (*Campylobacter pylori*) , 弯曲杆菌属 (*Campylobacter spp.*) , 衣原体 (*Chlamydia*) , 衣原体属 (*Chlamydia spp.*) , 沙眼衣原体 (*Chlamydia trachomatis*) , 嗜衣原体 (*Chlamydophila*) , 肺炎嗜衣原体 (*Chlamydophila pneumoniae*) (先前称为肺炎衣原体 (*Chlamydia pneumoniae*)) , 鹦鹉热嗜衣原体 (*Chlamydophila psittaci*) (先前称为鹦鹉热嗜衣原体 (*Chlamydia psittaci*)) , 嗜衣原体属 (*Chlamydophila spp.*) , 梭菌 (*Clostridium*) , 肉毒梭菌 (*Clostridium botulinum*) , 艰难梭菌 (*Clostridium difficile*) , 产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*) (先前称为魏氏梭菌 (*Clostridium welchii*)) , 梭菌属 (*Clostridium spp.*) , 破伤风梭菌 (*Clostridium tetani*) , 棒状杆菌 (*Corynebacterium*) , 白喉棒状杆菌 (*Corynebacterium diphtheriae*) , 梭形棒状杆菌 (*Corynebacterium fusiforme*) , 棒状杆菌属 (*Corynebacterium spp.*) , 伯氏考克斯氏体 (*Coxiella burnetii*) , 恰菲埃里希氏体 (*Ehrlichia chaffeensis*) , 埃里希氏体属 (*Ehrlichia spp.*) , 阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae*) , 肠杆菌属 (*Enterobacter spp.*) , 肠球菌 (*Enterococcus*) , 鸟肠球菌 (*Enterococcus avium*) , 耐久肠球菌 (*Enterococcus durans*) , 粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*) , 屎肠球菌 (*Enterococcus faecium*) , 鹅鸡肠球菌 (*Enterococcus gallinarum*) , 病臭肠球菌 (*Enterococcus maloratus*) , 肠球菌属 (*Enterococcus spp.*) , 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) , 弗朗西丝氏菌属 (*Francisella spp.*) , 土拉热弗朗西丝氏菌 (*Francisella tularensis*) , 具核梭杆菌 (*Fusobacterium nucleatum*) , 加德纳氏菌属 (*Gardnerella spp.*) , 阴道加德纳氏菌 (*Gardnerella vaginalis*) , 嗜血杆菌属 (*Haemophilus spp.*) , 嗜血杆菌 (*Haemophilus*) , 杜克雷嗜血杆菌 (*Haemophilus ducreyi*) , 流感嗜血杆菌 (*Haemophilus influenzae*) , 副流感嗜血杆菌 (*Haemophilus parainfluenzae*) , 百日咳嗜血杆菌 (*Haemophilus pertussis*) , 阴道嗜血杆菌 (*Haemophilus vaginalis*) , 幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*) , 螺杆菌属 (*Helicobacter spp.*) , 肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*) , 克雷伯氏菌属 (*Klebsiella spp.*) , 乳杆菌 (*Lactobacillus*) , 嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*) , 保加利亚乳杆菌 (*Lactobacillus bulgaricus*) , 干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei*) , 乳杆菌属 (*Lactobacillus spp.*) , 乳酸乳球菌 (*Lactococcus lactis*) , 嗜肺军团菌 (*Legionella pneumophila*) , 军团菌属 (*Legionella spp.*) , 细螺旋体属 (*Leptospira spp.*) , 单核细胞增多性李斯特氏菌 (*Listeria monocytogenes*) , 李斯特氏菌属 (*Listeria spp.*) , *extroquens* 甲烷杆菌 (*Methanobacterium extroquens*) , 多形微杆菌 (*Microbacterium multiforme*) , 藤黄微球菌 (*Micrococcus luteus*) , 卡他莫拉氏菌 (*Moraxella catarrhalis*) , 分枝杆菌

(*Mycobacterium*) , 鸟分枝杆菌 (*Mycobacterium avium*) , 牛分枝杆菌 (*Mycobacterium bovis*) , 类白喉分枝杆菌 (*Mycobacterium diphtheriae*) , 胞内分枝杆菌 (*Mycobacterium intracellulare*) , 麻风分枝杆菌 (*Mycobacterium leprae*) , 鼠麻风分枝杆菌 (*Mycobacterium lepraeumurium*) , 草分枝杆菌 (*Mycobacterium phlei*) , 耻垢分枝杆菌 (*Mycobacterium smegmatis*) , 分枝杆菌属 (*Mycobacterium spp.*) , 结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) , 枝原体 (*Mycoplasma*) , 发酵枝原体 (*Mycoplasma fermentans*) , 生殖道枝原体 (*Mycoplasma genitalium*) , 人型枝原体 (*Mycoplasma hominis*) , 穿透枝原体 (*Mycoplasma penetrans*) , 肺炎枝原体 (*Mycoplasma pneumoniae*) , 枝原体属 (*Mycoplasma spp.*) , 奈瑟氏球菌 (*Neisseria*) , 淋病奈瑟氏球菌 (*Neisseria gonorrhoeae*) , 脑膜炎奈瑟氏球菌 (*Neisseria meningitidis*) , 奈瑟氏球菌属 (*Neisseria spp.*) , 诺卡氏菌属 (*Nocardia spp.*) , 巴斯德氏菌 (*Pasteurella*) , 多杀巴斯德氏菌 (*Pasteurella multocida*) , 巴斯德氏菌属 (*Pasteurella spp.*) , 土拉巴斯德氏菌 (*Pasteurella tularensis*) , 消化链球菌 (*Peptostreptococcus*) , 牙龈卟啉单胞菌 (*Porphyromonas gingivalis*) , 产黑色素普雷沃菌 (*Prevotella melaninogenica*) (先前称为产黑色素拟杆菌 (*Bacteroides melaninogenicus*)) , 变形杆菌属 (*Proteus spp.*) , 绿脓假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) , 假单胞菌属 (*Pseudomonas spp.*) , 放射根瘤菌 (*Rhizobium radiobacter*) , 立克次氏体 (*Rickettsia*) , 普氏立克次氏体 (*Rickettsia prowazekii*) , 鹦鹉热立克次氏体 (*Rickettsia psittaci*) , 五日热立克次氏体 (*Rickettsia quintana*) , 立氏立克次氏体 (*Rickettsia rickettsii*) , 立克次氏体属 (*Rickettsia spp.*) , 沙眼立克次氏体 (*Rickettsia trachomae*) , 罗卡利马氏体 (*Rochalimaea*) , 汉氏罗卡利马氏体 (*Rochalimaea henselae*) , 五日热罗卡利马氏体 (*Rochalimaea quintana*) , *Rothia dentocariosa* , 沙门氏菌 (*Salmonella*) , 肠炎沙门氏菌 (*Salmonella enteritidis*) , 沙门氏菌属 (*Salmonella spp.*) , 伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhi*) , 鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*) , 粘质沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*) , 痢疾志贺氏菌 (*Shigella dysenteriae*) , 志贺氏菌属 (*Shigella spp.*) , 迂回螺菌 (*Spirillum volutans*) , 葡萄球菌 (*Staphylococcus*) , 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) , 表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*) , 葡萄球菌属 (*Staphylococcus spp.*) , 嗜麦芽糖寡养单胞菌 (*Stenotrophomonas maltophilia*) , 寡养单胞菌属 (*Stenotrophomonas spp.*) , 链球菌 (*Streptococcus*) , 无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*) , 鸟链球菌 (*Streptococcus avium*) , 牛链球菌 (*Streptococcus bovis*) , 大鼠链球菌 (*Streptococcus cricetus*) , 尿链球菌 (*Streptococcus faceium*) , 粪链球菌 (*Streptococcus faecalis*) , 野生链球菌 (*Streptococcus ferus*) , 鸡链球菌 (*Streptococcus gallinarum*) , 乳酸链球菌 (*Streptococcus lactis*) , 温和链球菌 (*Streptococcus mitior*) , 缓症链球菌 (*Streptococcus mitis*) , 变异链球菌 (*Streptococcus mutans*) , 口腔链球菌 (*Streptococcus oralis*) , 肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) , 酿脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*) , 鼠链球菌 (*Streptococcus rattus*) , 唾液链球菌 (*Streptococcus salivarius*) , 血链球菌 (*Streptococcus sanguis*) , 表兄链球菌 (*Streptococcus sobrinus*) , 链球菌属 (*Streptococcus spp.*) , 密螺旋体 (*Treponema*) , 齿垢密螺旋体 (*Treponema denticola*) , 苍白密螺旋体 (*Treponema pallidum*) , 密螺旋体属

(*Treponema spp.*) , 尿枝原体属 (*Ureaplasma spp.*) , 弧菌 (*Vibrio*) , 霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*) , 逗号弧菌 (*Vibrio comma*) , 副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) , 弧菌属 (*Vibrio spp.*) , 创伤弧菌 (*Vibrio vulnificus*) , 草绿色链球菌 (*viridans streptococci*) , 沃尔巴克氏体 (*Wolbachia*) , 耶尔森氏菌 (*Yersinia*) , 小肠结肠炎耶尔森氏菌 (*Yersinia enterocolitica*) , 耶尔森氏菌鼠疫 (*Yersinia pestis*) , 假结核耶尔森氏菌 (*Yersinia pseudotuberculosis*) 和耶尔森氏菌属 (*Yersinia spp.*) 。

[0188] 所述微生物可以是真菌。真菌的实例包括且不限于曲霉属 (*Aspergillus spp.*) 、芽生菌属 (*Blastomyces spp.*) 、假丝酵母属 (*Candida spp.*) 、枝孢属 (*Cladosporium*) 、球孢子菌属 (*Coccidioides spp.*) 、隐球菌属 (*Cryptococcus spp.*) 、突脐蠕孢属 (*Exserohilum*) 、镰刀菌属 (*fusarium*) 、组织胞浆菌属 (*Histoplasma spp.*) 、伊萨酵母属 (*Issatchenka spp.*) 、毛霉菌属 (*mucormycetes*) 、肺囊虫属 (*Pneumocystis spp.*) 、环癣虫 (ringworm) 、丝孢菌属 (*scedosporium*) 、孢子丝菌属 (*Sporothrix*) 和葡萄穗霉属 (*Stachybotrys spp.*) 。

[0189] 所述微生物可以是原生动物。原生动物的实例包括且不限于溶组织内阿米巴 (*Entamoeba histolytica*) 、疟原虫属 (*Plasmodium spp.*) 、兰氏贾第虫 (*Giardia lamblia*) 和布氏锥虫 (*Trypanosoma brucei*) 。

[0190] 示例性抗微生物剂

[0191] 当所述微生物是细菌时,示例性抗微生物剂包括阿米卡星、氨基糖苷类、氨基糖苷类阿莫西林、氨基糖苷类、阿莫西林、阿莫西林/克拉维酸、氨苄青霉素、氨苄青霉素/舒巴坦、抗毒素、肿凡纳明、阿奇霉素、阿洛西林、氨曲南、 β -内酰胺、杆菌肽、卷曲霉素、碳青霉烯类、羧苄青霉素、头孢克洛、头孢羟氨苄、头孢氨苄、头孢噻吩 (*Cefalothin*) 、头孢噻吩 (*Cefalotin*) 、头孢羟唑、头孢唑啉、头孢地尼、头孢托仑、头孢吡肟、头孢克肟、头孢哌酮、头孢噻肟、头孢西丁、头孢泊肟、头孢丙烯、头孢洛林、头孢洛林fosamil、头孢他啶、头孢布坦、头孢唑肟、头孢哌普、头孢曲松、头孢呋辛、头孢菌素、氯霉素、氯霉素 (Bs) 、环丙沙星、克拉霉素、克林霉素、氯法齐明、氯唑西林、粘菌素、复方新诺明、环丝氨酸、达巴万星、氨苯砜、达托霉素、地美环素、双氯西林、地红霉素、多利培南、多西环素、依诺沙星、厄他培南、红霉素、乙胺丁醇、乙胺丁醇 (Bs) 、乙硫烟胺、氟氯西林、氟喹诺酮、氟喹诺酮类、磷霉素、呋喃唑酮、夫西地酸、加替沙星、格尔德霉素、吉米沙星、庆大霉素、格帕沙星、除莠霉素、亚胺培南/西司他丁、异烟肼、卡那霉素、左氧氟沙星、林可霉素、利奈唑胺、洛美沙星、氯碳头孢、大环内酯类、磺胺米隆、美罗培南、甲氧西林、甲硝唑、美洛西林、米诺环素、莫西沙星、莫匹罗星、萘夫西林、萘夫西林、萘啶酸、新霉素、奈替米星、呋喃妥因 (Bs) 、诺氟沙星、氧氟沙星、奥利万星、苯唑西林、土霉素、巴龙霉素、青霉素、青霉素G、青霉素V、哌拉西林、哌拉西林/他唑巴坦、平板霉素、多粘菌素B、泼斯唑来、吡嗪酰胺、奎奴普丁/达福普丁、雷得唑来、瑞西巴库、利福布丁、利福平 (*Rifampicin*) 、利福平 (*Rifampin*) 、利福喷丁、利福昔明、罗红霉素、磺胺嘧啶银、司帕沙星、壮观霉素、壮观霉素 (Bs) 、螺旋霉素、链阳菌素、链霉素、舒巴坦、磺乙酰胺、磺胺嘧啶、磺胺地托辛、磺胺甲二唑、磺胺甲噁唑、磺胺二甲异噁唑 (*Sulfanilimide*) 、柳氮磺胺吡啶、磺胺异噁唑、磺酰胺基柯衣定、特地唑胺、替考拉宁、泰斯巴汀、特拉万星、泰利霉素、替马沙星、替莫西林、四环素、甲砜霉素、替卡西林、替卡西林/克拉维酸盐、替卡西林/克拉维酸、替加环素、替加环素 (Bs) 、替硝唑、TMP/SMX、妥布霉素、特地佐利、甲氧苄啶 (Bs) 、甲氧苄啶-磺胺甲噁唑、醋竹桃霉素、曲伐沙星、万古霉素及其泛型或其变体。

[0192] 与微生物的相互作用影响微生物表面上的负电荷且受微生物表面上的负电荷影响的抗微生物剂包括:聚阳离子氨基糖昔类,其在结合细胞表面时置换Mg²⁺离子,其桥接脂质膜组分,由此破坏外膜并增强药物摄取;阳离子多粘菌素(粘菌素和多粘菌素B),其与微生物细胞的结合也依赖于膜的负电荷,并且通过减少膜负电荷发生突变和质粒介导的对它的抗性;和达托霉素,一种脂肽,其类似于宿主先天免疫反应阳离子抗微生物肽且需要Ca²⁺和磷脂酰甘油作为其破坏膜的作用机制,并且对其的抗性也可以涉及细胞表面电荷的改变。

[0193] 当微生物是真菌时,示例性抗微生物剂包括5-氟胞嘧啶、阿巴芬净、阿巴康唑、烯丙胺类、两性霉素B、Ancobon、阿尼芬净、唑、秘鲁香脂、苯甲酸、联苯苄唑、布康唑、杀假丝菌素、卡泊芬净、环匹罗司、克霉唑、Cresemba、结晶紫、大扶康、棘白菌素类、益康唑、艾氟康唑、氟环唑、芬替康唑、菲律宾菌素、氟康唑、氟胞嘧啶、灰黄霉素V、灰黄霉素、Gris-Peg、卤普罗近、哈霉素、咪唑类、艾沙康唑、艾沙康唑鎓、异康唑、伊曲康唑、酮康唑、疗霉舒、卢立康唑、米卡芬净、咪康唑、纳他霉素、诺科飞、制霉菌素、奥莫康唑、Onmel、Oravig、奥昔康唑、泊沙康唑、丙环唑、雷夫康唑、龟裂霉素、舍他康唑、Sporanox、硫康唑、特比萘芬、特康唑、噻唑类、硫代氨基甲酸酯抗真菌剂、噻康唑、托萘酯、三唑类、十一碳烯酸、Vfend、伏立康唑及其泛型或其变体。

[0194] 当微生物是原生动物时,示例性抗微生物剂包括8-氨基喹啉、乙酰胂胺、针对变形虫门的药剂、臭椿酮、阿莫地喹、两性霉素B、安普罗铵、抗滴虫剂、除疟霉素、胂喹醇、蒿酰林酸、蒿甲醚、蒿甲醚/苯芴醇、青蒿素、蒿乙醚、青蒿氧烷、青蒿琥酯、青蒿琥酯/阿莫地喹、阿托伐醌、阿托伐醌/丙胍、阿扎硝唑、阿奇霉素、苄硝唑、溴羟喹啉、布帕伐醌、卡巴胂、卡硝唑、喹碘方、氯喹、氯丙胍、氯丙胍/氨苯砜,氯丙胍/氨苯砜/青蒿琥酯、氯喹那多、囊泡藻界抗寄生虫药、金鸡纳、Cipargamin、克拉珠利、克立法胺、克清诺、球虫抑制药、Codinaeopsin、Cotrifazid、白叶藤碱、环氯胍、去氢依米丁、双苯他胂、二氢青蒿素、二氯尼特、重氮氨苯咪、双硫仑、多西环素、依洛尼塞、ELQ-300、依米丁、依托法胺、古虫界抗寄生虫药、夫马菌素、呋喃唑酮、甘铋胂、GNF6702、卤泛群、羟氯喹、咪多卡、异丙硝唑、Jesuit的树皮(Jesuit's bark)、KAF156、苯芴醇、马度米星、甲氟喹、Megazol、葡甲胺锑酸盐、美拉胂醇、麦帕克林、甲硝唑、米替福新、Neurolenin B、尼卡巴嗪、硝呋莫司、尼莫拉唑、硝苯胂酸、两面针碱、硝呋醛、Olivaccine、奥硝唑、Ornidin、扑疟喹、巴龙霉素、戊烷脒、五价含锑药剂、泛喹酮、氧二苯脒、哌喹、伯氨喹、丙胍、项目523、普罗硝唑、乙嘧啶、咯萘啶、喹法米特、奎宁、罗硝唑、Schedula Romana、SCYX-7158、塞克硝唑、塞马莫德、葡萄糖酸锑钠、螺环吲哚酮、磺胺多辛、磺胺多辛-乙嘧啶、磺胺林、苏拉明、塔氟喹、替克洛占、替诺尼唑、甲溴羟喹(Tilbroquinol)、替硝唑、三甲曲沙、杀锥虫剂、Warburg酊剂及其泛型或其变体。

[0195] 抗微生物剂可以是通过类似于本文所述的药物的机制起作用的药物。

[0196] 本领域已知的其它抗微生物药物可用于本发明中。

[0197] 液体悬浮液

[0198] 可以通过使用机械、声学和/或磁性搅拌来搅拌微生物的液体悬浮液。机械搅拌的实例包括振荡或摇动和/或使用搅拌棒、搅拌桨、搅拌叶片和/或搅拌螺旋桨或叶轮。

[0199] 微生物分离通过以下进行:离心(例如,以g-力>500 × g),磁性分离,过滤(例如,经由具有小于或等于0.45微米、且优选小于或等于0.2微米的孔的过滤器),电泳,双向电

泳,沉淀,凝集或其任何组合。

[0200] 所述液体可以包括生长培养基,诸如阳离子调节的Mueller Hinton液体培养基。该培养基可以含有一种或多种本领域技术人员已知促进微生物生长和稳定性的添加剂。除了不同的抗微生物剂之外,不同的测试孔可以含有一种或多种已知改进特定抗微生物剂的AST准确度的添加剂。例如,可以将额外的氯化钠加入到包含苯唑西林的测试中,并且可以将额外的钙加入到包含达托霉素的测试中。

[0201] 盒

[0202] 盒的类型不受限制。盒是能够保持并允许微生物的液体悬浮液的生长的容器。盒的非限制性实例包括培养瓶、培养皿、petri皿、生物测定皿、培养管、试管、微量离心管、瓶、微孔板、多孔板、微量滴定板、微孔板。该盒可以含有一个室。该盒可以包括多个室,每个室是能够保持液体悬浮液与另一空间物理分离的空间;室的一个实例是多孔板中的孔。该盒可以包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、24、48、96、192、384、1536或更多个室,以及其之间的任何数量的室。

[0203] 光学装置

[0204] 具有许多不同特征的任何光学装置(例如,显微镜、微量读板仪)能够检测信号,可用于本发明中。例如:广谱灯(例如,氙)、窄谱灯、激光、LED、多光子、共聚焦或全内反射照明可用于激发。照相机(单个或多个)、单个光电二极管或光电二极管的阵列(1D或2D)、雪崩光电二极管、CMOS或CCD传感器、固态光电倍增管(例如硅光电倍增管)和/或具有基于滤光片或基于光栅的光谱分辨率(一个或多个光谱分辨的发射波长)的光电倍增管(单个或多个)在检测侧是可能的。

[0205] 试剂盒

[0206] 如本文所用的在本发明中的术语“试剂盒”和“系统”意指这样的事物诸如多种信号传导剂与一种或多种其它类型的元件或组分(例如,其它类型的生物化学试剂、信号检测试剂、对照(即,阳性和阴性对照,例如化学敏感/抗性微生物)、分离方式(例如,过滤器和磁珠)、容器、包装诸如用于商业销售的包装、其中可以培养、处理或含有微生物悬浮液的基质/盒、电子硬件组件和记录在非暂时性处理器可读介质上的软件)的组合。

[0207] 本发明的另一个方面是用于确定微生物的抗微生物剂敏感性的试剂盒。所述试剂盒包括能够结合至目标完整微生物的表面的信号传导剂;用于孵育含有微生物的样品的溶液;和一种或多种用于从信号传导剂生成信号的试剂。

[0208] 在实施方案中,所述信号传导剂与一个或多个能够直接或间接结合目标完整微生物的结合部分缔合。

[0209] 在实施方案中,所述一个或多个结合部分选自抗体、凝集素、天然和/或合成肽、合成和/或天然配体、合成和/或天然聚合物、合成和/或天然糖聚合物、碳水化合物-结合蛋白和/或聚合物、糖蛋白-结合蛋白和/或聚合物、带电小分子、其它蛋白、噬菌体和/或适体。

[0210] 在实施方案中,所述一个或多个结合部分可以是多克隆和/或单克隆抗体。

[0211] 在实施方案中,所述一个或多个结合部分可以是合成和/或天然配体和/或肽。所述配体和/或肽可以选自双(锌-二甲基吡啶胺)、TAT肽、丝氨酸蛋白酶、cathelicidins、阳离子糊精、阳离子环糊精、水杨酸、赖氨酸及其组合。

[0212] 在实施方案中,所述一个或多个结合部分可以是合成和/或天然聚合物和/或糖聚

合物。所述天然和/或合成聚合物可以是支链淀粉、聚 (N-[3-(二甲基氨基)丙基]甲基丙烯酰胺)、聚(亚乙基亚胺)、聚-L-赖氨酸、聚[甲基丙烯酸2-(N,N-二甲基氨基)乙基酯]及其组合。所述天然和/或合成聚合物和/或糖聚合物可以包括部分,其包括但不限于壳聚糖、明胶、葡聚糖、海藻糖、纤维素、甘露糖、阳离子葡聚糖和环糊精(cyclodextrans)或其组合,包括但不限于共嵌段、接枝和交替聚合物。

[0213] 在实施方案中,所述一个或多个结合部分可以包括选自甘露糖结合凝集素、其它凝集素、膜联蛋白及其组合的糖蛋白。

[0214] 在实施方案中,所述一个或多个结合部分可以包括两个或更多个结合部分。

[0215] 在实施方案中,所述一个或多个结合部分可以包括直接或间接结合微生物表面上存在的一种或多种生物分子。示例性生物分子包括肽聚糖、胞壁质、甘露糖蛋白、孔蛋白、 β -葡聚糖、几丁质、糖蛋白、多糖、脂多糖、脂寡糖、脂蛋白、内毒素、脂磷壁酸类、磷壁酸类、脂质A、碳水化合物结合结构域、外排泵、其它细胞壁和/或细胞膜相关蛋白、其它阴离子磷脂及其组合。

[0216] 在实施方案中,所述结合部分是纳米颗粒。

[0217] 在实施方案中,所述结合部分是噬菌体。

[0218] 在实施方案中,所述一个或多个结合部分可以特异性结合一种或多种生物分子。

[0219] 在实施方案中,所述一个或多个结合部分可以结合一种或多种物种特异性生物分子。

[0220] 在实施方案中,所述一个或多个结合部分可以非特异性结合微生物,例如,经由非共价相互作用和经由形成共价键。

[0221] 在实施方案中,所述试剂盒进一步包括磁珠,以将微生物与上清液磁性分离。

[0222] 在实施方案中,所述磁珠与一个或多个结合微生物的结合部分缔合。一个或多个与磁珠缔合的结合部分可以与和信号传导剂缔合的那些相同。一个或多个与磁珠缔合的结合部分可以与和信号传导剂缔合的那些不同。

[0223] 在实施方案中,所述磁珠具有范围为20nm至20微米的直径。

[0224] 在实施方案中,所述试剂盒进一步包括一种或多种离子或小分子,以增强结合部分和微生物之间的结合。

[0225] 在实施方案中,所述溶液包含<0.15 M盐。

[0226] 在实施方案中,所述试剂盒进一步包括微生物结合剂,且其中所述结合部分经由微生物结合剂间接结合微生物。所述结合部分可以与链霉抗生物素蛋白、中性抗生物素蛋白或抗生物素蛋白缀合,且所述微生物结合剂可以是生物素化的。所述结合部分可以是结合物种特异性Fc结构域的抗体,且所述微生物结合剂可以是能够用物种特异性Fc结构域结合微生物的抗体。

[0227] 在实施方案中,所述信号传导剂可以包括化学发光团、催化剂或酶中的一种或多种。所述酶可以是辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、乙酰胆碱酯酶、葡萄糖氧化酶、 β -D-半乳糖苷酶、 β -内酰胺酶及其组合中的至少一种。所述催化剂可以是有机金属化合物。

[0228] 在实施方案中,所述信号传导剂以纳米颗粒的形式提供,例如,所述信号传导剂被包封在纳米颗粒内。所述纳米颗粒可以是可离解的,其可以包括金属氧化物;所述金属氧化物可以是或包括氧化铁、氧化铯和/或氧化铈。

- [0229] 在实施方案中,在测定信号水平之前进行零次、一次或两次洗涤。
- [0230] 在实施方案中,在添加信号传导剂之前进行零次、一次或两次洗涤。
- [0231] 在实施方案中,所述试剂盒进一步包括显色剂试剂以产生可测量的信号。
- [0232] 在实施方案中,所述一种或多种试剂包括用于催化反应的试剂和停止催化反应的试剂。
- [0233] 在实施方案中,所述试剂盒进一步包含用于测量信号(例如光学和/或电信号)的装置。光学测量可以是荧光、时间分辨的荧光、吸收和/或发光的。
- [0234] 在实施方案中,所述试剂盒进一步包含多孔板,例如24孔、96孔、192孔或384孔板。
- [0235] 在实施方案中,所述试剂盒进一步含有使用试剂盒以进行本文公开的方法的说明书。所述试剂盒可以额外含有用于进行在本文所述的一种或多种方法之前或之后进行的步骤的说明书。
- [0236] 在一个实施方案中,提供了试剂盒,其含有进行如本文所述的一种或多种方法所必需的试剂或在如本文所述的一种或多种方法之前或之后进行步骤所必需的试剂。
- [0237] **治疗方法**
- [0238] 如本文所用,术语“治疗(treat)”、“治疗(treating)”、“治疗(treatment)”等是指减少或改善病症和/或与其相关的症状。应当理解,尽管不排除,但治疗病症或病况不需要完全消除所述病症、病况或与其相关的症状。治疗可以包括健康护理专业人员或诊断科学家向受试者推荐所用的作用过程或治疗方案,例如处方。
- [0239] 如本文所用,术语“预防(prevent)”、“预防(preventing)”、“预防(prevention)”、“预防性治疗”等是指降低在受试者中发展病症或病况的可能性,所述受试者没有病症或病况,但有发展病症或病况的风险或易于发展病症或病况。
- [0240] 术语“治疗方法”包括管控的方法,并且当与感染微生物生物体或感染结合使用时,包括改善、消除、减少、预防感染微生物的有害作用或感染微生物的有害作用的其它缓解或管控。
- [0241] 如本文所用,术语“药物(drug)”、“药物(medication)”、“治疗剂”、“活性剂”、“治疗性化合物”、“组合物”或“化合物”可互换使用,并且是指可用于治疗或预防身体功能的疾病、疾病、病况或病症的任何化学实体、药物(pharmaceutical)、药物(drug)、生物学、植物性物质等。药物可以包含已知和潜在治疗性化合物。可以使用本领域普通技术人员已知的筛选通过筛选确定药物是治疗性的。“已知的治疗性化合物”、“药物(drug)”或“药物(medication)”是指已经显示(例如,通过动物试验或先前向人类给药的经验)在这种治疗中有效的治疗性化合物。“治疗方案”涉及包含如本文公开的“药物(drug)”、“药物(medication)”、“治疗剂”、“活性剂”、“治疗性化合物”、“组合物”或“化合物”的治疗和/或包含受试者的行为改变的治疗和/或包含外科手段的治疗。
- [0242] 抗微生物剂,例如抗生素,是能够杀死微生物或抑制微生物的生长的试剂。
- [0243] **信号传导剂和化学连接**
- [0244] 在实施方案中,本发明的特征在于能够结合至微生物的表面的信号传导剂。在实施方案中,所述结合是非特异性的。在实施方案中,所述结合是特异性的。
- [0245] 在实施方案中,在本文描述的方法的孵育步骤期间存在信号传导剂。在实施方案中,在本文描述的方法的孵育步骤之后存在信号传导剂。

[0246] 在实施方案中,结合包含形成共价键。在实施方案中,信号传导剂能够结合至微生物的表面,其中所述结合包含形成共价键。在实施方案中,如本文所述的方法导致在微生物表面上的基团(例如,经由反应基团,诸如如本文所述的亲电子或亲核基团)与如本文所述的信号传导剂之间形成共价键。在实施方案中,信号传导剂已与微生物的表面形成共价键。

[0247] 在实施方案中,结合包含形成非共价相互作用。在实施方案中,信号传导剂能够结合至微生物的表面,其中所述结合包含形成非共价相互作用。在实施方案中,如本文所述的方法导致在微生物表面上的基团(例如,经由反应基团,诸如如本文所述的亲电子或亲核基团)与如本文所述的信号传导剂之间形成非共价相互作用。在实施方案中,信号传导剂已与微生物的表面形成非共价相互作用。

[0248] 在实施方案中,非共价相互作用包含:离子相互作用、离子-离子相互作用、偶极-偶极相互作用、离子-偶极相互作用、静电相互作用、伦敦分散、范德华相互作用、氢键、 π - π 相互作用、疏水相互作用或其任何组合。在实施方案中,非共价相互作用是:离子相互作用、离子-离子相互作用、偶极-偶极相互作用、离子-偶极相互作用、静电相互作用、伦敦分散、范德华相互作用、氢键、 π - π 相互作用、疏水相互作用或其任何组合。

[0249] 在实施方案中,非共价相互作用包含离子相互作用、范德华相互作用、疏水相互作用、 π - π 相互作用或氢键或其任何组合。在实施方案中,非共价相互作用包含离子相互作用、范德华相互作用、氢键或 π - π 相互作用或其任何组合。

[0250] 在实施方案中,能够结合至微生物的表面的信号传导剂包含能够结合微生物膜、壁、蛋白、细胞器、糖、脂质、细胞包膜或核酸或其任何组合的基团(例如,化学或生物化学基团)。在实施方案中,能够结合至微生物的表面的信号传导剂包含能够结合微生物膜、壁、蛋白、细胞器、糖、脂质、细胞包膜或核酸或其任何组合的化学基团(例如,亲核基团或亲电子基团)。在实施方案中,能够结合至微生物的表面的信号传导剂包含能够结合微生物膜、壁、蛋白、细胞器、糖、脂质、细胞包膜或核酸或其任何组合的生物化学基团。

[0251] 在实施方案中,所述表面可以包括信号传导剂与其结合或缔合的生物分子。示例性生物分子包括肽聚糖、胞壁质、甘露糖蛋白、孔蛋白、 β -葡聚糖、几丁质、糖蛋白、多糖、脂多糖、脂寡糖、脂蛋白、内毒素、脂磷壁酸类、磷壁酸类、脂质A、碳水化合物结合结构域、外排泵、其它细胞壁和/或细胞膜相关蛋白、其它阴离子磷脂及其组合。

[0252] 在实施方案中,能够结合至微生物的表面的信号传导剂包含能够结合微生物膜、壁、蛋白、细胞器、糖、脂质、细胞包膜或核酸或其任何组合的生物化学基团。

[0253] 在实施方案中,能够结合至微生物的表面的信号传导剂包含能够结合微生物膜、壁、蛋白、细胞器、糖、脂质、细胞包膜或核酸或其任何组合的化学基团(例如,亲核官能团或亲电子官能团)。在实施方案中,所述化学基团是亲核官能团。在实施方案中,所述化学基团是亲电子官能团。

[0254] 在实施方案中,信号传导剂是生物化学信号传导剂。在实施方案中,生物化学信号传导剂包含生物分子,诸如抗体、配体、蛋白、适体、ss-DNA、ss-RNA或ss-PNA)。

[0255] 在实施方案中,信号传导剂是化学信号传导剂。在实施方案中,化学信号传导剂是化学化合物(例如,合成化学化合物)。在实施方案中,化学信号传导剂不包含生物分子,诸如抗体、配体、蛋白、适体、ss-DNA、ss-RNA或ss-PNA)。

[0256] 在实施方案中,能够结合至微生物的表面的信号传导剂包含

- [0257] 接头基团L;和
- [0258] 放大器基团(例如,作为化学或生物化学放大器的放大器基团104)。
- [0259] 在实施方案中,放大器基团是放大器基团104,其为化学或生物化学放大器。在实施方案中,放大器基团104是化学放大器。在实施方案中,放大器基团104是生物化学放大器。
- [0260] 在实施方案中,信号传导剂是化学化合物。在实施方案中,化学化合物包含化学放大器基团,诸如本文所述的那些。
- [0261] 在实施方案中,接头基团L包含抗体的保守(Fc)区。
- [0262] 在实施方案中,接头基团L能够与放大器基团(例如,作为化学或生物化学放大器的放大器基团104)形成共价键。
- [0263] 在实施方案中,接头基团L与信号放大器基团(例如,作为化学或生物化学放大器的放大器基团104)形成共价键。
- [0264] 在实施方案中,接头基团L能够与放大器基团(例如,作为化学或生物化学放大器的放大器基团104)形成一种或多种非共价相互作用。
- [0265] 在实施方案中,接头基团L与放大器基团(例如,作为化学或生物化学放大器的放大器基团104)形成一种或多种非共价相互作用。
- [0266] 在实施方案中,接头基团L包含能够结合微生物表面的基团(例如,化学或生物化学基团)。在实施方案中,接头基团L包含结合微生物表面的基团(例如,化学或生物化学基团)。
- [0267] 在实施方案中,接头基团L包含能够与微生物的表面形成共价键的基团(例如,化学或生物化学基团)。在实施方案中,接头基团L包含与微生物的表面形成共价键的基团(例如,化学或生物化学基团)。
- [0268] 在实施方案中,接头基团L包含能够与微生物的表面形成一种或多种非共价相互作用的基团(例如,化学或生物化学基团)。在实施方案中,接头基团L包含与微生物的表面形成一种或多种非共价相互作用的基团(例如,化学或生物化学基团)。
- [0269] 在实施方案中,接头基团L包含化学部分101,其中所述化学部分能够与微生物的表面形成非共价相互作用。在实施方案中,接头基团L包含化学部分101,其中所述化学部分能够与微生物的表面形成共价键。在实施方案中,接头基团L包含化学部分101,其中所述化学部分与微生物的表面形成非共价相互作用。在实施方案中,接头基团L包含化学部分101,其中所述化学部分与微生物的表面形成共价键。
- [0270] 在实施方案中,接头基团L包含间隔基部分102。在实施方案中,间隔基部分102与化学部分101和/或与化学部分103共价连接。在实施方案中,间隔基部分102与化学部分101共价连接。在实施方案中,间隔基部分102与化学部分103共价连接。在实施方案中,间隔基部分102与化学部分101和与化学部分103共价连接。在实施方案中,间隔基部分102与化学部分101和/或与化学部分103形成非共价相互作用。在实施方案中,间隔基部分102与化学部分103形成非共价相互作用。在实施方案中,间隔基部分102与化学部分101和与化学部分103形成非共价相互作用。
- [0271] 在实施方案中,接头基团L包含化学部分103,其中所述化学部分能够与放大器基

团(例如,作为化学或生物化学放大器的放大器基团104)形成共价键。在实施方案中,接头基团L包含化学部分103,其中所述化学部分已经与放大器基团(例如,作为化学或生物化学放大器的放大器基团104)形成共价键。在实施方案中,接头基团L包含化学部分103,其中所述化学部分能够与放大器基团(例如,作为化学或生物化学放大器的放大器基团104)形成非共价相互作用。在实施方案中,接头基团L包含化学部分103,其中所述化学部分已经与放大器基团(例如,作为化学或生物化学放大器的放大器基团104)形成非共价相互作用。

- [0272] 在实施方案中,信号传导剂是包含接头基团L的化学化合物,所述接头基团L包含:
- [0273] 化学部分101,其中所述化学部分能够与微生物的表面形成共价键或非共价相互作用;
- [0274] 间隔基部分102,其中间隔基部分与化学部分101和与化学部分103共价连接;和
- [0275] 化学部分103,其中所述化学部分已经或可以与作为化学或生物化学放大器的放大器基团104形成共价键。
- [0276] 在实施方案中,信号传导剂是包含接头基团L的化学化合物,所述接头基团L包含:
- [0277] 化学部分101,其中所述化学部分能够与微生物的表面形成共价键或非共价相互作用;
- [0278] 间隔基部分102,其中间隔基部分与化学部分101和与化学部分103共价连接;和
- [0279] 化学部分103,其中所述化学部分已经或可以与作为化学或生物化学放大器的放大器基团104形成非共价相互作用。
- [0280] 在实施方案中,接头基团包含一个化学部分101。在实施方案中,接头基团包含多个化学部分101(例如,接头基团包含1、2、3、4、5或6个化学部分101)。
- [0281] 在实施方案中,接头基团包含一个间隔基部分102。在实施方案中,接头基团包含多个间隔基部分102(例如,接头基团包含1、2、3、4、5或6个间隔基部分102)。
- [0282] 在实施方案中,接头基团包含一个化学部分103。在实施方案中,接头基团包含多个化学部分103(例如,接头基团包含1、2、3、4、5或6个化学部分103)。
- [0283] 在实施方案中,接头基团包含:一个化学部分101、一个间隔基部分102和一个化学部分103。在实施方案中,接头基团由以下组成:一个化学部分101、一个间隔基部分102和一个化学部分103。
- [0284] 在实施方案中,接头基团具有子结构(I)的结构:
- [0285] -101-102-103-, (I)
- [0286] 其中
- [0287] “101”代表化学部分101;
- [0288] “102”代表间隔基部分102;且
- [0289] “103”代表化学部分103。
- [0290] 在实施方案中,化学部分101能够与微生物的表面形成共价键。
- [0291] 在实施方案中,化学部分101能够在一种或多种促进偶联的试剂(在本文中也称为偶联剂)存在的情况下与微生物的表面形成共价键。
- [0292] 在实施方案中,促进偶联的试剂包括戊二醛、甲醛、多聚甲醛、1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDC)、N,N'-二环己基碳二亚胺(DCC)、N-环己基-N'-(2-吗啉代乙基)碳二亚胺-甲基对甲苯磺酸酯(CMC)、二异丙基碳二亚胺(DIC)、(1-[双(二甲基氨基)

亚甲基] -1H-1,2,3-三唑并[4,5-b]吡啶鎓3-氧化物六氟磷酸盐) (HATU)、伍德沃德氏试剂、N,N'-羰基二咪唑、N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 或N-羟基磺基琥珀酰亚胺 (磺基-NHS) 或其任何组合。

[0293] 在实施方案中,促进偶联的试剂包括醛、丙烯酸酯、酰胺、酰亚胺、酸酐、氯三嗪类、环氧化物、异氰酸酯、异硫氰酸酯、有机酸、单体、聚合物、硅烷或硅酸酯 (silicates) 或其任何组合。

[0294] 在实施方案中,促进偶联的试剂包括碳二亚胺、𬭸盐或铵盐或其任何组合。

[0295] 在实施方案中,促进偶联的试剂包括戊二醛、N- (3-二甲基氨基丙基) -N' -乙基碳酸酯 (EDC)、(1-[双(二甲基氨基) 亚甲基]-1H-1,2,3-三唑并[4,5-b]吡啶鎓 3-氧化物六氟磷酸盐) (HATU)、(O-苯并三唑-1-基-N,N,N',N' -四甲基脲鎓六氟磷酸盐) (HBTU)、N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS)、N,N'-二环己基碳二亚胺 (DCC)、二异丙基碳二亚胺 (DIC)、羟基-3,4-二氢-4-氧代-1,2,3-苯并三嗪 (HOOBt)、羟基苯并三唑 (HOBT)、1-羟基-7-氮杂苯并三唑 (HOAt)、(N- (3-二甲基氨基丙基) -N' -乙基碳二亚胺 (EDAC)、4- (N,N-二甲基氨基) 吡啶 (DMAP)、苯并三唑-1-基氧基-三(二甲基氨基)-𬭸六氟磷酸盐 (BOP)、苯并三唑-1-基氧基-三吡咯烷子基-𬭸六氟磷酸盐 (PyBOP)、溴-三吡咯烷子基-𬭸六氟磷酸盐 (PyBrOP)、7-氮杂-苯并三唑-1-基氧基-三吡咯烷子基-𬭸六氟磷酸盐 (PyAOP)、乙基氰基(羟基亚氨基)乙酸基-02) -三- (1-吡咯烷基) -𬭸六氟磷酸盐 (Py0xim)、3- (二乙氧基-磷酰基氧基) -1,2,3-苯并[d]三嗪-4 (3H) -酮 (DEPBT)、2- (6-氯-1H-苯并三唑-1-基) -N,N,N',N' -四甲基铵六氟磷酸盐 (HCTU)、N- [(5-氯-1H-苯并三唑-1-基) -二甲基氨基-吗啉代] -脲鎓六氟磷酸盐N-氧化物 (HDMC)、1- [1- (氰基-2-乙氧基-2-氧代亚乙基 (ethylidene) 氨基氧基) -二甲基氨基-吗啉代] -脲鎓六氟磷酸盐 (COMU)、2- (1-氧基-吡啶-2-基) -1,1,3,3-四甲基异硫脲鎓四氟硼酸盐 (TOTT)、四甲基氟甲脒鎓六氟磷酸盐 (TFFH)、N-乙氧基羰基-2-乙氧基-1,2-二氢喹啉 (EEDQ)、2-丙烷膦酸酐 (PPA)、三光气、1,1'-羰基二咪唑 (CDI)、[(6-硝基苯并三唑-1-基) 氧基]三(吡咯烷子基) 𬭸六氟磷酸盐 (PyNOP)、[[6- (三氟甲基) 苯并三唑-1-基] 氧基]三(吡咯烷子基) 𬭸六氟磷酸盐 (PyFOP)、[[4-硝基-6- (三氟甲基) 苯并三唑-1-基] 氧基]三(吡咯烷子基) 𬭸六氟磷酸盐 (PyNFOP)、[(6-硝基苯并-三唑-1-基) 氧基]三(二甲基-氨基) 𬭸六氟磷酸盐 (NOP)、1- β -萘磺酰基氧基苯并三唑 (NSBt)、1- β -萘磺酰基氧基-6-硝基苯并三唑 (N-NSBt)、四甲基氟甲脒鎓六氟磷酸盐 (TFFH)、双(四亚甲基) 氟甲脒鎓六氟磷酸盐 (BTFFH)、1,3-二甲基-2-氟-4,5-二氢-1H-咪唑鎓六氟磷酸盐 (DFIH)、氰尿酰氯 (CC) 或2,4-二氯-6-甲氧基-1,3,5-三嗪 (DCMT) 和2-氯-4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪 (CDMT) 或其任何组合。

[0296] 在实施方案中,促进偶联的试剂包括EDC、HATU、HBTU、NHS、DCC、HOBT或PyBOP或其任何组合。

[0297] 在实施方案中,促进偶联的试剂包括EDC、DCC、CMC、DIC或HATU或其任何组合。

[0298] 在实施方案中,促进偶联的试剂包括戊二醛、甲醛或多聚甲醛或其任何组合。

[0299] 在实施方案中,化学部分101能够与微生物的表面形成非共价相互作用(例如,本文所述的任何非共价相互作用)。在实施方案中,非共价相互作用包含:离子相互作用、离子-离子相互作用、偶极-偶极相互作用、离子-偶极相互作用、静电相互作用、伦敦分散、范德华相互作用、氢键或 π - π 相互作用或其任何组合。

[0300] 在实施方案中,化学部分101能够与微生物的表面形成非共价相互作用,其中所述

非共价相互作用包含离子相互作用、范德华相互作用、疏水相互作用、 π - π 相互作用或氢键或其任何组合。

[0301] 在实施方案中,化学部分101包含亲核官能团。在实施方案中,化学部分101包含由亲核官能团形成的基团。

[0302] 在实施方案中,亲核官能团是:氨基、酰氨基、肼基、羟基氨基、羟基或硫基(thio)。在实施方案中,亲核官能团是:氨基、肼基、羟基氨基或硫基。在实施方案中,亲核官能团包含:氨基、肼基、羟基氨基、羟基或硫基。在实施方案中,亲核官能团是羧酰胺、N-羟基羧酰胺、羧基酰肼或胍基。

[0303] 在实施方案中,亲核官能团是-NH₂、-NHNH₂、-CONHOH、-CONHNH₂、-ONH₂、-OH或-SH。在实施方案中,亲核官能团是-NH₂、-NHNH₂、-CONHNH₂或-ONH₂。

[0304] 在实施方案中,化学部分101包含亲电子官能团。

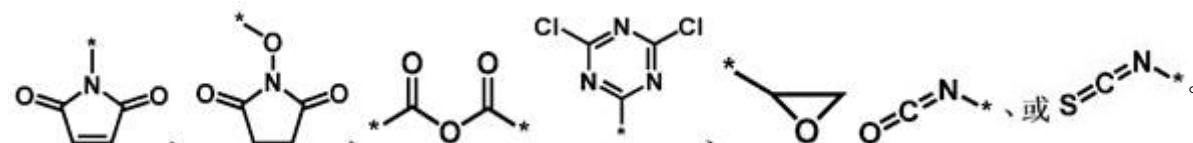
[0305] 在实施方案中,化学部分101包含由亲电子官能团形成的基团。

[0306] 在实施方案中,亲电子官能团包含醛、酮、羧酸、羧酸酯、羧酸卤化物(例如,乙酰氯)或羧酸酐(例如,乙酸酐)。

[0307] 在实施方案中,亲电子官能团包含醛、 α -卤代酮、马来酰亚胺、琥珀酰亚胺、羟基琥珀酰亚胺、异硫氰酸酯、异氰酸酯、酰基叠氮化物、碘酰氯、甲苯磺酸酯、乙二醛、环氧化物、环氧乙烷、碳酸酯、亚氨酸酯、酸酐、氟苯基酯、羟基甲基膦衍生物、碳酸酯、卤代乙酰基、氯三嗪、卤代乙酰基、烷基卤化物、氮杂环丙烷或丙烯酰基衍生物。在实施方案中,亲电子官能团是醛、 α -卤代酮、马来酰亚胺、琥珀酰亚胺、羟基琥珀酰亚胺、异硫氰酸酯、异氰酸酯、酰基叠氮化物、碘酰氯、甲苯磺酸酯、乙二醛、环氧化物、环氧乙烷、碳酸酯、亚氨酸酯、酸酐、氟苯基酯、羟基甲基膦衍生物、碳酸酯、卤代乙酰基、氯三嗪、卤代乙酰基、烷基卤化物、氮杂环丙烷或丙烯酰基衍生物。

[0308] 在实施方案中,亲电子官能团包含醛、 α -卤代酮、马来酰亚胺、琥珀酰亚胺或羟基琥珀酰亚胺基团。

[0309] 在实施方案中,亲电子官能团包含-CHO、-C(0)CH₂I、



[0310] 在实施方案中,亲电子官能团包含-CHO、-C(0)CH₂I、

[0311] 在实施方案中,化学部分101包含基团,其为烷基、烯基、炔基、苯基、杂芳基、卤代烷基、羟基、羰基、酰基卤、烷氧基羰基)氧基、羧基、卤代酮、烷氧基、烷氧醇(alkoxyol)(半缩醛或)半缩酮、二烷氧基(例如,缩酮或缩醛)、三烷氧基(正交醚)、氨基甲酰基、氨基、胺基(ammonio)、亚氨基、亚胺基(imido)、琥珀酰胺基、马来酰亚胺基、羟基琥珀酰胺基、生物素、D-生物素、叠氮基、偶氮、氰酸酯、异氰酸根合、硝酰基、氰基、异氰基、亚硝基氧基、硝基、亚硝基、肟、硫烷基、亚磺酰基、磺酰基、亚磺基、磺基、氰硫酸根合(thiocyanato)、异硫氰酸根合、thietyl、磷酸酯或硼酸酯。

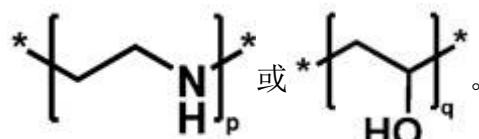
[0312] 在实施方案中,间隔基部分102是疏水的。在实施方案中,间隔基部分102是亲水的。

[0313] 在实施方案中,间隔基部分102是肽的(例如,衍生自肽键)。

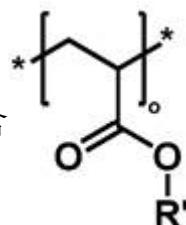
[0314] 在实施方案中,间隔基部分102包含无机键。在实施方案中,间隔基部分102包含有机键。在实施方案中,间隔基部分102仅包含有机键。

[0315] 在实施方案中,间隔基部分102是寡聚的。在实施方案中,间隔基部分102是多聚的。在实施方案中,间隔基部分102包含亚甲基(-CH₂-)、乙二醇(-CH₂CH₂O-)、亚氨基亚乙基(-CH₂CH₂NH-)、乙烯醇(-CH₂CHOH-)_x、乳酸(-CH(CH₃)C(0)-O-)、丙烯酸(-CH₂CH₂(CO₂H)-)、甲基丙烯酸(-CH₂C(CH₃)(CO₂H)-)或甲基丙烯酸甲酯(-CH₂C(CH₃)(CO₂CH₃)-)的区段(例如,1至约300,1至约200,1至约100,1至约50,1至约25,或1至约10,或1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个区段)。

[0316] 在实施方案中,间隔基部分102包含区段,其为 $*[-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-]_m^*$ 、 $*[-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-]_p^*$ 、 $*[-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(0)-\text{O}-]_q^*$ 、



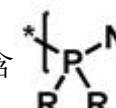
[0317] 在实施方案中,n、m、p和q独立地为1至约300(例如,1至约200,1至约100,1至约50,1至约25,或1至约10)的整数。在实施方案中,n、m、p和q各自独立地为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。



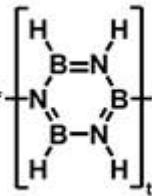
[0318] 在实施方案中,间隔基部分102包含 $*[-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(0)-\text{O}-\text{R}']_n^*$ 。在实施方案中,R'独立地为氢或作为C₁-C₁₂烷基、C₂-C₁₂烯基或C₂-C₁₂炔基的基团。在实施方案中,o为1至约300(例如,1至约200,1至约100,1至约50,1至约25,或1至约10)的整数。在实施方案中,o独立地为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。

[0319] 在实施方案中,间隔基部分102包含 $*[-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(0)-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(0)-]_r^*$ 。在实施方案中,R独立地为氢或作为C₁-C₁₂烷基、C₂-C₁₂烯基或C₂-C₁₂炔基的基团。在实施方案中,r为1至约300(例如,1至约200,1至约100,1至约50,1至约25,或1至约10)的整数。在实施方案中,r独立地为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。

[0320] 在实施方案中,间隔基部分102包含 $*[-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{P}(R)_2-\text{NH}-]_s^*$ 。在实施方案中,R独立地为氢或作

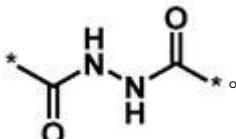


为C₁-C₁₂烷基、C₂-C₁₂烯基或C₂-C₁₂炔基的基团。在实施方案中，s为1至约300(例如，1至约200, 1至约100, 1至约50, 1至约25, 或1至约10)的整数。在实施方案中，s独立地为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。



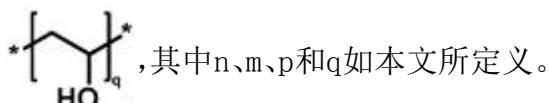
[0321] 在实施方案中,间隔基部分102包含-NH-CH₂-CH₂-NH-。在实施方案中,t为1至约300(例如

如,1至约200,1至约100,1至约50,1至约25,或1至约10)的整数。在实施方案中,t独立地为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。



[0323] 在实施方案中,间隔基部分102是包含重复基团的聚合物,所述重复基团包含烷基、烷氧基、酯、丙烯酸、氨基、羟基或酰基肼官能团或其任何组合。

[0324] 在实施方案中,间隔基部分102是: $\text{*} \left[\begin{array}{c} | \\ \text{H} \\ | \\ \text{H} \end{array} \right]_n \text{*}$ 、 $\text{*} \left[\begin{array}{c} | \\ \text{C} \\ \text{H} \\ | \\ \text{C} \\ \text{H} \\ | \\ \text{O} \end{array} \right]_m \text{*}$ 、 $\text{*} \left[\begin{array}{c} | \\ \text{C} \\ \text{H} \\ | \\ \text{C} \\ \text{H} \\ | \\ \text{N} \\ | \\ \text{H} \end{array} \right]_d \text{*}$ 或



[0325] 在实施方案中, n、m、o、p、q、r、s或t各自独立地是1至100、10至90、10至80、10至70、10至60、10至50、10至40、10至30、10至20或1至10的整数。

[0326] 在实施方案中,化学部分103包含作为亲核官能团的基团。

[0327] 在实施方案中,化学部分103包含由亲核官能团形成的基团。

[0328] 在实施方案中,亲核官能团是:氨基、酰氨基、肼基、羟基氨基、羟基或硫基。在实施方案中,亲核官能团是:氨基、肼基、羟基氨基或硫基。

[0329] 在实施方案中,亲核官能团包含:氨基、肼基、羟基氨基、羟基或巯基。在实施方案中,亲核官能团是羧酰胺、N-羟基羧酰胺、羧基酰肼或胍基。

[0330] 在实施方案中，亲核官能团是 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{CONHOH}$ 、 $-\text{CONHNH}_2$ 、 $-\text{OH}_2$ 、 $-\text{OH}$ 或 $-\text{SH}$ 。在实施方案中，亲核官能团是 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{CONHNH}_2$ 或 $-\text{OH}_2$ 。

[0331] 在实施方案中,化学部分103包含作为亲电子官能团的基团。

[0332] 在实施方案中,化学部分103包含由亲电子官能团形成的基团。

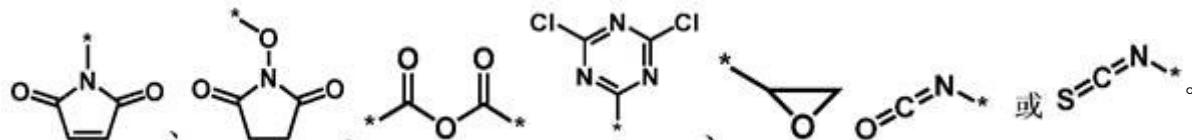
[0333] 在实施方案中,亲电子官能团包含醛、酮、羧酸、羧酸酯、羧酸卤化物(例如,乙酰氯)或羧酸酐(例如,乙酸酐)。

[0334] 在实施方案中,亲电子官能团包含醛、 α -卤代酮、马来酰亚胺、琥珀酰亚胺、羟基琥珀酰亚胺、异硫氰酸酯、异氰酸酯、酰基叠氮化物、磺酰氯、甲苯磺酸酯、乙二醛、环氧化物、环氧乙烷、碳酸酯、亚氨酸酯、酸酐、氟苯基酯、羟基甲基膦衍生物、碳酸酯、卤代乙酰基、氯三嗪、卤代乙酰基、烷基卤化物、氮杂环丙烷或丙烯酰基衍生物。在实施方案中,亲电子官能

团是醛、 α -卤代酮、马来酰亚胺、琥珀酰亚胺、羟基琥珀酰亚胺、异硫氰酸酯、异氰酸酯、酰基叠氮化物、磺酰氯、甲苯磺酸酯、乙二醛、环氧化物、环氧乙烷、碳酸酯、亚氨酸酯、酸酐、氟苯基酯、羟基甲基膦衍生物、碳酸酯、卤代乙酰基、氯三嗪、卤代乙酰基、烷基卤化物、氮杂环丙烷或丙烯酰基衍生物。

[0335] 在实施方案中,亲电子官能团包含醛、 α -卤代酮、马来酰亚胺、琥珀酰亚胺或羟基琥珀酰亚胺基团。

[0336] 在实施方案中，亲电子官能团包含 $-\text{CH}_2\text{O}-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2-$ 、



[0337] 在实施方案中,亲电子官能团包含-CHO、-C(0)CH₂I、或。

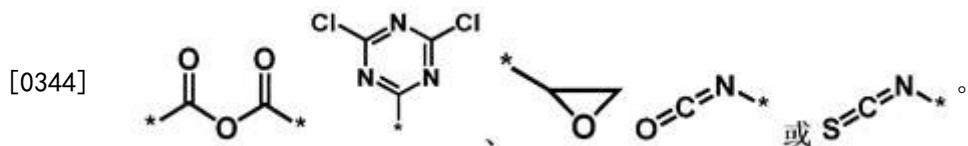
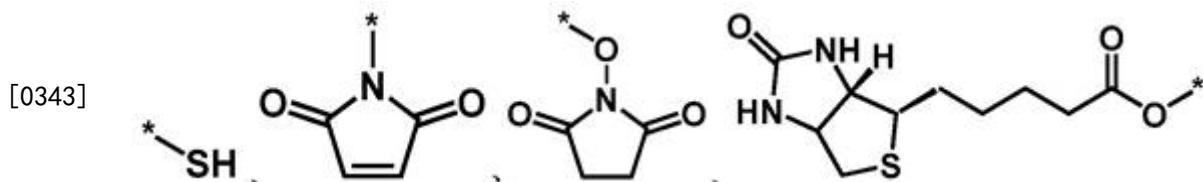
[0338] 在实施方案中,化学部分103包含化学结构,其为羰基、烯基、炔基、羟基、氨基、硫醇、马来酰亚胺、琥珀酰亚胺、羟基琥珀酰亚胺、生物素基、酸酐、氯三嗪、环氧化物、异氰酸酯或异硫氰酸酯。在实施方案中,所述作为羰基、烯基、炔基、羟基、氨基、硫醇、马来酰亚胺、琥珀酰亚胺、羟基琥珀酰亚胺、生物素基、酸酐、氯三嗪、环氧化物、异氰酸酯或异硫氰酸酯的基团能够与放大器基团(例如,放大器基团104)形成共价键。在实施方案中,所述作为羰基、烯基、炔基、羟基、氨基、硫醇、马来酰亚胺、琥珀酰亚胺、羟基琥珀酰亚胺、生物素基、酸酐、氯三嗪、环氧化物、异氰酸酯或异硫氰酸酯的基团能够与放大器基团(例如,放大器基团104)形成非共价相互作用。

[0339] 在实施方案中,化学部分103由化学结构形成,所述化学结构包含作为羧基、烯基、炔基、羟基、氨基、硫醇、马来酰亚胺、琥珀酰亚胺、羟基琥珀酰亚胺、生物素基、酸酐、氯三嗪、环氧化物、异氰酸酯或异硫氰酸酯的基团。在实施方案中,所述作为羧基、烯基、炔基、羟基、氨基、硫醇、马来酰亚胺、琥珀酰亚胺、羟基琥珀酰亚胺、生物素基、酸酐、氯三嗪、环氧化物、异氰酸酯或异硫氰酸酯的基团已经与放大器基团(例如,放大器基团104)形成共价键。在实施方案中,所述作为羧基、烯基、炔基、羟基、氨基、硫醇、马来酰亚胺、琥珀酰亚胺、羟基琥珀酰亚胺、生物素基、酸酐、氯三嗪、环氧化物、异氰酸酯或异硫氰酸酯的基团已经与放大器基团(例如,放大器基团104)形成非共价相互作用。

[0340] 在实施方案中,化学部分103包含作为羰基、烯基、炔基、羟基、氨基、硫醇、马来酰亚胺、琥珀酰亚胺、羟基琥珀酰亚胺或生物素基的基团。

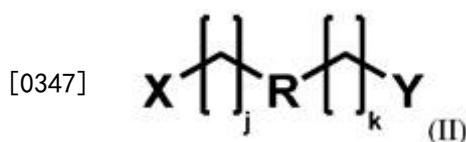
[0341] 在实施方案中,化学部分103包含羧基、烯基、炔基、羟基、氨基、硫醇、马来酰亚胺、琥珀酰亚胺、羟基琥珀酰亚胺或生物素基官能团。

[0342] 在实施方案中,化学部分103包含:*C=O *C=CC=* *C#CC#*



[0345] 在实施方案中,化学部分103包含由化学结构形成的基团,所述化学结构包含作为羰基、烯基、炔基、羟基、氨基、硫醇、马来酰亚胺、琥珀酰亚胺、羟基琥珀酰亚胺或生物素基官能团的基团。

[0346] 在实施方案中,接头基团L具有子结构(II)的结构:



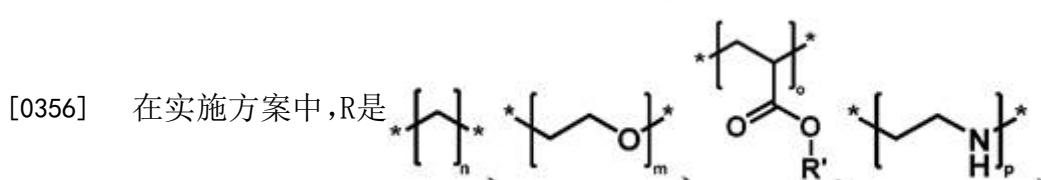
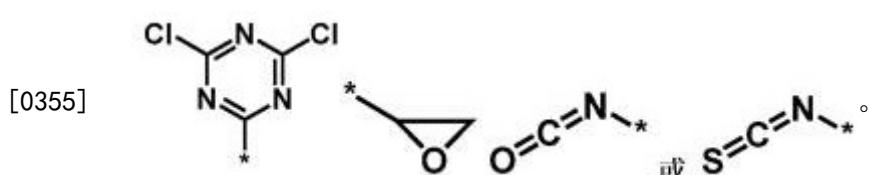
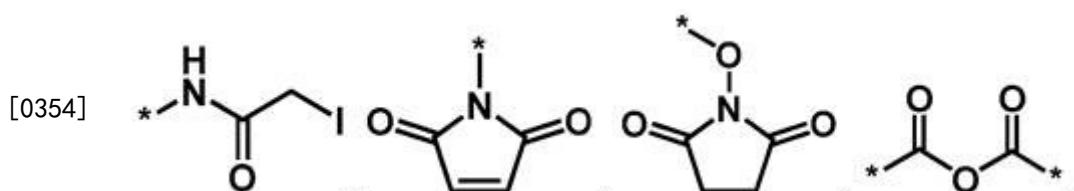
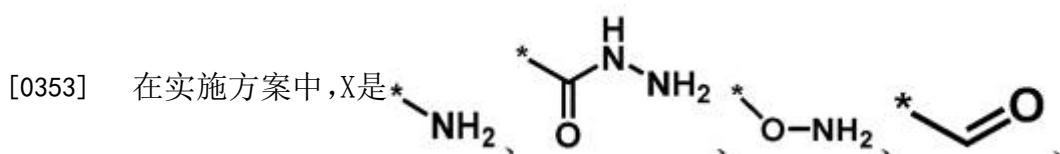
[0348] 其中

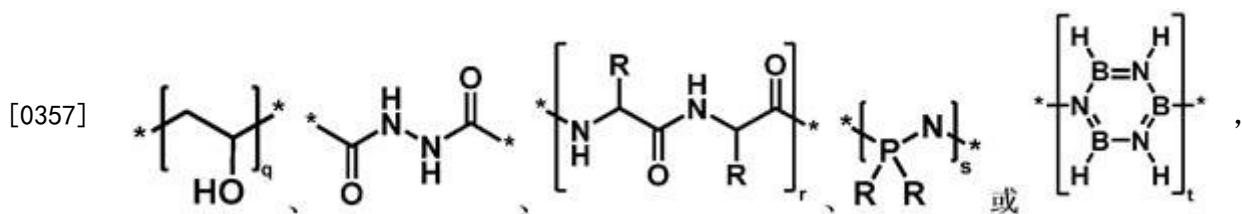
[0349] X代表化学部分101(例如,如本文所述的任何化学部分101);

[0350] R代表间隔基部分102(例如,如本文所述的任何间隔基部分102);

[0351] Y代表化学部分103(例如,如本文所述的任何化学部分103);且

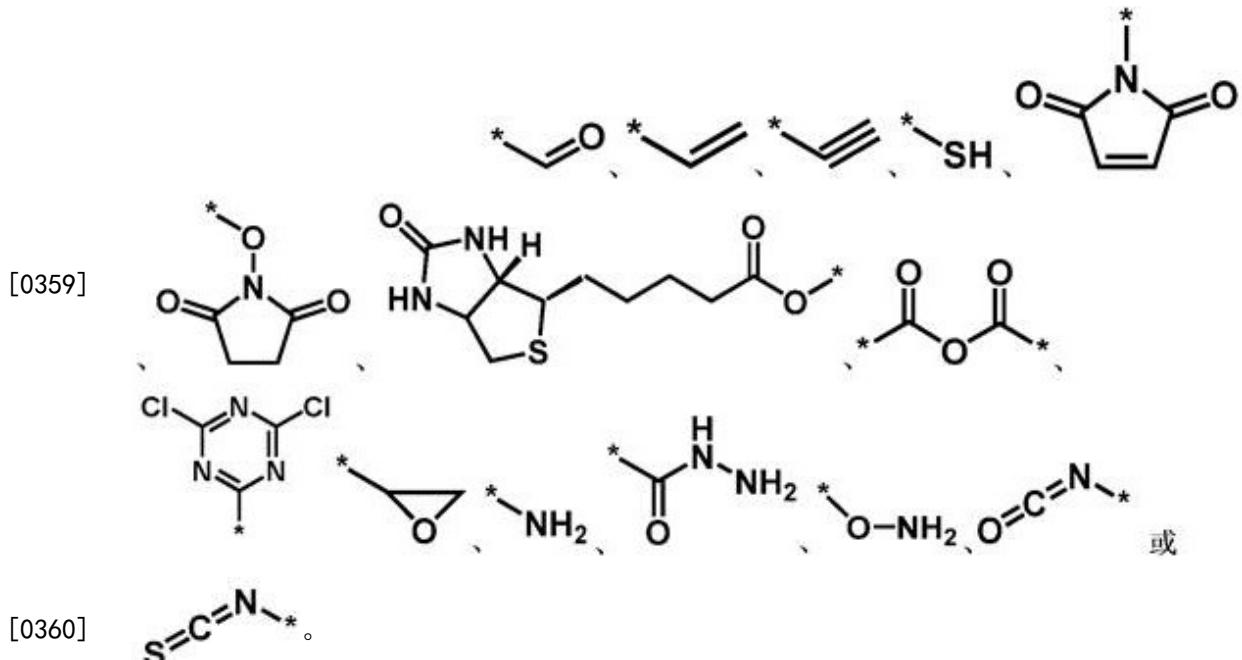
[0352] j和k各自独立地是0至100的整数。





其中n、m、o、p、q、r、s或t各自如本文所述(例如,1至约300的整数)。

[0358] 在实施方案中,Y是



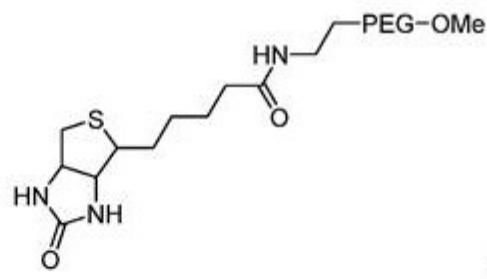
[0361] 在实施方案中,X能够与微生物的表面形成共价键。在实施方案中,X与微生物的表面形成共价键。

[0362] 在实施方案中,X能够与微生物的表面形成一种或多种非共价相互作用。在实施方案中,X与微生物的表面形成一种或多种非共价相互作用。

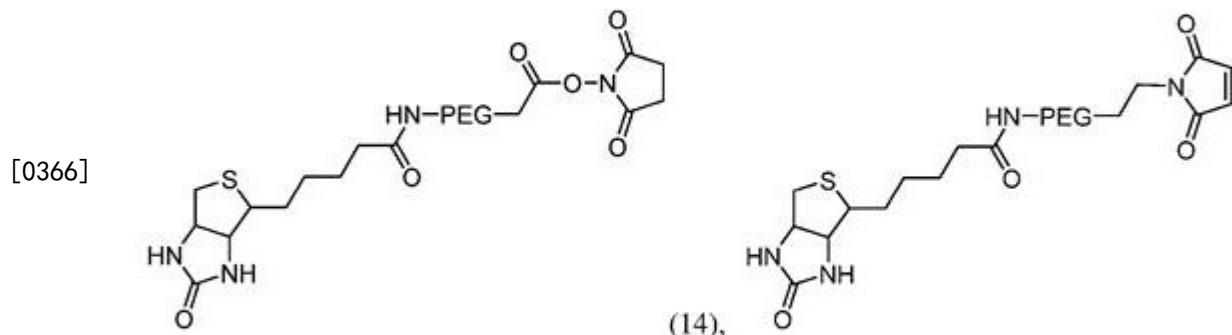
[0363] 在实施方案中,Y能够与放大器基团104(例如,化学或生物化学放大器)形成共价键。在实施方案中,Y与放大器基团(诸如放大器基团104)(例如,化学或生物化学放大器)形成共价键。

[0364] 在实施方案中,Y能够与放大器基团104(例如,化学或生物化学放大器)形成一种或多种非共价相互作用。在实施方案中,Y与放大器基团(诸如放大器基团104)(例如,化学或生物化学放大器)形成一种或多种非共价相互作用。

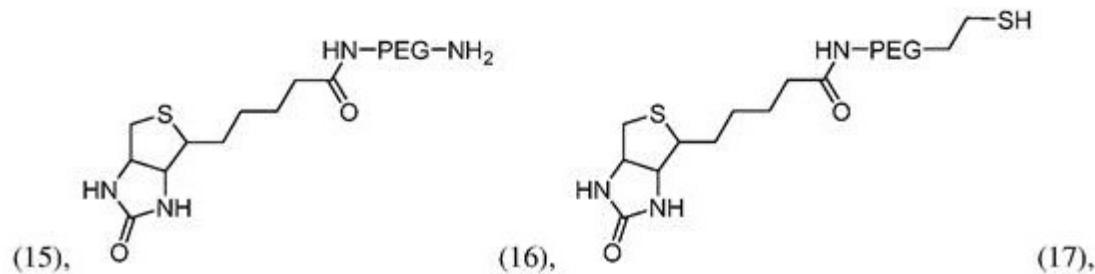
[0365] 在实施方案中,接头基团L是:



(13),

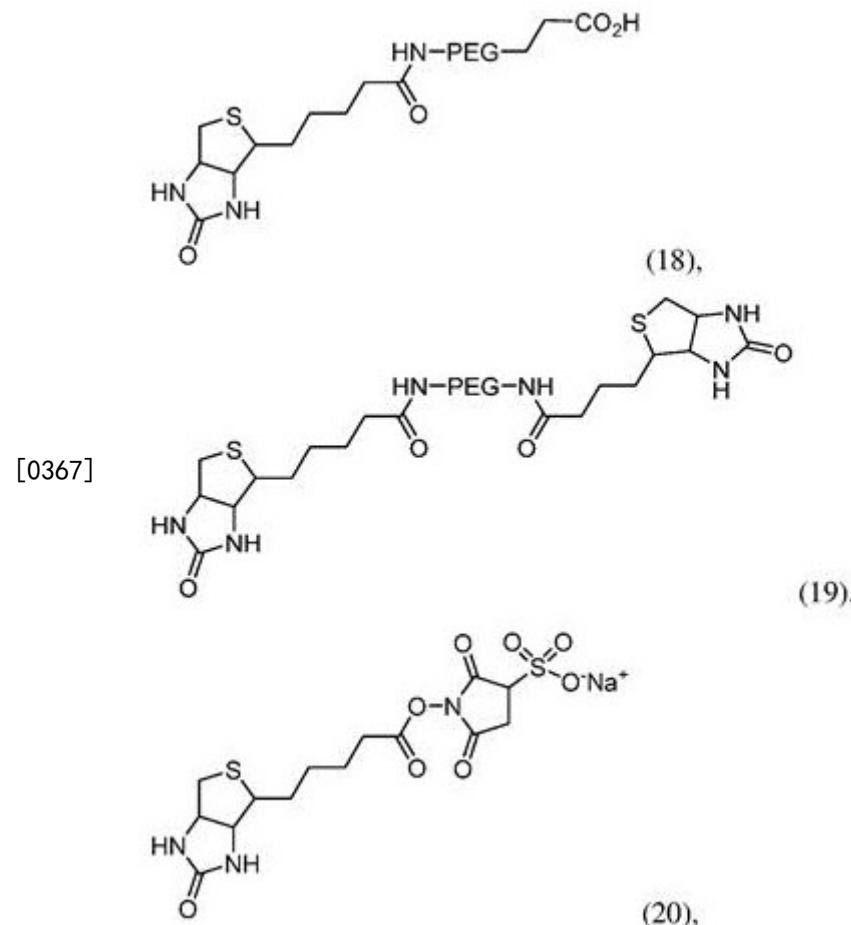


(14),



(16),

(17),



[0368] WGA-生物素、多粘菌素B-生物素、单克隆抗体、多克隆抗体、生物素化的单克隆抗体、生物素化的多克隆抗体、铕螯合物-抗体、辣根过氧化物酶-缀合的抗体和抗体变体(例如,Fab:片段,抗原结合(一个臂);F(ab')2:片段,抗原结合,包括铰链区(两个臂);Fab':片段,抗原结合,包括铰链区(一个臂);scFv:单链可变片段;二-scFv:二聚的单链可变片段;sdAb:单结构域抗体;双特异性单克隆抗体;三功能抗体;和BiTE:双特异性T-细胞接合者)。

[0369] 示例性放大器基团包括在例如国际公开号WO 2016/015027和在国际申请号PCT/US 16/42589(其各自通过引用以其整体并入)中描述的那些。

[0370] 在实施方案中,放大器基团(例如,放大器基团104)包含催化剂、荧光团或比色染料。在实施方案中,放大器基团(例如,放大器基团104)是催化剂、荧光团或比色染料。

[0371] 在实施方案中,放大器基团(例如,放大器基团104)包含酶、催化剂或纳米颗粒。在实施方案中,放大器基团(例如,放大器基团104)是酶、催化剂或纳米颗粒。

[0372] 在实施方案中,化学放大器基团包含催化剂、荧光团、纳米颗粒或比色染料。在实施方案中,化学放大器基团是催化剂、荧光团、纳米颗粒或比色染料。

[0373] 在实施方案中,放大器基团(例如,放大器基团104)包含催化剂。在实施方案中,放大器基团(例如,放大器基团104)是催化剂。

[0374] 在实施方案中,放大器基团(例如,放大器基团104)包含荧光团。在实施方案中,放大器基团(例如,放大器基团104)是荧光团。示例性荧光团包括在国际申请号PCT/US 16/42589(其通过引用以其整体并入)的表1中描述的那些。

[0375] 在实施方案中,放大器基团(例如,放大器基团104)包含比色染料。在实施方案中,

放大器基团(例如,放大器基团104)是比色染料。

[0376] 在实施方案中,放大器基团(例如,放大器基团104)包含酶。在实施方案中,放大器基团(例如,放大器基团104)是酶。

[0377] 在实施方案中,放大器基团(例如,放大器基团104)包含纳米颗粒。在实施方案中,放大器基团(例如,放大器基团104)是纳米颗粒。

[0378] 在实施方案中,放大器基团(例如,放大器基团104)包含镧系元素。

[0379] 在实施方案中,放大器基团(例如,放大器基团104)包含镧系元素,其为铕、锶、铽、钐或镝。在实施方案中,放大器基团(例如,放大器基团104)包含选自以下的镧系元素:铕、锶、铽、钐和镝。

[0380] 在实施方案中,放大器基团(例如,放大器基团104)包含有机荧光团。

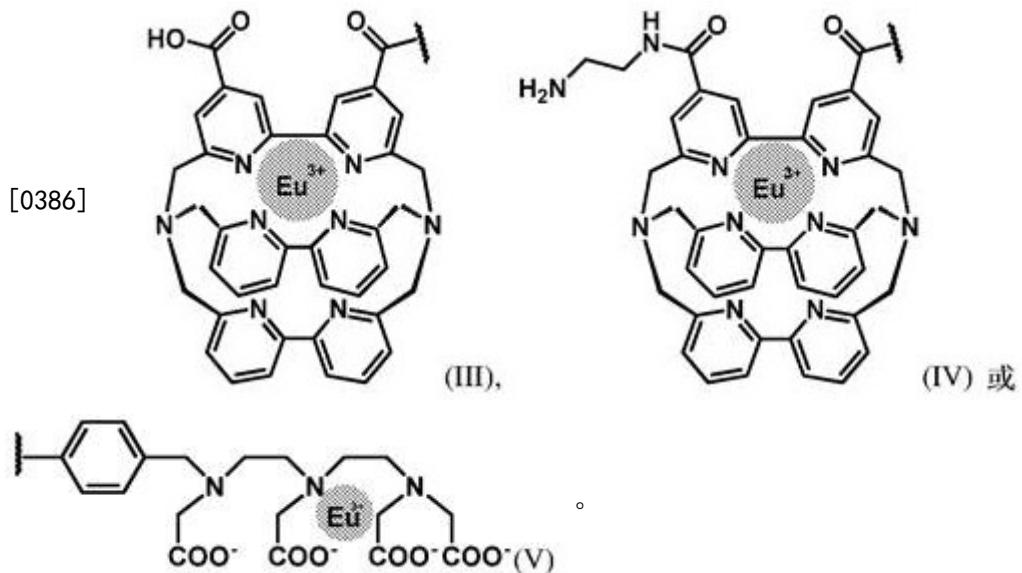
[0381] 在实施方案中,放大器基团(例如,放大器基团104)包含作为配位络合物的荧光团。

[0382] 在实施方案中,放大器基团(例如,放大器基团104)包含铕配位络合物。在实施方案中,配位络合物是铕配位络合物。在实施方案中,放大器基团(例如,放大器基团104)包含钉配位络合物。在实施方案中,配位络合物是钉配位络合物。在实施方案中,放大器基团(例如,放大器基团104)包含铼配位络合物。在实施方案中,配位络合物是铼配位络合物。在实施方案中,放大器基团(例如,放大器基团104)包含钯配位络合物。在实施方案中,配位络合物是钯配位络合物。在实施方案中,放大器基团(例如,放大器基团104)包含铂配位络合物。在实施方案中,配位络合物是铂配位络合物。

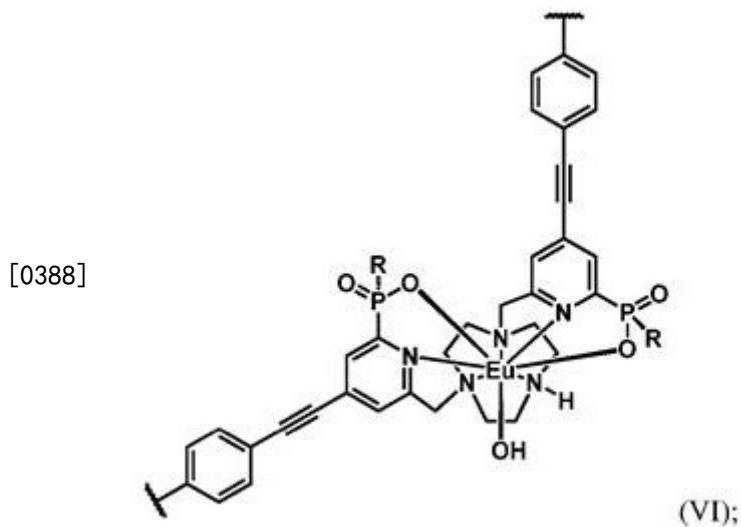
[0383] 在实施方案中,放大器基团(例如,放大器基团104)包含化学发光团、量子点、酶、铁配位催化剂、铕配位络合物、钉配位络合物、铼配位络合物、钯配位络合物、铂配位络合物、钐配位络合物、铽配位络合物或镝配位络合物。

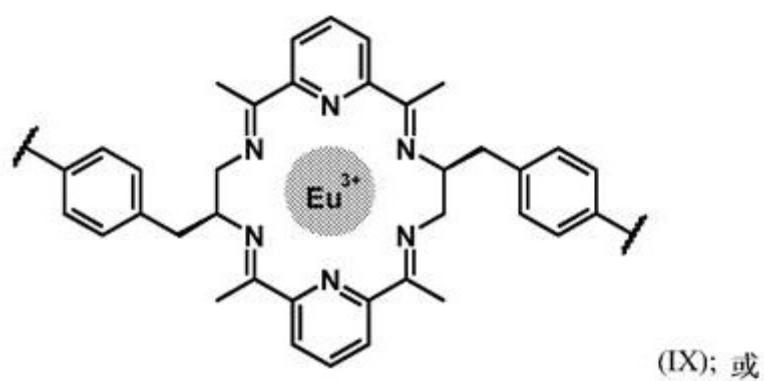
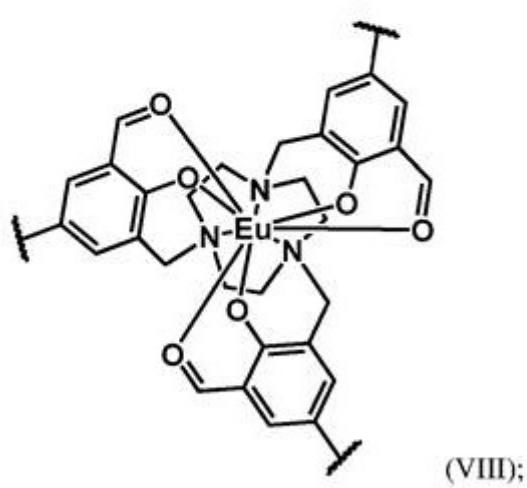
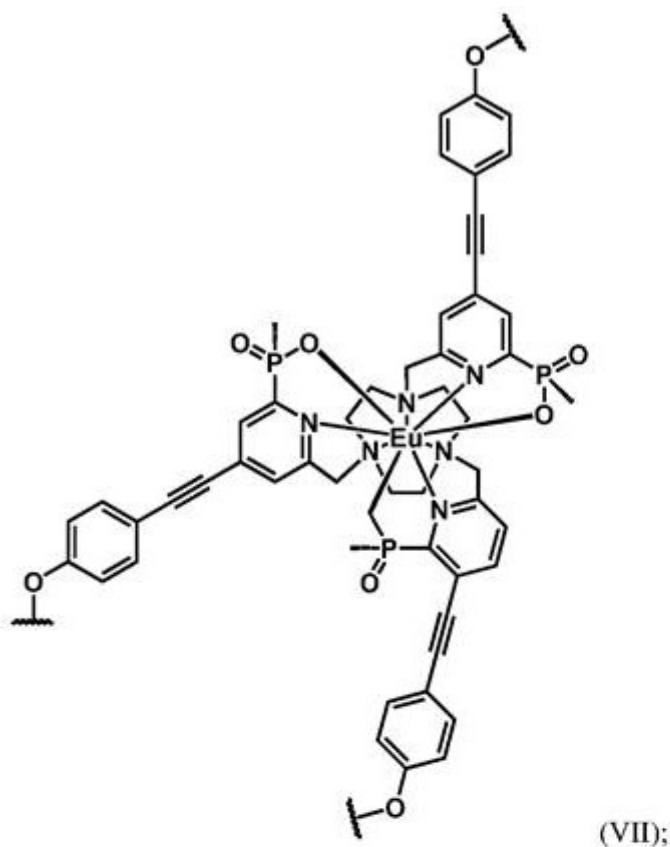
[0384] 在实施方案中,放大器基团(例如,放大器基团104)包含化学发光团。在实施方案中,放大器基团(例如,放大器基团104)包含量子点。在实施方案中,放大器基团(例如,放大器基团104)包含酶。在实施方案中,放大器基团(例如,放大器基团104)包含铁配位催化剂。在实施方案中,放大器基团(例如,放大器基团104)包含铕配位络合物。在实施方案中,放大器基团(例如,放大器基团104)包含钉配位络合物。在实施方案中,放大器基团(例如,放大器基团104)包含铼配位络合物。在实施方案中,放大器基团(例如,放大器基团104)包含钯配位络合物。在实施方案中,放大器基团(例如,放大器基团104)包含铂配位络合物。在实施方案中,放大器基团(例如,放大器基团104)包含钐配位络合物。在实施方案中,放大器基团(例如,放大器基团104)包含铽配位络合物。在实施方案中,放大器基团(例如,放大器基团104)包含镝配位络合物。

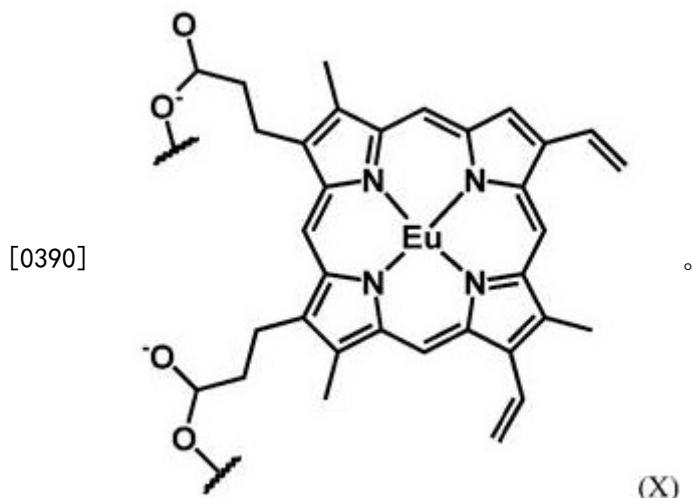
[0385] 在实施方案中,放大器基团104包含部分,其为:



[0387] 在实施方案中, 放大器基团104包含部分, 其为:







[0391] 在实施方案中,放大器基团104是催化剂或酶。在实施方案中,放大器基团是辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、乙酰胆碱酯酶、葡萄糖氧化酶、 β -D-半乳糖苷酶或 β -内酰胺酶。

[0392] 在实施方案中,放大器基团104是辣根过氧化物酶。

[0393] 在实施方案中,放大器基团104是荧光团或比色染料。

[0394] 合适的荧光团和比色染料是本领域技术人员众所周知的,并且描述于*The Molecular Probes® Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*, 第11版 (2010) 以及Gomes, Fernandes和Lima *J. Biochem. Biophys. Methods* 65 (2005) pp 45-80中,其通过引用以其整体并入本文。示例性荧光团还包括在例如国际公开号WO 2016/015027和国际申请号PCT/US 16/42589 (其各自通过引用以其整体并入) 中描述的那些。

[0395] 合适的荧光团或比色染料的实例包括但不限于溴化乙锭、碘化丙啶、SYTOX绿、菲啶类化合物、吖啶类化合物、吲哚类化合物、咪唑类化合物、花青、TOTO、TO-PRO、SYTO、5-羧基-2,7-二氯荧光素、5-羧基荧光素 (5-FAM)、5-羧基萘基荧光素、5-羧基四甲基罗丹明 (5-TAMRA)、5-FAM (5-羧基荧光素)、5-HAT (羟基色胺)、5-ROX (羧基-X-罗丹明)、6-羧基罗丹明6G、7-氨基-4-甲基香豆素、7-氨基放线菌素D (7-AAD)、7-羟基-4-甲基香豆素、9-氨基-6-氯-2-甲氧基吖啶、ACMA (9-氨基-6-氯-2-甲氧基吖啶)、吖啶类化合物、Alexa Fluors、茜素、别藻蓝蛋白 (APC)、AMCA (氨基甲基香豆素)、Bodipy、羧基-X-罗丹明、儿茶酚胺、荧光素 (FITC)、羟基香豆素、丽丝胺罗丹明、Monobromobimane、俄勒冈绿、藻红蛋白、SYTO、硫杂二簇花青 (DiSC3)、硫磺素、X-罗丹明、C或四甲基罗丹明异硫氰酸酯。

[0396] 在实施方案中,放大器基团104是有机金属化合物、过渡金属络合物或配位络合物。示例性实例描述于,但不限于EP 0 180 492、EP 0 321 353、EP 0 539 435、EP 0 539 477、EP 0 569 496、EP139675、EP64484、US 4,283,382、US 4,565,790、US 4,719,182、US 4,735,907、US 4,808,541、US 4,927,923、US 5,162,508、US 5,220,012、US 5,324,825、US 5,346,996、US 5,373,093、US 5,432,101、US 5,457,185、US 5,512,493、US 5,527,684、US 5,534,622、US 5,627,074、US 5,696,240、US 6,100,394、US 6,340,744、US 6,524,727、US 6,717,354、US 7,067,320、US 7,364,597、US 7,393,599、US 7,456,023、US 7,465,747、US 7,625,930、US 7,854,919、US 7,910,088、US 7,955,859、US 7,968,904、US 8,007,926、US 8,012,609、US 8,017,254、US 8,018,145、US 8,048,659、US 8,067,100、US 8,129,897、US

8,174,001、US 8,183,586、US 8,193,174、US 8,221,719、US 8,288,763、US 8,362,691、US 8,383,249、US 8,492,783、US 8,632,753、US 8,663,603、US 8,722,881、US 8,754,206、US 8,890,402、US 8,969,862、US 9,012,034、US 9,056,138、US 9,118,028、US 9,133,205、US 9,187,690、US 9,193,746、US 9,312,496、US 9,337,432、US 9,343,685、US 9,391,288和US 9,537,107,其通过引用以其整体并入。示例性有机金属化合物、过渡金属络合物或配位络合物还包括在例如国际公开号WO 2016/015027和在国际申请号PCT/US 16/42589(其各自通过引用以其整体并入)中描述的那些。

[0397] 在实施方案中,放大器基团104是镧系元素配位络合物。

[0398] 在实施方案中,镧系元素配位络合物是在镧系元素(例如,Eu或Tb)和四齿配体之间的络合物。

[0399] 在实施方案中,镧系元素配位络合物是在镧系元素(例如,Eu或Tb)和穴状化合物配体之间的络合物。

[0400] 在实施方案中,放大器基团104是镧(La)、铈(Ce)、镨(Pr)、钕(Pm)、钐(Sm)、铕(Eu)、钆(Gd)、铽(Tb)、镝(Dy)、钬(Ho)、铒(Er)、铥(Tm)、镱(Yb)、镥(Lu)、钌(Ru)、铑(Rh)、钯(Pd)、锇(Os)、铱(Ir)或铂(Pt)的配位络合物。

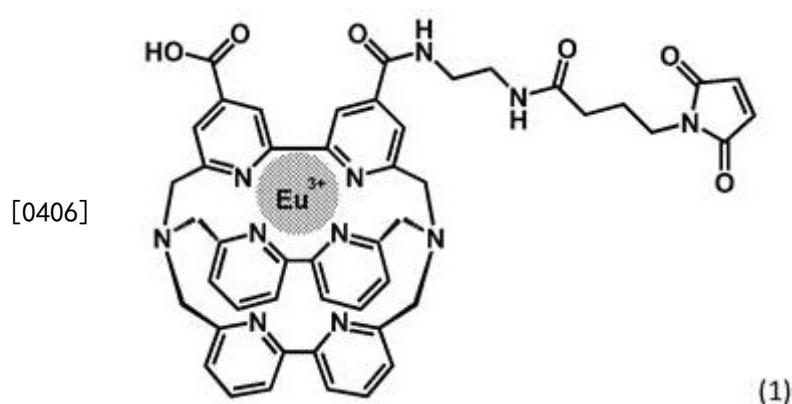
[0401] 在实施方案中,放大器基团104是稀土金属的配位络合物,其共同指由从原子序数为57的镧到原子序数为71的镥的15种元素的组组成的17种元素(镧系元素),和由原子序数为21的钪和原子序数为39的钇组成的两种额外元素。稀土金属的具体实例包括铕、铽、镧、铈、镨、钕、钷、钐、钆、镝、钬、铒、铥、镱、镥、钪和钇,优选铕和铽,且更优选铕。

[0402] 在实施方案中,放大器基团104是镧系元素(例如铕或铽)与二亚乙基三胺四乙酸或穴状化合物配体的配位络合物。

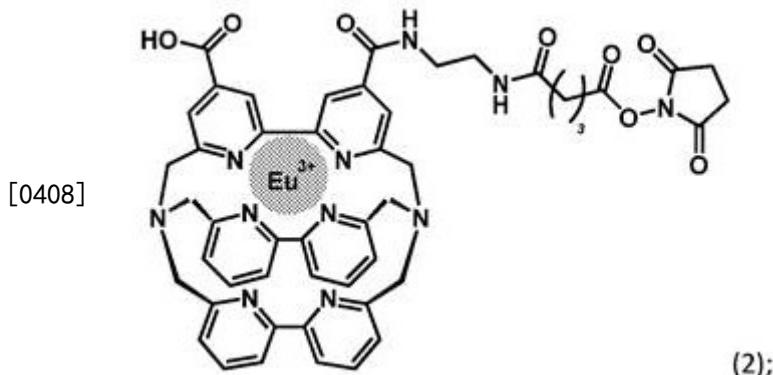
[0403] 在实施方案中,放大器基团104是镧系元素(例如铕或铽)与二亚乙基三胺四乙酸的配位络合物。

[0404] 在实施方案中,放大器基团104是镧系元素(例如铕或铽)与穴状化合物配体的配位络合物。

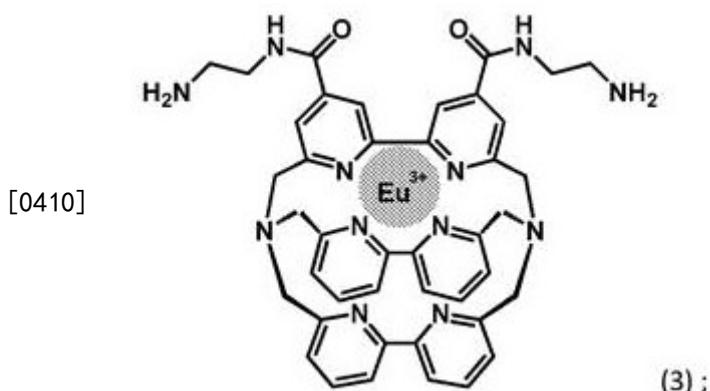
[0405] 在实施方案中,信号传导剂(例如,化学信号传导剂)包含以下或由以下形成:



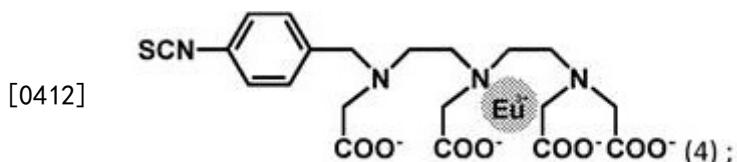
[0407] Eu-穴状化合物-马来酰亚胺



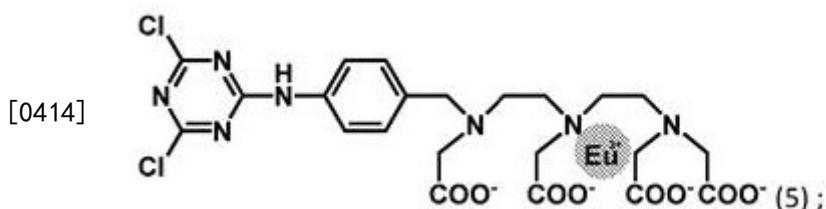
[0409] Eu-穴状化合物-NHS



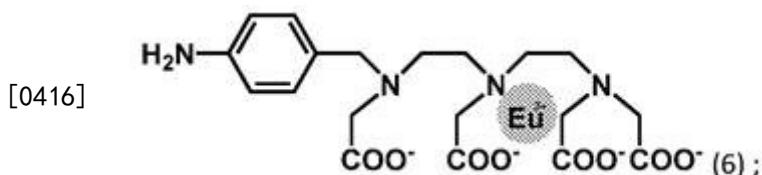
[0411] Eu-穴状化合物-二胺



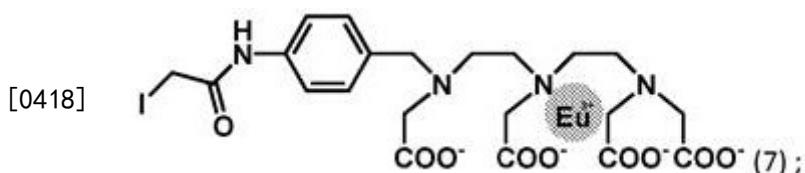
[0413] Eu-N1-ITC (Delfia)



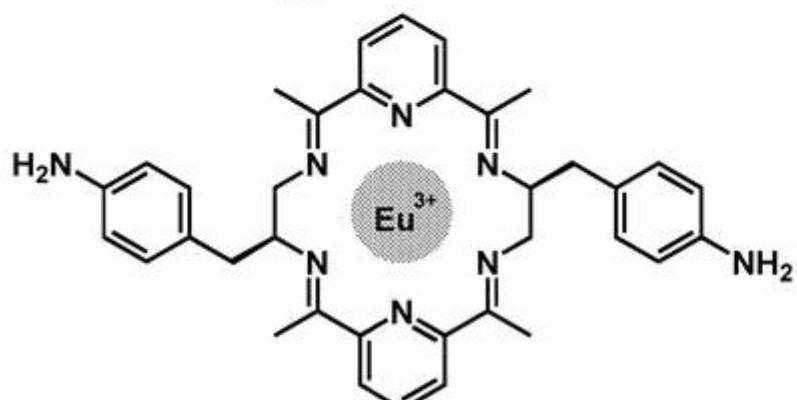
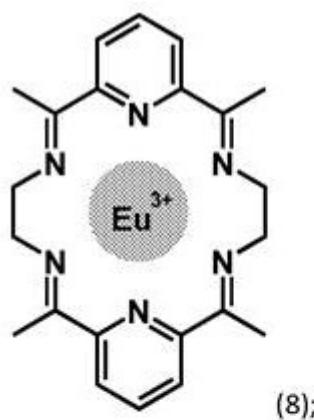
[0415] Eu-N1-DTA



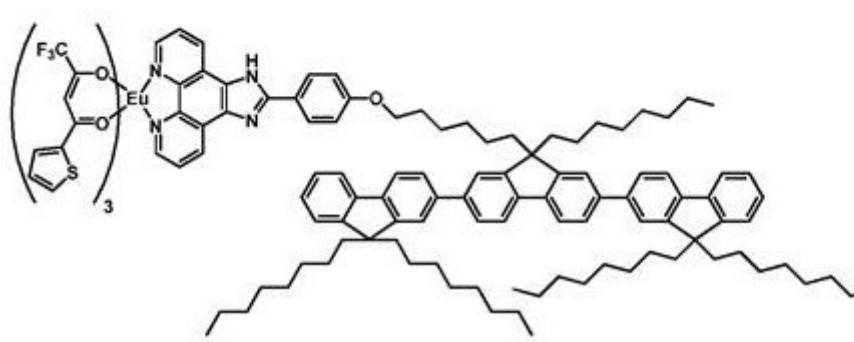
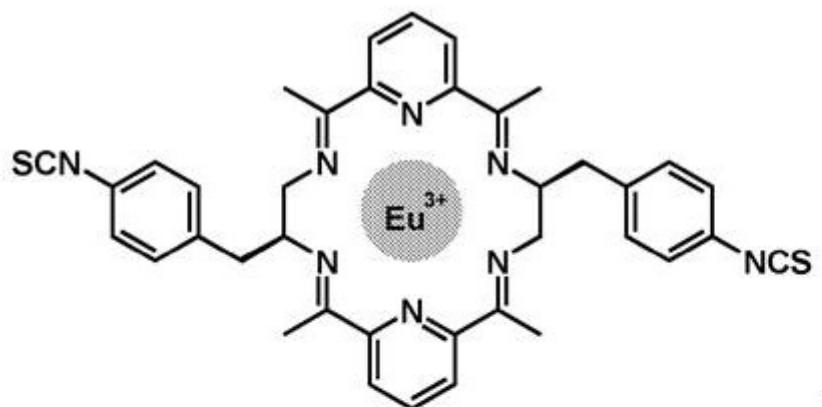
[0417] Eu-N1-氨基

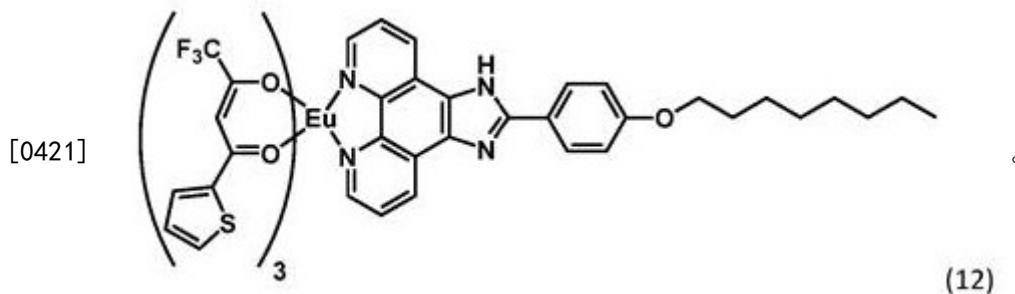


[0419] Eu-N1-碘乙酰胺基



[0420]





[0422] 在实施方案中,信号传导剂可以包含一种或多种顺磁性金属螯合物以形成造影剂。优选的顺磁性金属离子具有原子序数21-29、42、44或57-83。这包括过渡金属或镧系元素系列的离子,其具有一个、且更优选五个或更多个未配对电子和至少1.7玻尔磁子的磁矩。优选的顺磁性金属包括铬(III)、锰(II)、锰(III)、铁(II)、铁(III)、钴(II)、镍(II)、铜(II)、镨(III)、钕(III)、钐(III)、钆(III)、铽(III)、镝(III)、钬(III)、铒(III)、铕(III)和镱(III)。另外,本发明的信号传导剂还可以包含一种或多种超顺磁性颗粒:

[0423] 在实施方案中,信号传导剂可以包含一种或多种金属,其与荧光化合物一起或作为荧光化合物的一部分包括在金属络合物中:金属络合物包括具有Al、Zn、Be等;稀土金属,诸如Tb、Eu或Dy;或过渡金属诸如Pt或Ir作为中心金属,且具有噁二唑、噻二唑、苯基吡啶、苯基苯并咪唑或喹啉结构作为配体的金属络合物,诸如铝喹啉醇络合物、苯并喹啉醇铍络合物、苯并噁唑锌络合物、苯并噻唑锌络合物、偶氮甲基锌络合物、卟啉锌络合物和铕络合物。

[0424] 在实施方案中,信号传导剂可以包含发光体(供体),其特征在于高发光量子效率和长发光衰减时间(>100 ns)。优选的发光体是钯、铑、铂、钌、锇、稀土(特别是铕和镧)的阳离子、金属有机络合物。这些金属有机络合物的有机部分可以由例如来自卟啉类化合物、联吡啶类化合物、菲咯啉类化合物或其它杂环化合物的组的配体组成。

[0425] 在实施方案中,能够结合微生物表面的信号传导剂包含抗体(例如,单克隆或多克隆)、修饰的抗体(例如,生物素化的单克隆抗体、生物素化的多克隆抗体、铕螯合物-抗体、辣根过氧化物酶缀合的抗体)、抗体变体(例如,Fab:片段,抗原结合(一个臂);F(ab')₂:片段,抗原结合,包括铰链区(两个臂);Fab':片段,抗原结合,包括铰链区(一个臂);scFv:单链可变片段;二-scFv:二聚单链可变片段;sdAb:单结构域抗体;双特异性单克隆抗体;三功能抗体;和BiTE:双特异性T细胞接合者)、WGA-生物素、多粘菌素B-生物素、凝集素、天然肽、合成肽、合成和/或天然配体、合成和/或天然聚合物、合成和/或天然糖聚合物、碳水化合物结合蛋白和/或聚合物、糖蛋白结合蛋白和/或聚合物、带电荷的小分子、其它蛋白、噬菌体和/或适体。

[0426] 如本文所用,术语“抗体”是指任何本文所述类型的抗体、修饰的抗体或抗体片段或如本领域已知类型的抗体、修饰的抗体或抗体片段。因此,“包含抗体的信号传导剂”包括,例如,包含未修饰的单克隆抗体、Fab片段和三功能抗体的信号传导剂。

[0427] 在实施方案中,能够结合微生物表面的信号传导剂包含镧系元素配位络合物、生物素、抗体和/或酶。

[0428] 在实施方案中,能够结合微生物表面的信号传导剂包含结构或由结构形成,所述结构包含抗体、凝集素、天然肽、合成肽、合成和/或天然配体、合成和/或天然聚合物、合成

和/或天然糖聚合物、碳水化合物结合蛋白和/或聚合物、糖蛋白结合蛋白和/或聚合物、带电荷的小分子、其它蛋白、噬菌体和/或适体。

[0429] 在实施方案中,能够结合微生物表面的信号传导剂包含放大器基团104,其包含镧系元素配位络合物,和/或酶和链霉抗生物素蛋白和/或抗体和/或适体。

[0430] 在实施方案中,能够结合微生物表面的信号传导剂包含结合部分,其包含多克隆和/或单克隆抗体。

[0431] 在实施方案中,能够结合微生物表面的信号传导剂包含结合部分,其包含修饰的抗体。示例性的修饰的抗体包括生物素化的单克隆抗体、生物素化的多克隆抗体、铕螯合物-抗体和辣根过氧化物酶缀合的抗体。

[0432] 在实施方案中,能够结合微生物表面的信号传导剂包含结合部分,其包含抗体变体。示例性抗体变体包括Fab:片段,抗原结合(一个臂);F(ab')₂:片段,抗原结合,包括铰链区(两个臂);Fab':片段,抗原结合,包括铰链区(一个臂);scFv:单链可变片段;二-scFv:二聚的单链可变片段;sdAb:单结构域抗体;双特异性单克隆抗体;三功能抗体;和BiTE:双特异性T-细胞接合者)。

[0433] 在实施方案中,能够结合微生物表面的信号传导剂包含WGA-生物素或多粘菌素B-生物素。

[0434] 在实施方案中,能够结合微生物表面的信号传导剂包含结合部分,其包含合成和/或天然配体和/或肽。

[0435] 在实施方案中,配体和/或肽选自双(锌-二甲基吡啶胺)、TAT肽、丝氨酸蛋白酶、cathelicidins、阳离子糊精、阳离子环糊精、水杨酸、赖氨酸及其组合。

[0436] 在实施方案中,能够结合微生物表面的信号传导剂包含结合部分,其包含合成和/或天然聚合物和/或糖聚合物。

[0437] 在实施方案中,天然和/或合成聚合物是直链或支链的且选自支链淀粉、聚(N-[3-(二甲基氨基)丙基]甲基丙烯酰胺)、聚(亚乙基亚胺)、聚-L-赖氨酸、聚[甲基丙烯酸2-(N,N-二甲基氨基)乙基酯]及其组合。

[0438] 在实施方案中,天然和/或合成聚合物和/或糖聚合物包含部分,其包括但不限于壳聚糖、明胶、葡聚糖、海藻糖、纤维素、甘露糖、阳离子葡聚糖和环糊精、季胺、吡啶鎓三溴化物、组氨酸、赖氨酸、半胱氨酸、精氨酸、锍、𬭸或其组合,包括但不限于共嵌段、接枝和交替聚合物。

[0439] 在实施方案中,能够结合微生物表面的信号传导剂包含结合部分,其包含选自甘露糖结合凝集素、其它凝集素、膜联蛋白及其组合的糖蛋白。

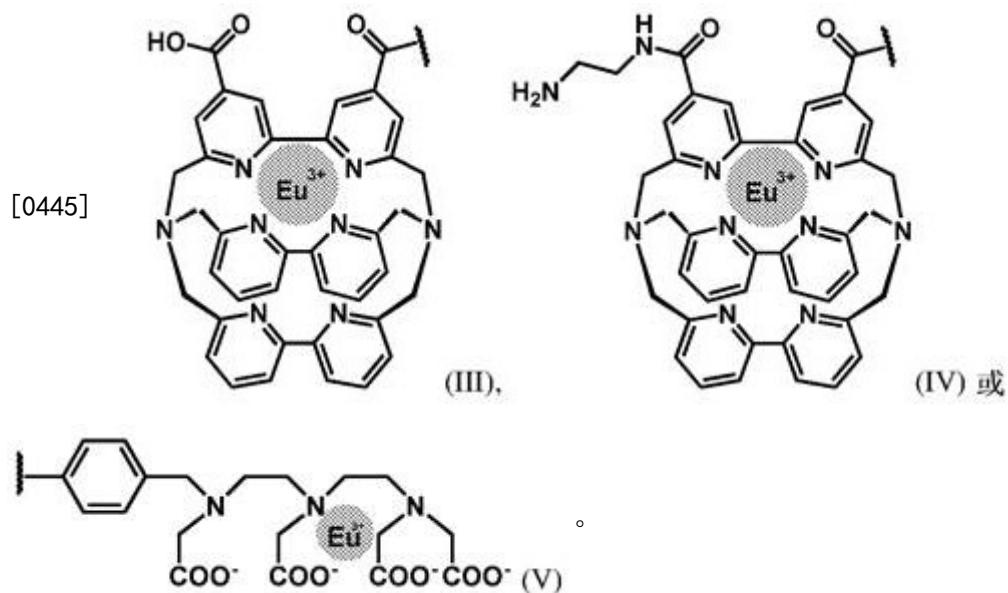
[0440] 在实施方案中,能够结合至微生物表面的信号传导剂包含:

[0441] 抗体;和

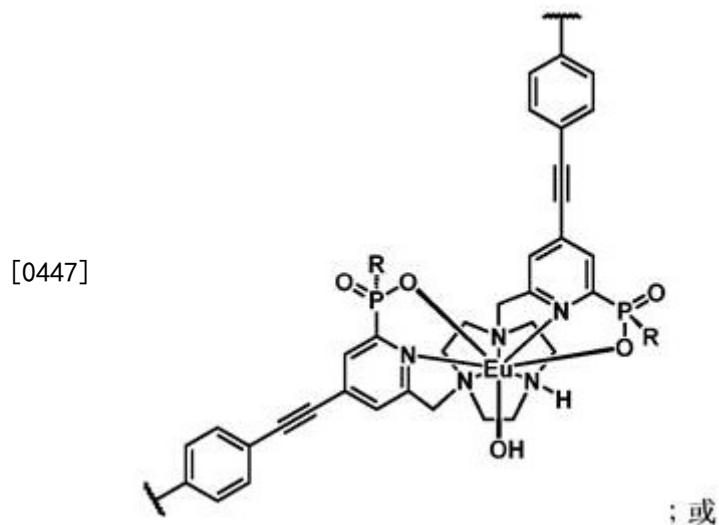
[0442] 铕配位络合物。

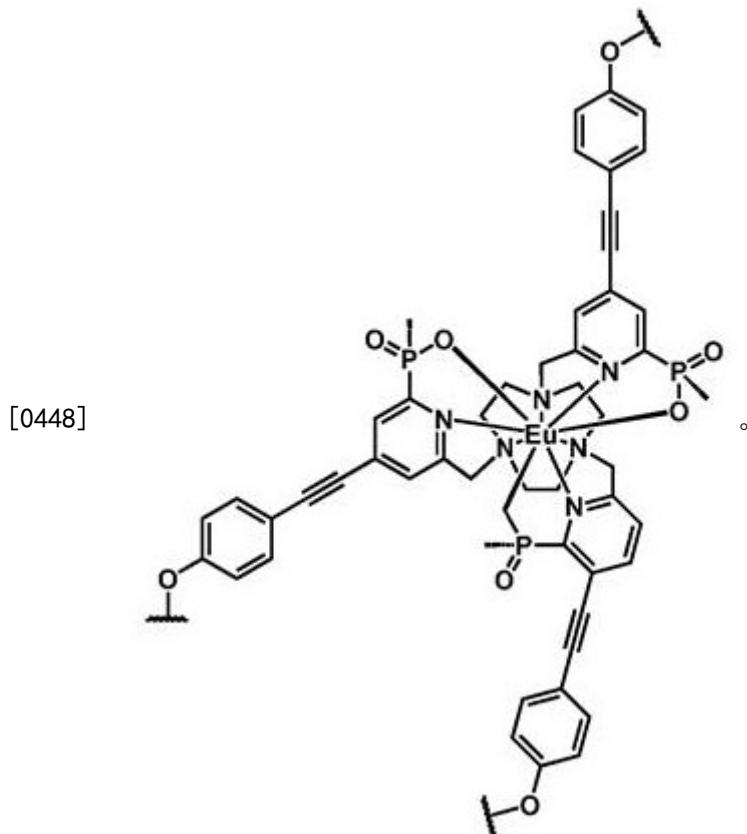
[0443] 在实施方案中,能够结合至微生物表面的信号传导剂包含接头基团L,其包含NH₂-PEG-生物素(2K)、NH₂-PEG-生物素(4K)、碘基-NHS-生物素、WGA-生物素或多粘菌素B-生物素。

[0444] 在实施方案中,能够结合至微生物表面的信号传导剂包含铕络合物,其包含:



[0446] 在实施方案中,能够结合至微生物表面的信号传导剂包含铕络合物,其包含:





[0449] 如以下工作实施例和整个说明书和附图中所公开的那样,本发明提供了至少:

[0450] · 对于12种细菌物种的75种菌株(包括具有革兰氏阴性杆的β-内酰胺),在目前公开的方法和CLSI标准之间的>89.9% MIC一致性(±1个稀释度),且没有主要/非常大的误差;

[0451] · 在目前公开的直接来自阳性血液培养物的方法和CLSI标准血液培养样品处理之间的等效MIC

[0452] · 检测低至 2×10^3 CFU/ml的革兰氏阳性和阴性物种;

[0453] · 通过信号传导剂对微生物的非特异性结合;

[0454] · 使用铕制剂;

[0455] · 具有数据输出的半自动装置使用。

[0456] 与本发明相关的额外教导描述于以下的一者或更多者中:EP139675;EP64484;US 2013/0217063;US 2014/0278136;US 2014/0323340;US 2014/0363817;US 2015/0064703;US 2015/0337351;US 2016/0010138;US 3,798,320;US 4,565,790;US 4,647,536;US 4,808,541;US 4,927,923;US 5,457,185;US 5,489,401;US 5,512,493;US 5,527,684;US 5,627,074;US 5,665,554;US 5,695,946;US 6,284,470;US 6,385,272;US 6,844,028;US 7,341,841;US 7,629,029;US 7,868,144;US 8,178,602;US 8,895,255;PCT/US2016/042589;和WO/2016015027,其各自通过引用以其整体并入本文。

[0457] 任何上述方面和实施方案可以与如附图、发明概述和/或详述(包括以下实施例)中所公开的任何其它方面或实施方案组合。

[0458] 尽管与本文所述的方法和材料类似或等效的方法和材料也可以用于实施或测试本发明,但下文描述合适的方法和材料。本文提到的所有出版物、专利申请、专利和其它参

考文献以其整体通过引用并入。本文引用的参考文献不被承认是所请求保护的发明的现有技术。此外,材料、方法和实施例仅是说明性的,并不旨在进行限制。

实施例

[0459] 实施例1:本发明提供了抗微生物剂的最小抑制浓度 (MIC) 的快速和准确的测定

[0460] 在本实施例中,将用于快速测定针对金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 或铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 的抗微生物剂的最小抑制浓度 (MIC) 的本发明与需要过夜孵育金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*) 或铜绿假单胞菌 (*P. aeruginosa*) 的标准方法进行比较。

[0461] 使用Mueller-Hinton (MH) 液体培养基在37°C下在剧烈摇动下使金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) (ATCC菌株29213) 的培养物生长过夜。同时,用32μg/ml至0.125μg/ml的克林霉素的系列稀释液和无克林霉素对照(均在MH液体培养基中)制备两个无菌96孔微孔板。然后使用McFarland标准技术将来自过夜培养物的金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*) 浓度设定为 5×10^5 CFU/ml,用于在600nm处的光密度读数。将微孔板(每个孔含有200 μL)用制备的抗微生物剂的稀释液接种,并在37°C下孵育3.5小时用于使用本文公开的发明(例如,“快速-AST”技术)测定抗微生物剂敏感性或在37°C下孵育过夜(> 12小时)用于OD₆₀₀对照。4小时后从振荡培养箱中移取“快速-AST”微孔板,并将多克隆兔抗金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*) 抗体的辣根过氧化物酶 (HRP) 缀合物 (Fitzgerald Industries International, Inc.) 加入每个孔中。然后将板在室温下振荡20分钟以使其结合,然后将微孔板以4,000 × g离心,以沉淀剩余的完整细菌。然后吸出MH液体培养基并添加无菌液体培养基,总共洗涤3次。在最终抽吸后,添加由3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB) 和过氧化氢组成的稳定化的显色溶液 (ThermoFisher),并用酶标仪 (microplate reader) (Vmax, Molecular Devices) 监测在650nm和450nm处的光密度达10分钟。孵育过夜后,从培养箱中取出OD₆₀₀对照微孔板,并直接读取在600nm处的光密度 (Vmax, Molecular Devices)。最后,根据数据测定每个CLSI标准的MIC,如图5中所示。通过两种技术测定的MIC是相同的:0.125 μg/ml。

[0462] 类似地,使用MH液体培养基在37°C下在剧烈摇动下使铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) (ATCC菌株27853) 的培养物生长过夜。同时,用32μg/ml至0.125μg/ml的头孢他啶的系列稀释液和无头孢他啶对照(均在MH液体培养基中)制备两个无菌96孔微孔板。然后使用McFarland标准技术将来自过夜培养物的铜绿假单胞菌 (*P. aeruginosa*) 浓度设定为 5×10^5 CFU/ml,用于在600nm处的光密度读数。将这些微孔板(每个孔含有200 μL)用制备的抗微生物剂稀释液接种,并在37°C下孵育3.5小时用于使用本文公开的发明测定抗微生物剂敏感性或在37°C下孵育过夜(> 12小时)用于OD₆₀₀对照。4小时后从振荡培养箱中移取“快速-AST”微孔板,并将多克隆兔抗铜绿假单胞菌 (*P. aeruginosa*) 抗体 (Abcam) 的辣根过氧化物酶 (HRP) 缀合物的溶液加入每个孔中。然后将板在室温下振荡20分钟以使其结合,然后将微孔板以4,000 × g离心,以沉淀剩余的完整细菌。然后吸出MH液体培养基并添加无菌液体培养基,总共洗涤3次。在最终抽吸后,添加由3,3',5,5'-TMB和过氧化氢组成的稳定化的显色溶液 (ThermoFisher),并用酶标仪 (Vmax, Molecular Devices) 监测在650nm和450nm处的光密度达10分钟。图6中显示的数据描绘从开始与检测溶液孵育后的5分钟点。孵育过夜后,从培养箱中取出OD₆₀₀对照微孔板,并直接读取在600nm处的光密度 (Vmax,

Molecular Devices)。最后,根据数据测定每个CLSI标准的MIC,如图6中所示。通过两种技术测定的MIC是相同的:4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

[0463] 本发明在确定MIC中的准确性清楚地表明,数据的向下区域的斜率(图5中和图6中)在本发明和过夜培养物之间几乎相同。

[0464] 这些数据显示,本发明能够准确地测定抗微生物剂的MIC,其至少与需要过夜孵育细菌培养物的标准方法一样准确。

[0465] 实施例2:本发明提供了对于抗微生物剂抗性细菌的抗微生物剂的最小抑制浓度(MIC)的快速和准确的测定

[0466] 在本实施例中,本发明用于分别比较抗微生物剂抗性的铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*)、金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)和大肠杆菌(*E. coli*)菌株的MIC,抗微生物剂敏感的铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*)、金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)和大肠杆菌(*E. coli*)菌株的MIC。

[0467] 如实施例1中所述测定敏感的铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*)菌株ATCC 27853的MIC,关键差异在于使用亚胺培南作为抗微生物剂(使用32 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至0.125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的连续稀释液)。类似地测定抗性铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*)菌株ATCC BAA-2108的MIC。两种菌株均使用相同的96孔微孔板,每种菌株专用48个孔。实验重复3次,具有结果相似,且所得数据显示于图7中。敏感菌株的MIC为2 $\mu\text{g}/\text{ml}$;抗性菌株的MIC为32 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

[0468] 对于金黄色葡萄球菌(*S. aureus*),使用与上文实施例1中所述相同的程序,不同之处在于使用甲氧西林作为抗微生物剂并使用抗性菌株ATCC 43300。对于大肠杆菌(*E. coli*),使用与上文对于铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*)所述相同的程序,除了使用大肠杆菌(*E. coli*)敏感(25922)和抗性(35218)菌株且使用氨苄青霉素作为抗微生物剂,且使用多克隆兔抗大肠杆菌(*E. coli*)抗体的HRP缀合物(Abcam)作为允许信号传导剂结合细菌的化学部分。将与检测溶液孵育5分钟后的“快速-AST”值与OD₆₀₀过夜对照进行比较,并将数据汇编于图8中。

[0469] 这些数据显示,本发明能够准确地区分抗微生物剂对于抗微生物剂抗性的细菌菌株和抗微生物剂敏感的相同细菌菌株的MIC。

[0470] 实施例3:本发明在比标准方法所需浓度低两百倍的微生物浓度处提供了可检测信号

[0471] 在本实施例中,将本发明中提供可检测信号所需的微生物浓度与需要过夜孵育金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)的标准方法进行比较。

[0472] 如实施例1中所述将金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)培养过夜。在96孔微孔板中进行过夜菌落的连续稀释,并在600 nm处读取吸光度。将这些值与McFarland标准进行比较,以获得以CFU/ml计的细菌浓度。曲线的可定量区域显示于图9中(OD₆₀₀);实验重复三次,结果相似。如实施例2中所述,用金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)特异性信号传导剂将金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)的类似稀释系列处理20分钟。遵循实施例2的程序,将微生物离心并洗涤三次,并添加检测溶液。

[0473] 在图9中,显示所得吸光度vs. McFarland标准测定的金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)浓度。如箭头所示,从临床实验室标准研究所(CLSI)-标准AST实验的起始细菌浓度(即,5 $\times 10^5$ CFU/ml)可见“快速-AST”信号。相反,光学信号直到~10⁸ CFU/ml才能实现准确

的定量。

[0474] 这些数据显示,本发明能够在比标准方法所需浓度低两百倍的微生物培养浓度处提供了可检测且可用的信号。

[0475] 实施例4:本发明提供了跨越多种致病性细菌的物种和菌株与获得自CLSI参考方法的MIC值类似的MIC值,但其时间显著短于CLSI方法所需的时间。

[0476] 在本实施例中,将用于快速测定抗微生物剂对于多种致病性细菌的MIC的本发明与临床实验室标准研究所(CLSI)方法进行比较。

[0477] 如图10中所示,在3.5小时孵育后获得六种细菌的MIC测定,而在16小时孵育(对于氨苄青霉素处理的培养物)或24小时孵育(对于苯唑西林处理的培养物)后获得CLSI AST参考方法测定。药物,信号传导剂/化学部分(“抗体-HRP缀合物”)和细菌菌株列于图11中。对于信号传导剂/化学部分,小麦胚芽凝集素(WGA)HRP缀合物用于表皮葡萄球菌(*S. epidermidis*)测试,并且“快速-AST”测定遵循上述实施例2的程序。所有临床分离物均为未鉴定的样品,并在使用前最少亚培养两次。测试总共87种个别样品,包括但不限于以下细菌物种:大肠杆菌(*E. coli*)、金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)、铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*)、肺炎克雷伯氏菌(*K. pneumoniae*)、粪肠球菌(*E. faecalis*)、凝固酶阴性葡萄球菌(*Coagulase-Negative Staphylococci*)、奇异变形杆菌(*P. mirabilis*)、屎肠球菌(*E. faecium*)、*E. clocae*和鲍曼不动杆菌(*A. baumannii*)。值得注意的是,在本实施例中测试的细菌物种(除了普通变形杆菌(*P. mirabilis*))一起负责许多临床实验室中的>90%的阳性血液培养物。因此,本发明与人类感染性疾病具有明显的临床相关性。在本发明和CLSI方法之间的MIC值高度相似,但本发明需要三个半小时孵育,而CLSI方法需要十六小时或二十四小时孵育。

[0478] 这些数据显示,本发明能够准确地测定抗微生物剂的MIC,其至少与CLSI方法一样准确,但花费显著更少的时间来测定MIC;因此,本发明大大减少了为患者提供适当治疗方案(即特定抗微生物剂和以特定剂量)之前的时间。

[0479] 实施例5:对于金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)和肺炎克雷伯氏菌(*K. pneumoniae*)样品,跨越各种各样抗微生物剂,本发明提供了与获得自CLSI参考方法的那些MICs值类似的MICs值,但时间显著更少。

[0480] 在本实施例中,当处理金黄色葡萄球菌(*S. aureus*) (革兰氏阳性细菌)或肺炎克雷伯氏菌(*K. pneumoniae*) (革兰氏阴性细菌)时,本发明用于快速测定多种抗微生物剂的MIC,并与通过CLSI方法获得的MIC值进行比较。

[0481] 如上文实施例2中所述,将商业的全板干燥的抗微生物板SensiTitre®(ThermoFisher)用于本发明的方法中,其中在4小时时评价细菌活力。代表性的金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)和肺炎克雷伯氏菌(*K. pneumoniae*)结果显示于图12A至图12C中。对于除了用金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)进行的红霉素实验和用肺炎克雷伯氏菌(*K. pneumoniae*)进行的四环素和亚胺培南实验以外的所有实验,在获得自本发明“快速-AST”的MIC值和CLSI获得的结果之间存在优秀的一致性;然而,根据FDA,在本发明和CLSI结果之间的差异是“微小误差”,参见图12C。

[0482] 这些数据显示,本发明能够对于两种不同的细菌物种准确地测定多种抗微生物剂的MIC,其至少与CLSI方法一样准确,但花费显著更少的时间来测定MIC;因此,本发明大大

减少了为患者提供适当治疗方案(即特定抗微生物剂和以特定剂量)之前的时间。

[0483] 实施例6:使用多种金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)和大肠杆菌(*E. coli*)临床菌株,跨越各种各样的抗微生物剂,本发明提供了与获得自CLSI参考方法的MICs值类似的MICs值,但时间显著更少。

[0484] 在本实施例中,当处理金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)(革兰氏阳性细菌)或大肠杆菌(*E. coli*)(革兰氏阴性细菌)时,本发明用于快速测定多种抗微生物剂的MIC,并与通过CLSI方法获得的MIC值进行比较。

[0485] 如实施例5中,使用SensiTitre®板(ThermoFisher)进行这些实验。使用与实施例2中所述相同的程序,除了根据ThermoFisher的说明书向每个孔中添加50μL接种物。进行CLSI参考方法24小时(苯唑西林和万古霉素)和18小时(左氧氟沙星),并且对于使用本发明的所有实验(“快速-AST”方法),在4小时内进行(包括三个半小时的孵育)。结果显示于图13A至图13C和图14A至图14D中。图13A至图13C和图14A至图14D中的暗线显示每种抗微生物剂的CLSI断点。基本协议“EA”和分类协议“CA”由FDA在其自动AST系统的II类指导文件中定义。另外,对于金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)的一种临床物种,如上所述的多种“快速-AST”测定和CLSI标准参考测定在一个月的过程中运行以确定结果的一致性;参见图15。

[0486] 这些数据显示,当在金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)和大肠杆菌(*E. coli*)临床菌株上用多种抗微生物剂进行测试时,本发明(“快速-AST”方法)提供了与CLSI参考方法一致的结果,但花费显著更少的时间来测定MIC;因此,本发明大大减少了为患者提供适当治疗方案(即特定抗微生物剂和以特定剂量)之前的时间。

[0487] 实施例7:本发明提供了多种抗微生物剂对于抗微生物剂抗性的细菌的MIC的快速和准确测定。

[0488] 在本实施例中,本发明用于测定多种抗微生物剂对于抗微生物剂抗性的大肠杆菌(*E. coli*)菌株的MIC与对于抗微生物剂敏感的大肠杆菌(*E. coli*)菌株的MIC。

[0489] 大肠杆菌(*Escherichia coli*)(QC菌株,ATCC 25922)和临床抗性大肠杆菌(*E. coli*)(“临床”)两者在标准无菌条件下在Mueller-Hinton (MH)液体培养基中在37°C下振荡培养过夜。然后使用McFarland标准技术将来自过夜培养物的大肠杆菌(*E. coli*)浓度设定为 5×10^5 CFU/ml,用于在600nm处的光密度读数。同时,用特定抗微生物剂(参见下文)和无抗微生物剂(盐水)对照的系列稀释液(均在MH液体培养基中)制备两个无菌96孔微孔板。将微孔板(每个孔含有200μL)与制备的抗微生物剂稀释液接种,并在37°C下孵育3小时45分钟用于使用本发明(“快速-AST”技术)进行测定。3小时45分钟后从振荡培养箱中取出“快速-AST”微孔板,并以2500g离心2.5分钟以沉淀。然后吸出MH液体培养基并向两个微孔板的每个孔中加入100μL水。然后,将10μL化学部分(此处,铕-穴状化合物制剂)加入每个孔中(至20ng/孔),并向每个孔中加入10μL 5%戊二醛(作为信号传导剂)。然后将两个微孔板以300rpm摇动30分钟。之后,将两个板以2500g离心2.5分钟以沉淀。吸出溶液并向每个孔中加入200μL PBS-tween洗涤液,随后离心以沉淀。在吸出溶液后,发生200μL PBS-tween的第二次相同的洗涤,随后最后离心以沉淀。然后在BioTek HI读板器上使用时间分辨的荧光读板。该方法用以下抗微生物剂制剂进行:以8 μg/ml至0.12 μg/ml的浓度稀释的亚胺培南(图16);以32 μg/ml至0.25 μg/ml的浓度稀释的氨苄青霉素(图17);以32 μg/ml至0.03 μg/ml的浓度稀释的头孢他啶(图18);以16 μg/ml至0.06 μg/ml的浓度稀释的庆大霉素(图

19) ;以8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至0.06 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度稀释的左氧氟沙星(图20) ;以32 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度稀释的三甲氧苄/磺胺甲噁唑(SXT)(图21) ;以4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至0.015 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度稀释的环丙沙星(图22) ;和以64 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至0.12 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度稀释的头孢曲松(图23) 。

[0490] 如图16至图23中可以看出的那样,大肠杆菌(*Escherichia coli*) (QC菌株,ATCC 25922) 和临床抗性大肠杆菌(*E. coli*) (“临床”) 对亚胺培南、头孢他啶、庆大霉素、左氧氟沙星、环丙沙星和头孢曲松具有类似的MIC,而两种菌株对于氨苄青霉素和三甲氧苄/磺胺甲噁唑(SXT) 具有不同的MIC。因此,数据显示临床抗性大肠杆菌(*E. coli*) 菌株对氨苄青霉素和三甲氧苄/磺胺甲噁唑(SXT) 具有抗性。因此,如果患者呈现感染该菌株(或类似菌株),则不应给药氨苄青霉素和三甲氧苄/磺胺甲噁唑(SXT) ;相反,应当给药亚胺培南、头孢他啶、庆大霉素、左氧氟沙星、环丙沙星和头孢曲松。

[0491] 这些数据显示,本发明能够准确地区分抗微生物剂对于作为对于一种或多种抗微生物剂抗性的细菌的临床相关菌株的MIC和抗微生物剂对于作为对于抗微生物剂敏感的相同细菌菌株的MIC;因此,相对于标准方法,本发明可以以大大减少量的时间为患者提供适当的治疗方案,即特定的抗微生物剂和以特定的剂量。

[0492] 实施例8:本发明提供了多种抗微生物剂对于抗微生物剂敏感的细菌的MIC的快速和准确测定。

[0493] 在本实施例中,本发明用于测定多种抗微生物剂对于抗微生物剂敏感的金黄色葡萄球菌(*S. aureus*) 菌株的MIC。

[0494] 金黄色葡萄球菌(*S. aureus*) (QC菌株29213) 在标准无菌条件下在Mueller-Hinton(MH) 液体培养基中在37℃下摇动培养过夜。然后使用McFarland标准技术将来自过夜培养物的金黄色葡萄球菌(*S. aureus*) 浓度设定为 5×10^5 CFU/ml,用于在600nm处的光密度读数。同时,用特定抗微生物剂(参见下文) 和无抗微生物剂(盐水) 对照的系列稀释液(均在MH液体培养基中) 制备两个无菌96孔微孔板。

[0495] 将微孔板(每个孔含有100 μL) 与制备的抗微生物剂稀释液接种,并在37℃下孵育3小时45分钟用于使用本发明(“快速-AST”技术) 进行测定。3小时45分钟后从振荡培养箱中取出“快速-AST”微孔板,并以 $2500 \times g$ 离心2.5分钟以沉淀。然后吸出MH液体培养基并向两个微孔板的每个孔中加入100 μL 25 mM PBS。然后,将10 μL 化学部分(此处,铕-穴状化合物制剂) 加入每个孔中(至20ng/孔),并向每个孔中加入10 μL 0.005%戊二醛(作为信号传导剂)。然后将两个微孔板以300 rpm摇动30分钟。之后,将两个板以 $2500 \times g$ 离心2.5分钟以沉淀。吸出溶液并向每个孔中加入200 μL PBS-tween洗涤液,随后离心以沉淀。在吸出溶液后,发生200 μL PBS-tween的第二次相同的洗涤,随后最后离心以沉淀。将200 μL PBS-tween加入每个孔中。然后在BioTek HI读板器上使用时间分辨的荧光读板。该方法用以下抗微生物剂制剂进行:以32 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度稀释的万古霉素(图24) ;以8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至0.0625 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度稀释的青霉素(图25) ;和以16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至0.0125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度稀释的替考拉宁(图26) 。

[0496] 如图24至图26中所见,本发明的金黄色葡萄球菌(*S. aureus*) (QC菌株29213) 测定的MIC与获得自标准CLSI参考方法的MIC类似:万古霉素:0.5-2 $\mu\text{g}/\text{ml}$;青霉素:0.25-2 $\mu\text{g}/\text{ml}$;和替考拉宁0.25-1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

[0497] 这些数据显示,本发明能够准确地测定多种抗微生物剂的MIC;因此,相对于标准

方法,本发明可以以大大减少量的时间为患者提供适当的治疗方案,即特定的抗微生物剂和以特定的剂量。

[0498] 实施例9:本发明提供了直接从血液培养样品快速和准确地测定抗微生物剂的MIC,而无需进行亚培养和过夜生长孵育。

[0499] 在本实施例中,本发明用于直接从血液培养样品快速测定抗微生物剂的MIC。

[0500] 获得了对于大肠杆菌(*E. coli*)、金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)和肺炎克雷伯氏菌(*K. pneumoniae*)各自的一个临床样品。将分离物转运在琼脂斜面上,亚培养,并在-80℃下储存。将样品从冰箱中取出,使其温热至室温,并在5%绵羊血液-胰蛋白酶处理的大豆琼脂(TSA) petri皿(ThermoFisher)上划线。将petri皿置于35℃的培养箱中过夜。挑取单个菌落并在新平板上重复划线过程,随后进行第二次35℃过夜孵育。挑取总共三至五个菌落并分散至1 mL无菌盐水(Hardy Diagnostics)中,并通过在600 nm处的光密度测量(Molecular Devices M2)来测定浓度。将样品在有盖烧瓶中在40mL无菌阳离子调节的Mueller Hinton液体培养基(MHB,Hardy Diagnostics)中分两步稀释至2 CFU/ml。

[0501] 将烧瓶在35℃下装入摇床培养箱中过夜,以模拟BD BACTEC®血液培养系统的性能。10小时后将烧瓶置于4℃,此时大肠杆菌(*E. coli*)浓度被测定为~ 1×10^8 CFU/ml。这是商业血液培养系统(诸如BD BACTEC和bioMerieux BacT/Alert)记录阳性血液培养物的近似浓度。通过将血液培养样品划线在5%绵羊血液TSA-petri皿上,将这些在35℃下孵育过夜,并测定菌落计数来测定10小时孵育时间。

[0502] 通过将该“阳性”血液培养物划线至TSA板上并在35℃下孵育过夜来采集亚培养“对照”样品。然后进行标准CLSI液体培养基微量稀释参考方法,如前所述。

[0503] 然后通过遵循SepsiTyper (Bruker Daltonics)方案来进行基于离心的分离。简而言之,将1 mL裂解缓冲液(Bruker Daltonics)加入5 mL含有 1×10^8 CFU/ml大肠杆菌(*E. coli*)的MHB液体培养基中。将混合物等分至六个微量离心管中,涡旋10秒,然后以13,000rpm旋转2分钟。移取上清液并弃去,向每个管中加入1 mL洗涤缓冲液(Bruker),并将管以13,000rpm离心1分钟。再次移取上清液并弃去。通过上下吸移将各沉淀物重悬于500μL无菌盐水中。将溶液混合并使用Promega Bactitre-Glo™细菌细胞活力试剂盒测定细菌浓度。

[0504] 将样品以~ 5×10^5 CFU/ml的浓度稀释至MHB中。然后进行“快速-AST”测定(如实施例2中所述),并比较MIC测定。临床样品上的“快速-AST”方法提供了与需要亚培养的标准方法类似的MIC值,参见图27和图28。

[0505] 这些数据显示,本发明(“快速-AST”程序),当直接用于临床样品上时,提供了与标准MIC-测定方法一致的结果,所述标准MIC-测定方法需要在过夜生长之前进行亚培养步骤;因此,本发明大大减少了为患者提供适当治疗方案(即特定抗微生物剂和以特定剂量)之前的时间。

[0506] 实施例10:与铕缀合的链霉抗生素蛋白结合生物素化的小麦胚芽凝集素,其特异性结合革兰氏阳性细菌。

[0507] 在本实施例中,铕用作在包含小麦胚芽凝集素的信号传导剂中的化学部分,所述小麦胚芽凝集素特异性结合革兰氏阳性细菌。

[0508] 将细菌(金黄色葡萄球菌(*S. aureus*))以范围为 1×10^5 至 1×10^9 的浓度跨越96孔板

接种于pH 6的MES缓冲液中。向每个含有细菌的孔和相应的对照孔中加入2 μ g生物素化的小麦胚芽凝集素(Sigma),并将反应溶液孵育15分钟,以便于用所选报告物标记孔内的细菌的外部。然后,添加市售的链霉抗生物素蛋白-铕(例如,来自Perkin-Elmer)至0.4 μ g/ml的每孔最终浓度。再孵育15分钟后,使用Thermo Scientific Heraeus Multifuge X3以2500 \times g的速度将测试板离心2.5分钟,以便将细菌沉淀在板的底部,同时在上清液中留下任何未相关的报告物。然后使用BioTek Multiflo X洗板机将板吸取,以除去上清液和未反应的报告物,然后添加洗涤缓冲液。将该洗涤程序再重复两次,以彻底除去任何未反应的报告物。最后,在添加Delfia增强溶液之前,向经吸取的孔中添加读数缓冲液。然后将板孵育15分钟,以允许在BioTek HI读板器上使用时间分辨的荧光测量铕之前增强铕,如图29中所示。

[0509] 这些数据显示,使用铕作为在信号传导剂中的化学部分能够准确地定量溶液中的细菌浓度。

[0510] 实施例11:与铕缀合的链霉抗生物素蛋白结合生物素化的多粘菌素B,其特异性结合革兰氏阴性细菌。

[0511] 在本实施例中,铕用作在包含多粘菌素B的信号传导剂中的化学部分,所述多粘菌素B特异性结合革兰氏阴性细菌。

[0512] 将细菌(大肠杆菌(*E. coli*))以范围为1 \times 10⁵至1 \times 10⁹的浓度跨越96孔板接种于pH 6的MES缓冲液中。向每个含有细菌的孔和相应的对照孔中加入生物素化的多粘菌素(Hycult Biosciences),最终稀释度为1:200,并将反应溶液孵育15分钟,以便于用所选报告物标记孔内的细菌的外部。然后,添加市售的链霉抗生物素蛋白-铕(例如,来自Perkin-Elmer)至0.4 μ g/ml的每孔最终浓度。再孵育15分钟后,使用Thermo Scientific Heraeus Multifuge X3以2500 \times g的速度将测试板离心2.5分钟,以便将细菌沉淀在板的底部,同时在上清液中留下任何未相关的报告物。然后使用BioTek Multiflo X洗板机将板吸取,以除去上清液和未反应的报告物,然后添加洗涤缓冲液。将该洗涤程序再重复两次,以彻底除去任何未反应的报告物。最后,在添加Delfia增强溶液之前,向经吸取的孔中添加读数缓冲液。然后将板孵育15分钟,以允许在BioTek HI读板器上使用时间分辨的荧光测量铕之前增强铕,如图30中所示。

[0513] 这些数据显示,使用铕作为在信号传导剂中的化学部分能够准确地定量溶液中的细菌浓度。

[0514] 实施例12:铕检测器提供了更大的信号范围,且因此提供了更准确的MIC数据。

[0515] 该实施例比较了铕和HRP作为信号传导剂(包含特异性结合细菌的抗体)中的化学部分以准确地测定MIC的能力。

[0516] 使用含有阳离子调节的Mueller Hinton液体培养基和适当的抗微生物剂稀释液的96孔板,通过将菌落稀释至盐水中以达到0.5的McFarland值(其使用分光光度计进行验证)来制备细菌。将其以1:20稀释至盐水中,并向每个孔中加入10 μ l接种物。将细菌抗微生物剂测试板在35°C下孵育,以150 rpm振荡3小时45分钟。该孵育后,将阳离子磁珠和抗金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)抗体(与辣根过氧化物酶或铕缀合;由Cisbio Assays进行定制缀合)加入每个孔中并孵育20分钟。使用自动洗板机,捕获磁珠,并用PBS-Tween20 (0.1%)洗涤各孔的内容物三次。然后,使用时间分辨的荧光(铕)直接成像孔,或者加入TMB并允许孵育15分钟,其后通过加入1M硫酸终止反应,并测量每个孔在450nm处的吸光度。

[0517] 如图31中所示,使用铕作为化学部分测定的SXT的MIC比使用HRP作为化学部分测定的MIC更准确。

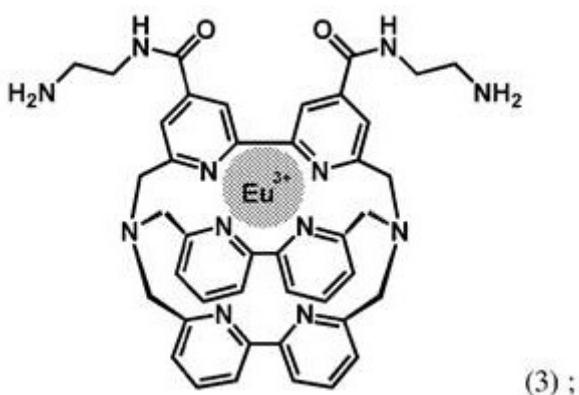
[0518] 这些数据显示,使用铕作为信号传导剂中的化学部分能够准确地测定抗微生物剂的MIC。

[0519] 实施例13. 非特异性标记细菌的铕制剂的实施方案在检测细菌和定量细菌浓度中是有效的。

[0520] 在本实施例中,铕制剂与细菌非特异性结合。

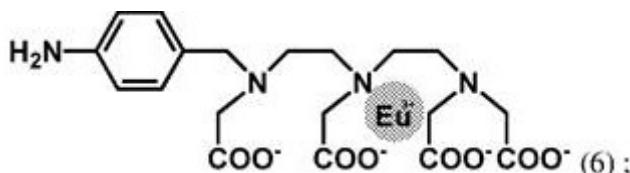
[0521] 将细菌(大肠杆菌(*E. coli*))以范围为1e5至1e9的浓度跨越96孔板接种于pH 6的MES缓冲液(铕穴状化合物-二胺)或HEPES pH 7.5(铕N1-氨基)中。向每个含有细菌的孔和相应的对照孔中以66 ng/孔加入铕穴状化合物-二胺(化合物(3);Cisbio)或铕N1-氨基(化合物(6);PerkinElmer),然后如所示加入EDC/NHS(以0.1和0.3 mg/ml)或戊二醛(0.5%最终浓度)。

[0522]



[0523] 铕-穴状化合物-二胺 (Eu-穴状化合物-二胺)

[0524]



[0525] 铕-N1-氨基 (Eu-N1-氨基)。

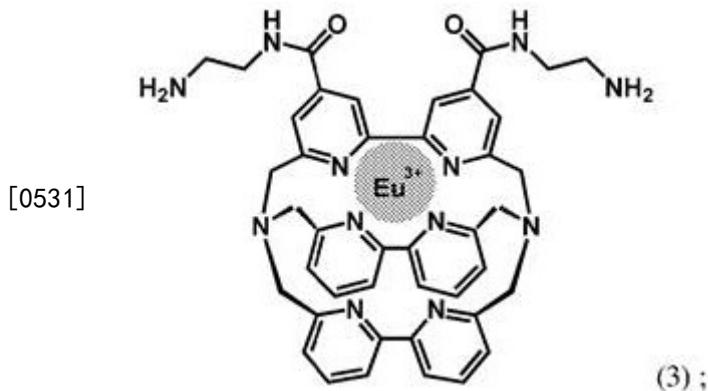
[0526] 使反应溶液孵育30分钟,以便于用所选报告物标记孔内的细菌的外部。然后,使用Thermo Scientific Heraeus Multifuge X3以2500 × g的速度将测试板离心2.5分钟,以便将细菌沉淀在板的底部,同时在上清液中留下任何未相关的报告物。然后使用BioTek Multiflo X洗板机将板吸取,以除去上清液和未反应的报告物,然后添加洗涤缓冲液。将该洗涤程序再重复一次(Eu-穴状化合物-二胺)或两次(铕N1-氨基),以彻底除去任何未反应的报告物。将含有铕穴状化合物-二胺的孔在读取缓冲液中重构,并在BioTek H1读板器上使用时间分辨的荧光读取,如图32中所示。最后,在添加Delfia增强溶液之前,向经吸取的用铕N1-氨基处理的孔中添加读数缓冲液。然后将板孵育15分钟,以允许在BioTek HI读板器上使用时间分辨的荧光测量铕之前增强铕,如图32中所示。

[0527] 这些数据显示,当铕制剂与细菌非特异性结合时,铕制剂能够准确地定量溶液中的细菌浓度。

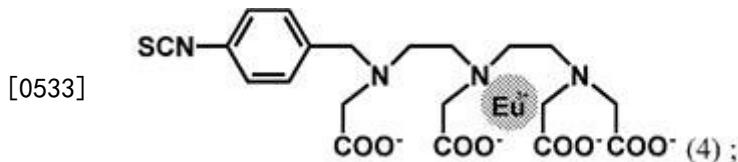
[0528] 实施例14. 当定量细菌浓度时,铕可以经由异硫氰酸酯与胺连接,或经由NH₂与羧酸连接,用于非特异性标记细菌。

[0529] 在本实施例中,铕制剂与细菌非特异性结合。

[0530] 将肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 或大肠杆菌 (*E. coli*) 以范围为 1×10^5 至 1×10^9 的浓度跨越96孔板接种于pH 6的MES缓冲液(铕穴状化合物-二胺;化合物(3))或HEPES pH 7.5(铕ITC;化合物(4))中。向每个含有细菌的孔和相应的对照孔中以66 ng/孔加入铕穴状化合物-二胺(Cisbio)或铕ITC (PerkinElmer),然后将EDC/NHS (以0.1和0.3 mg/ml)加入含有铕穴状化合物的孔中。



[0532] 铕-穴状化合物-二胺(Eu-穴状化合物-二胺)



[0534] Eu-N1-ITC (Delfia)。

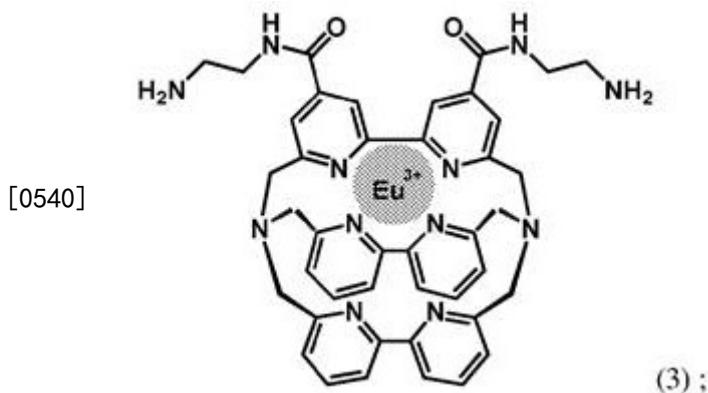
[0535] 使反应溶液孵育30分钟,以便于用所选报告物标记孔内的细菌的外部。然后,使用Thermo Scientific Heraeus Multifuge X3以 $2500 \times g$ 的速度将测试板离心2.5分钟,以便将细菌沉淀在板的底部,同时在上清液中留下任何未相关的报告物。然后使用BioTek Multiflo X洗板机将板吸取,以除去上清液和未反应的报告物,然后添加洗涤缓冲液。将该洗涤程序再重复一次(铕穴状化合物-二胺)或两次(PerkinElmer),以彻底除去任何未反应的报告物。将含有铕穴状化合物-二胺的孔在读取缓冲液中重构,并在BioTek H1读板器上使用时间分辨的荧光读取,如图33中所示。最后,在添加Delfia增强溶液之前,向经吸取的用Eu-N1处理的孔中添加读数缓冲液。然后将板孵育15分钟,以允许在BioTek HI读板器上使用时间分辨的荧光测量铕之前增强铕,如图33中所示。

[0536] 这些数据显示,当铕制剂与细菌非特异性结合时,铕制剂能够准确地定量溶液中的细菌浓度。

[0537] 实施例15:戊二醛可用于将铕-穴状化合物非特异性连接至细菌表面。

[0538] 在本实施例中,用戊二醛使铕制剂与细菌非特异性结合。

[0539] 将肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、大肠杆菌 (*E. coli*) 或金黄色葡萄球菌 (*Staph. aureus*) 以范围为 1×10^5 至 1×10^9 的浓度跨越96孔板接种于pH 6的MES缓冲液中。向每个含有细菌的孔和相应的对照孔中以66 ng/孔加入铕穴状化合物-二胺(化合物(3);Cisbio),然后将戊二醛的5%溶液加入含有铕穴状化合物的孔中。



[0541] 钕-穴状化合物-二胺 (Eu-穴状化合物-二胺)。

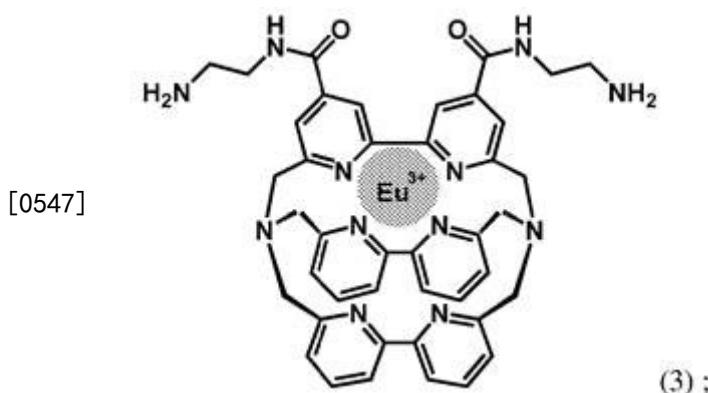
[0542] 使反应溶液孵育30分钟,以便于用所选报告物标记孔内的细菌的外部。然后,使用 Thermo Scientific Heraeus Multifuge X3以2500 × g的速度将测试板离心2.5分钟,以便将细菌沉淀在板的底部,同时在上清液中留下任何未相关的报告物。然后使用BioTek Multiflo X洗板机将板吸取,以除去上清液和未反应的报告物,然后添加洗涤缓冲液。将该洗涤程序重复一次,以彻底除去任何未反应的报告物。将含有铕穴状化合物-二胺的孔在读取缓冲液中重构,并在BioTek H1读板器上使用时间分辨的荧光读取,如图34中所示。

[0543] 这些数据显示,当铕制剂与细菌非特异性结合时,铕制剂能够准确地定量溶液中的细菌浓度。

[0544] 实施例16:EDC/NHS可用于将铕-穴状化合物非特异性偶联至细菌表面。

[0545] 在本实施例中,用EDC/NHS使铕制剂与细菌非特异性结合。

[0546] 将肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 或大肠杆菌 (*E. coli*) 以范围为 1×10^5 至 1×10^9 的浓度跨越96孔板接种于pH 6的MES缓冲液中。向每个含有细菌的孔和相应的对照孔中以66 ng/孔加入铕穴状化合物-二胺 (化合物(3); Cisbio), 然后将EDC/NHS (以0.1和0.3 mg/ml) 加入含有铕穴状化合物的孔中。



[0548] 钕-穴状化合物-二胺 (Eu-穴状化合物-二胺)。

[0549] 使反应溶液孵育30分钟,以便于用所选报告物标记孔内的细菌的外部。然后,使用 Thermo Scientific Heraeus Multifuge X3以2500 × g的速度将测试板离心2.5分钟,以便将细菌沉淀在板的底部,同时在上清液中留下任何未相关的报告物。然后使用BioTek Multiflo X洗板机将板吸取,以除去上清液和未反应的报告物,然后添加洗涤缓冲液。将该洗涤程序重复一次,以彻底除去任何未反应的报告物。将含有铕穴状化合物-二胺的孔在读取缓冲液中重构,并在BioTek H1读板器上使用时间分辨的荧光读取,如图35中所示。

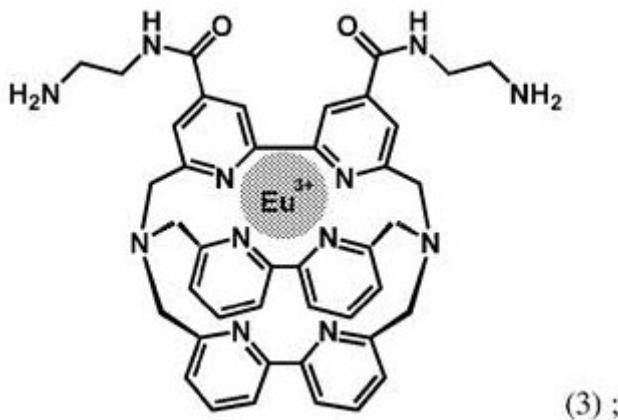
[0550] 这些数据显示,当铕制剂与细菌非特异性结合时,铕制剂能够准确地定量溶液中的细菌浓度。

[0551] 实施例17:戊二醛洗涤循环对非特异性、穴状化合物标记的细菌的影响。

[0552] 在本实施例中,用包含戊二醛的各种洗涤物使铕制剂与细菌非特异性结合。

[0553] 将大肠杆菌(*E. coli*)或金黄色葡萄球菌(*Staph. aureus*)以范围为 1×10^5 至 1×10^9 的浓度跨越96孔板接种于pH 6的MES缓冲液中。向每个含有细菌的孔和相应的对照孔中以66 ng/孔加入铕穴状化合物-二胺(化合物(3);Cisbio),然后将戊二醛的5%溶液加入含有铕穴状化合物的孔中。

[0554]



[0555] 铕-穴状化合物-二胺(Eu-穴状化合物-二胺)。

[0556] 使反应溶液孵育30分钟,以便于用所选报告物标记孔内的细菌的外部。然后,使用Thermo Scientific Heraeus Multifuge X3以 $2500 \times g$ 的速度将测试板离心2.5分钟,以便将细菌沉淀在板的底部,同时在上清液中留下任何未相关的报告物。然后使用BioTek Multiflo X洗板机将板吸取,以除去上清液和未反应的报告物,然后添加洗涤缓冲液。将该洗涤程序重复两次以研究多次洗涤对总体数据质量的影响。将含有铕穴状化合物-二胺的孔在读取缓冲液中重构,并在BioTek H1读板器上使用时间分辨的荧光读取,如图36A至图36C中所示。

[0557] 这些数据显示,可以使用包含戊二醛的各种洗涤物使铕制剂与细菌非特异性结合。

[0558] 实施例18:使用NH₂-PEG-生物素、随后链霉抗生物素蛋白-铕(Eu-SAv)的两步标记方法可以非特异性标记细菌。

[0559] 在本实施例中,使用两步方法使铕制剂与细菌非特异性结合。

[0560] 将大肠杆菌(*E. coli*)以范围为 1×10^5 至 1×10^9 的浓度跨越96孔板接种于pH 6的MES缓冲液中。向每个含有细菌的孔和相应的对照孔中以1mg/孔加入胺-PEG-生物素(Laysan Bio),然后将EDC/NHS(以0.1和0.3 mg/ml)加入含有胺-PEG-生物素的孔中。使反应溶液孵育15分钟,以便于用生物素物质使孔内的细菌的外部官能化。向每个反应孔中以400ng/孔加入链霉抗生物素蛋白-铕(Eu-SAv)(PerkinElmer)。使反应溶液孵育15分钟,以便于生物素和链霉抗生物素蛋白之间的偶联。然后,使用Thermo Scientific Heraeus Multifuge X3以 $2500 \times g$ 的速度将测试板离心2.5分钟,以便将细菌沉淀在板的底部,同时在上清液中留下任何未相关的报告物。然后使用BioTek Multiflo X洗板机将板吸取,以除去上清液和未反应的报告物,然后添加洗涤缓冲液。将该洗涤程序重复两次以研究多次洗涤对总体

数据质量的影响。将含有Eu-SAv的孔在读取缓冲液中重构，并在BioTek H1读板器上使用时间分辨的荧光读取，如图37中所示。

[0561] 这些数据显示，铕制剂可以使用包含NH2-PEG-生物素、随后Eu-SAv的两步方法与细菌非特异性结合。

[0562] 实施例19. 用NHS-LC-LC-生物素、随后Eu-SAv的两步细菌标记方法可以非特异性标记细菌。

[0563] 在本实施例中，使用另一种两步方法使铕制剂与细菌非特异性结合。

[0564] 将大肠杆菌 (*E. coli*) 以范围为 1×10^5 至 1×10^9 的浓度跨越96孔板接种于pH 6的MES缓冲液中。向每个含有细菌的孔和相应的对照孔中以1mg/孔加入胺-LC-LC-生物素 (Thermo-Fisher)，然后将EDC/NHS (以0.1和0.3 mg/ml) 加入含有胺-PEG-生物素的孔中。使反应溶液孵育15分钟，以便于用生物素物质使孔内的细菌的外部官能化。向每个反应孔中以400ng/孔加入链霉抗生物素蛋白-铕 (Perkin-Elmer)。使反应溶液孵育15分钟，以便于生物素和链霉抗生物素蛋白之间的偶联。然后，使用Thermo Scientific Heraeus Multifuge X3以 $2500 \times g$ 的速度将测试板离心2.5分钟，以便将细菌沉淀在板的底部，同时在上清液中留下任何未相关的报告物。然后使用BioTek Multiflo X洗板机将板吸取，以除去上清液和未反应的报告物，然后添加洗涤缓冲液。将该洗涤程序重复两次以研究多次洗涤对总体数据质量的影响。将含有铕穴状化合物-二胺的孔在读取缓冲液中重构，并在BioTek H1读板器上使用时间分辨的荧光读取，如图38中所示。

[0565] 这些数据显示，铕制剂可以使用包含NHS-LC-LC-生物素、随后Eu-SAv的两步方法与细菌非特异性结合。

[0566] 实施例20: 可以使用具有尺寸范围为 >0.2 微米至 <10 微米的孔的过滤系统从溶液中分离丝状细菌；由此提供更准确的化学敏感性数据。

[0567] 该实施例说明使用过滤来排除已响应于抗微生物剂处理而经历丝状生长的细菌的实施方案。

[0568] 革兰氏阴性杆特别是首先响应于亚抑制浓度的细胞壁作用的抗微生物剂(诸如 β -内酰胺)而经历丝状生长。尽管这些最终将被抑制，但代谢“体积”方法显著难以区分抗微生物剂抗性细菌与已经历丝状生长的细菌。当不考虑时，这种丝状生长不正确地将细菌鉴定为比其实际更具有抗性。使用“体积”方法确定抗微生物剂抗性的困难见于图39中。

[0569] 为了避免这种情况，在一个实施方案中，在孵育期结束时，将每种液体培养基微量稀释液装入包含一种或多种预定孔径的过滤器中(参见图40)。选择孔径，使得多个“正常”细菌能够通过过滤器，但是俘获大于一定长度的丝状细菌。孔径可以是 >0.2 微米且 <10 微米。

[0570] 可以设计该过滤器用于并行样品处理，诸如96、384或1586孔板。可以在AST过程期间应用过滤器，如图40中所示。

[0571] 本实施例进一步说明设计快速AST平台与传统的代谢方法(其基本上是体积测量)相比的关键优势，所述快速AST平台通过表面面积确定完整细菌存在。

[0572] 实施例21: 用于制备和使用包含荧光纳米颗粒的信号传导剂的方法。

[0573] 在本实施例中，描述了用于制备和使用包含荧光纳米颗粒的信号传导剂的方法。

[0574] 首先，将20 mg二月桂酸荧光素 (FL-DL) 称入透明玻璃闪烁小瓶中，并加入1000 mg

乙醇。然后经由涡旋将FL-DL溶解于小瓶中。其后,将10 mg DSPE-PEG-2k-胺 (Laysan Bio) 加入该混合物中并通过涡旋溶解。分别地,在烧杯中称量40 g去离子水,并加入搅拌棒。然后将烧杯置于磁力搅拌器上并以200 RPM搅拌。接下来,将乙醇溶液以逐滴方式加入烧杯中,且然后将随后的溶液引入Microfluidics均化器中并以6000 psi处理一次。然后将200克去离子水加入所得混合物中,并使用切向流过滤 (TFF) 以将纳米颗粒纯化并浓缩约12倍至20 mL,然后收集于玻璃闪烁小瓶中。将该收集的纳米颗粒制剂过滤通过0.2μm过滤器,并通过NanoSight (Malvern) 测定纳米颗粒尺寸和浓度,平均尺寸读数为102 nm。

[0575] 含有荧光团的纳米颗粒用带正电荷的小分子官能化以形成可用于本发明中的信号传导剂。

[0576] 将大肠杆菌 (*Escherichia coli*) (ATCC 11303) 和氨苄青霉素抗性大肠杆菌 (*E. coli*) (ATCC 39936) 在标准无菌条件下在LB液体培养基中在37°C下培养。通过测量在600 nm处的吸光度 (McFarland) 来测定浓度,并通过稀释设定 5×10^5 CFU/ml的浓度。然后将氨苄青霉素称重至无菌水中并以适当的浓度加入到无菌的3 mL微量离心管中。将浓度为 8×10^8 纳米颗粒/ml的细菌和纳米颗粒两者均加入这些氨苄青霉素包被的无菌微量离心管中。然后将管加盖并在37°C下在连续摇动下放置1.5小时,其后将它们打开并使各自通过0.2μm 过滤器。接下来,将100μL每种滤液加入到96孔板的孔中,并将150μL的显色溶液 (乙醇中的5% 氢氧化四甲基铵) 加入到各孔中。5分钟后,在SpectraMax M2微量读板器 (Molecular Devices) 中在490nm激发/530nm发射下读板。

[0577] 图41显示使用上述制备的包含纳米颗粒的信号传导剂的测定结果。在此,在有和没有100μg/ml氨苄青霉素(浓度远高于MIC)的情况下处理大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 和氨苄青霉素抗性大肠杆菌 (*E. coli*)。在通过0.2μm过滤器过滤除去完整细菌后,进行与完整细菌无关的游离信号传导剂的测定。不含氨苄青霉素的对照组显示低荧光信号,用氨苄青霉素处理的氨苄青霉素抗性的大肠杆菌 (*E. coli*) 组也是如此。用高于MIC的氨苄青霉素处理的大肠杆菌显示荧光的显著增加,表明该抗微生物剂的效力。

[0578] 图42显示各种氨苄青霉素浓度的大肠杆菌的测定结果。当氨苄西林浓度低于MIC, ~15μg/ml时, 荧光信号低, 并且其在该值处上升, 表明抗微生物剂在该范围内的效力。

[0579] 实施例22: 可以使用磁珠进行本发明以分离完整细菌。

[0580] 在该实施例中, 使用与能够结合完整细菌的试剂相关的磁珠来从溶液中分离完整细菌。

[0581] 根据制造商的说明 (ThermoFisher), 由N-羟基琥珀酰亚胺基酯活化的1微米磁珠制备与大肠杆菌反应性的磁珠。简而言之, 磁性捕获供应的珠粒并吸出储存溶液。然后用冰冷的0.1M盐酸洗涤珠粒, 随后加入多克隆山羊-抗脂多糖 (LPS) 抗体 (Antibodies-Online Inc.)。根据制造商的说明, 将反应物摇动2小时, 其中在前30分钟每5分钟涡旋。然后将珠粒彻底洗涤并在4°C下储存于磷酸盐缓冲盐水, pH 7.4中, 直至使用。

[0582] 信号传导剂包含能够结合微生物的部分(例如,结合大肠杆菌 (*E. coli*) 的抗体) 和能够提供信号或有助于产生信号的化学部分(例如, 辣根过氧化物酶 (HRP))。

[0583] 将抗LPS磁珠和抗大肠杆菌 (*E. coli*) 的信号传导剂同时加入到McFarland标准测定的大肠杆菌 (*E. coli*) 于MH液体培养基中的稀释系列中。使反应进行20分钟, 随后用96孔微孔板磁力架 (V&P Scientific) 捕获磁珠。将孔洗涤三次, 随后加入实施例1中所述的检测

溶液。读取在450 nm处和650 nm处的光密度10分钟。在5分钟时的值绘制于图43中。

[0584] 然后通过添加信号传导剂和官能化磁珠使用实施例1的程序。然而,此处,金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)菌株是ATCC 12600,并且使用三种抗微生物剂:头孢他啶、苯唑西林和万古霉素。

[0585] 孵育期后,与信号传导剂同时加入具有0.5 μ m尺寸的固定阳离子电荷的磁珠(ChemiCell Fluidmag)。通过加入50 μ L硼酸盐缓冲液将pH调节至~8.4。将微孔板在轨道振荡器上摇动20分钟。然后将微孔板置于包含24个钕N52磁性材料的磁性捕获板上。然后吸出MH液体培养基并添加含有0.1% Tween-20的PBS,总共洗涤3次。在最终抽吸后,添加由3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)和过氧化氢组成的稳定化的显色溶液(ThermoFisher),并用酶标仪(Vmax, Molecular Devices)监测在650nm处和450nm处的光密度达10分钟。图44中显示的数据描绘从开始与检测溶液孵育后的5分钟点。如所预期的那样,引起细菌细胞裂解的渐增量的抗微生物剂减少完整细菌的数量。

[0586] 这些数据显示,官能化的磁性颗粒可以捕获完整细菌,并且使得能够在抗微生物剂处理后定量完整细菌(当与信号传导剂结合时)。这种磁性捕获可以与其它分离技术一起使用或代替其它分离技术使用,以收集完整细菌用于本发明中。

[0587] 实施例23:当与通过官能化磁珠分离完整细菌相比时,细菌溶液的离心提供了更准确的完整细菌的计数。

[0588] 在本实施例中,将用于使用官能化磁珠分离完整细菌的方法(正如在实施例21+中所描述的那样)与用于使用离心分离完整细菌的方法进行比较。

[0589] 如上所述进行使用官能化磁珠捕获完整细菌。对于离心数据,通过在2500 \times g离心2.5分钟、手动抽吸和加入PBS-Tween的过程洗涤细菌三次。磁珠不用于离心洗涤。用不同浓度的万古霉素(“VAN”)处理细菌。

[0590] 图45显示离心提供了比通过官能化磁珠分离更高和更准确的细菌数量和MIC。

[0591] 这些数据显示,用于分离完整细菌的细菌培养物的离心优于使用官能化磁性颗粒的方法。使用离心的分离可以与其它分离技术(例如磁性分离)一起使用或代替其它分离技术(例如磁性分离)使用,以收集完整细菌用于本发明中。

[0592] 实施例24:经由TAML纳米颗粒放大器的化学放大允许使用标准光学检测设备以1 \times 10³至1 \times 10⁸ CFU/ml范围内的最佳灵敏度的信号传导。

[0593] 在本实施例中,描述了用于制备和使用包含四氨基金属有机配体(TAML[®])催化剂的信号传导剂的方法。

[0594] 采用专有纳米颗粒放大器实现化学放大,其适应来自药物输送的尖端纳米颗粒制剂技术和来自绿色化学的小分子催化剂。每种“纳米标记物”包含>6 \times 10⁴个致密堆积的含铁的四氨基金属有机配体(TAML[®])催化剂,其被用特定配体官能化的聚合物壳屏蔽(图46)。每个TAML分子的摩尔活性在辣根过氧化物酶(金标准免疫测定酶标记物)的5倍之内(图46B)。在特异性结合后,纳米标记物被化学触发以将其内容物释放至溶液中,使得能够均相催化光学信号。每个结合事件的大量催化剂使得能够定量少至200个完整细菌(图46A)和相对于标准酶免疫测定的100倍灵敏度增强(图46C)。除了不需要开发新的检测技术以外,标准的光学检测还使得能够与标准的干燥抗微生物剂组微孔板(诸如SensiTitre板)兼容。

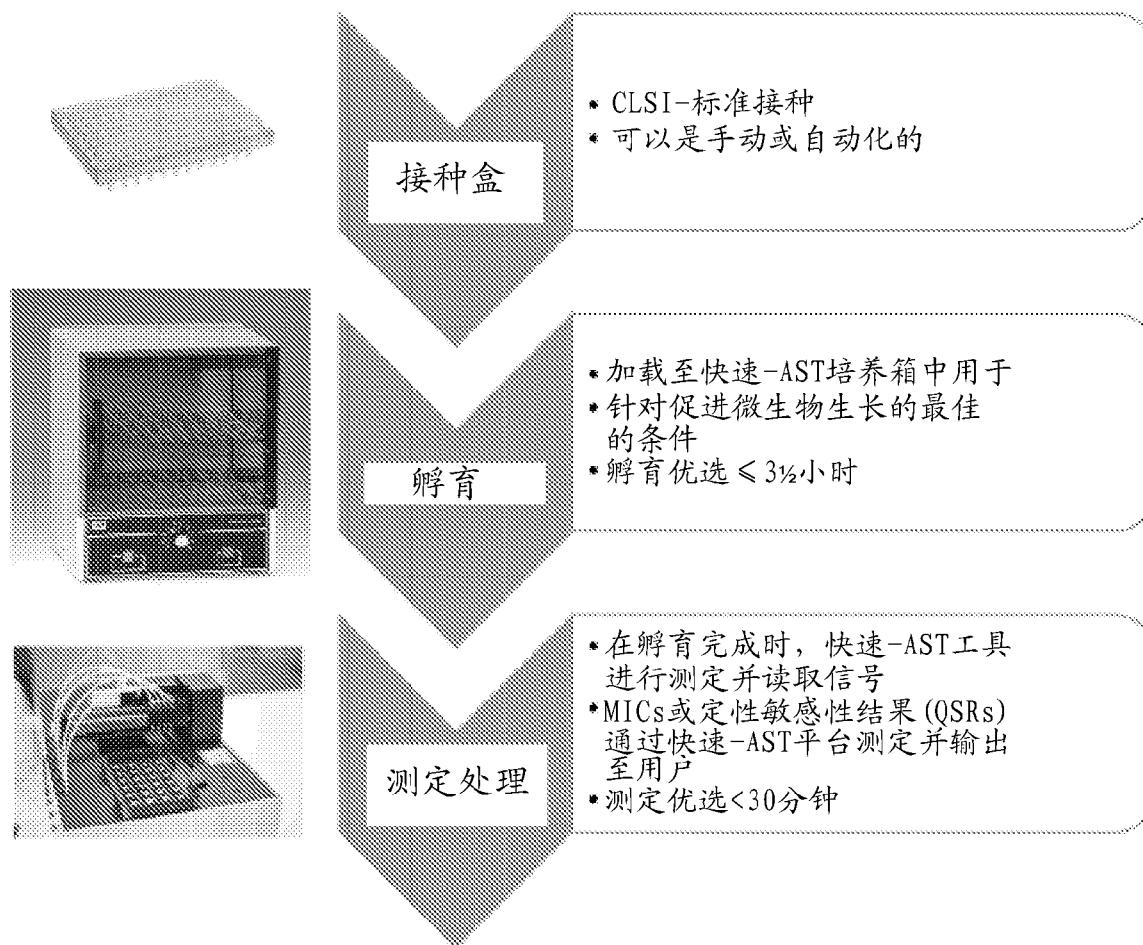


图 1

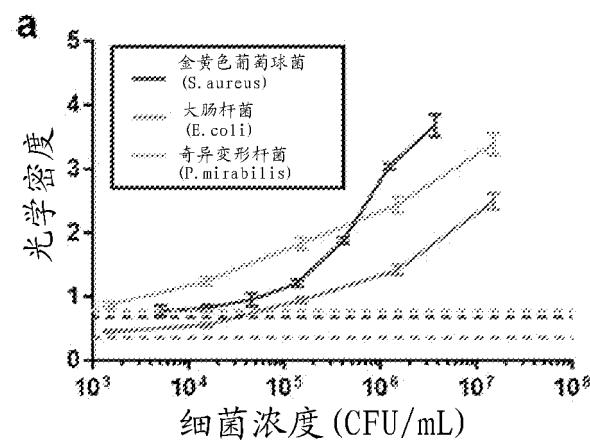


图 2A

b

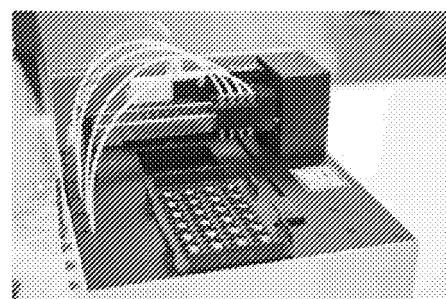


图 2B

c

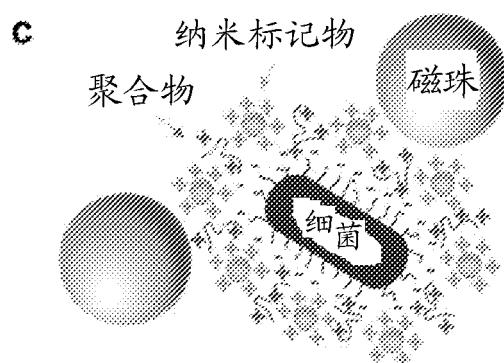


图 2C

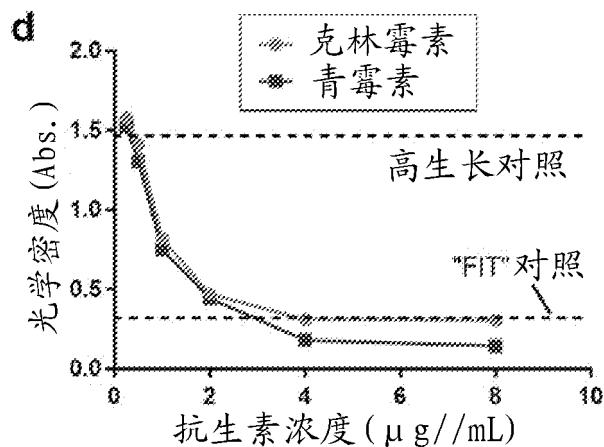


图 2D

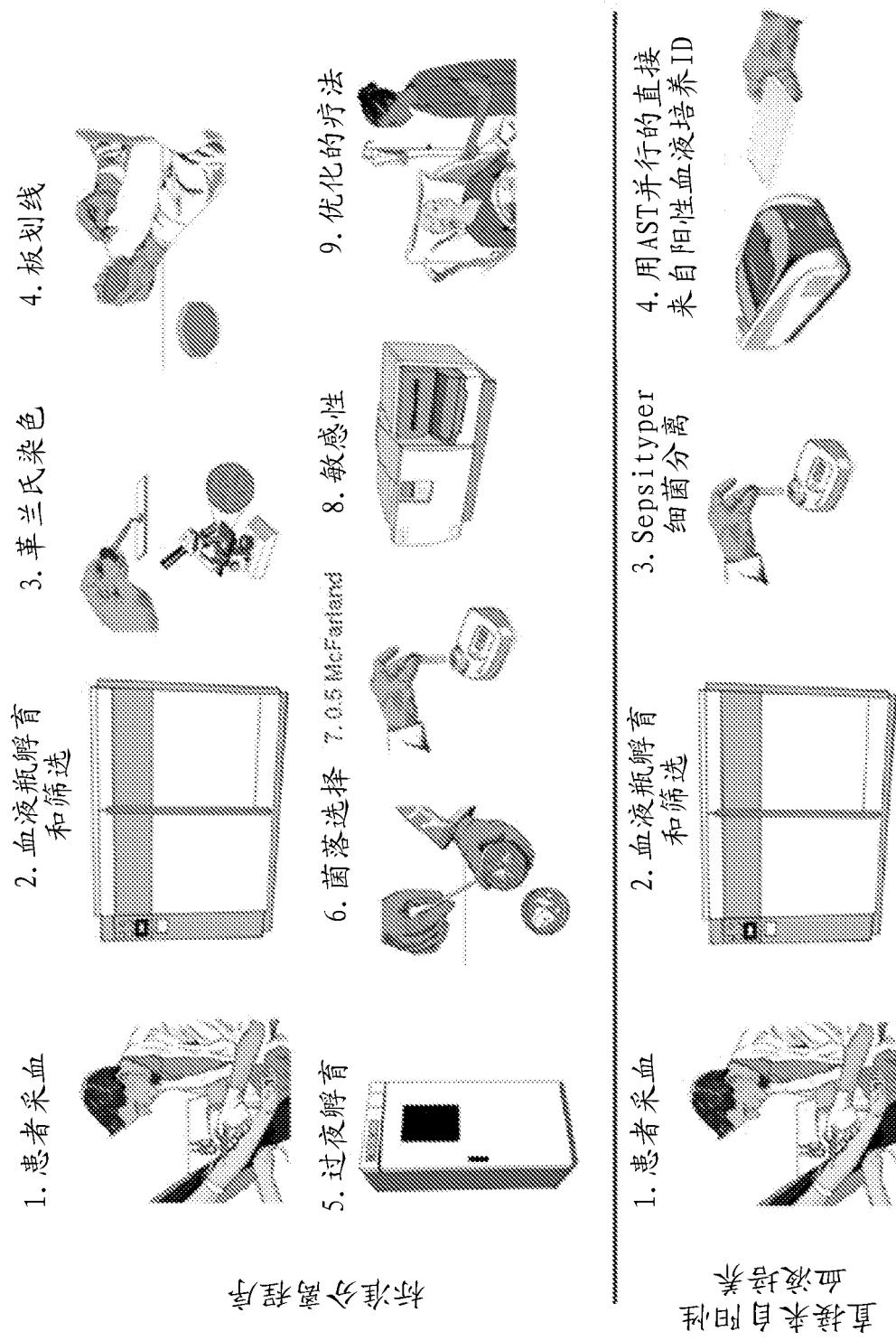


图 3

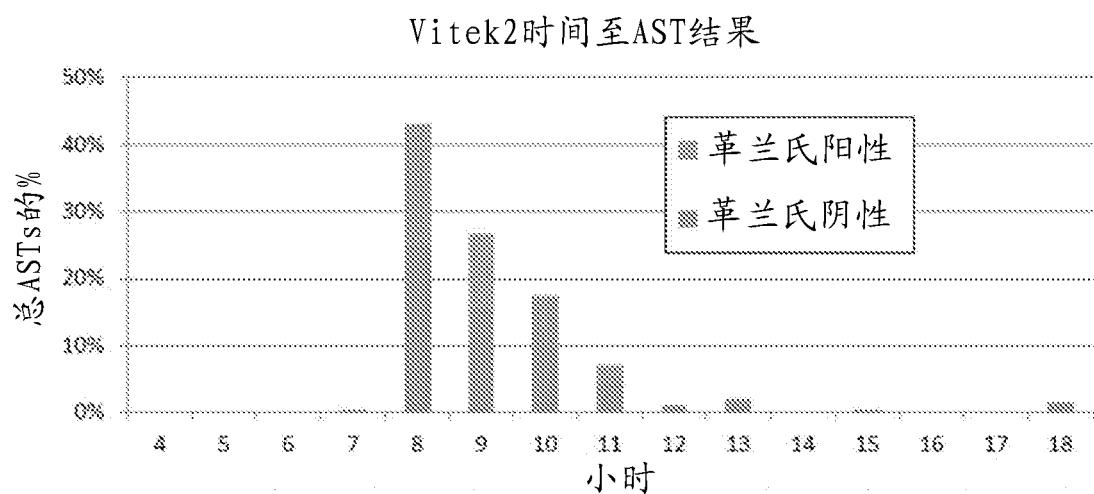


图 4

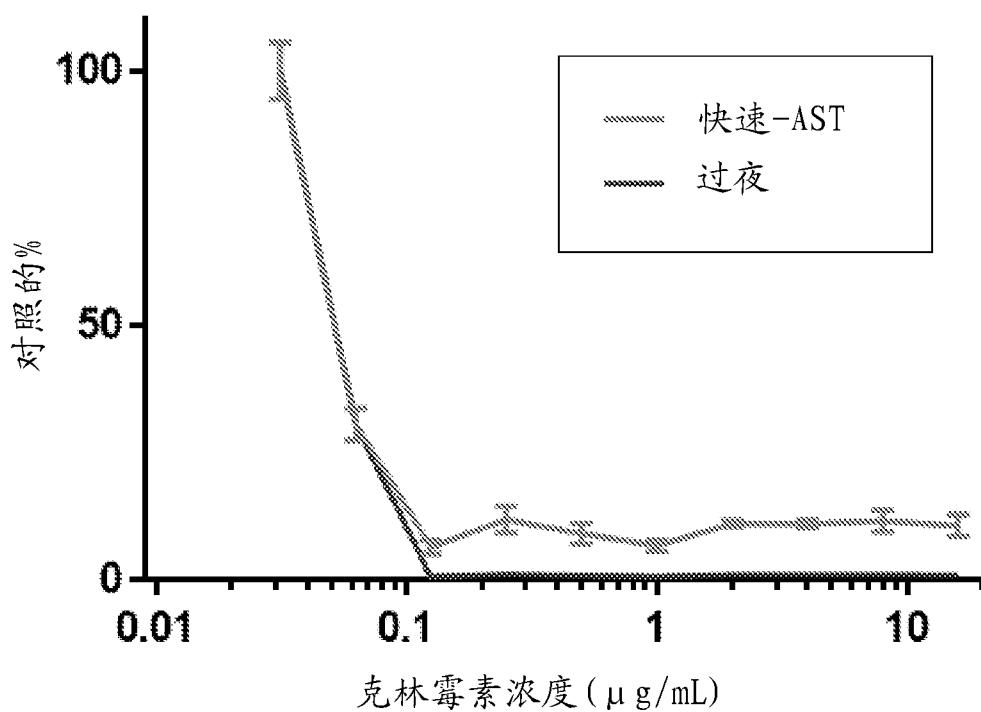
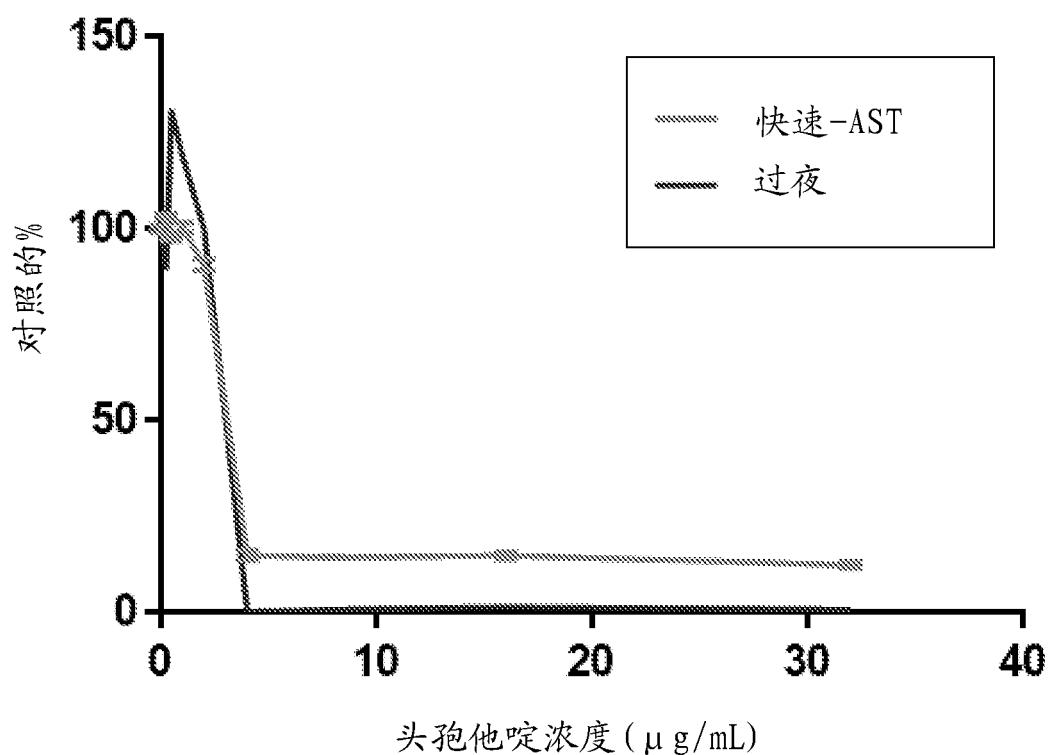


图 5



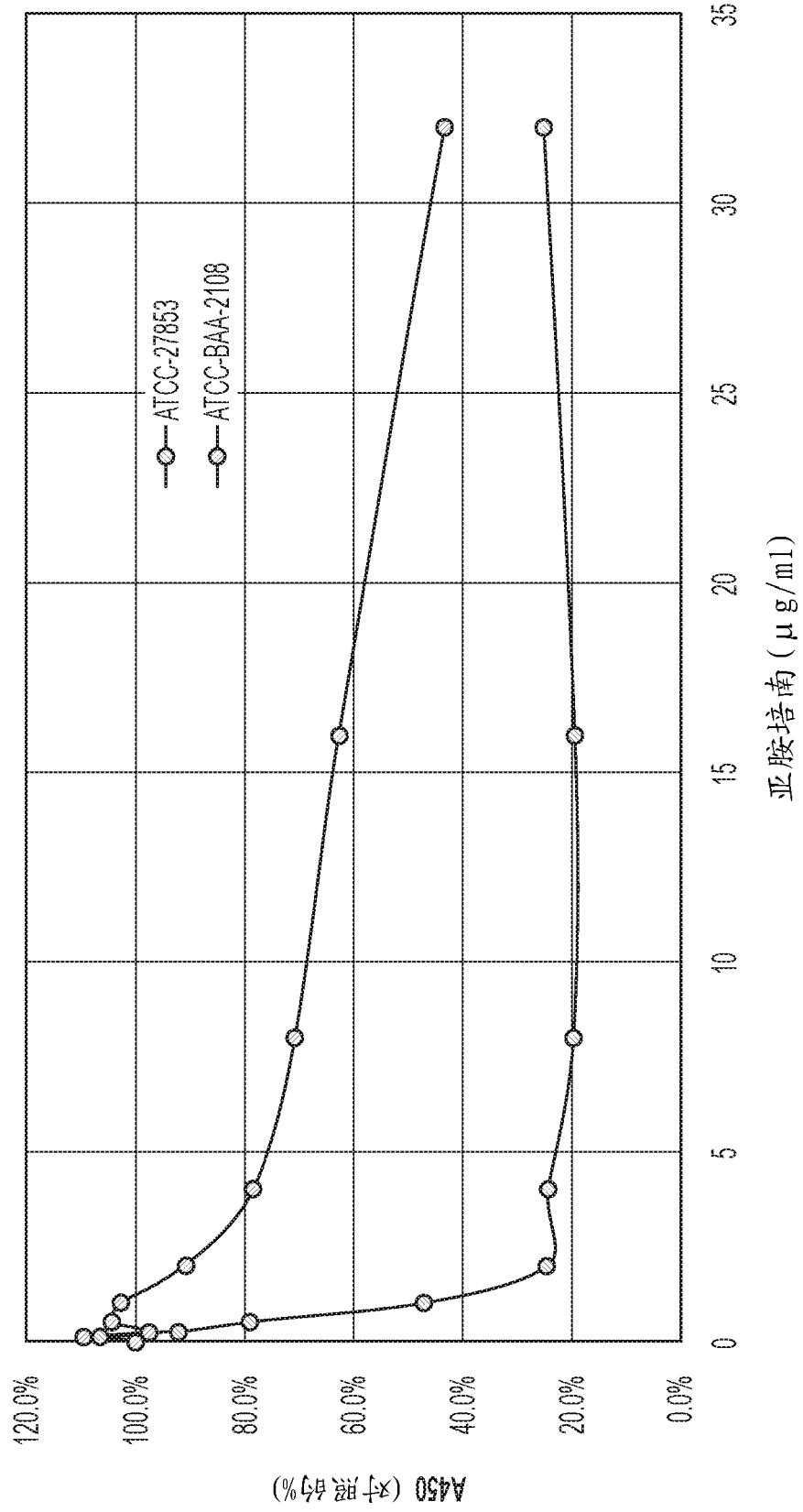
亚胺培南对绿脓假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 的MIC

图 7

物种/抗微生物剂	菌株类型 (ATCC)	MIC (μg/ml): 快速- AST	MIC (μg/ml): OD_{600}
金黄色葡萄球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>) /甲氧西林	敏感 (29213)	2	2
	抗性 (43300)	4	4
绿脓假单胞菌 (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>) /亚胺培南	敏感 (27853)	2	4
	抗性 (BAA- 2108)	32	32
大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>) /氨苄青霉素	敏感 (25922)	4	4
	抗性 (35218)	32	32

图 8

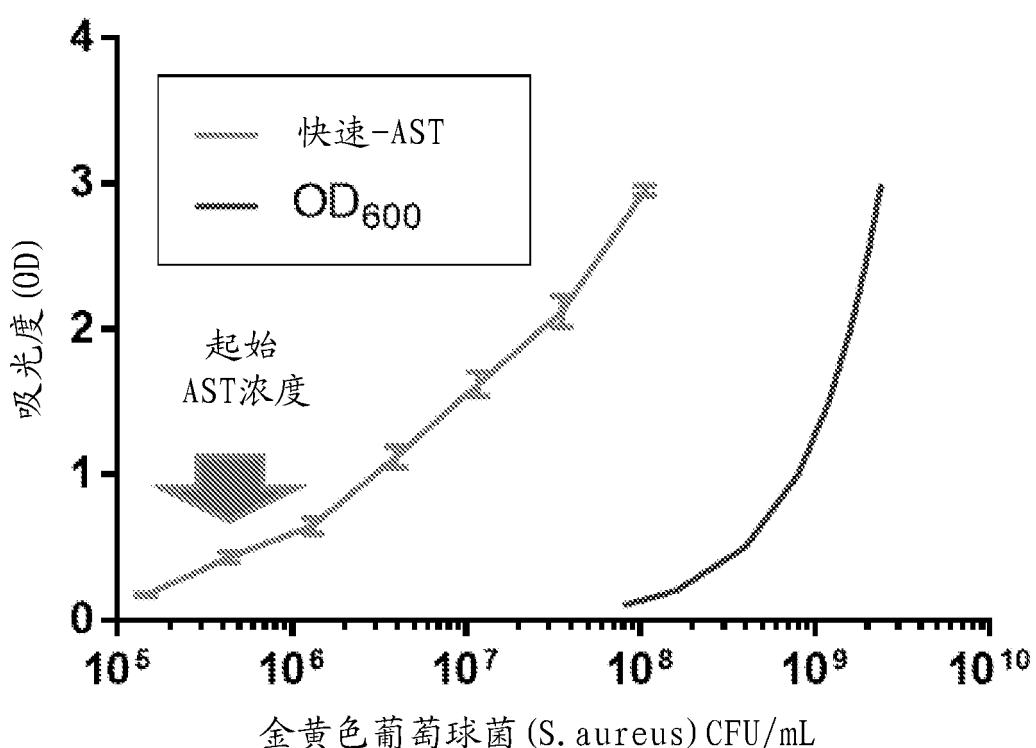


图 9

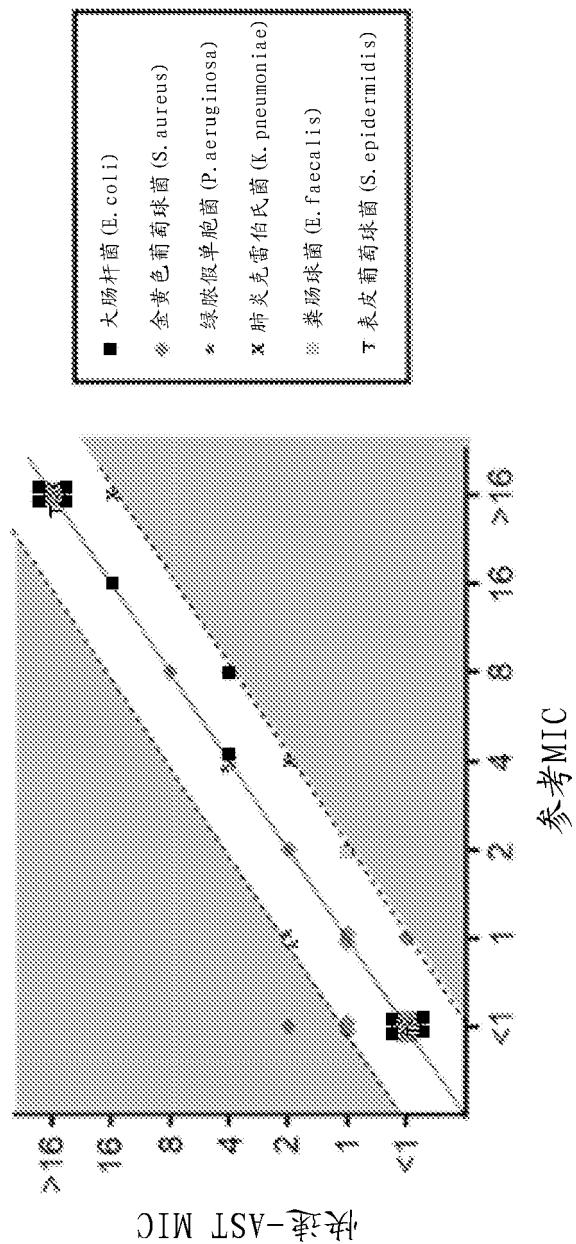


图 10

药物	大肠杆菌 (E. coli)	金黄色葡萄球菌 (S. aureus)	绿脓假单胞菌 (P. aeruginosa)	肺炎克雷伯氏菌 (K. pneumoniae)	粪肠球菌 (E. faecalis)	表皮葡萄球菌 (S. epidermidis)
抗体/WGA-IRP 复合物	氨苄青霉素 Abcam ab68450	苯唑西林 Fitzgerald 60C- CR1274RX	氨苄青霉素 Abcam ab156654	氨基青霉素 Thermo PA1-73176	苯唑西林 Thermo PA1-73122	苯唑西林 Vector Labs Pl-1026 (WGA-HRP)
菌株	ATCC 25922, 35228 BAA-2340; 32种临床分离物	ATCC 29213, 43300 22669, 27560; 12和临床分离物	ATCC 27853; BAA- 2108; 4种临床分离物	ATCC 190603; BAA- 1755; 4种临床分离物	ATCC 23212, 54293 2种临床分离物	4种临床分离物

a 抗生素	参考文献
氯霉素	S (1)
达托霉素	S (1)
克林霉素	S (≤ 0.25)
庆大霉素	I (6)
左氧氟沙星	R (4)
DT1	Neg
利奈唑胺	S (1)
万古霉素	I (3)
头孢西丁筛选	Pos
青霉素	R (≥ 0.5)
莫昔沙星	R (2)
苯唑西林	R (≥ 4)
利福平	R (≥ 32)
替加环素	S (≤ 0.25)
呋喃妥因	S (≤ 16)
红霉素	S (≤ 0.25)
四环素	R (≥ 16)
环丙沙星	R (≥ 8)

图 12A

b 抗生素		CLSI	参考文献
阿米卡星	8	S	
替加环素	≤0.5	S	
替卡西林 /Clavu	≥64/2	R	
左氧氟沙星	≥8	R	
四环素	≥4	S	
多利培南	2	R	
米诺环素	4	S	
厄他培南	≥8	R	
Trimetho/Sulf	≥4/76	R	
亚胺培南	≥	R	
哌拉西林	≥64	R	
美罗培南	≥8	R	
庆大霉素	≥8	R	
头孢唑啉	≥16	R	
妥布霉素	≥8	R	
头孢他啶	≥16	R	
Amp/Sulbac	≥16/8	R	
氨曲南	≥32	R	
氨苄青霉素	≥16	R	
头孢吡肟	≥32	R	
环丙沙星	≥2	R	
头孢曲松	≥32	R	

图 12B

c 错误 / 矛盾		描述
非常主要 (vmj)		CLSI方法得到R且 FAST得到S
主要		CLSI方法得到S且 FAST得到R
微小		CLSI得到R或S且FAST 得到I; 或CLSI得到I 且FAST得到R或S

图 12C

药物: 莎唑西林

		参考结果 (CLSI O/N)						
		≤0.25	0.5	1	2	4	8	≥16
Selux 结果 (4 hr)	≤0.25							
	0.5		2					
	1		1	1				
	2			3	1			
	4				1	1		
	8					1		
	≥16						4	
		3	3	1	0	1		
EA	100							
CA	100							

图 13A

药物: 万古霉素

		参考结果 (CLSI O/N)						
		≤0.25	0.5	1	2	4	8	≥16
Selux 结果 (4 hr)	≤0.25	3	1					
	0.5		2	5				
	1			1				
	2				1			
	4					1		
	8					1		
	≥16						1	
		2	6	0	0	0		
EA	100							
CA	100							

图 13B

		参考结果 (CLSI O/N)						
		≤0.25	0.5	1	2	4	8	≥16
Selux 结果 (4 hr)	≤0.25	1						
	0.5	1						
	1							
	2							
	4					4	1	
	8						1	
	≥16							
		0	0	0	4	2		
EA	100							
CA	100							

图 13C

		参考结果 (CLSI O/N)						
		≤0.5	1	2	4	8	16	≥32
Selux 结果 (4 hr)	≤0.5	2	2					
	1	1	4	3				
	2			1	1			
	4			1	2	1		
	8							
	16					1	1	
	≥32						12	
		4	5	3	1	1		
EA	100							
CA	100							

图 14A

		药物: 环丙沙星						
		参考结果 (CLSI O/N)						
		≤0.25	0.5	1	2	4	8	≥16
	≤0.25							
	0.5							
	1							
	2			1	1			
	4							
	8						1	
	≥16							
		0	1	1	0	0		
EA	100							
CA	100							

图 14B

		参考结果 (CLSI O/N)						
		≤0.25	0.5	1	2	4	8	≥16
Selux 结果 (4 hr)	≤0.25							
	0.5		2					
	1			2				
	2				2			
	4					2		
	8						2	
	≥16							2
		2	0	0	0	0	0	
EA	100							
CA	100							

图 14C

		参考结果 (CLSI O/N)						
		≤0.25	0.5	1	2	4	8	≥16
Selux 结果 (4 hr)	≤0.25							
	0.5		2					
	1			2				
	2				2			
	4					2		
	8						2	
	≥16							2
		0	0	0	0	0	2	
EA	100							
CA	100							

图 14D

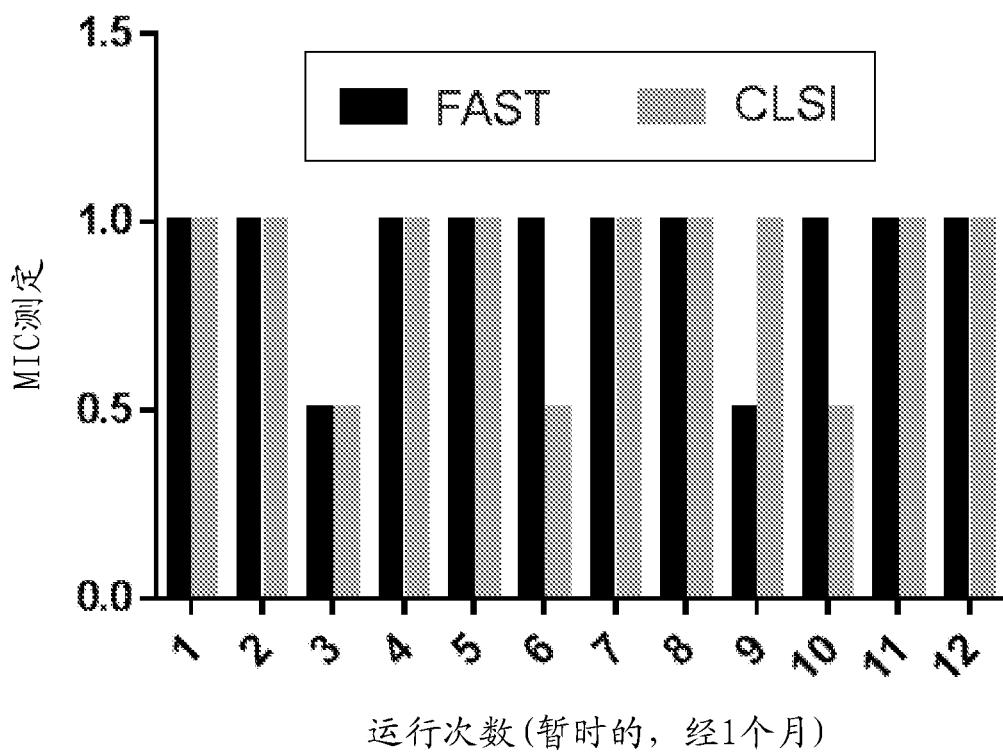


图 15

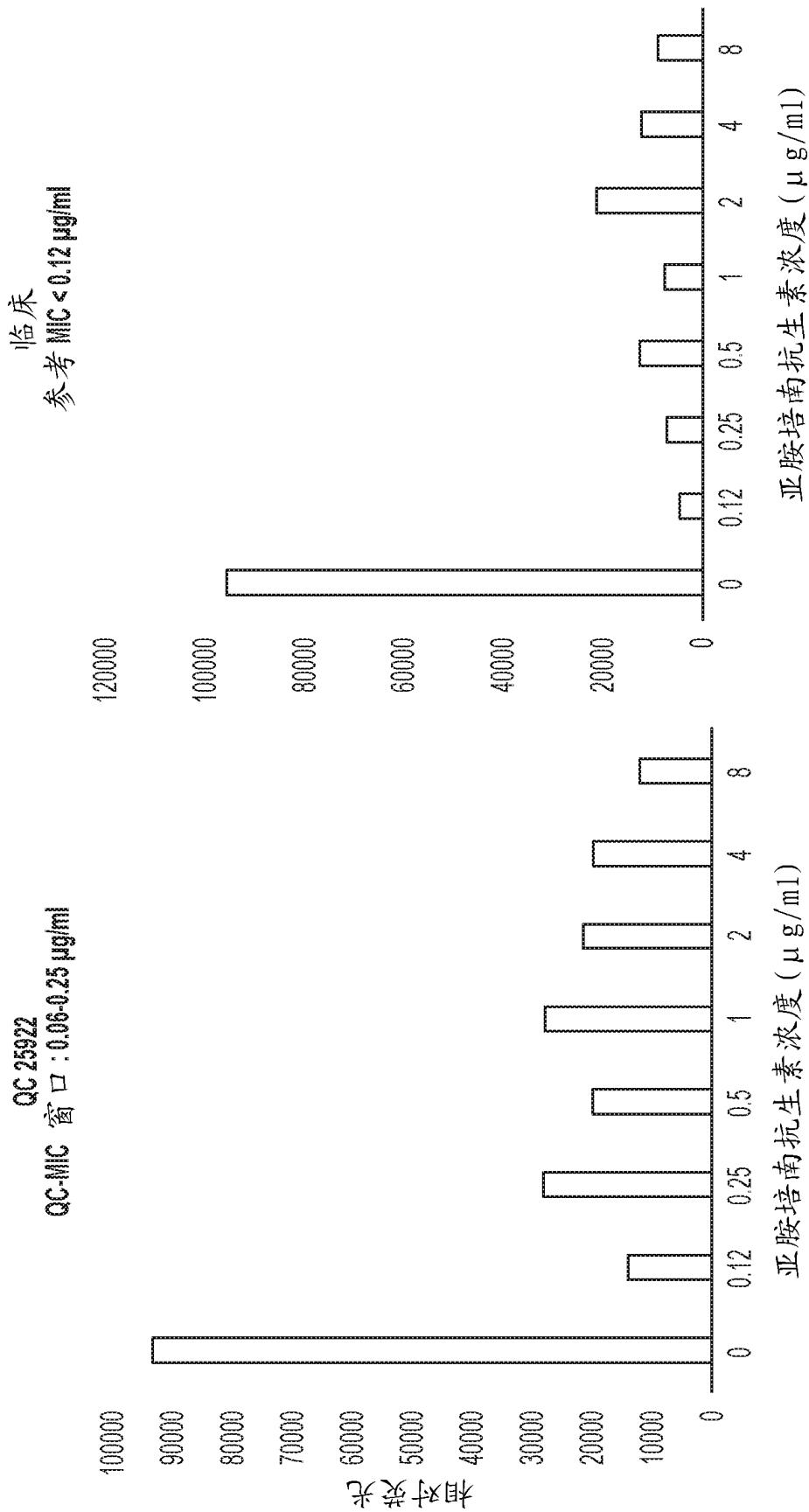


图 16

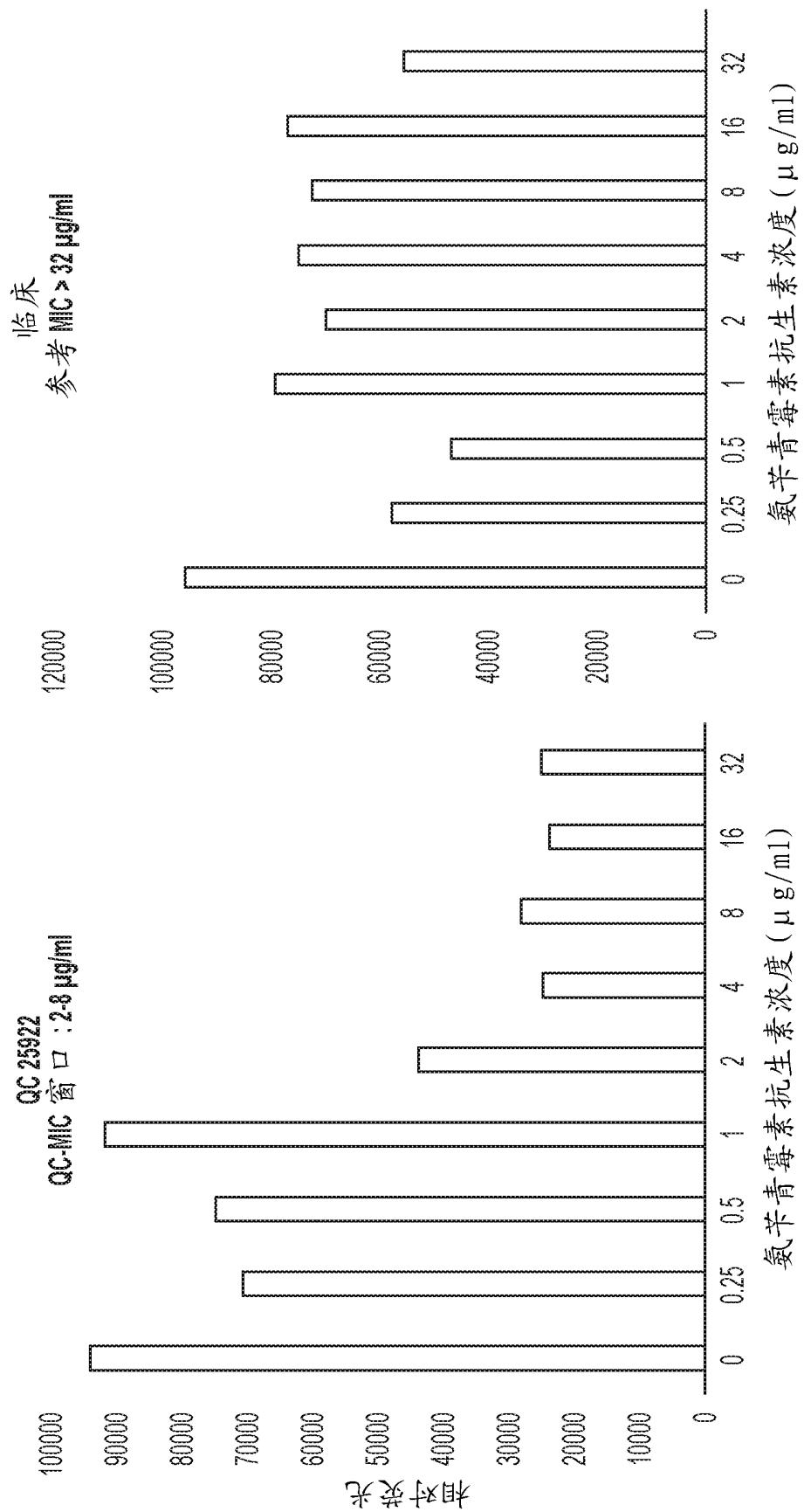
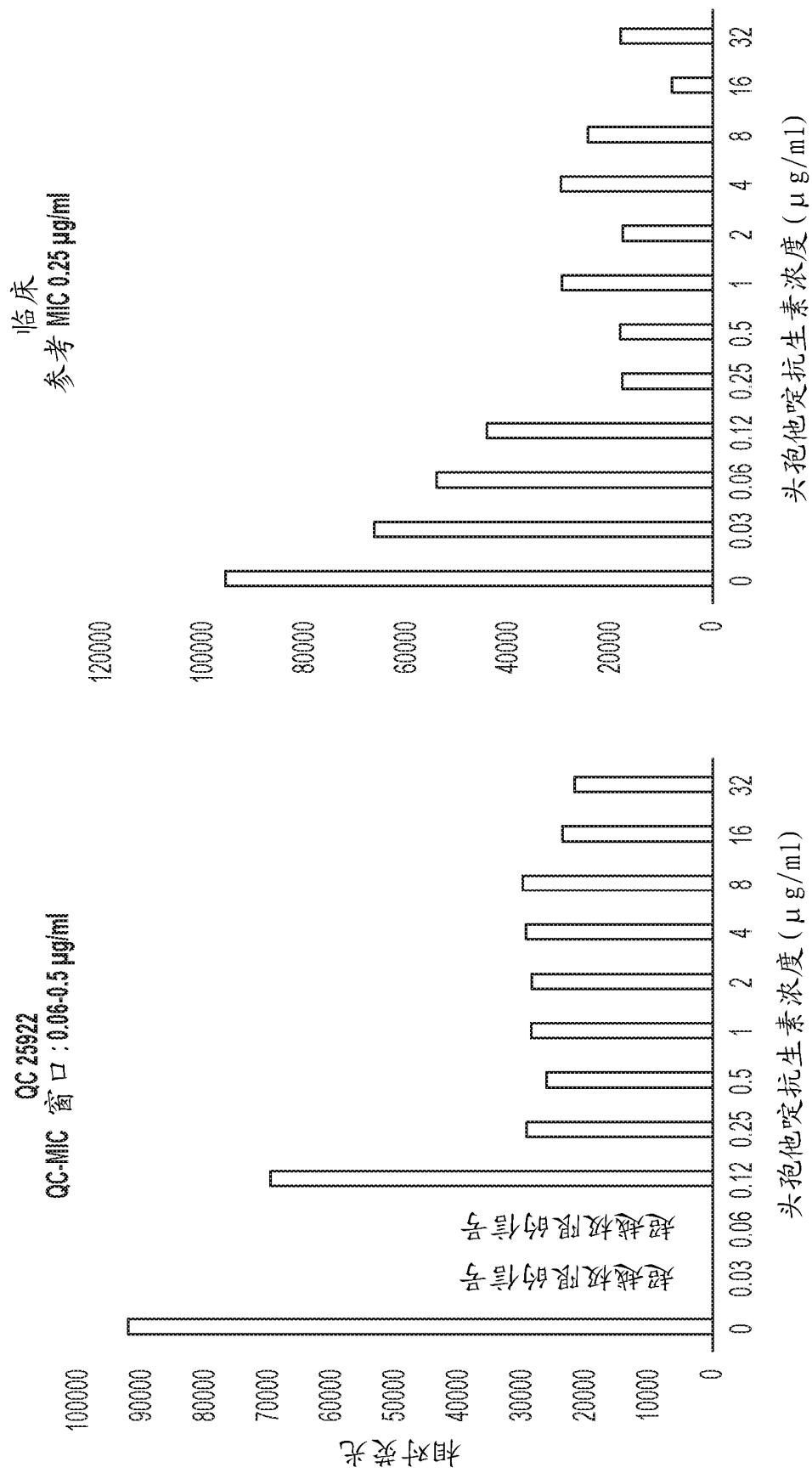


图 17



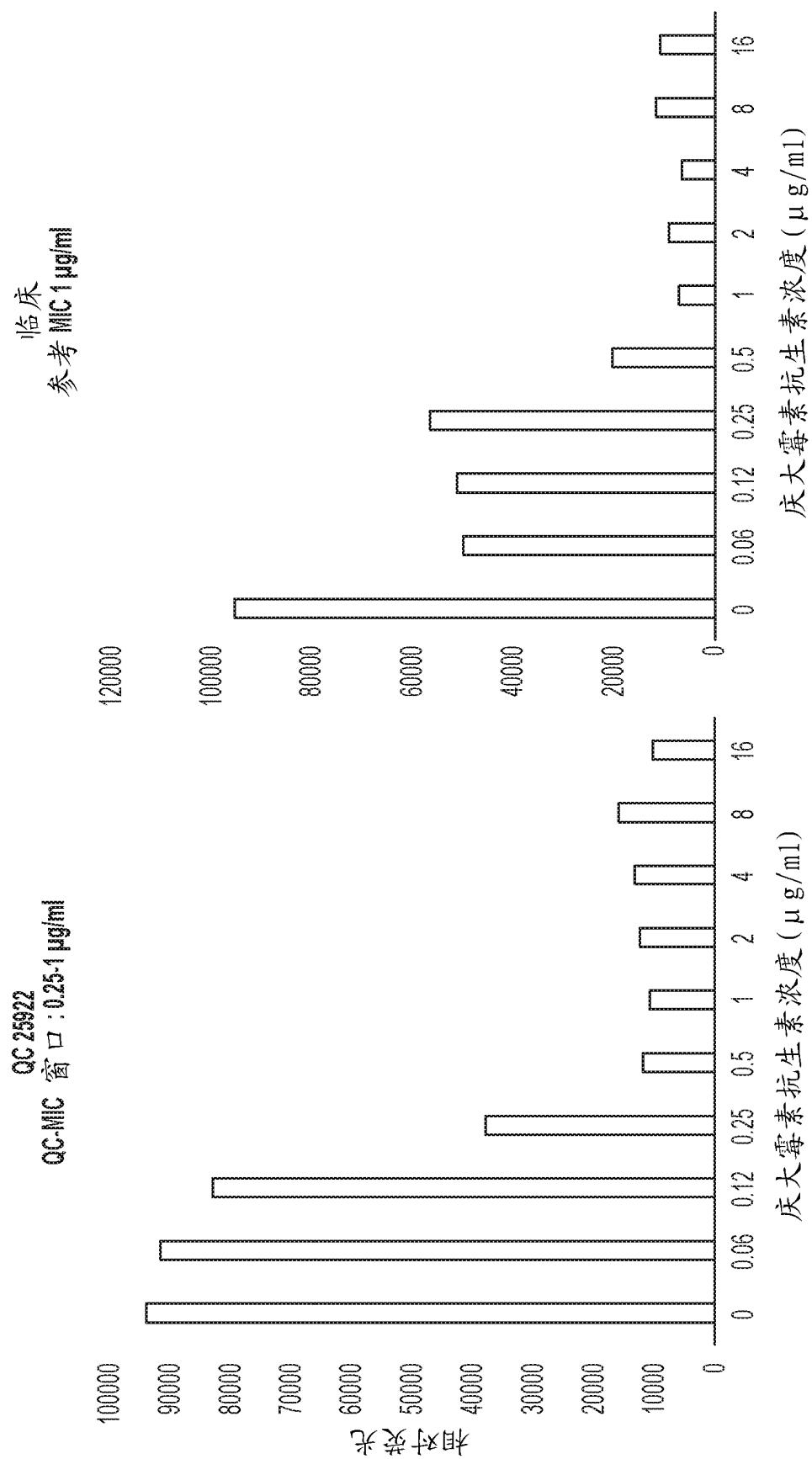


图 19

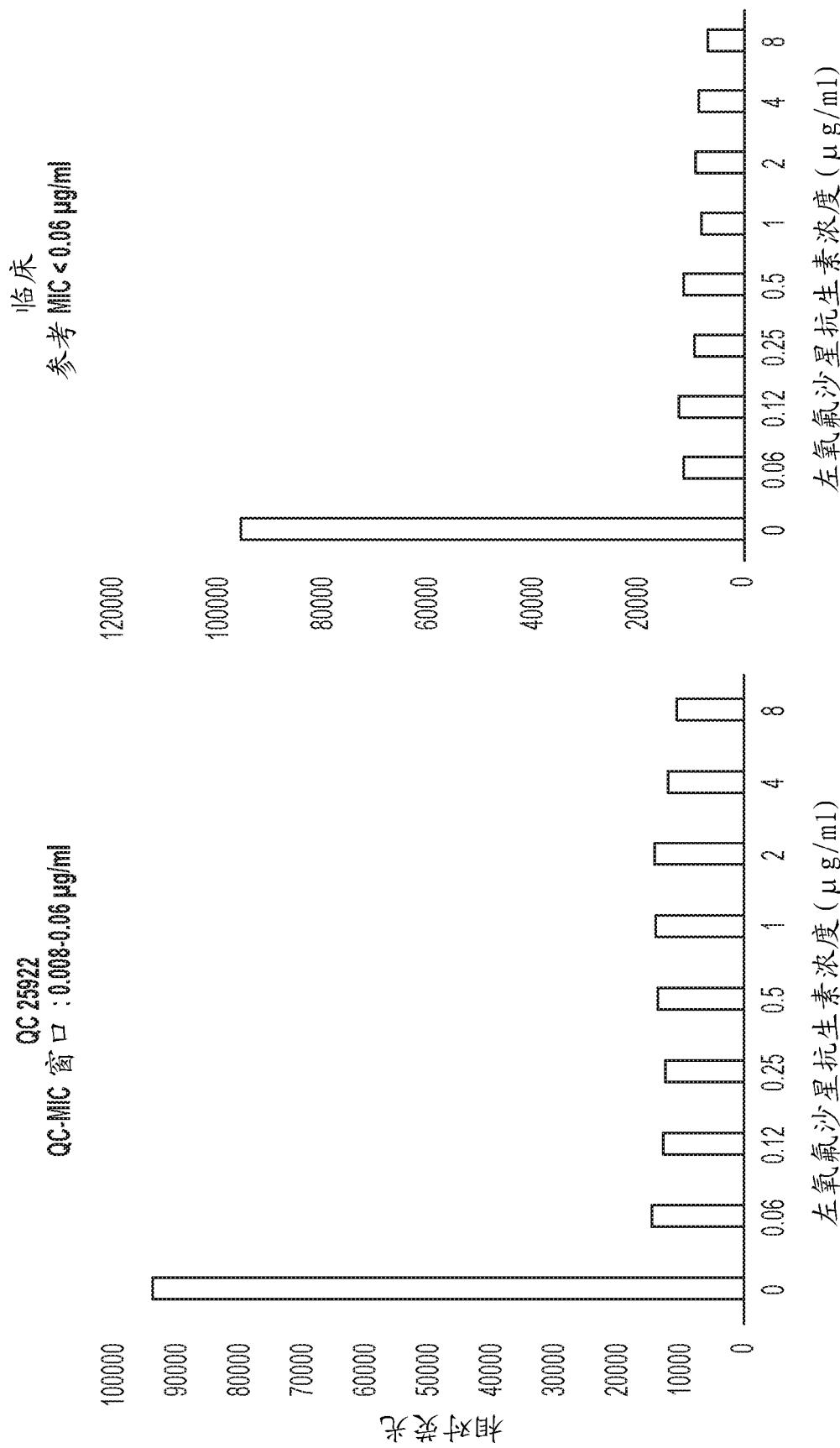


图 20

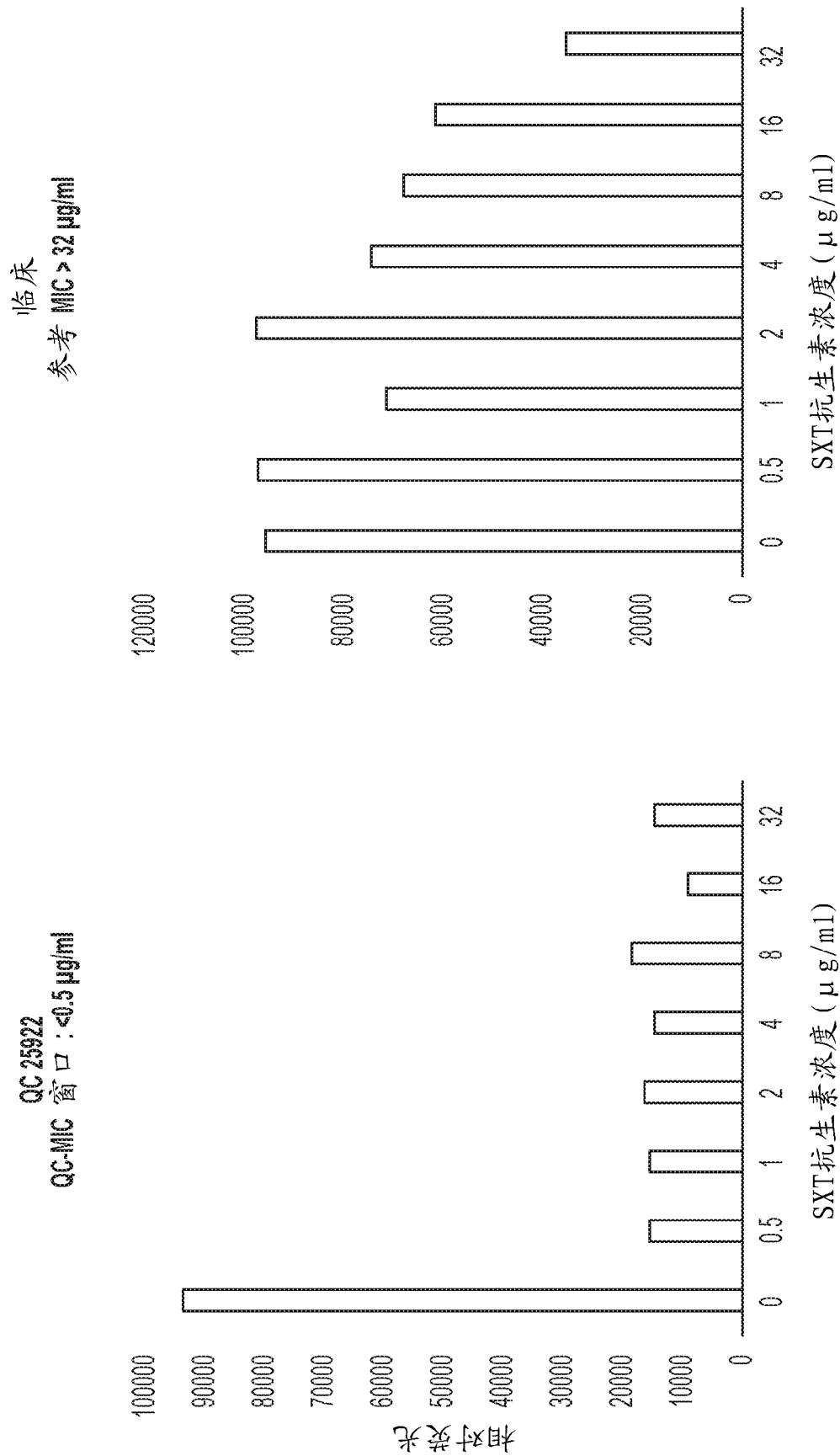


图 21

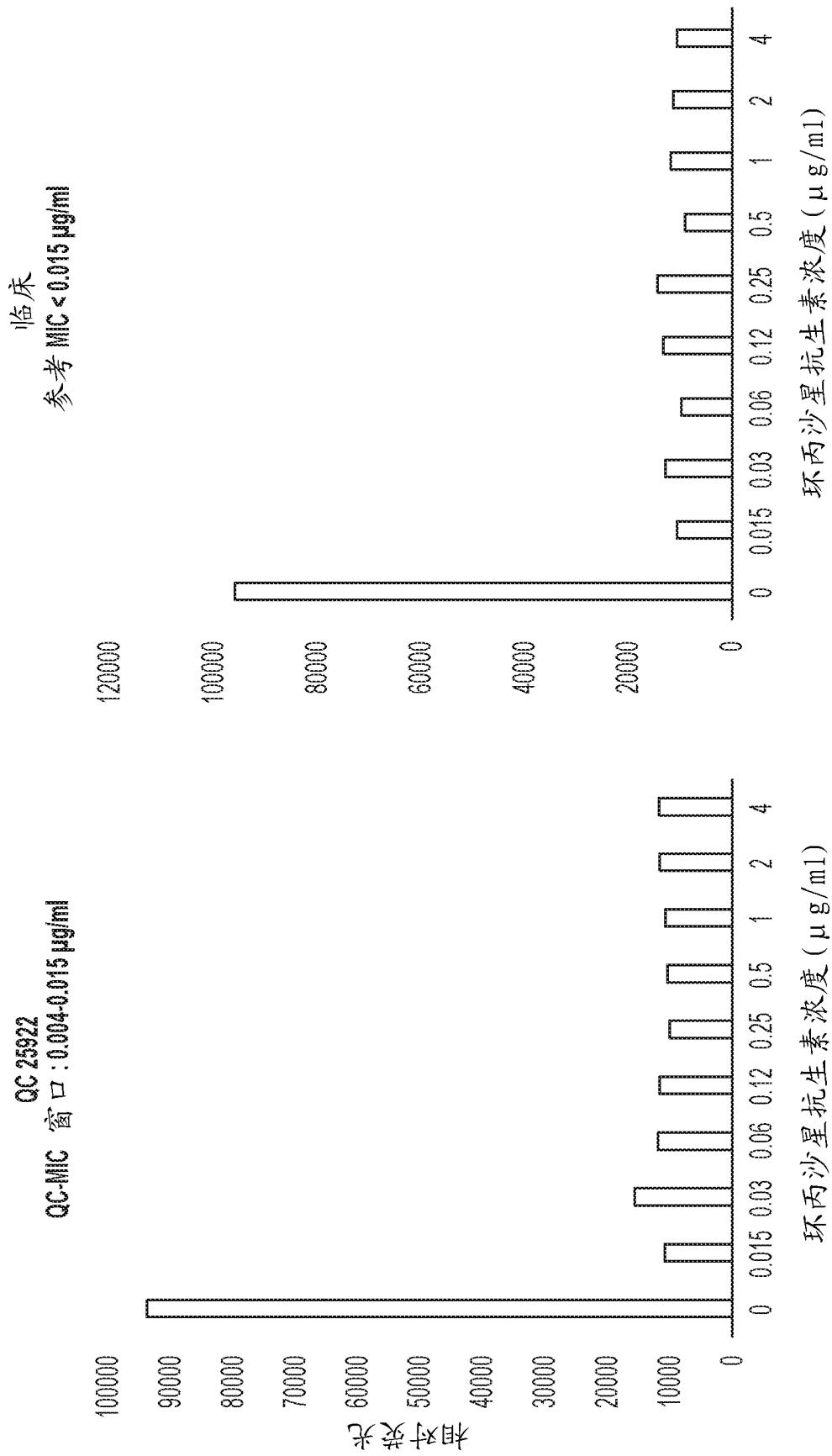


图 22

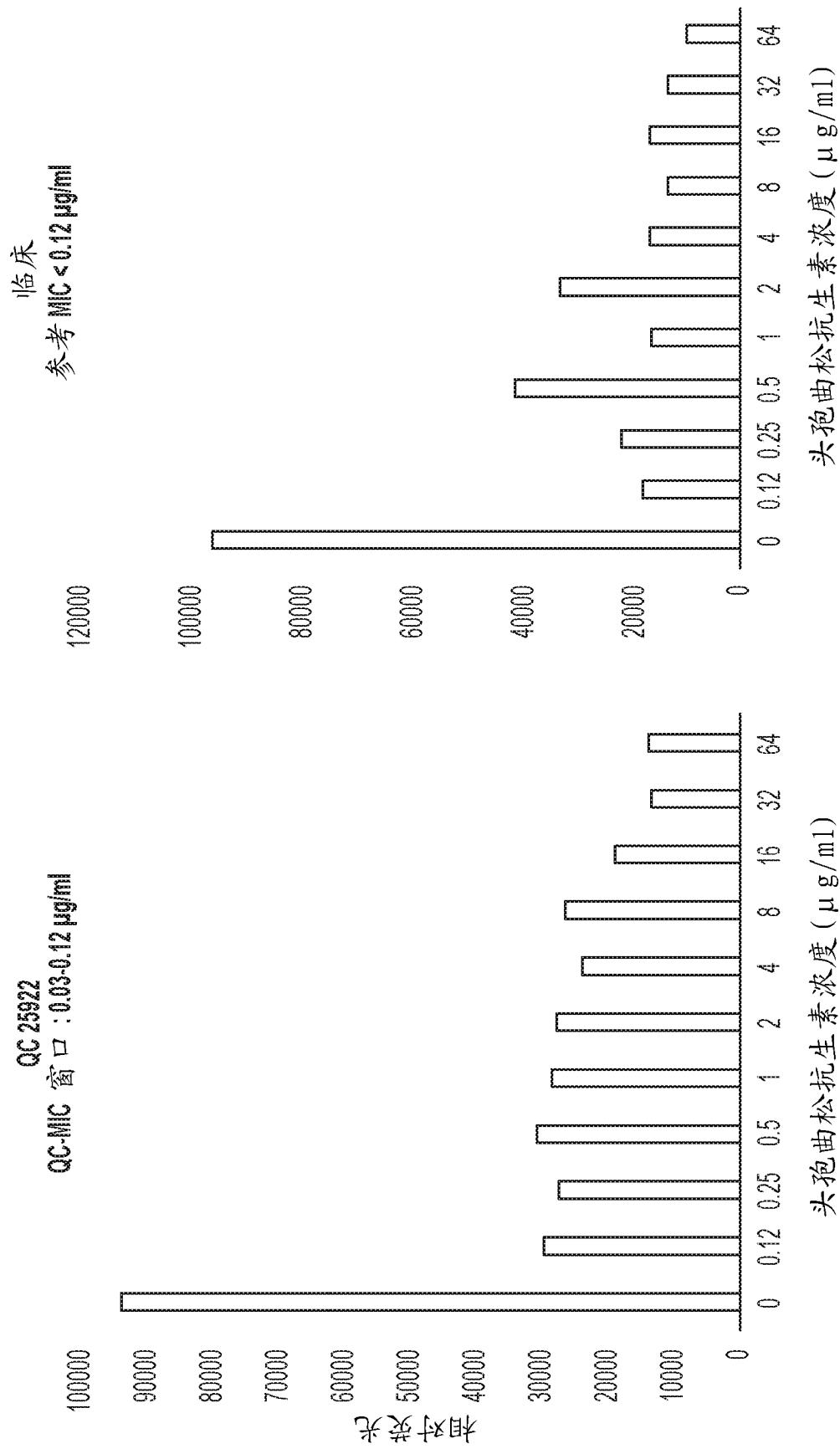


图 23

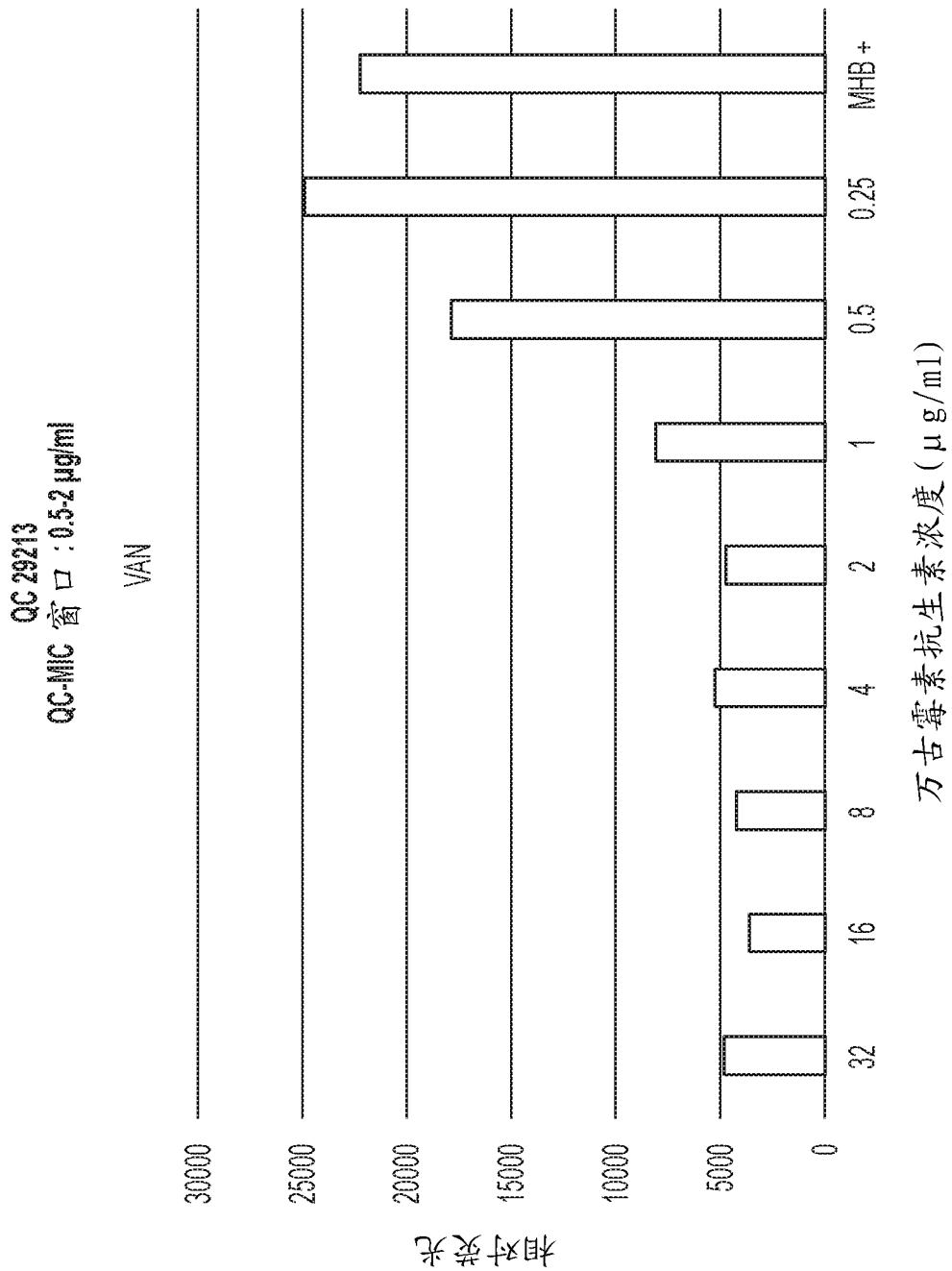


图 24

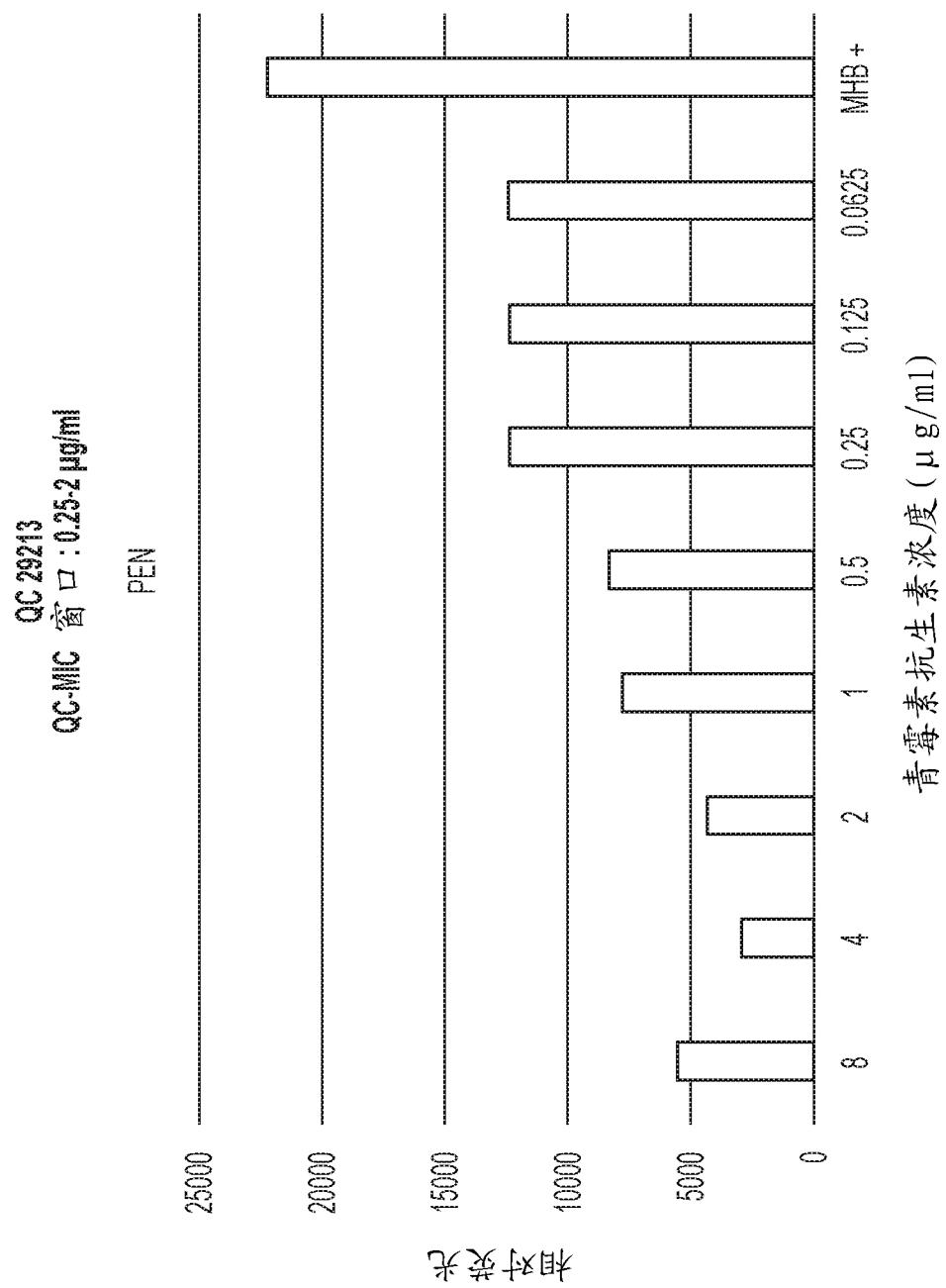


图 25

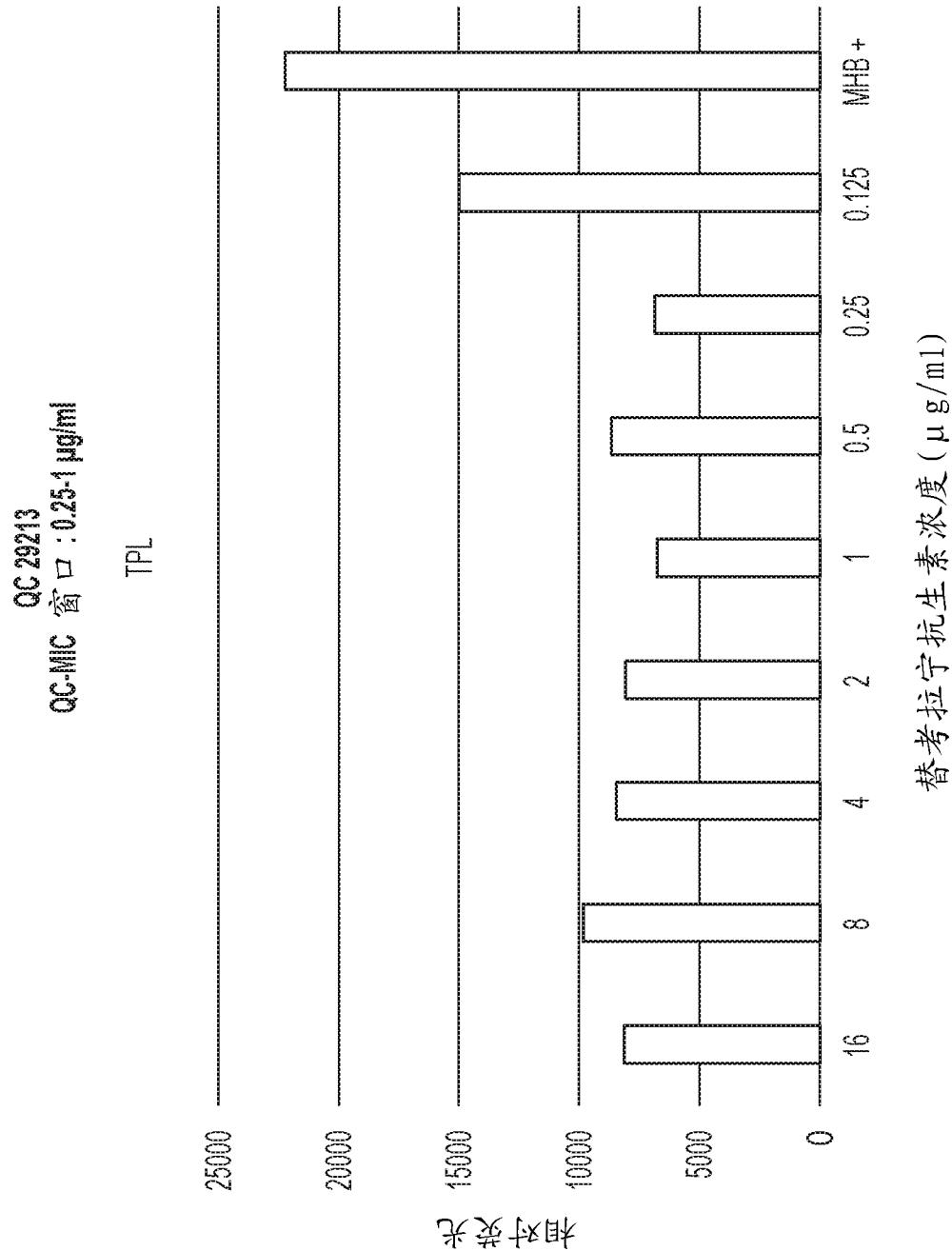


图 26

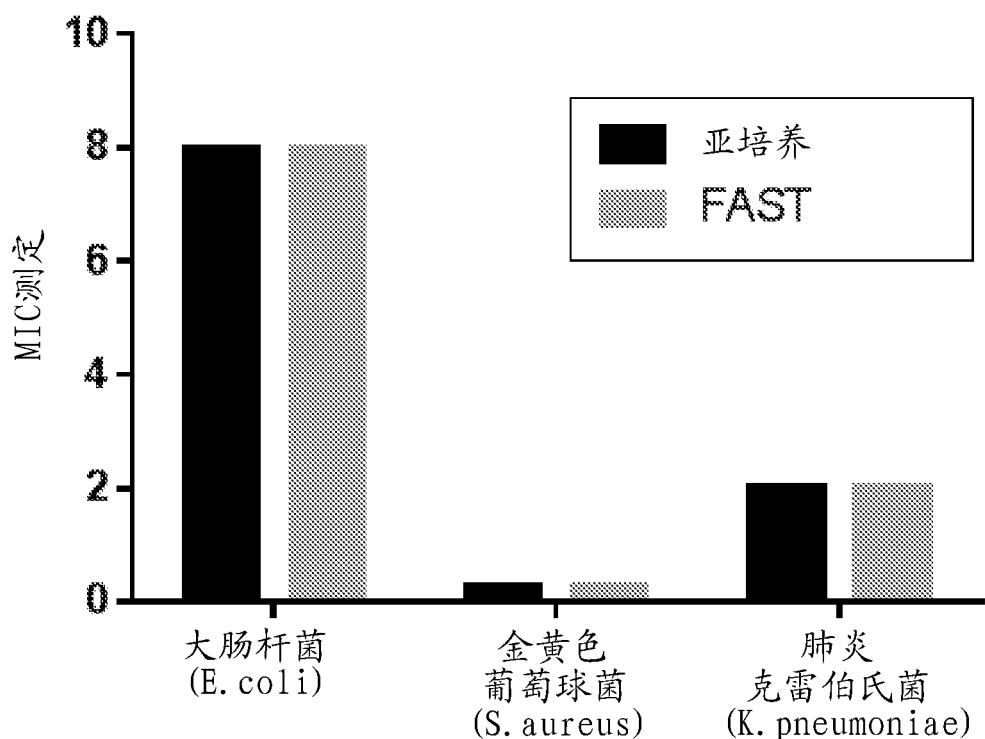


图 27

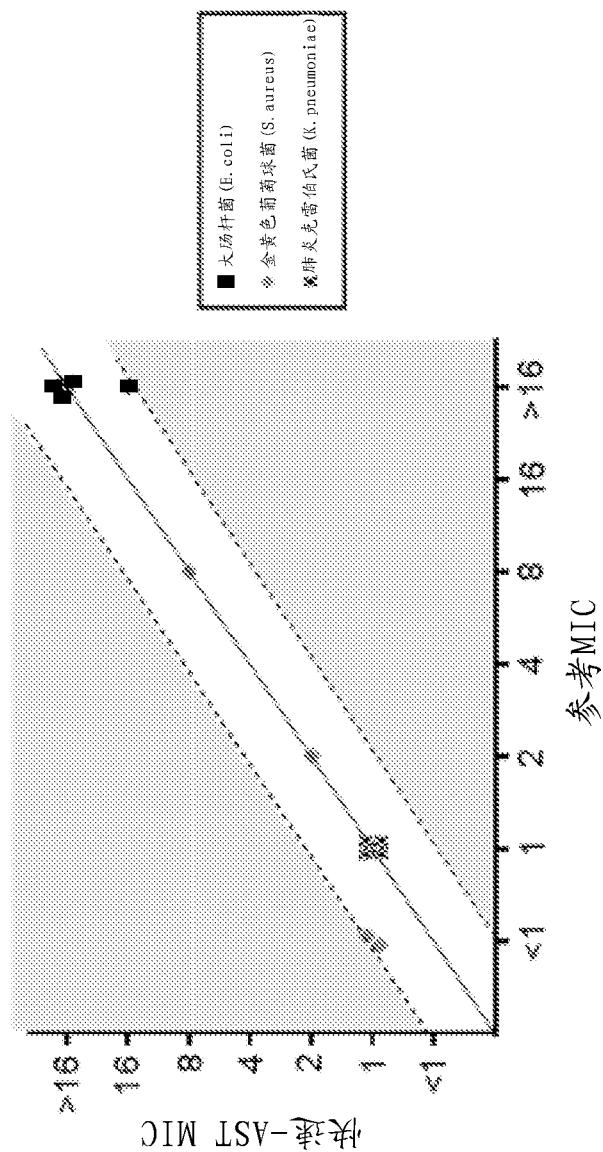


图 28

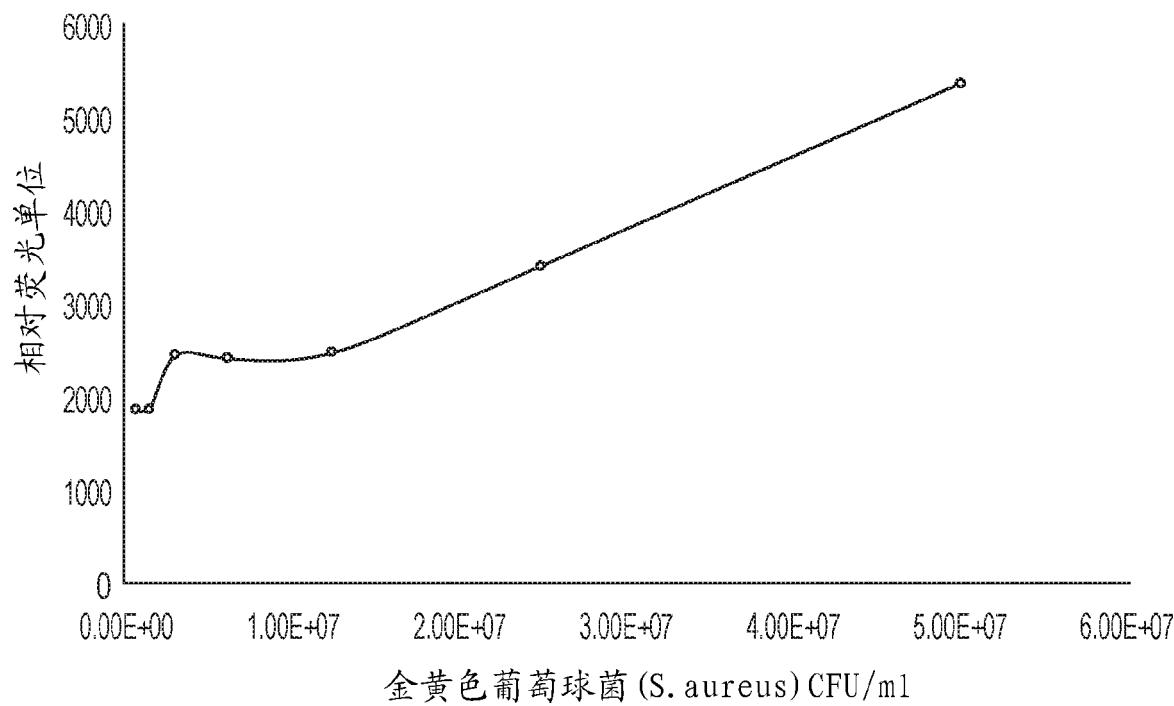


图 29

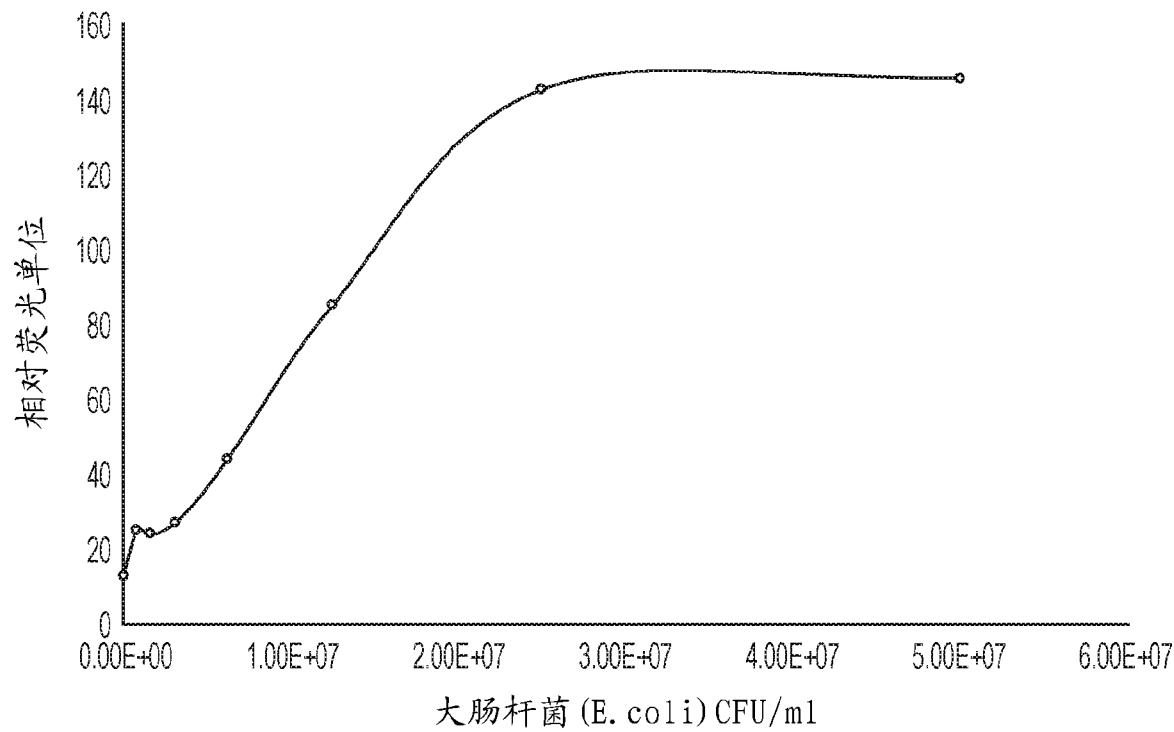


图 30

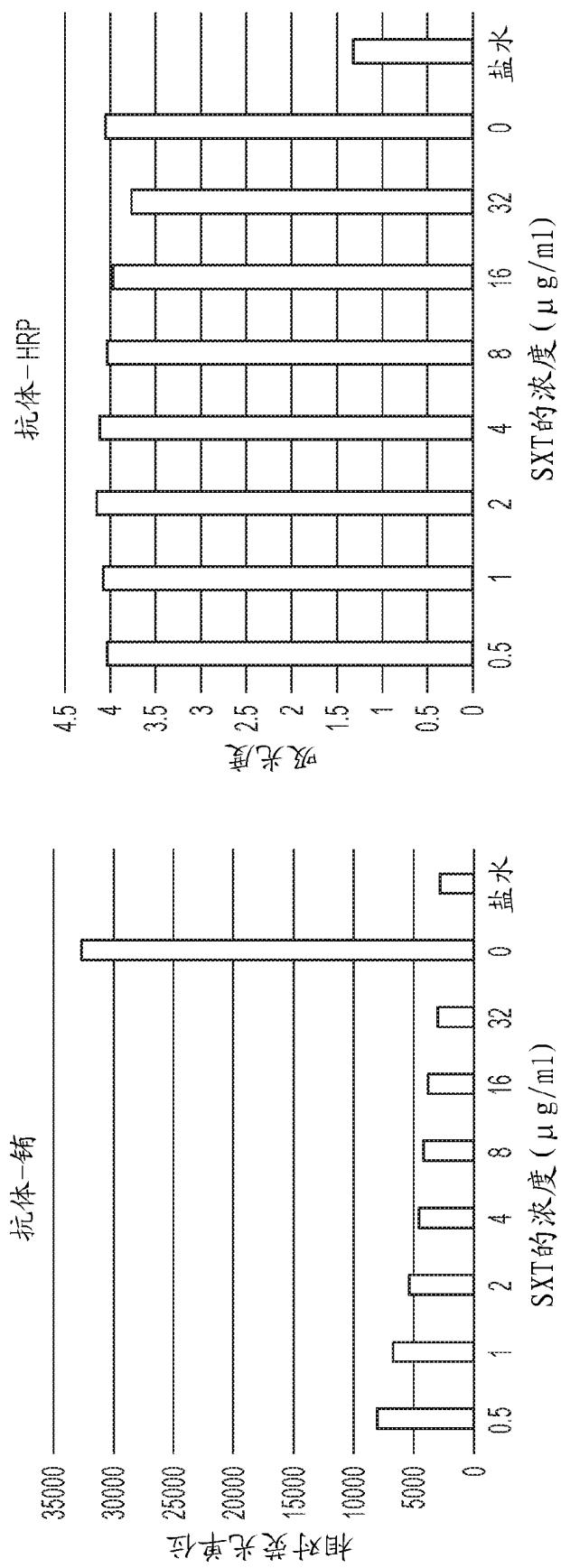


图 31

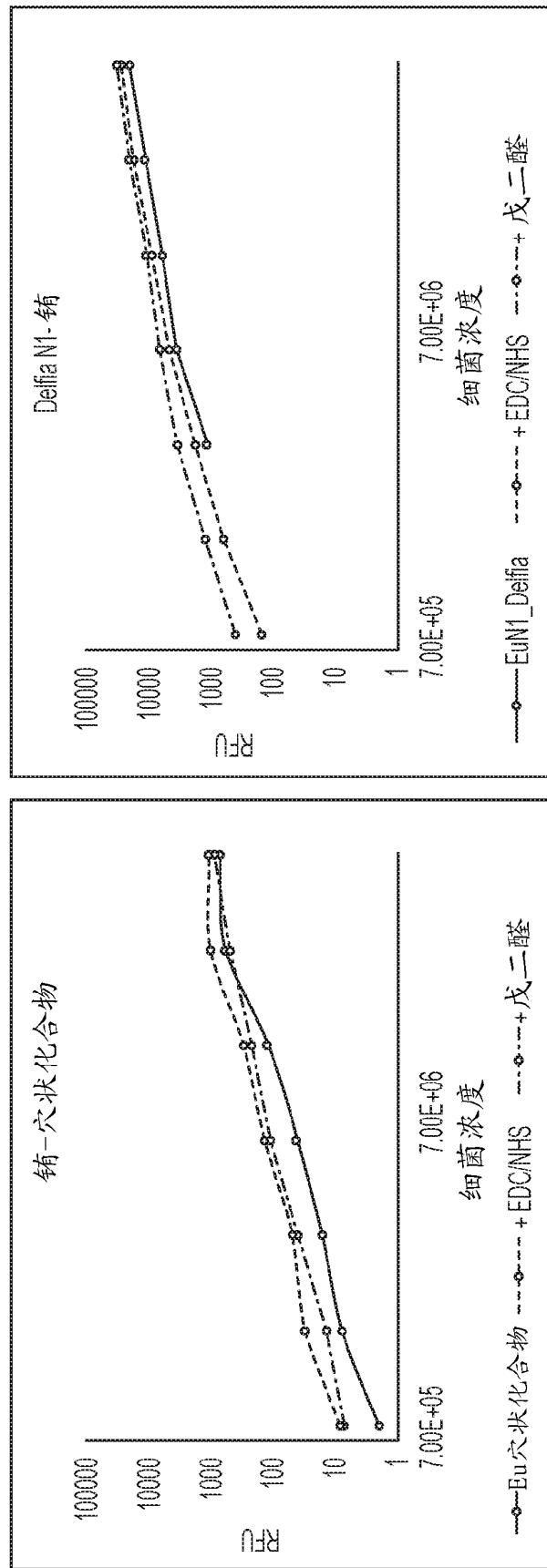


图 32

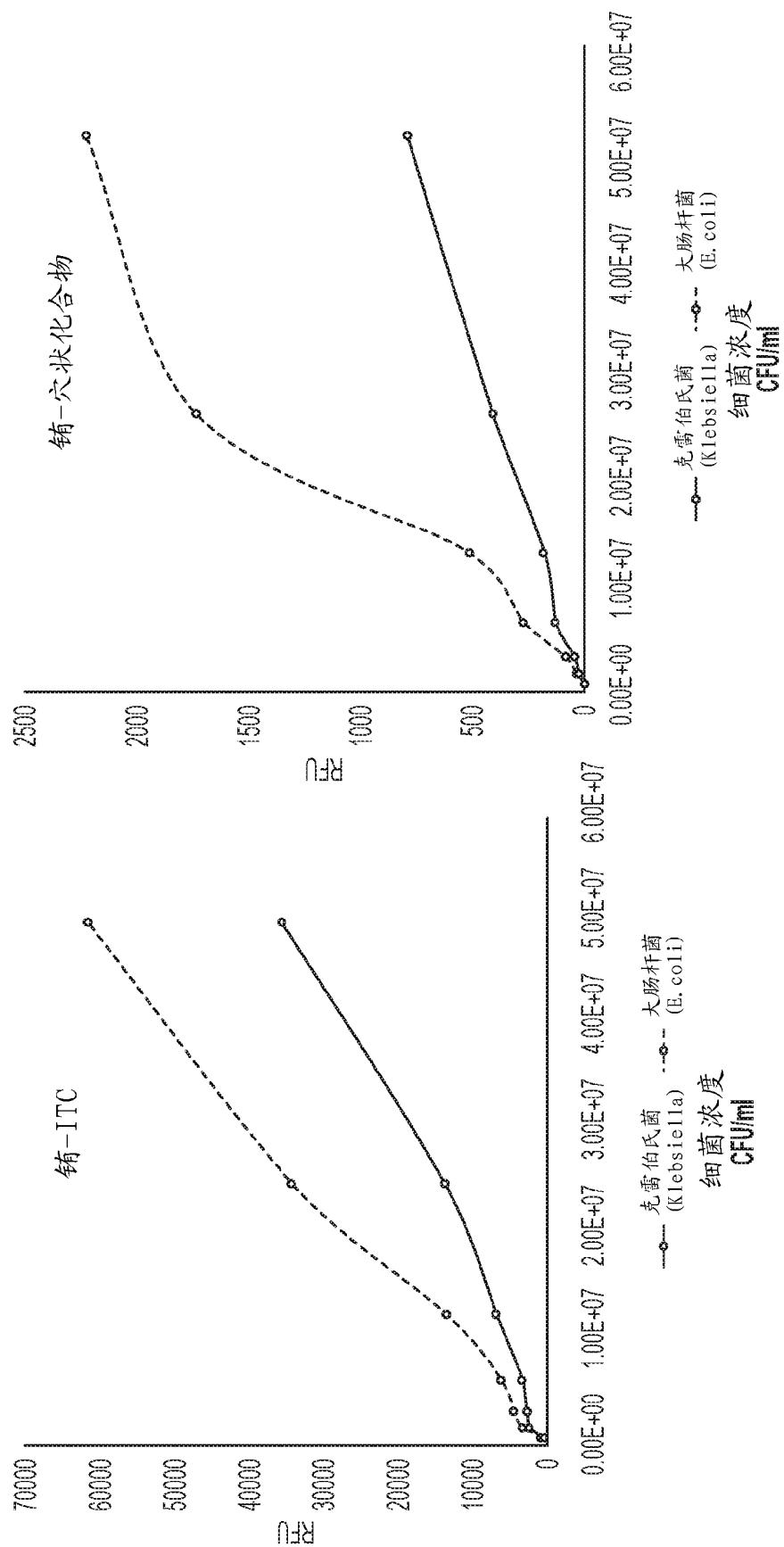


图 33

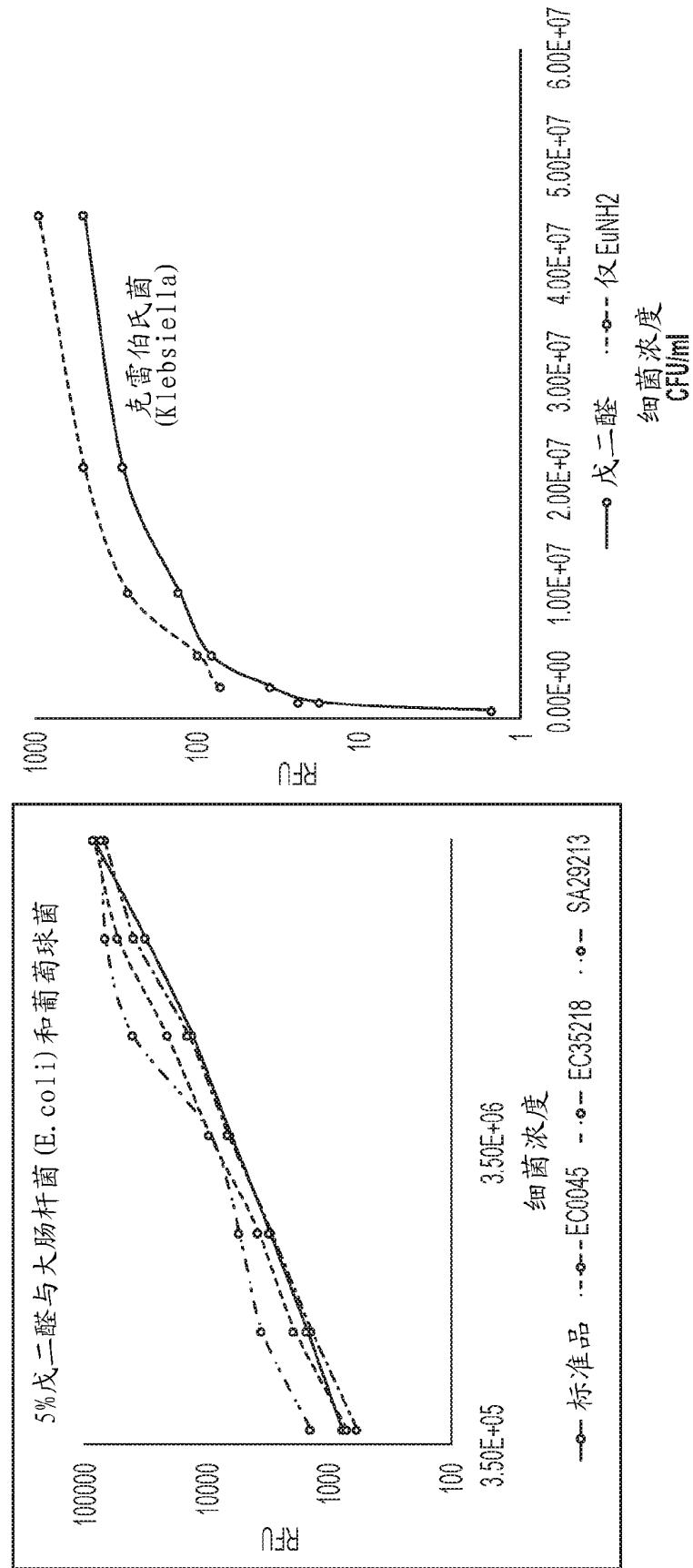


图 34

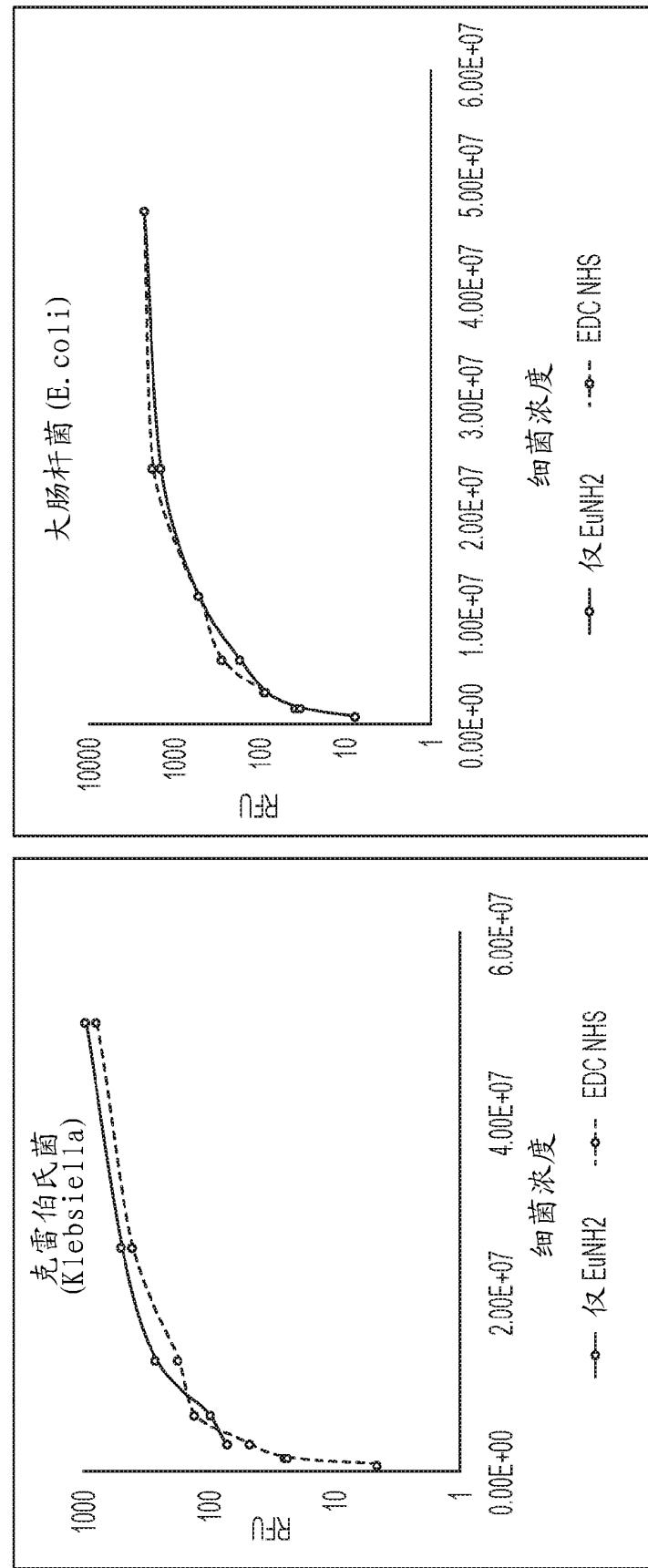


图 35

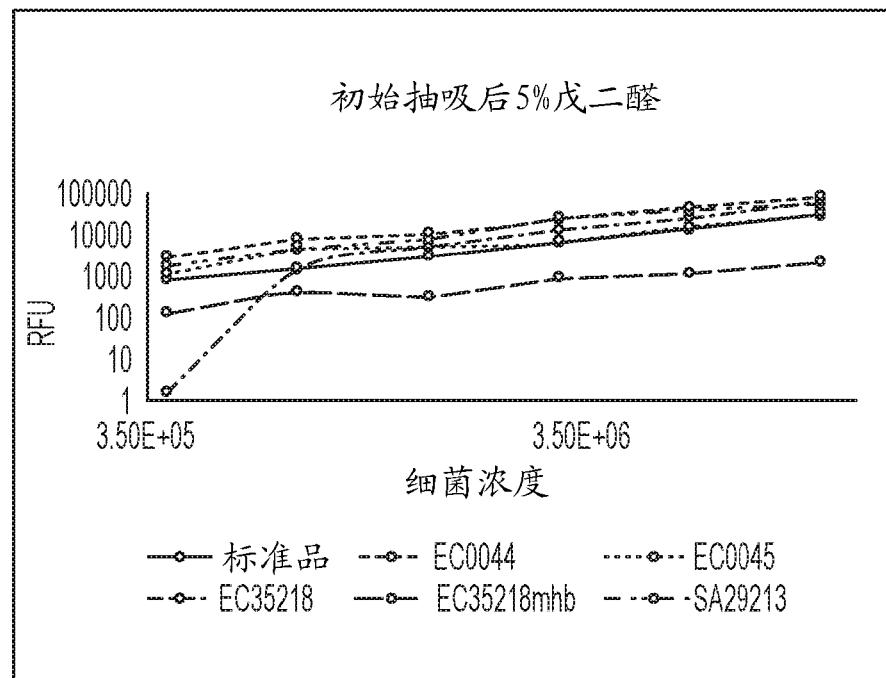


图 36A

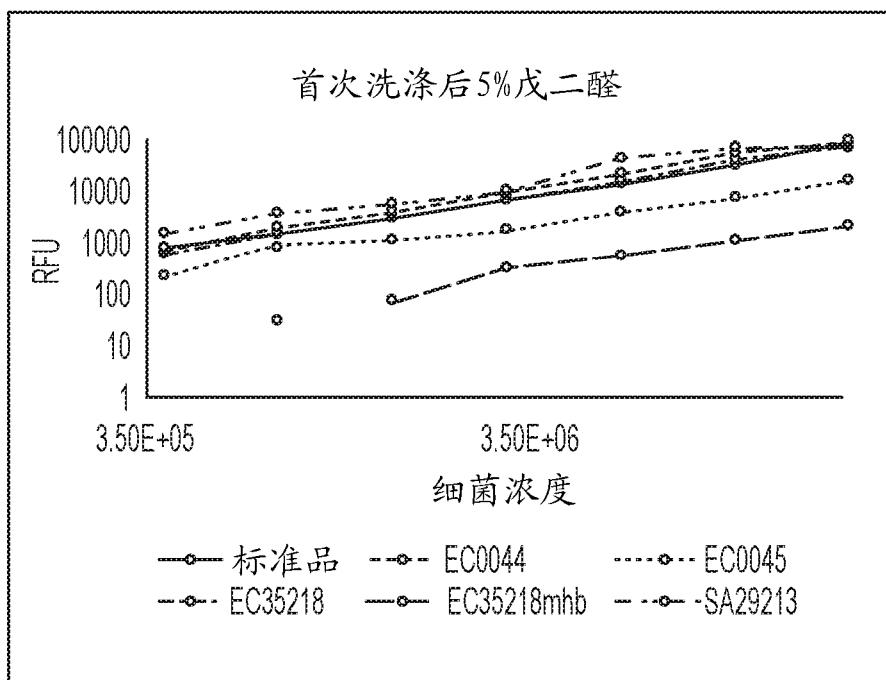


图 36B

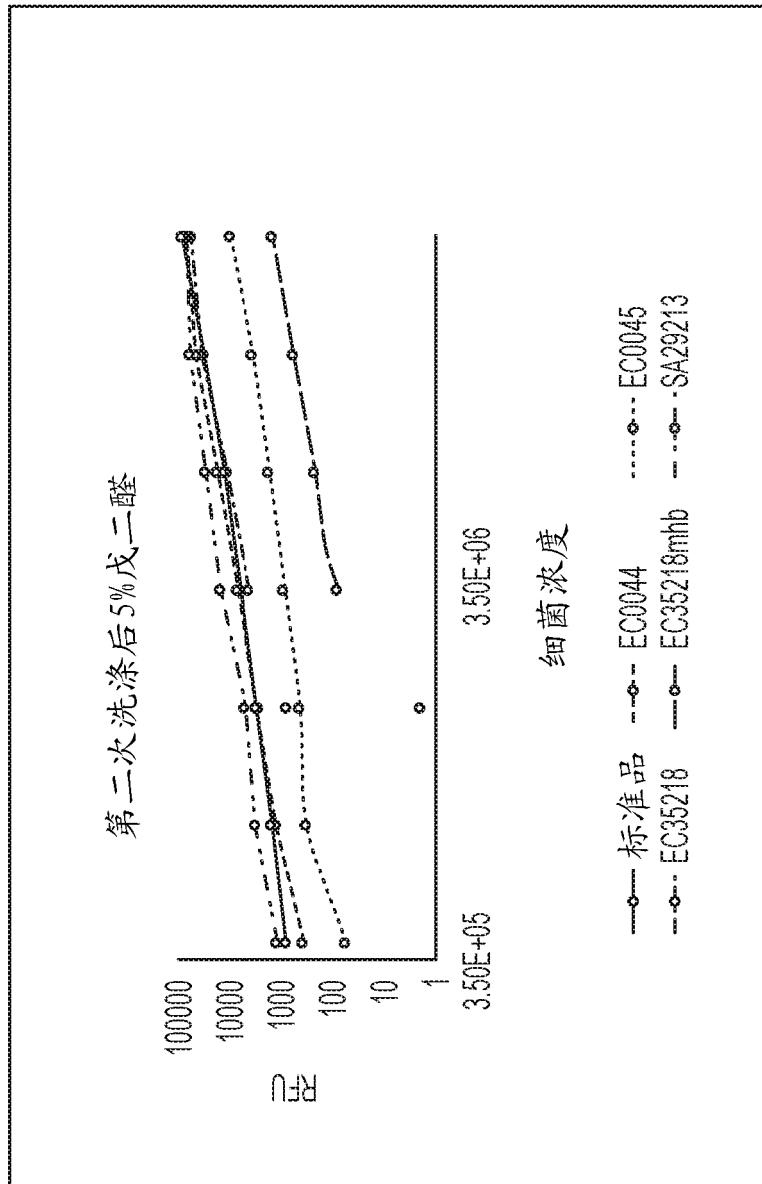


图 36C

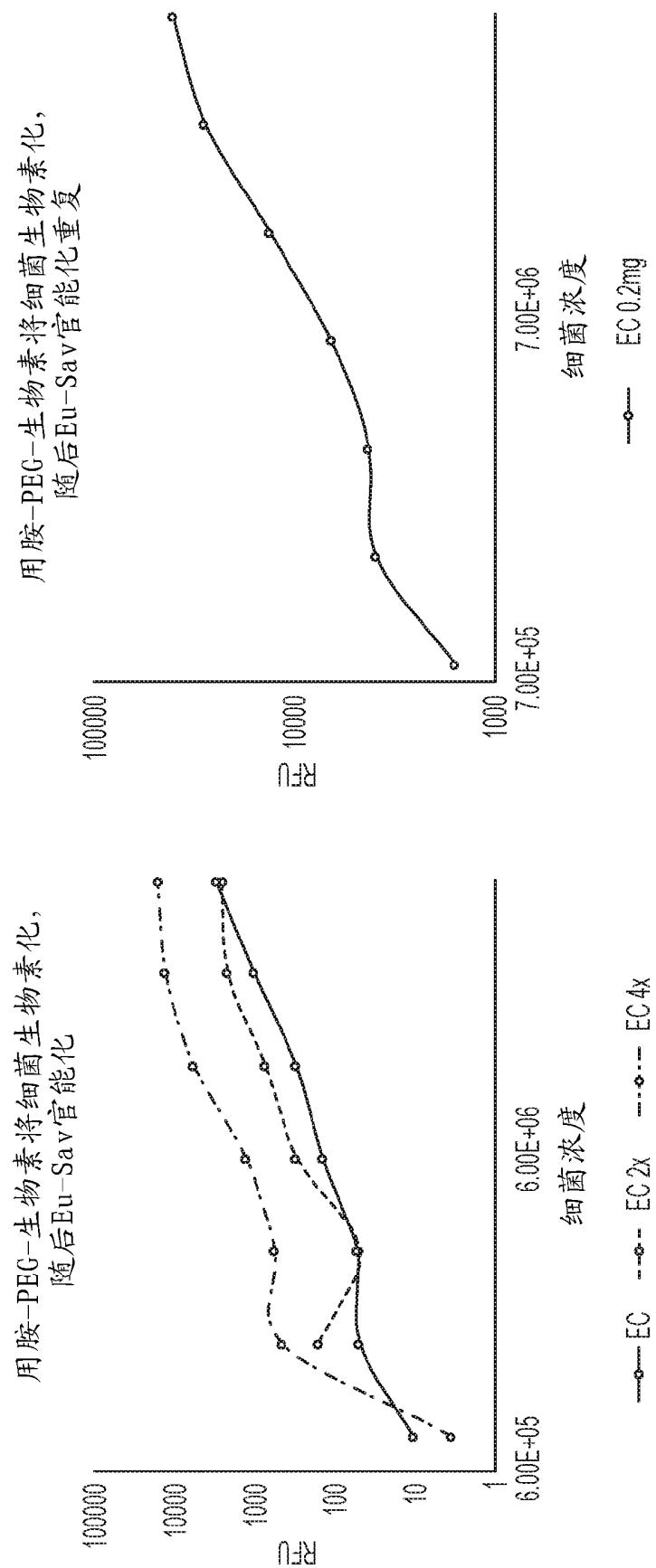


图 37

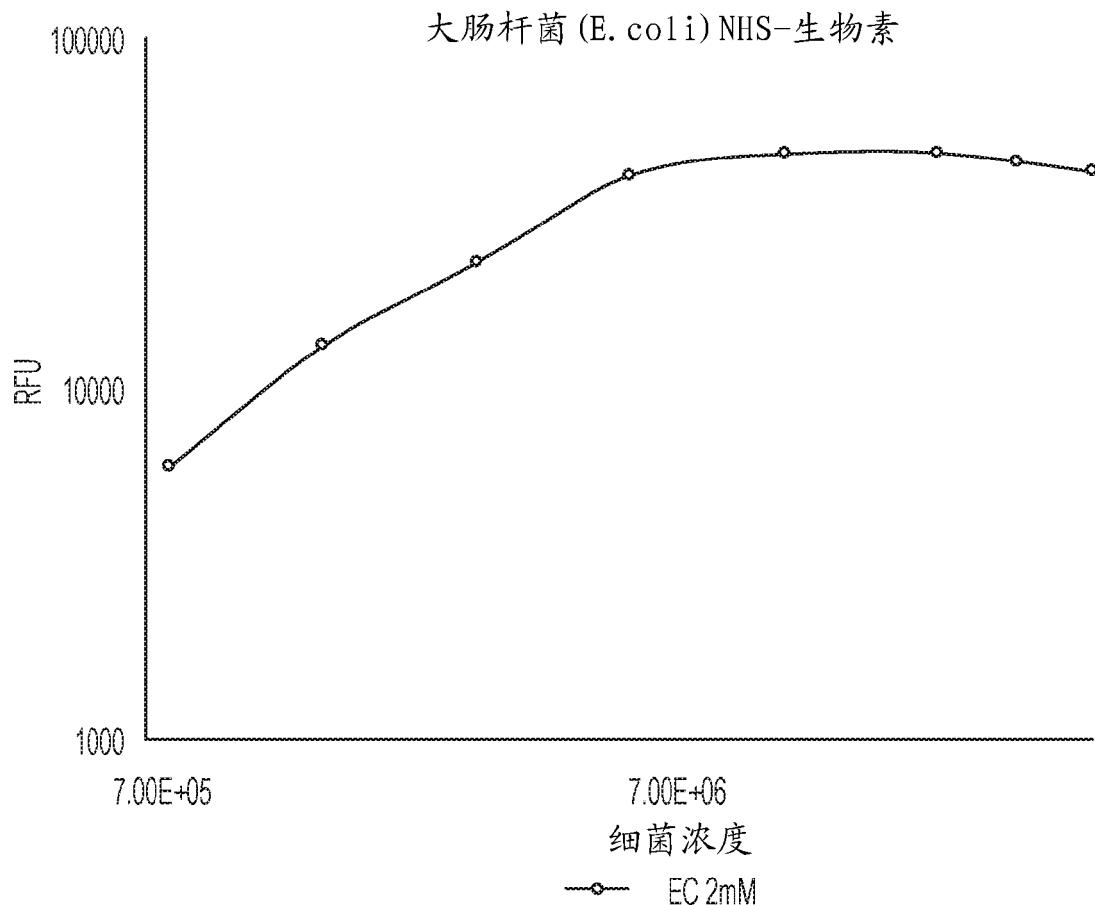


图 38

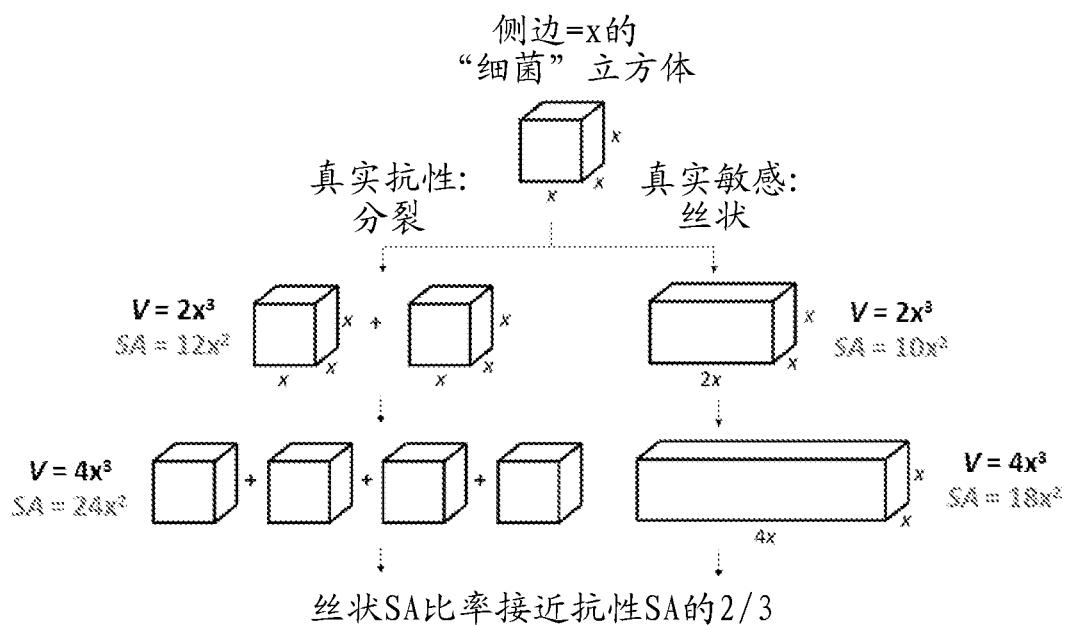


图 39

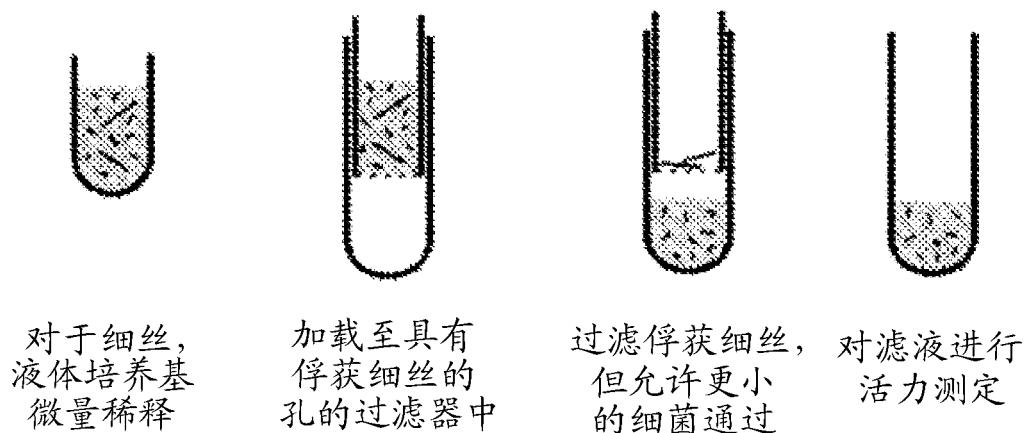


图 40

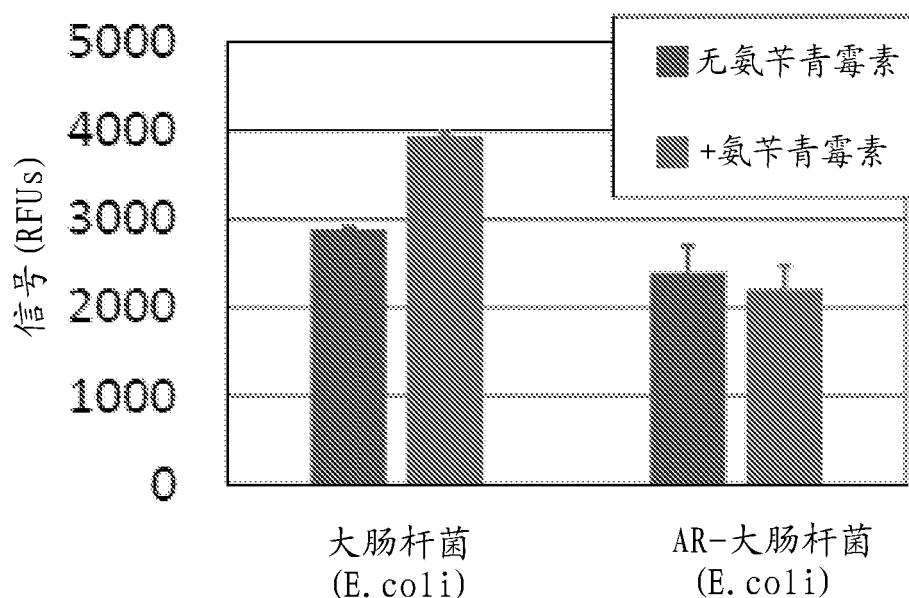


图 41

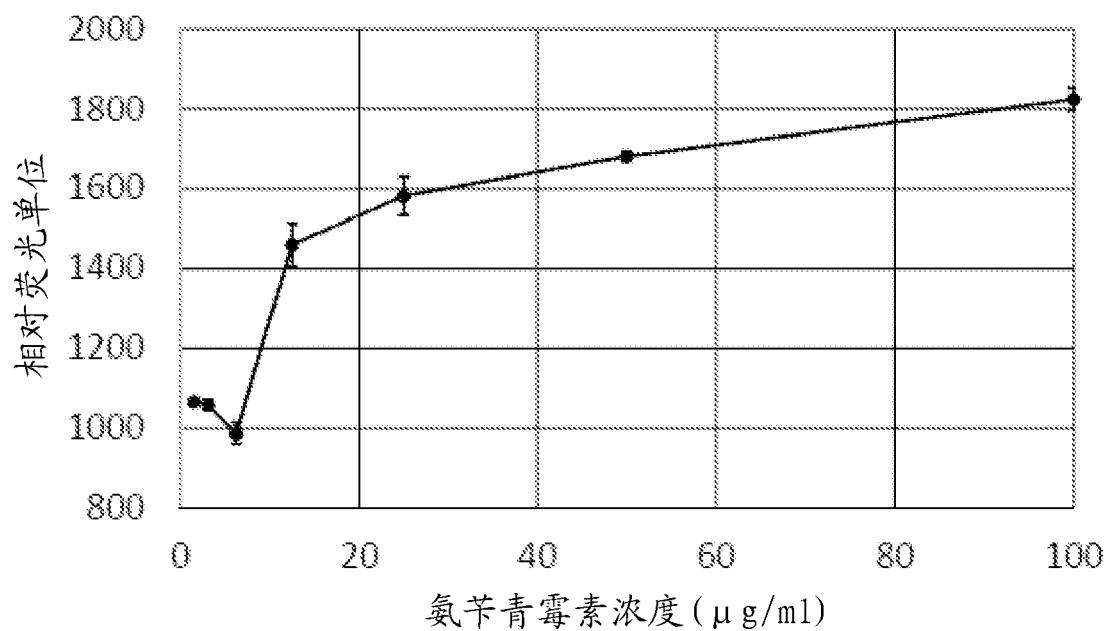


图 42

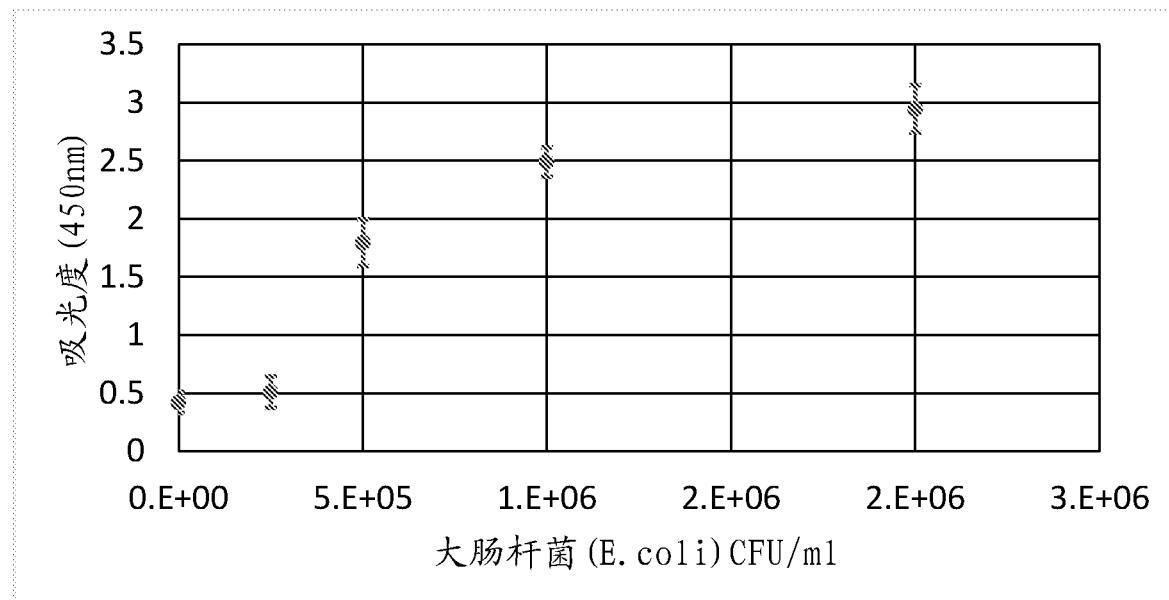
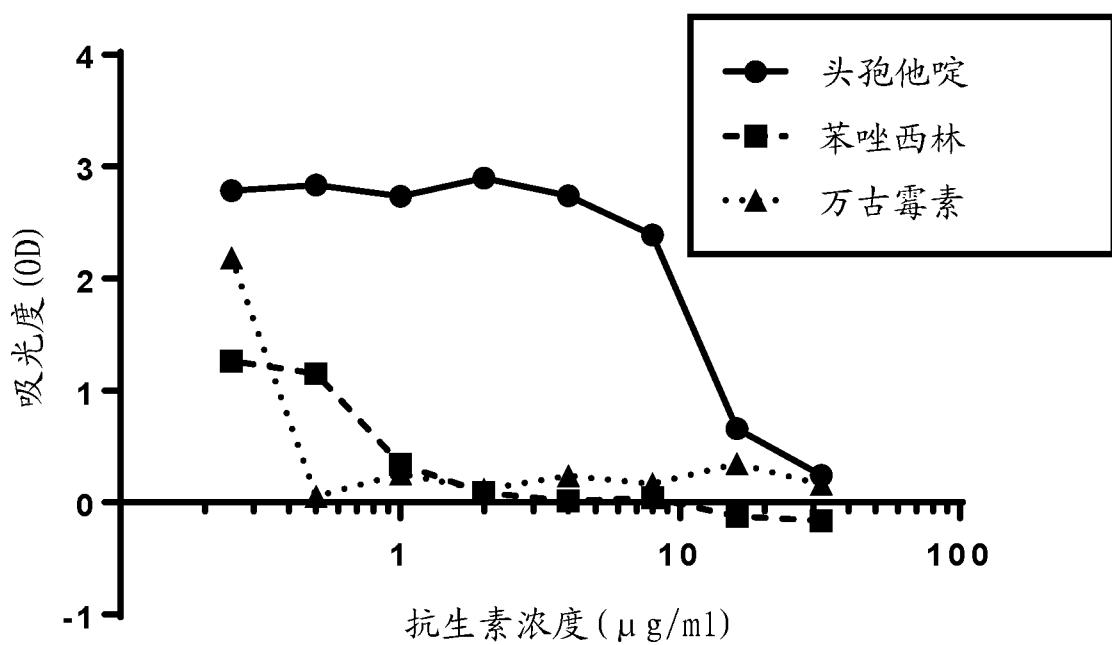


图 43



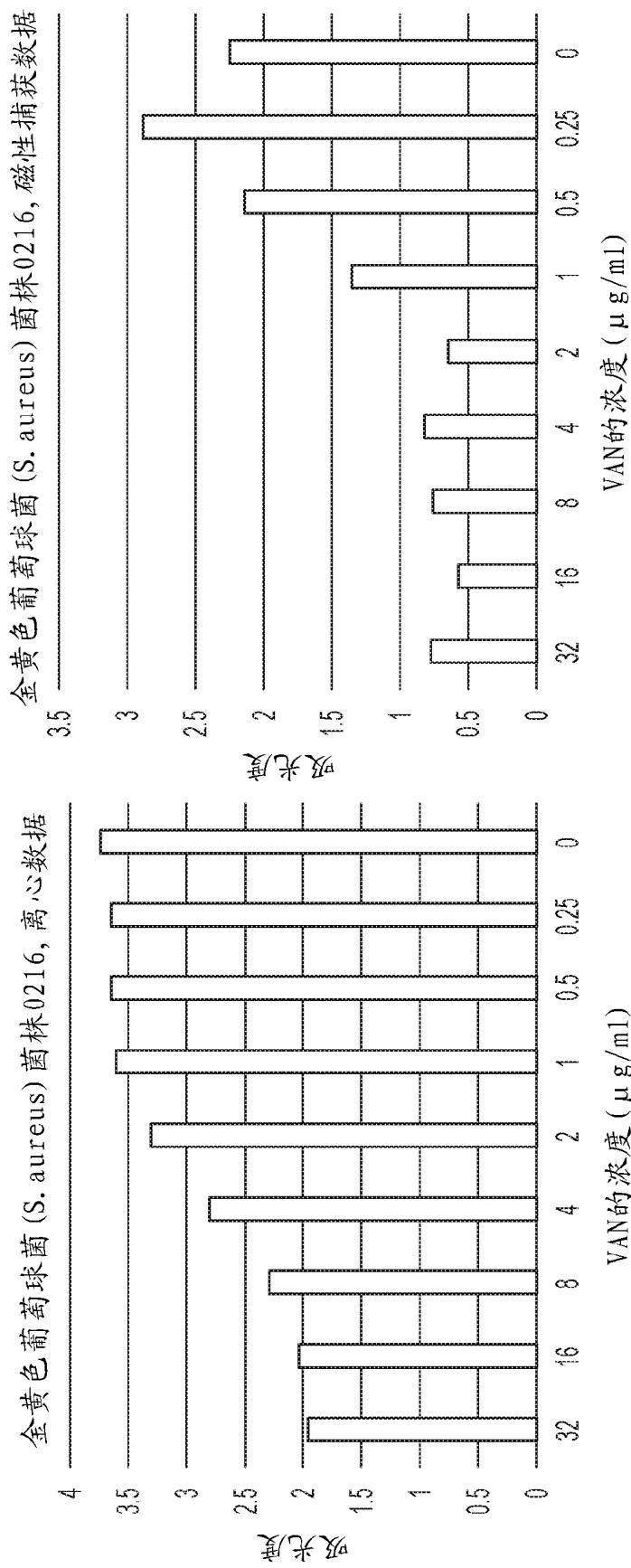


图 45

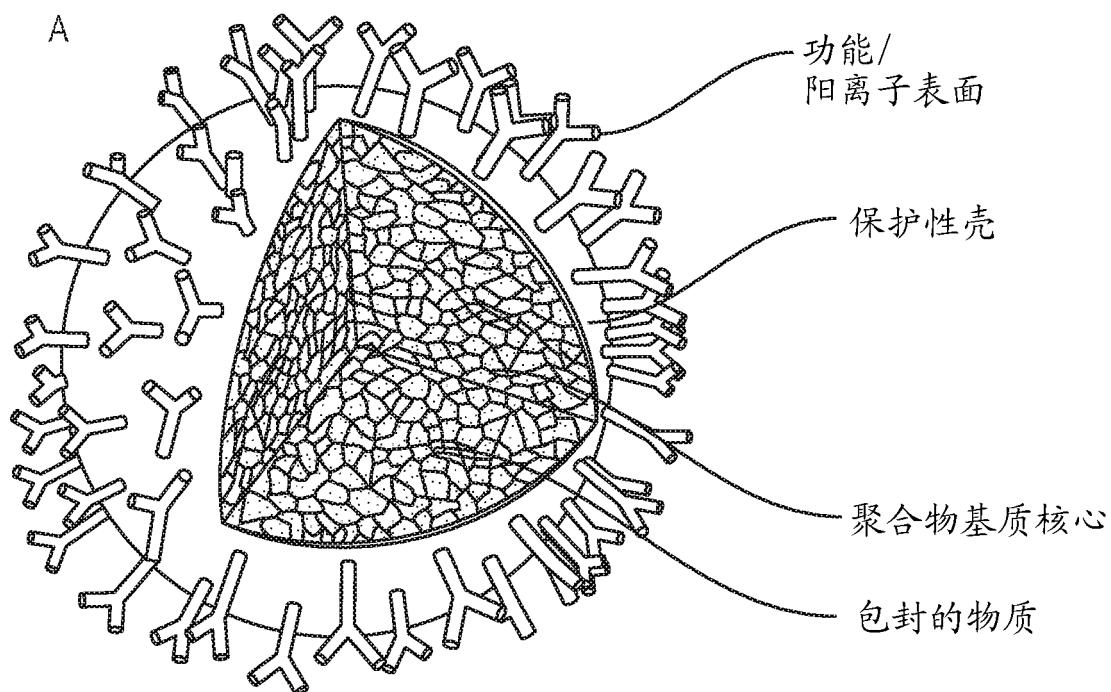


图 46A

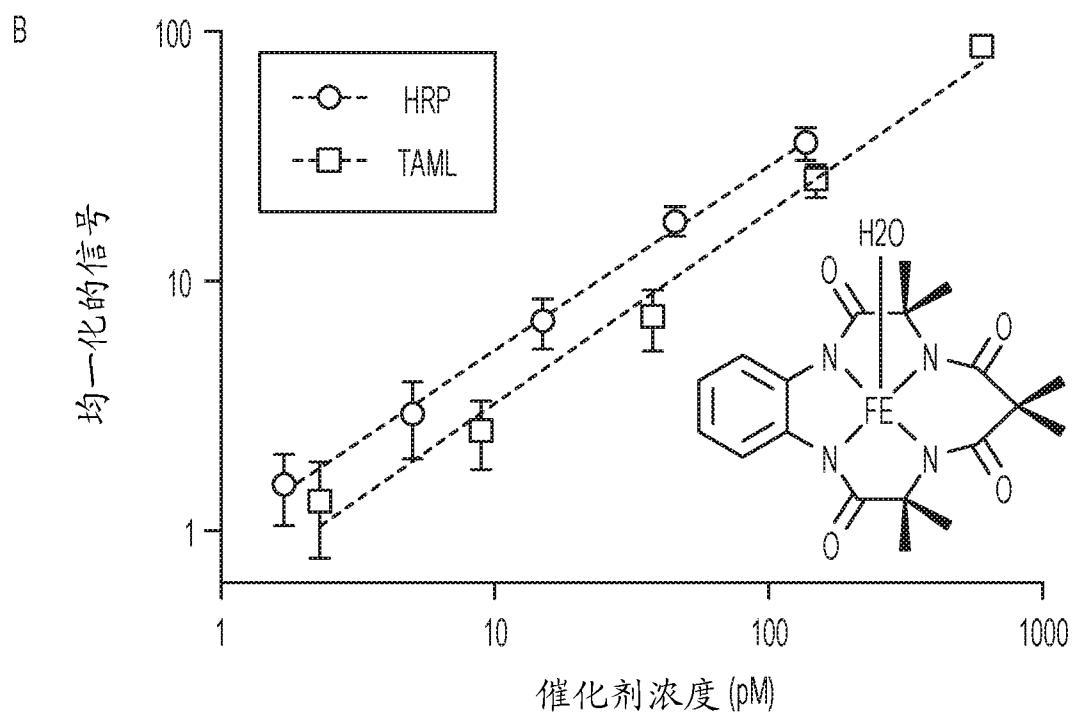


图 46B

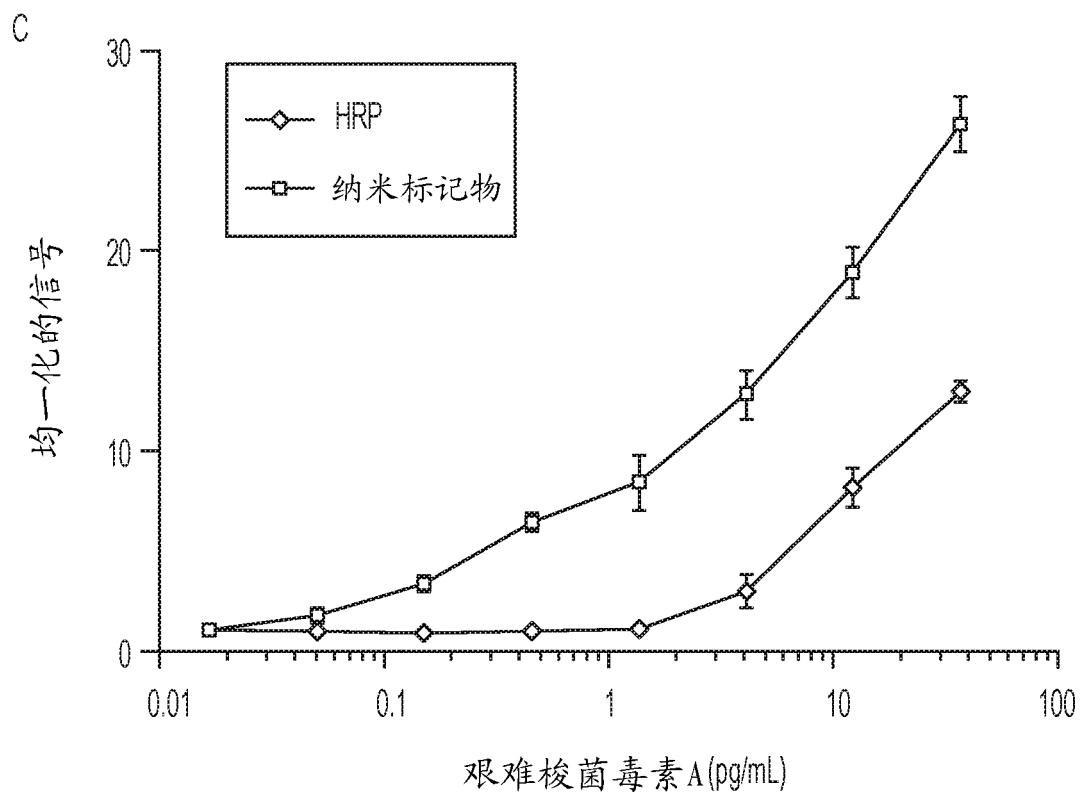


图 46C