



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 102471757 B

(45)授权公告日 2017. 11. 14

(21)申请号 201080030010.X

莱蒂西亚·巴顿

(22)申请日 2010.06.30

约安妮·波尔蒂拉

道格拉斯·劳沃恩

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 102471757 A

(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

(43)申请公布日 2012.05.23

代理人 王思琪 郑霞

(30)优先权数据

61/269,977 2009.07.01 US

(51)Int. Cl.

C12N 1/20(2006.01)

C12N 1/38(2006.01)

C12Q 1/04(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2011.12.31

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2010/040564 2010.06.30

(56)对比文件

J.GALLAGHER AND D.M.HORWILL.A

selective oleic acid albumin agar medium for the cultivation of Mycobacterium bovis..《J.Hyg.,Camb.》.1977,第79卷摘要和“discussion”部分.

(87)PCT国际申请的公布数据

W02011/002862 EN 2011.01.06

审查员 刘新蕾

(73)专利权人 生物梅里埃有限公司

地址 美国北卡罗来纳州

权利要求书2页 说明书25页 附图11页

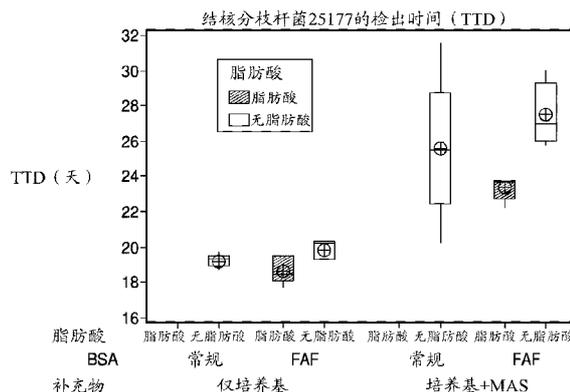
(72)发明人 帕拉姆帕尔·多尔

(54)发明名称

用于分枝杆菌的增强的检测的方法和培养基

(57)摘要

本发明涉及用于分枝杆菌(Mycobacterium)生长的增强的生长和检测的改良的培养基和方法。本发明还涉及可用于分枝杆菌的增强的生长和检测的改良的分枝杆菌试剂系统或试剂盒。



1. 一种用于分枝杆菌的增强的生长的方法,所述方法包括,将怀疑含有分枝杆菌的样品添加到包括无脂肪酸BSA、包括肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、油酸和亚油酸的脂肪酸补充物和包括一种或多种抗微生物剂的抗微生物补充物的培养基中,并且其中所述抗微生物补充物包括磷霉素,和将所述培养基置于适宜于所述分枝杆菌的生长的条件下,其中,与不包含无脂肪酸BSA和脂肪酸补充物的培养基相比,所述无脂肪酸BSA和所述脂肪酸补充物增强了所述分枝杆菌的生长。

2. 如权利要求1所述的方法,其中所述增强的生长包括将分枝杆菌生长的检出时间减少至少1天。

3. 如权利要求1所述的方法,其中所述抗微生物补充物还包括足以抑制所述培养基中的细菌污染、酵母污染或真菌污染的量的一种或多种另外的抗微生物剂,并且其中所述一种或多种另外的抗微生物剂选自抗细菌剂、抗病毒剂、抗真菌剂、抗原生动物剂和抗寄生虫剂组成的组。

4. 如权利要求1所述的方法,其中所述抗微生物补充物还包括足以抑制所述培养基中的细菌污染、酵母污染或真菌污染的量的一种或多种另外的抗微生物剂,并且其中所述一种或多种另外的抗微生物剂为抗生素。

5. 如权利要求4所述的方法,其中所述抗微生物补充物还包括一种或多种抗微生物剂,所述一种或多种抗微生物剂包括一种或多种选自以下组成的组的抗生素:多粘菌素B、万古霉素、阿洛西林、两性霉素B、萘啶酮酸和甲氧苄啶。

6. 如权利要求4所述的方法,其中所述抗微生物补充物包括多粘菌素B、两性霉素B、萘啶酮酸、甲氧苄啶和磷霉素。

7. 包含无脂肪酸BSA和肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、油酸和亚油酸的营养补充物在制备用于诊断由分枝杆菌属物种导致的感染的试剂盒中的用途,所述诊断包括如下步骤:(a) 提供培养基;(b) 将所述营养补充物添加到所述培养基;(c) 添加包括一种或多种抗微生物剂的抗微生物补充物,并且其中所述抗微生物补充物包括磷霉素;(d) 添加待确定其中存在所述分枝杆菌属物种或不存在所述分枝杆菌属物种的样品;和(e) 分析所述培养物中所述分枝杆菌属物种的存在,其中发现存在所述分枝杆菌属物种表明所述感染的阳性诊断。

8. 如权利要求7所述的用途,其中所述样品选自血清样品、血浆样品、唾液样品、痰样品、吸出物样品和拭子样品组成的组。

9. 如权利要求7所述的用途,其中利用所述营养补充物悬浮所述抗微生物补充物并且将所述营养补充物悬浮的抗微生物补充物添加到所述培养基中。

10. 如权利要求7所述的用途,其中所述抗微生物补充物还包括选自多粘菌素B、万古霉素、阿洛西林、两性霉素B、萘啶酮酸和甲氧苄啶组成的组的一种或多种抗生素。

11. 如权利要求7所述的用途,其中所述抗微生物补充物包括多粘菌素B、两性霉素B、萘啶酮酸、甲氧苄啶和磷霉素。

12. 一种用于检测培养基中分枝杆菌的生长的试剂盒,所述试剂盒包括:(1) 含有基础培养基的培养瓶;(2) 包括无脂肪酸BSA和肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、油酸和亚油酸的营养补充物;和(3) 包括用于阻抑所述培养基中污染呼吸道菌群的生长的一种或多种抗微生物剂的抗微生物补充物,并且其中所述抗微生物补充物包括磷霉素。

13. 如权利要求12所述的试剂盒,其中所述分枝杆菌具有增强的生长,并且所述增强的

生长包括将分枝杆菌生长的检出时间减少至少1天。

14. 如权利要求12所述的试剂盒,其中所述基础培养基是Middlebrook7H9。

15. 如权利要求12所述的试剂盒,其中所述基础培养基不含热不稳定组分。

16. 如权利要求15所述的试剂盒,其中所述培养瓶和所述基础培养基通过高压灭菌来灭菌。

17. 如权利要求12所述的试剂盒,其中所述抗微生物补充物还包括选自由多粘菌素B、万古霉素、阿洛西林、两性霉素B、萘啶酮酸和甲氧苄啶组成的一种或多种抗生素。

18. 如权利要求17所述的试剂盒,其中所述抗微生物补充物还包括多粘菌素B、万古霉素、两性霉素B、萘啶酮酸和甲氧苄啶。

## 用于分枝杆菌的增强的检测的方法和培养基

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2009年7月1日提交的标题为“Method and Culture Medium for Enhanced Detection of Mycobacterium(用于分枝杆菌的增强的检测的方法和培养基)”的美国临时专利申请第61/269,977号的权益,将其并入本文。

### 发明领域

[0003] 本发明一般涉及用于分枝杆菌的增强的检测的培养基和方法。更具体地,本发明涉及针对用于改良或减少培养基中的分枝杆菌生长的检出时间(TTD)的培养基和方法的各种改良。

[0004] 发明背景

[0005] 分枝杆菌是细菌的一个属,其特征为抗酸性的、非运动性的、革兰氏阳性杆菌。该属包括许多种,包括:非洲分枝杆菌(*Mycobacterium africanum*)、鸟分枝杆菌(*M. avium*)、牛分枝杆菌(*M. bovis*)、牛分枝杆菌卡介苗(*M. bovis*-BCG)、龟分枝杆菌(*M. chelonae*)、偶发分枝杆菌(*M. fortuitum*)、戈登分枝杆菌(*M. goodii*)、胞内分枝杆菌(*M. intracellulare*)、堪萨斯分枝杆菌(*M. kansasii*)、麻风分枝杆菌(*M. leprae*)、田鼠分枝杆菌(*M. microti*)、瘰疬分枝杆菌(*M. scrofulaceum*)、副结核分枝杆菌(*M. paratuberculosis*)和结核分枝杆菌(*M. tuberculosis*)。分枝杆菌中的一些对于人和动物是致病的,尤其是结核分枝杆菌、麻风分枝杆菌和牛分枝杆菌。其他的分枝杆菌属物种(*mycobacterial species*)通常不是致病的,但在诸如AIDS患者的无免疫应答的个体中导致机会感染。例如,在免疫系统受抑制或免疫系统受损的受试者中,堪萨斯分枝杆菌、鸟分枝杆菌和胞内分枝杆菌的感染可导致严重的肺病。事实上,自1953年首次报道后,所报道的分枝杆菌感染的病例在美国逐渐增加;这些病例中的许多与AIDS流行有关。

[0006] 在临床物种中检测分枝杆菌属物种作为临床诊断工具是重要的。历史上,认为结核分枝杆菌是该属中唯一的临床上重要的病原体。结核分枝杆菌的药物抗性菌株的发病率的增高已进一步地加强了检测该物种的需求。结核病表现出全球流行病的所有主要特性。目前,世界范围中超过三千五百万的个体罹患结核病,并导致每年四百万以上的死亡。因此,结核病是全世界主要关心的问题。结核病可由结核分枝杆菌、牛分枝杆菌、非洲分枝杆菌和田鼠分枝杆菌(分枝杆菌科的抗酸性的、革兰氏阳性的结核杆菌)导致。在印度的马德拉斯(Madras)和其他城市中还已从患者中分离了结核分枝杆菌的一些地方性致病菌株,其在某些方面不同于强毒株结核分枝杆菌H37Rv。

[0007] 然而,其他分枝杆菌属物种在临床上也是重要的。这些分枝杆菌属物种有时被称作“MOTT”,即非结核分枝杆菌,通常包括鸟分枝杆菌/胞内分枝杆菌复合物生物体(鸟分枝杆菌、胞内分枝杆菌、副结核分枝杆菌,常称作MAIC)、戈登分枝杆菌、偶发分枝杆菌、龟分枝杆菌、产粘液分枝杆菌(*M. mucogenicum*)和临床样本中分枝杆菌属物种的混合物。例如,已显示通过鸟分枝杆菌复合物(MAC)细菌的快速生长机会感染频繁发生于AIDS个体和其他的无免疫应答的个体中。在此类感染的个体中,已发现每毫升痰沉淀物至少 $10^6$ MAC细胞。因

此,可检测许多分枝杆菌属物种的检测测定在临床上是很重要的。

[0008] 用于检测和鉴定样品中的分枝杆菌属物种的许多临床方法需要分析细菌的物理特性(例如,抗酸细菌染色法和杆菌的显微镜检测)、生理特性(例如,在确定的培养基上的生长)或生化特性(例如,膜脂组成)。这些方法需要待检测的样品中相对高浓度的细菌,根据临床技术人员的经验和专业知识不同可能是主观的,且是费时的。因为分枝杆菌属物种通常难以在体外生长,且可能需要几周来达到有用的培养密度,所以这些方法还可能延迟的患者治疗和诊断完成之前与隔离感染的个体有关的花费。

[0009] 一般分枝杆菌是生长非常缓慢的苛求菌,尤其是结核分枝杆菌和牛分枝杆菌。使这些生物体在常用的培养基上生长可能需要2至3周。已作出许多努力来寻找可增强生长并降低时间因素的培养基或物质。例如,美国专利第3,935,073号,其通过引用并入本文,公开了用于培养分枝杆菌的生长培养基,其含有指定水平的以下营养物:7H9肉汤基质0.47%(含有获自Cockeysville,Maryland的BBL Microbiology Systems的磷酸钾和磷酸钠、谷氨酸钠、柠檬酸钠、硫酸铵、吡哆素、柠檬酸铁铵、硫酸镁、硫酸锌、硫酸铜、生物素和氯化钙)、牛血清白蛋白0.5%、酪蛋白水解物0.1%、过氧化氢酶96单位/小瓶、<sup>14</sup>C标记的底物2uCi/小瓶,去离子水平衡至2ml,最终pH 6.8±0.1。

[0010] 白蛋白可用作作用于分枝杆菌的生长的培养基中的解毒剂。白蛋白是发现于几乎每种动物中和许多植物组织中的单纯蛋白质。白蛋白的特征是在水中是可溶的并通过加热可凝固。它们含有碳、氢、氮、氧和硫。对于本发明的生长培养基,优选的白蛋白是牛血清白蛋白。白蛋白通常以按重量计约0.1%至按重量计约10%的水平存在于生长培养基中。

[0011] 然而,因为缓慢的生长速率和对用于培养中分枝杆菌生长的富集培养基的需求,从临床样品(例如,痰、肺液、组织或排泄物)中检测分枝杆菌仍代表着重要的生物学挑战。该挑战中的一个因素起因于以下事实:更快速地生长的细菌可能过度生长而抑制感兴趣的缓慢生长的分枝杆菌生物体,因此阻止了或显著阻碍了分枝杆菌检测。数十年以来,已开发了一些技术来使提交分枝杆菌鉴定的诊断样品脱去杂质(即,杀灭或抑制非分枝杆菌生物体)。这些技术杀灭可能的污染物或将其损害至其生长受到抑制或完全阻止的程度。

[0012] 常规地,分枝杆菌的实验室诊断基于抗酸细菌染色法和生物体的培养,然后进行生化测定。由于分枝杆菌的缓慢生长和长的增代时间,通过常规技术对分枝杆菌进行精确的实验室诊断可能需要长达6周。诸如BacT/ALERT<sup>®</sup>系统(bioMérieux,Inc.)的自动化培养系统可以将鉴定分枝杆菌的时间减少长达两周。

[0013] 本专利受让人,bioMérieux,Inc.提供了在BacT/ALERT<sup>®</sup>微生物检测系统中用作其基于培养的系统的塑料BacT/ALERT<sup>®</sup>MP培养瓶,以用于检测除血液外的临床样品中的分枝杆菌。该BacT/ALERT<sup>®</sup>微生物检测系统利用了比色传感器和反射光以监测溶解于培养基中的二氧化碳(CO<sub>2</sub>)的存在和产生。如果检验样品中存在分枝杆菌,则二氧化碳随微生物代谢培养基中的底物而产生。当分枝杆菌的生长产生CO<sub>2</sub>时,安装在每个培养瓶底部的透气性传感器的颜色从蓝绿色变为黄色。

[0014] BacT/ALERT<sup>®</sup>MP试剂系统包括BacT/ALERT<sup>®</sup>MP培养瓶、重构液体(RF)和MB BacT抗生素补充物(MAS)(下文称作常规或旧RF(或常规/旧RF)和常规或旧MAS(或常规/旧MAS))。BacT/ALERT<sup>®</sup>MP培养瓶是含有培养基的一些组分的塑料瓶。重构液体(RF)含有用

于分枝杆菌生长的其余营养物并用来重构MAS。MAS是由阻抑来自痰样品的不想要的呼吸道菌群的6种抗微生物剂组成的冻干的粉末。RF和MAS被包装为MAS试剂盒。尽管如此,本领域中仍存在进一步减少精确诊断分枝杆菌所需时间的需求。

[0015] 因此,本发明的主要目的是提供用于可能存在于临床样品中的分枝杆菌属物种的增强的生长和检测的培养基和方法。本发明的另一个目的是提供适用于体外培养分枝杆菌的新颖的分枝杆菌培养基。本发明的又一个目的是提供根据前述目的的分枝杆菌培养基,其中抑制了污染生物体的生长。

[0016] 因此,我们在本文描述了新型培养基制品(formulation)、新型营养补充物(NS)和新型分枝杆菌抗微生物补充物(MAS)制品,和显示分枝杆菌的生长和检测的出人意料的增强的制造工艺改良。本文还描述了用于分枝杆菌的增强的生长和检测的方法。

[0017] 发明概述

[0018] 本发明总体上涉及用于分枝杆菌的生长和检测的新颖培养基。并且,本发明提供了检测可能存在于临床样品中的广谱的分枝杆菌属物种的组合物和诊断方法。本发明还涉及显示分枝杆菌生长和检测的增强的检出时间(TTD)的新型的和改良的MP系统或试剂盒,所述MP系统或试剂盒包括可高压灭菌的BacT/ALERT<sup>®</sup>MP培养瓶、营养补充物(NS)和新型分枝杆菌抗微生物补充物(MAS)。

[0019] 在一个实施方案中,本发明涉及用于培养分枝杆菌的新颖培养基,所述培养基包括:(a)适合于分枝杆菌的生长的基础培养基;(b)一种或多种营养补充物添加剂;(c)以及改良的抗微生物补充物;并且其中所述培养基表现出所述分枝杆菌的增强的生长。

[0020] 在另一个实施方案中,本发明涉及用于分枝杆菌的增强的生长的方法,所述方法包括将怀疑含有分枝杆菌的样品添加到含有有效量的一种或多种营养添加剂以增强所述分枝杆菌的生长的培养基中,和将所述培养基置于适宜于所述分枝杆菌的生长的条件下。

[0021] 本发明的另一个实施方案涉及用于诊断由分枝杆菌属物种导致的感染的方法,所述方法包括以下步骤:(a)提供培养基;(b)将营养补充物添加到所述培养基中,所述营养补充物包括用于所述分枝杆菌的增强的生长的一种或多种营养添加剂;(c)添加待确定其中存在所述分枝杆菌属物种或不存在所述分枝杆菌属物种的样品,和(d)分析培养物中分枝杆菌属物种的存在,其中发现存在分枝杆菌属物种表明所述感染的阳性诊断。

[0022] 在又一个实施方案中,本发明涉及改良的BacT/ALERT<sup>®</sup>MP试剂系统或试剂盒。改良的BacT/ALERT<sup>®</sup>MP试剂系统或试剂盒将包括改良的MP培养瓶,所述改良的MP培养瓶包括用于分枝杆菌的生长的基础培养基或水。任选地,新型MP培养瓶的培养基或水将不包括任何热不稳定组分,从而允许新型MP培养瓶可高压灭菌。试剂系统或试剂盒还将包括新型营养补充物(NS)和新型分枝杆菌抗微生物补充物(MAS)。营养补充物(NS)可包括用于分枝杆菌的生长的基础培养基和/或一种或多种碳源、氮源、糖类、盐类、营养物、蛋白质、氨基酸、脂肪酸或其他营养物。

[0023] 附图简述

[0024] 图1A——是显示在具有脂肪酸补充和没有脂肪酸补充时结核分枝杆菌的检出时间(TTD)的箱线图。

[0025] 图1B——是显示在具有脂肪酸补充和没有脂肪酸补充时胞内分枝杆菌的检出时间(TTD)的箱线图。

[0026] 图1C——是显示在具有脂肪酸补充和没有脂肪酸补充时鸟分枝杆菌的检出时间 (TTD) 的箱线图。

[0027] 图2——是显示在具有 $\alpha$ -酮戊二酸 ( $\alpha$ -ketoglutarate) 和没有 $\alpha$ -酮戊二酸时分枝杆菌菌株的检出时间 (TTD) 的箱线图。

[0028] 图3——是显示利用阿洛西林时分枝杆菌菌株的检出时间 (TTD) 的箱线图。

[0029] 图4——是显示万古霉素对分枝杆菌菌株生长的作用的箱线图。

[0030] 图5A——是显示利用不同的分枝杆菌抗微生物补充物 (MAS) 制品时结核分枝杆菌 18283 的检出时间 (TTD) 的箱线图。

[0031] 图5B——是显示利用不同的分枝杆菌抗微生物补充物 (MAS) 制品时结核分枝杆菌 27294 的检出时间 (TTD) 的箱线图。

[0032] 图5C——是显示利用不同的分枝杆菌抗微生物补充物 (MAS) 制品时鸟分枝杆菌 569 的检出时间 (TTD) 的箱线图。

[0033] 图5D——是显示利用不同的分枝杆菌抗微生物补充物 (MAS) 制品时胞内分枝杆菌 13950 的检出时间 (TTD) 的箱线图。

[0034] 图5E——是显示利用不同的分枝杆菌抗微生物补充物 (MAS) 制品时瘰疬分枝杆菌 19981 的检出时间 (TTD) 的箱线图。

[0035] 图5F——是显示利用不同的分枝杆菌抗微生物补充物 (MAS) 制品时堪萨斯分枝杆菌 12478 的检出时间 (TTD) 的箱线图。

[0036] 图6——是显示先前的MAS制品与新型分枝杆菌抗微生物补充物 (MAS) 制品关于结核分枝杆菌复合物生长的检出时间 (TTD) 的箱线图的比较的箱线图。

[0037] 图7——是显示先前的MAS制品与新型分枝杆菌抗微生物补充物 (MAS) 制品关于其他分枝杆菌菌株生长的检出时间 (TTD) 的箱线图的比较的箱线图。

[0038] 发明详述

[0039] 通过提供适当的营养条件和环境条件来培养增殖的微生物是熟知的。适宜的生长培养基或培养基应该含有待培养的微生物所需的所有营养物。例如,典型的微生物培养基应该含有可获得的水源、碳源、氮源、维生素、痕量元素诸如钾、镁、钙和铁,和矿物质,比如硫和磷。通常,这些需求从许多来源来供给。用于适宜的增殖条件的其他因素可包括培养基的pH、温度、通气、盐浓度和渗透压。

[0040] 另外,已知可能需要某些生长因子。生长因子是微生物必须含有以进行生长但该微生物不能合成的有机化合物。当提供以上所列的营养物时,许多微生物能够合成其原生质的所有有机成分,包括氨基酸、维生素、嘌呤和嘧啶、脂肪酸和其他化合物。这些必需化合物中的每一种通过顺序不相连的酶促反应来合成,且每种酶在特定基因的控制下产生。然而,某些微生物不能合成这些生长因子中的一种或多种,且然后必须从环境中获得该化合物。所需的生长因子可包括,但不限于,氨基酸、维生素、嘌呤和嘧啶、脂肪酸和其他生长所需的化合物。

[0041] 如以上所讨论的,本专利受让人, bioMérieux, Inc., 生产并销售用于分枝杆菌的生长和检测的培养基瓶 (BacT/ALERT<sup>®</sup> MP 程序瓶 (BacT/ALERT<sup>®</sup> MP Process Bottle))。BacT/ALERT<sup>®</sup> MP 程序瓶是为与 BacT/ALERT<sup>®</sup> 或 BacT/ALERT<sup>®</sup> 3D 系统一起使用来用于从无菌机体样本 (sterile body specimens) 和消化的-去除污染的临床样本

(digested-decontaminated clinical specimens) 中进行分枝杆菌的回收和检测而设计的。MP程序瓶可与**MB/BacT**<sup>®</sup>抗微生物补充物(MAS)和/或**MBBacT**<sup>®</sup>重构液体(RF)(本文中称作常规或旧MAS和常规或旧RF)一起使用。

[0042] **BacT/ALERT**<sup>®</sup>MP一次性培养瓶具有可移出的盖(removable closure)并含有约10ml的培养基和检测作为微生物生长的指示物的二氧化碳的内部传感器。培养基制品包括:净化水中的Middlebrook 7H9肉汤(0.47%w/v)、酪蛋白的胰腺消化物(pancreatic digest of casein)(0.1%w/v)、牛血清白蛋白(0.5%w/v),和过氧化氢酶(48u/ml)(本文中称作常规或旧培养基)。

[0043] 常规或旧**MB/BacT**<sup>®</sup>抗微生物补充物(常规/旧MAS)是经配制含有两性霉素B(0.0180%w/v)、阿洛西林(0.0034%w/v)、萘啶酮酸(0.0400%w/v)、多粘菌素B(10,000单位)、甲氧苄啶(0.00105%w/v),和万古霉素(0.0005%w/v)的冻干的补充物。

[0044] 常规/旧**MB/BacT**<sup>®</sup>重构液体(常规/旧RF)含有净化水中的油酸(0.05%w/v)、甘油(5%w/v)、苋菜红(0.004%)、和牛血清白蛋白(1%w/v)。重构液体(RF)和**MB BacT/ALERT**<sup>®</sup>抗微生物补充物(MAS)构成可添加到MP瓶中的补充物试剂盒。

[0045] 本发明涉及用于分枝杆菌的增强的生长的新型的和改进的培养基和方法。本发明的培养基和方法可用于培养任何已知的分枝杆菌,包括但不限于,结核分枝杆菌、牛分枝杆菌、田鼠分枝杆菌、非洲分枝杆菌、卡氏分枝杆菌(*Mycobacterium canetti*)、鸟分枝杆菌、胞内分枝杆菌、瘰疬分枝杆菌、堪萨斯分枝杆菌、玛尔摩分枝杆菌(*Mycobacterium malmoense*)、蟾分枝杆菌(*Mycobacterium xenopi*)、海分枝杆菌(*Mycobacterium marinum*)、猿分枝杆菌(*Mycobacterium simiae*)、土地分枝杆菌(*Mycobacterium terrae*)、溃疡分枝杆菌(*Mycobacterium ulcerans*)、脓肿分枝杆菌(*Mycobacterium abscessus*)、偶发分枝杆菌、龟分枝杆菌和戈登分枝杆菌。我们现已发现新型的培养基制品、新型营养补充物(本文称新型NS)和新型抗微生物补充物(本文称新型MAS)制品,和在分枝杆菌的生长和检测上表现出人意料的增强的制造工艺改良。

[0046] 本发明的MP系统的新颖特征可包括:(1)将热不稳定组分从MP培养基转移到营养补充物,允许MP瓶的终末灭菌;(2)使用新颖的碳源来优化CO<sub>2</sub>产生;(3)营养补充物的优化;和/或(4)MAS抗微生物剂和/或抗微生物剂的浓度的优化。这些改良导致分枝杆菌的生长和检测上的一些人意料的改良,包括:(1)MP瓶关于分枝杆菌生长的检出时间(TTD)的改良的表现;(2)临床相关的分枝杆菌的提高了的回收率;(3)污染性呼吸道菌群(CRF)的突破的降低;和/或(4)假阳性的最小化。另外的改良包括制造工艺的简化,从而**BacT/ALERT**<sup>®</sup>MP瓶可在室温下贮存和运输。

[0047] 培养基

[0048] 在一个实施方案中,本发明的新颖培养基提供了分枝杆菌的增强的生长。如本文所用的,“增强的生长”意为利用本发明的培养基和/或补充物可比利用常规培养基早至少约0.5天、至少约1天、至少约2天、至少约3天、至少约5天或至少约7天在例如培养瓶中检测分枝杆菌生长。换言之,可增强分枝杆菌生长从而允许与常规培养基中的分枝杆菌的生长相比生长的检出时间(TTD)的改良或减少。根据本发明,与常规培养基相比,利用本发明的培养基可改良或减少TTD至少约0.5天、至少约1天、至少约2天、至少约3天、至少约5天或至

少约7天。在一个实施方案中,常规培养基可以是补充有如上文所描述的BacT/ALERT<sup>®</sup>MP程序瓶(bioMérieux, Inc.)的常规/旧RF和常规/旧MAS的常规培养基。

[0049] 在另一个实施方案中,本发明的新颖培养基提供了分枝杆菌生长的滞后时间的减少。如本文所用的,“减少的滞后时间”意为分枝杆菌进入对数期生长之前的培养时间或潜伏时间的减少。根据本发明,当与常规/旧培养基中的分枝杆菌的滞后期相比较时,培养基和/或补充物导致滞后时间降低或减少至少约0.5天、或至少约1天、或至少约2天、或至少约3天。在一个实施方案中,常规/旧培养基可以是补充有如上文所描述的BacT/ALERT<sup>®</sup>MP程序瓶(bioMérieux, Inc.)的常规/旧RF和常规/旧MAS的常规培养基。

[0050] 本发明的培养基包括液体营养培养基或营养肉汤。本发明的培养基或营养肉汤通常包括一种或多种已知的营养物,例如,培养基可含有一种或多种碳源(例如,甘油)、氮源(例如,铵盐)、糖类、盐类(例如, $K^+$ 、 $Mg^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$ )、营养物、和/或水。在一个实施方案中,本发明的培养基包括Middlebrook 7H9。如上文所讨论的,Middlebrook 7H9包括钾盐、钠盐、谷氨酸钠、柠檬酸钠、硫酸铵、吡哆素、柠檬酸铁铵、硫酸镁、硫酸锌、硫酸铜、生物素和氯化钙。

[0051] 本发明的培养基还可包括允许分枝杆菌生长的增强的检测的另外的营养物和/或组分。可添加到本发明的培养基中的另外的营养物和/或组分包括,但不限于,蛋白质、氨基酸、脂肪酸、细胞或植物提取物和/或其他营养物。例如,本发明的培养基还可包括酪蛋白(例如,酪蛋白的胰腺消化物)、白蛋白(例如,牛血清白蛋白)、过氧化氢酶和/或苋菜红。在一个实施方案中,如本文所进一步讨论的,这些另外的营养物和/或组分可包括在用可能需要确定其中存在分枝杆菌或不存在分枝杆菌的样品接种培养基之前可添加到基础培养基中的单独的营养补充物。

[0052] 根据本发明,我们已发现在培养基瓶中与牛血清白蛋白(BSA)结合的高水平的短链脂肪酸和中链脂肪酸(例如,具有约8个或更少碳原子的脂肪酸)可能导致假阳性读数。因此,避免使用短链脂肪酸或中链脂肪酸可能是优选的。例如,根据本实施方案,应避免使用具有8个或更少碳原子的脂肪酸(例如,辛酸)。

[0053] 然而,我们也已发现,通过使用无脂肪酸BSA和用长链脂肪酸补充培养基制品可消除或显著减少这些试剂引起的假阳性。因此,培养基还可包括无脂肪酸BSA(无FA BSA)和一种或多种饱和的或不饱和的长链脂肪酸,或其盐类。在一个实施方案中,使用具有10个或更多碳原子的一种或多种长链脂肪酸可能是优选的。一般地说,可使用任何已知的长链脂肪酸,包括,但不限于,肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、油酸、亚油酸,和其盐类。在另一个实施方案中,如本文所进一步讨论的,我们已发现可将脂肪酸从瓶的培养基转移到在利用检验样品接种之前可单独地添加到培养基中的营养补充物。如本文所示(参见,例如,实施例1和图1A-1C),无脂肪酸BSA的使用和用长链脂肪酸补充培养基导致了结核分枝杆菌(参见图1A)、胞内分枝杆菌(参见图1B)和鸟分枝杆菌(参见图1C)的生长和检测的检出时间(TTD) 2至2.5天的改良。

[0054] 在本发明的一方面,可利用一种或多种已知的代谢途径底物或中间产物来补充本发明的培养基。我们令人惊奇地发现,通过在培养基中包括代谢途径底物(例如, $\alpha$ -酮戊二酸),与不含代谢途径底物(例如, $\alpha$ -酮戊二酸)的培养基相比可增强分枝杆菌的生长和检测。虽然不希望被理论所束缚,相信在培养基中使用代谢途径底物(例如, $\alpha$ -酮戊二酸)可增

强由存在于培养基中的分枝杆菌产生的CO<sub>2</sub>。根据本实施方案,可使用柠檬酸循环、糖酵解或乙醛酸支路中的底物或中间产物。在一个实施方案中,产生CO<sub>2</sub>的酶(CO<sub>2</sub>-producing enzymes)的底物或辅因子、或其中间产物、前体或衍生物可用于本发明中。例如,柠檬酸循环中间产物,比如,丙酮酸(pyruvate)、柠檬酸(citrate)、顺乌头酸(cis-aconitate)、异柠檬酸(isocitrate)、草酰琥珀酸(oxalosuccinate)、 $\alpha$ -酮戊二酸、琥珀酰辅酶A、琥珀酸(succinate)、延胡索酸(fumarate)、苹果酸(malate)、草酰乙酸(oxaloacetate)可能是有用的。在另一个实施方案中, $\alpha$ -酮戊二酸、 $\alpha$ -酮戊二酸前体、和/或 $\alpha$ -酮戊二酸衍生物中的一种或多种可被包括于本发明的培养基中。 $\alpha$ -酮戊二酸前体或衍生物可包括,但不限于,谷氨酸(glutamate)、异柠檬酸、草酰琥珀酸、或其混合物。 $\alpha$ -酮戊二酸、 $\alpha$ -酮戊二酸前体、和/或 $\alpha$ -酮戊二酸衍生物能够以从约0.1g/L至约50g/L的终浓度、从约0.5g/L至约20g/L的终浓度、从约1g/L至约20g/L的终浓度存在于培养基中。在一个实施方案中,如本文所进一步讨论的, $\alpha$ -酮戊二酸、 $\alpha$ -酮戊二酸前体、和/或 $\alpha$ -酮戊二酸衍生物可被包括在可单独地添加到培养基中的营养补充物中。

[0055] 在本发明的另一方面,本发明的培养基还可包括一种或多种抗微生物剂或抗微生物物质。抗微生物剂是杀灭、阻抑或以其他方式抑制微生物的生长的剂或物质。一般地说,可使用任何已知的抗微生物剂,比如,杀灭、阻抑或减缓微生物的生长的药物、化学品或其他物质。有用的抗微生物剂包括,但不限于,抗生素、制细菌剂(bacteriostatics)、杀细菌剂(bactericides)、抗细菌剂(antibacterials)、抗病毒剂、抗真菌剂、抗原生动物剂和抗寄生虫剂。一般地说,抗微生物剂以足以杀灭、阻抑或抑制可能存在于培养基中的污染性细菌的生长的量来使用。例如,如本领域中的技术人员将理解地,抑制培养基中污染性呼吸道菌群(CRF)的生长可能是优选的。CRF可干扰分枝杆菌的生长,消耗用于分枝杆菌生长的必需营养物和/或导致假阳性。污染性呼吸道菌群(CRF)可包括,但不限于,铜绿假单胞菌(*P.aeruginosa*)、金黄色葡萄球菌(*S.aureus*)、白色念珠菌(*C.albicans*)、粪肠球菌(*E.faecalis*)、肺炎克雷伯氏菌(*K.pneumoniae*)、嗜麦芽糖寡养单胞菌(*S.maltophilia*)、热带念珠菌(*C.tropicalis*)、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(即,MRSA)、耐万古霉素粪肠球菌(即,VRE)。

[0056] 抗微生物剂可以是一种或多种抗生素或合成药物,包括但不限于,多粘菌素B、万古霉素、阿洛西林、两性霉素B、萘啶酮酸、甲氧苄啶和磷霉素。在一个优选的实施方案中,有用的抗生素抑制污染性呼吸道菌群(CRF)而不阻抑或抑制分枝杆菌生长。

[0057] 在一些实施方案中,抗微生物补充物包括一种或多种抗真菌抗生素、革兰氏阴性菌抗生素、革兰氏阳性菌抗生素、抗真菌抗生素和广谱抗生素。例如,本发明的抗微生物补充物可包括,抗真菌剂(例如,两性霉素B)、改变细胞质膜通透性的革兰氏阴性菌抗生素(例如,多粘菌素B)、抑制DNA促旋酶的广谱抗生素(例如,萘啶酮酸)、化疗剂(例如,抑制二氢叶酸还原酶的剂(例如,甲氧苄啶))和抑制烯醇式丙酮酸转移酶的广谱抗生素(例如,磷霉素)。一般地说,任何已知的抗真菌剂、革兰氏阴性菌抗生素、广谱抗生素、DNA促旋酶的抗生素抑制物、或化疗剂可用于本发明的实践中。在一个实施方案中,抗微生物补充物可包括两性霉素B、多粘菌素B、萘啶酮酸、甲氧苄啶和磷霉素。

[0058] 如本文所示(参见,例如,实施例3-4和图3-4),万古霉素和/或阿洛西林的使用可阻抑、抑制或减缓一些分枝杆菌物种的生长。因此,在一些实施方案中,避免使用万古霉素

和/或阿洛西林可能是优选的。我们已发现可使用磷霉素替代阿洛西林和万古霉素以产生可用来(当与MB/BacT<sup>®</sup>抗微生物补充物相比较时)增强培养中的分枝杆菌的生长和检测的抗微生物补充物(MAS)。例如,通过用磷霉素来替代阿洛西林和万古霉素,我们已发现当与常规/旧MAS比较时,新型分枝杆菌抗微生物补充物(MAS)将分枝杆菌生长的检出时间(TTD)改良或减少了2至9天(参见,例如,实施例5和图5A-5F)。因此,在一些实施方案中,多粘菌素B、两性霉素B、萘啶酮酸、甲氧苄啶和磷霉素的使用可以是优选的。这些抗生素能够以足以抑制可能存在于培养基中的污染性细菌的生长的量来使用。例如,培养基可含有终浓度从约400单位/ml到约2000单位/ml的多粘菌素B、终浓度从约50 $\mu$ g/ml到约400 $\mu$ g/ml的两性霉素B、终浓度从约100 $\mu$ g/ml到约1000 $\mu$ g/ml的萘啶酮酸、终浓度从约10 $\mu$ g/ml到约100 $\mu$ g/ml的甲氧苄啶和终浓度从约100 $\mu$ g/ml到约1000 $\mu$ g/ml的磷霉素。在一个实施方案中,如本文所进一步讨论的,这些抗微生物剂可包括在用可能需要确定其中存在分枝杆菌或不存在分枝杆菌的样品接种培养基之前可添加到基础培养基中的单独的补充物。

[0059] 根据本发明,在一个实施方案中,本发明的培养基可包括Middlebrook 7H9、牛血清白蛋白、 $\alpha$ -酮戊二酸、酪蛋白、过氧化氢酶和/或水中的一种或多种。培养基还可包括本领域中的技术人员已知的有利于培养分枝杆菌的一种或多种另外的营养物和/或组分。例如,本发明的培养基可另外包括一种或多种糖类或碳源、氮源、矿物质、盐类、氨基酸、维生素、嘌呤和嘧啶、脂肪酸和其他化合物。在另一个实施方案中,本发明的培养基包括Middlebrook 7H9、甘油、硬脂酸(例如,硬脂酸钠)、肉豆蔻酸(或其盐)、棕榈酸(例如,棕榈酸钠)、油酸(例如,油酸钠)、牛血清白蛋白、酪蛋白(例如,酪蛋白的胰腺消化物)、过氧化氢酶、丙酮酸钠、 $\alpha$ -酮戊二酸、苋菜红和水。

[0060] 在另一个实施方案中,培养基还包括一种或多种抗微生物剂(例如,磷霉素)。例如,培养基还可包括选自多粘菌素B、阿洛西林、万古霉素、两性霉素B、萘啶酮酸、甲氧苄啶和/或磷霉素中的一种或多种的抗微生物剂的混合物。培养基还可包括含多粘菌素B、两性霉素B、萘啶酮酸、甲氧苄啶和磷霉素的抗生素的混合物。

[0061] 在又一个实施方案中,可将培养基调至从约5.5至约7.5的pH、从约6.0至约7.0的pH、从约6.5至约7.0的pH。根据本发明,与常规/旧分枝杆菌培养基相比,培养基将分枝杆菌生长的检出时间(TTD)改良或减少了至少约0.5天、至少约1天、至少约2天、至少约3天、至少约5天或至少约7天。

[0062] 用于分枝杆菌的增强的检测的方法

[0063] 一般地说,本发明还涉及用于检测可能存在于生物样品中的一种或多种分枝杆菌的生长的方法。可检验的样品包括可能怀疑其中存在分枝杆菌的临床样品和非临床样品两者。可检验的临床样品包括临床实验室中通常检验的任何样品类型,包括但不限于,血液、痰、吸出物、拭子和拭子漂洗物,其他的体液和类似的样品。在一个实施方案中,样品可以是无菌机体样本或消化的一去除污染的临床样本。可检验的非临床样品还包括高度易变的物质,包括但不限于,食品、饮料、药物、化妆品、水、空气、土壤、植物、血液产品(包括血小板)、供体器官或组织样品,和类似的样品。

[0064] 在一方面,本发明涉及用于分枝杆菌的增强的生长和/或检测的方法,所述方法包括将怀疑含有分枝杆菌的样品添加到培养基中,所述培养基包括无脂肪酸BSA、一种或多种长链脂肪酸和任选地抗微生物补充物,和将所述培养基置于适宜于所述分枝杆菌的生长的

条件下,其中所述无脂肪酸BSA和所述一种或多种长链脂肪酸增强了所述分枝杆菌的生长。我们已发现,在NS中使用无脂肪酸BSA和一种或多种长链脂肪酸导致假阳性读数的显著减少。并且,如本文所示(参见实施例1和图1A-1C),无脂肪酸BSA的使用和用长链脂肪酸补充培养基导致结核分枝杆菌(参见图1A)、胞内分枝杆菌(参见图1B)和鸟分枝杆菌(参见图1C)的生长和检测的检出时间(TTD)的2-2.5天的改良。在一个实施方案中,培养基还可包括有效量的添加剂,所述添加剂包括 $\alpha$ -酮戊二酸、 $\alpha$ -酮戊二酸前体或 $\alpha$ -酮戊二酸衍生物以增强所述分枝杆菌的生长,且将所述培养基置于适宜于所述分枝杆菌的生长的条件下。我们已出乎意料地发现,通过在本发明的培养基和方法中使用 $\alpha$ -酮戊二酸、 $\alpha$ -酮戊二酸前体和/或 $\alpha$ -酮戊二酸衍生物,可检测的分枝杆菌生长的检出时间(TTD)比使用常规/旧培养基(即,不具有 $\alpha$ -酮戊二酸、 $\alpha$ -酮戊二酸前体或衍生物的培养基)早至少约0.5天、至少约1天、至少约2天、至少约3天、至少约5天、或至少约7天。如实施例2和图2中所示,含有 $\alpha$ -酮戊二酸的培养基中的分枝杆菌菌株的检出时间(TTD)与不含 $\alpha$ -酮戊二酸的培养基中的TTD相比改良或减少了约2天。

[0065] 本发明还涉及用于诊断由分枝杆菌属物种导致的感染的方法,所述方法包括以下步骤:(a)提供培养基;(b)向所述培养基添加营养补充物,所述营养补充物添加剂包括无脂肪酸BSA和任选地一种或多种长链脂肪酸;(c)添加待确定其中存在所述分枝杆菌属物种或不存在所述分枝杆菌属物种的样品;和(d)分析所述培养物中所述分枝杆菌属物种的存在,其中发现存在所述分枝杆菌属物种表明所述感染的阳性诊断。我们已发现在NS中使用无脂肪酸BSA和一种或多种长链脂肪酸导致假阳性读数的显著减少。并且,如本文所示(参见实施例1和图1A-1C),无脂肪酸BSA的使用和利用长链脂肪酸补充培养基导致结核分枝杆菌(参见图1A)、胞内分枝杆菌(参见图1B)和鸟分枝杆菌(参见图1C)的生长和检测的检出时间(TTD)的2-2.5天的改良。在一个实施方案中,补充物还可包括 $\alpha$ -酮戊二酸、 $\alpha$ -酮戊二酸前体和/或 $\alpha$ -酮戊二酸衍生物。如上文所讨论的,在本发明的培养基和方法中 $\alpha$ -酮戊二酸、 $\alpha$ -酮戊二酸前体或 $\alpha$ -酮戊二酸衍生物的使用可将TTD减少至少约0.5天、至少约1天、至少约2天、至少约3天、至少约5天、或至少约7天。根据该方法,营养补充物(NS)可任选地使用无脂肪酸BSA且还包括一种或多种长链脂肪酸(例如,具有10个或更多个碳原子的脂肪酸)。

[0066] 在另一个实施方案中,本发明涉及抑制分枝杆菌培养物中的细菌污染的方法,所述方法包括在含足以抑制污染性细菌的生长的量的磷霉素的培养基中培养怀疑含有分枝杆菌的样品,所述培养在适宜于所述分枝杆菌的生长的条件下进行。根据该方法,在利用待检验的生物样品接种培养基之前、或与利用待检验的生物样品接种培养基同时,可将一种或多种抗微生物剂或抗微生物物质添加到培养基中。随后,可将培养基和样品培养足够的时间,并处于允许可能存在于检验样品中的任何分枝杆菌的生长和检测的充足的温度下。在另一个实施方案中,一种或多种抗微生物剂可被包括在分枝杆菌抗微生物补充物(MAS)中,所述分枝杆菌抗微生物补充物(MAS)可在利用待检验的样品接种培养基之前、或与利用待检验的样品接种培养基同时加入到可添加到基础培养基中。如上文所描述的,MAS可包括一种或多种多粘菌素B、两性霉素B、茶啉酮酸、甲氧苄啶和磷霉素。

[0067] 在又一个实施方案中,本发明涉及应用改良的BacT/ALERT<sup>®</sup>MP试剂系统或试剂盒用于可能存在于生物样品中的分枝杆菌的生长和/或检测的用途的方法。根据该实施方

案,如本文所进一步详细描述,改良的 BacT/ALERT<sup>®</sup>MP 试剂系统将包括改良的 MP 培养瓶,所述改良的 MP 培养瓶包括用于分枝杆菌生长的基础培养基、新型营养补充物 (NS) 和新型分枝杆菌抗微生物补充物 (MAS)。在利用待检验存在分枝杆菌的生物样品接种培养基之前、或与利用待检验存在分枝杆菌的生物样品接种培养基同时,可将营养补充物 (NS) 和/或分枝杆菌抗微生物补充物 (MAS) 添加到瓶的基础培养基中。接种的瓶将培养足够的时间并处于允许可能存在于生物样品中的任何分枝杆菌的生长和/或检测的充足的温度下。在一个实施方案中,新型 MP 培养瓶的培养基将不包括任何热不稳定组分,从而允许新型培养瓶可高压灭菌。

[0068] MP 试剂盒

[0069] 在一方面,本发明涉及用于分枝杆菌的增强的生长和检测的 MP 试剂盒。MP 试剂盒将包括培养瓶,所述培养瓶具有基础分枝杆菌培养基、营养补充物 (NS)、和/或分枝杆菌抗微生物补充物 (MAS)。

[0070] 培养瓶

[0071] 在一个实施方案中,本发明涉及含有新型和改良的分枝杆菌培养基的瓶或容器(即,培养瓶)。一般地说,培养瓶可具有本领域中已知的任何设计或尺寸,且可包括有利于分枝杆菌的生长和/或检测的任何已知的培养基。在一个实施方案中,培养瓶包括作为基础培养基的 Middlebrook 7H9 肉汤和/或水。常规/旧 MP 瓶使用了 pH 约 6.8 的液体培养基以用于分枝杆菌的生长和检测。同样地,新型和改良的 MP 培养瓶将具有其中可添加新型营养补充物和/或新型分枝杆菌抗微生物补充物 (MAS) 的液体基础培养基或肉汤基础培养基。可将培养基调至从约 5.5 至约 7.5 的 pH、从约 6.0 至约 7.0 的 pH、或从约 6.5 至约 7.0 的 pH。在另一个实施方案中,MP 培养瓶培养基将具有约 6.8 的 pH。

[0072] 我们已令人惊奇地发现,通过从培养基瓶中去掉某些生长营养物,包括例如牛血清白蛋白、牛肝过氧化氢酶和/或酪蛋白,瓶可被终末灭菌。例如,通过去除热不稳定组分可对瓶进行高压灭菌。与瓶的终末灭菌有关的改良包括改良的贮存和运输。例如,可在室温下贮存和运输终末灭菌的瓶(例如,高压灭菌过的瓶),导致可观的成本减少。终末灭菌的瓶还可进一步导致提高的贮藏寿命和/或提高的灭菌水平 (SAL)。

[0073] 营养补充物 (NS)

[0074] 本发明还涉及可添加到本发明的培养瓶中以增强分枝杆菌的生长和检测的改良的营养补充物 (NS)。一般地说,在利用需要检测其中存在分枝杆菌的样品接种瓶和培养基之前,可将营养补充物 (NS) 添加到含基础培养基的培养瓶中以用于分枝杆菌生长。

[0075] 本发明的改良的营养补充物 (NS) 可包括有利于分枝杆菌的生长的任何已知的营养物或补充物。例如,营养补充物可包括一种或多种碳源、氮源、糖类、盐类、营养物、蛋白质、氨基酸、脂肪酸和/或本领域中的技术人员已知的其他营养物。

[0076] 根据本发明,在一个实施方案中,营养补充物还可包括  $\alpha$ -酮戊二酸、 $\alpha$ -酮戊二酸前体和/或  $\alpha$ -酮戊二酸衍生物。一般地说,可使用任何已知的  $\alpha$ -酮戊二酸前体或衍生物,包括但不限于,谷氨酸、异柠檬酸、草酰琥珀酸、或其混合物。 $\alpha$ -酮戊二酸、 $\alpha$ -酮戊二酸前体和/或  $\alpha$ -酮戊二酸衍生物能够以足够的量存在于营养补充物中以使  $\alpha$ -酮戊二酸、 $\alpha$ -酮戊二酸前体和/或  $\alpha$ -酮戊二酸衍生物添加到培养瓶的培养基之后的终浓度为从约 0.1g/L 到约 50g/L。

[0077] 根据本发明的另一个实施方案,营养补充物还可包括一种或多种饱和的或不饱和

的长链脂肪酸,或其盐类。在一个实施方案中,利用一种或多种具有10个或更多个碳原子的长链脂肪酸可能是优选的。一般地说,可使用任何已知的长链脂肪酸,包括但不限于,肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、油酸、亚油酸,和其盐类。在另一个实施方案中,避免使用短链脂肪酸或中链脂肪酸可能是优选的。例如,根据该实施方案,应该避免使用具有8个或更少碳原子的脂肪酸(例如,辛酸)。

[0078] 在另一方面,如上文所述,在本发明的营养补充物中使用无脂肪酸牛血清白蛋白(BSA)可能是优选的。如先前所述,无脂肪酸BSA的使用可显著地减少或消除基于试剂的假阳性。

[0079] 在一个实施方案中,营养补充物(NS)包括乙二醇、一种或多种长链脂肪酸、无脂肪酸牛血清白蛋白(BSA)、酪蛋白的胰腺消化物、丙酮酸钠、苋菜红和 $\alpha$ -酮戊二酸。可将营养补充物与基础培养基一起添加到培养瓶中,或可在利用检验样品接种之前将营养补充物添加到培养瓶中。可选地,营养补充物可用来重悬分枝杆菌抗微生物补充物(MAS)且然后添加到培养基瓶中。

[0080] 分枝杆菌抗微生物补充物(MAS)

[0081] 本发明还涉及可添加到本发明的培养瓶中以增强分枝杆菌的生长和检测的改良的分枝杆菌抗微生物补充物(MAS)。我们已开发了增强培养中的分枝杆菌生长的改良的分枝杆菌抗微生物补充物(MAS)。改良的MAS有效阻抑或抑制污染性呼吸道菌群(CRF)的生长而不阻抑或抑制分枝杆菌生长。污染性呼吸道菌群(CRF)可包括,但不限于,铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、白色念珠菌、粪肠球菌、肺炎克雷伯氏菌、嗜麦芽糖寡养单胞菌、热带念珠菌、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA),耐万古霉素粪肠球菌(VRE)。在一个实施方案中,在利用需要检测分枝杆菌的存在的样品接种瓶和培养基之前,可将分枝杆菌抗微生物补充物(MAS)直接添加到包括基础培养基的培养瓶中以用于分枝杆菌生长。在另一个实施方案中,可在将营养补充物(NS)添加到培养基瓶之前,使用营养物培养物(NS)来重悬抗微生物补充物(MAS)。

[0082] 一般地说,可使用任何已知的抗微生物剂或抗微生物物质,包括但不限于,抗生素、制细菌剂、杀细菌剂、抗细菌剂、抗病毒剂、抗真菌剂、抗原生动物剂和/或抗寄生虫剂。然而,优选的抗微生物剂包括阻抑或抑制污染性呼吸道菌群(CRF)的生长而不阻抑或抑制分枝杆菌的生长的任何抗微生物剂。在一个实施方案中,MAS包括足以抑制所述培养基中的细菌污染的量的的一种或多种抗微生物剂。

[0083] 在另一个实施方案中,本发明的培养基包括一种或多种抗生素。有用的抗生素包括,例如,阻抑或抑制CRF生长的抗生素,包括但不限于,多粘菌素B(POLY B)、万古霉素(VAN)、阿洛西林(AZL)、两性霉素B(AMP B)、萘啶酮酸(NA)、甲氧苄啶(TMP)和磷霉素(FOS)。用来治疗分枝杆菌感染和可能杀灭、阻抑或抑制分枝杆菌生长的抗生素不用于本发明的抗生素补充物中,且包括,例如,异烟肼、利福平、吡嗪酰胺、链霉素和乙胺丁醇。如上文先前所讨论的,本专利受让人销售和出售**MB/BacT<sup>®</sup>**抗微生物补充物,其是冻干的补充物,经配制含有两性霉素B(0.0180%w/v)、阿洛西林(0.0034%w/v)、萘啶酮酸(0.0400%w/v)、多粘菌素B(10,000单位)、甲氧苄啶(0.00105%w/v),和万古霉素(0.0005%w/v)。然而,我们现已出人意料地发现,可用磷霉素补充阿洛西林和万古霉素以产生可用于培养中的分枝杆菌(当与常规/旧**MB/BacT<sup>®</sup>**抗微生物补充物相比时)增强的生长和检测的抗微生物补充物

(MAS)。

[0084] 因此,在一个实施方案中,改良的分枝杆菌抗微生物补充物(MAS)包括经配制含有两性霉素B(AMP B)、多粘菌素B(POLY B)、甲氧苄啶(TMP)、萘啶酮酸(NA)和磷霉素(FOS)的冻干的补充物。可配制分枝杆菌抗微生物补充物(MAS)而使最终培养基将含有终浓度从约400单位/ml到约2000单位/ml的多粘菌素B、终浓度从约50 $\mu$ g/ml到约400 $\mu$ g/ml的两性霉素B、终浓度从约100 $\mu$ g/ml到约800 $\mu$ g/ml的萘啶酮酸、终浓度从约10 $\mu$ g/ml到约100 $\mu$ g/ml的甲氧苄啶和终浓度从约100 $\mu$ g/ml到约1000 $\mu$ g/ml的磷霉素。

[0085] 在另一个实施方案中,营养补充物(NS)和抗微生物补充物(MAS)可形成单独的试剂盒,且然后将所述单独的试剂盒添加到经终末灭菌的培养基瓶中。在该实施方案中,NS/MAS试剂盒可作为BacT/ALERT MP瓶的添加剂来单独地销售和出售。

[0086] 给出了以下的实施例来进一步地示出本发明的特征,但并不意在以任何方式限制本发明的范围。

## 实施例

[0087] 实施例1.具有脂肪酸补充和没有脂肪酸补充时不同的分枝杆菌菌株的TTD

[0088] 为评估长链脂肪酸(FA)对分枝杆菌生长的作用,选择了来自Proliant, Inc. (Ames, Iowa)的无脂肪酸(FAF)BSA。基于脂肪酸谱和生长表现将5种长链脂肪酸:肉豆蔻酸(C14:0)、棕榈酸(C16:0)、硬脂酸(C18:0)、油酸(C18:1)和亚油酸(C18:2)鉴定为可能的脂肪酸补充物。制备了具有FAF BSA的新型补充物制品,并在具有5种脂肪酸和没有5种脂肪酸时对其进行检验(关于新型补充物制品参见表1)。脂肪酸补充水平以获自先前评估的脂肪酸含量为基础。使用的FAF BSA浓度为10g/L。通过脂肪酸甲酯(FAME)分析确定了新型补充物过滤过程中脂肪酸的损失。在用0.45 $\mu$ m滤器过滤之后观察的脂肪酸的回收率为>80%。对该制品的分析证明,较高水平的BSA通过BSA-脂肪酸结合增强了脂肪酸溶解和稳定性(数据未示出)。该分析还证明BSA含量越低,脂肪酸结合越少,导致过滤过程中更多的脂肪酸损失。

[0089] 通过将存在于常规瓶或旧瓶中的培养基的热不稳定组分转移到常规/旧RF中而设计了新型可高压灭菌的培养瓶。该新型可高压灭菌的培养瓶包括Middlebrook 7H9。利用常规或旧RF(但经更改以适合从旧MP瓶制品中转移的热不稳定组分)的组合物制备了新型RF补充物。以下表1显示了新型可高压灭菌的MP瓶(如上文所描述的)和新型补充物的组成。用于该新型补充物中的BSA是无脂肪酸(FAF)BSA(Proliant Inc., Ames, Iowa)而不是用于常规/旧RF中的常规BSA。

[0090] 表1——新型MP瓶和新型补充物制品

新型 MP 瓶		更改的 RF 或新型补充物	
MP 培养瓶		重构液体	
原料	g/L	原料	g/L
Middlebrook 7H9	4.7	牛血清白蛋白	210
[0091]		酪蛋白的胰腺消化物	20
		牛肝过氧化氢酶	0.86
		甘油	50
		油酸	0.475
		丙酮酸钠	20
		苋菜红	0.04

[0092] 关于生长表现,检验了5种生物体(结核分枝杆菌、鸟分枝杆菌和胞内分枝杆菌)。关于这些实验使用了常规MAS制品。使用具有/没有脂肪酸补充的新型补充物和常规/旧RF来再水合常规或旧MB BacT抗生素补充物(常规/旧MAS) (bioMérieux, Inc.) 的冻干粉末。常规/旧MAS含有1000单位/ml的多粘菌素B (POLY B)、180µg/ml的两性霉素B (AMP B)、400µg/ml的萘啶酮酸 (NA)、10.5µg/ml的甲氧苄啶 (TMP)、34µg/ml的阿洛西林 (AZL) 和5µg/ml的万古霉素 (VAN)。

[0093] 对于新型补充物,使用了新型的、可高压灭菌的BacT/ALERT<sup>®</sup>MP瓶(如上文所描述的),和对于常规/旧RF,使用了常规/旧MP瓶。在利用分枝杆菌培养物接种新型MP培养瓶和常规/旧MP培养瓶(bioMérieux, Inc.)之前,将含有/不含脂肪酸的0.5ml的新型补充物或0.5ml的常规/旧RF添加到一组BacT/ALERT<sup>®</sup>MP培养瓶中。将再水合的常规MAS(使用含有/不含脂肪酸的新型补充物和常规/旧RF)添加到第二组MP培养瓶中。在用约 $0.5 \times 10^3$ CFU/ml接种之后,将鸟分枝杆菌培养物、胞内分枝杆菌培养物和结核分枝杆菌培养物在这些瓶中的生长(即生长的TTD)进行比较。还利用Middlebrook 7H10琼脂平板进行菌落计数以验证接种物水平和培养物的纯度。将接种的MP瓶装载于35°C-37°C下BacT/ALERT<sup>®</sup>3D(bioMérieux, Inc.)非摇动系统(non-rocking system),持续35天。当BacT/ALERT<sup>®</sup>仪器表示瓶为阳性时,采集检出时间(TTD)数据。结果显示于表2和图1A-1C中。

[0094] 表2——结核分枝杆菌、胞内分枝杆菌和鸟分枝杆菌的TTD结果

[0095]

生物体	补充物	BSA	脂肪酸	平均 TTD	标准差 TTD	最小 TTD	最大 TTD	阳性的 数目	被检验 的数目
鸟分枝杆菌 25291	仅培养基	常规	无脂肪酸	15.1	0.7	14.3	16.0	5	5
		FAF	脂肪酸	15.3	0.5	14.8	15.8	5	5
			无脂肪酸	17.0	0.6	16.2	17.7	5	5
	培养基+MAS	常规	无脂肪酸	18.1	0.9	16.7	19.0	5	5
		FAF	脂肪酸	16.8	0.9	15.8	17.7	5	5
			无脂肪酸	21.0	0.8	20.3	22.0	5	5
胞内分枝杆菌 13950	仅培养基	常规	无脂肪酸	8.3	0.3	7.8	8.7	5	5
		FAF	脂肪酸	7.9	0.3	7.5	8.2	5	5
			无脂肪酸	12.5	0.5	11.7	12.8	5	5
	培养基+MAS	常规	无脂肪酸	18.7	2.7	16.0	22.5	5	5
		FAF	脂肪酸	13.8	1.4	11.5	16.0	10	10
			无脂肪酸	24.8	6.1	17.3	33.5	10	10
结核分枝杆菌 25177	仅培养基	常规	无脂肪酸	19.3	0.4	18.7	19.7	5	5
		FAF	脂肪酸	18.7	0.8	17.7	19.5	5	5
			无脂肪酸	19.9	0.5	19.3	20.3	5	5
	培养基+MAS	常规	无脂肪酸	25.6	4.0	20.2	31.5	5	5
		FAF	脂肪酸	23.4	0.6	22.3	23.8	5	5
			无脂肪酸	27.6	1.8	25.8	30.0	5	5

[0096] 图1A显示了在具有长链脂肪酸补充和没有长链脂肪酸补充时含无脂肪酸 (FAF) BSA的培养中的结核分枝杆菌的TTD结果。如图1A中所示,当与没有脂肪酸补充时的含BSA的样品相比较时,在补充有脂肪酸的含无脂肪酸BSA的样品中发现TTD的减少。

[0097] 图1B显示了在具有长链脂肪酸补充和没有长链脂肪酸补充时含无脂肪酸 (FAF) BSA的培养中的胞内分枝杆菌的TTD结果。如图1B中所示,当与没有脂肪酸补充时的含BSA的样品相比较时,在补充有脂肪酸的含无脂肪酸BSA的样品中发现TTD的减少。

[0098] 图1C显示了在具有长链脂肪酸补充和没有长链脂肪酸补充时含无脂肪酸 (FAF) BSA的培养中的鸟分枝杆菌的TTD结果。如图1C中所示,当与没有脂肪酸补充时的含BSA的样品相比较时,在补充有脂肪酸的含无脂肪酸BSA的样品中发现TTD的减少。

[0099] 结果证明了在分枝杆菌抗微生物补充物 (MAS) 和新型营养补充物 (NS) 的存在下,结核分枝杆菌、胞内分枝杆菌和鸟分枝杆菌的TTD改良了2-2.5天。如上文所讨论的,新型NS包括无脂肪酸BSA和补充的长链脂肪酸。

[0100] 实施例2. 具有 $\alpha$ -酮戊二酸和没有 $\alpha$ -酮戊二酸时分枝杆菌菌株的TTD

[0101] 为进一步改良分枝杆菌的TTD,选择分枝杆菌细胞途径中的产生 $\text{CO}_2$ 的酶的底物和/或辅因子用于进一步研究,所述底物和辅因子包括 $\alpha$ -酮戊二酸、异柠檬酸、L-苹果酸、草酰乙酸 (oxaloacetic acid)、乳酸 (lactate) 和L-精氨酸。制备了具有脂肪酸的新型补充物,并如以上所说明的进行过滤灭菌。将所述底物以不同浓度添加到新型补充物中。

[0102] 检验 $0.5 \times 10^3 \text{CFU/ml}$ 的分枝杆菌的4个种。研究不同浓度的 $\alpha$ -酮戊二酸对鸟分枝杆菌培养物、胞内分枝杆菌培养物和结核分枝杆菌培养物的生长 (即生长的TTD) 的作用。使用了新型可高压灭菌BacT/ALERT<sup>®</sup>MP培养瓶 (如上文所描述的)。在利用分枝杆菌培养物

接种MP培养瓶之前,将具有不同的量的 $\alpha$ -酮戊二酸的0.5ml新型补充物添加到新型BacT/ALERT<sup>®</sup>MP培养瓶中。还利用Middlebrook 7H10琼脂平板进行菌落计数以验证接种物水平和培养物的纯度。将接种的MP瓶装载于35°C-37°C下BacT/ALERT<sup>®</sup>3D非摇动系统,持续35天。当BacT/ALERT<sup>®</sup>仪器表示瓶为阳性时,采集检出时间(TTD)数据。

[0103] 表3和图2中呈现了加入5g/L和15g/L两种浓度的 $\alpha$ -酮戊二酸时关键分枝杆菌属物种的TTD的结果。表3和图2显示了当与不含 $\alpha$ -酮戊二酸的培养基相比较时,将 $\alpha$ -酮戊二酸(5g/L或15g/L)添加到培养基中导致了鸟分枝杆菌培养物、胞内分枝杆菌培养物和结核分枝杆菌培养物的生长的检出时间(TTD)减少约2天。

[0104] 利用不同浓度的异柠檬酸、L-苹果酸、草酰乙酸、乳酸和L-精氨酸进行了相似的实验,然而,与 $\alpha$ -酮戊二酸不同,这些其他的底物没有显示TTD的减少(数据未示出)。

[0105] 表3——具有 $\alpha$ -酮戊二酸和没有 $\alpha$ -酮戊二酸时分枝杆菌属物种的TTD

[0106]

生物体	底物	平均 TTD	标准差 TTD	最小 TTD	最大 TTD	阳性的 数目	被检验 的数目
鸟分枝杆菌 25291	无- $\alpha$ -酮戊二酸	15.6	0.2	15.5	15.8	3	3
	$\alpha$ -酮戊二酸-5g	13.8	1.1	12.7	14.8	3	3
	$\alpha$ -酮戊二酸-15g	13.5	1.3	12.2	14.8	3	3
胞内分枝杆菌 13950	无- $\alpha$ -酮戊二酸	11.6	1.3	10.7	13.0	3	3
	$\alpha$ -酮戊二酸-5g	9.0	0.3	8.7	9.2	3	3
	$\alpha$ -酮戊二酸-15g	8.8	0.4	8.5	9.2	3	3
结核分枝杆菌 27294	无- $\alpha$ -酮戊二酸	15.7	0.8	14.8	16.2	3	3
	$\alpha$ -酮戊二酸-5g	14.3	0.8	13.8	15.2	3	3
	$\alpha$ -酮戊二酸-15g	13.9	0.2	13.7	14.0	3	3

[0107] 实施例3.具有常规MAS时分枝杆菌属物种的TTD

[0108] 通过研究包括多粘菌素B(POLY B)、两性霉素B(AMP B)、萘啶酮酸(NA)、甲氧苄啶(TMP)、阿洛西林(AZL)和万古霉素(VAN)的6种药物的作用确定了常规MAS针对分枝杆菌生长的有效性。还进行这些研究以鉴定对分枝杆菌生长具有不利作用的药物和其浓度。

[0109] 对于生长表现,制备了常规/旧RF,并添加了不同浓度的6种抗微生物剂。选择的浓度为低于或高于常规MAS的浓度的25-50%的水平,常规MAS的浓度为1000单位/ml的多粘菌素B(POLY B)、180 $\mu$ g/ml的两性霉素B(AMP B)、400 $\mu$ g/ml的萘啶酮酸(NA)、10.5 $\mu$ g/ml的甲氧苄啶(TMP)、34 $\mu$ g/ml的阿洛西林(AZL)和5 $\mu$ g/ml的万古霉素(VAN)。

[0110] 利用培养基中的阿洛西林确定胞内分枝杆菌、堪萨斯分枝杆菌、瘰疬分枝杆菌和结核分枝杆菌的生长(即生长的TTD)。还用相同制品对可能存在于痰样品中的革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌和酵母(称作污染性呼吸道菌群,或CRF)的阻抑进行了平行研究(数据未示出)。

[0111] 对于该评估,使用了常规或旧MP制品(bioMérieux, Inc.)。在利用分枝杆菌或其他细菌/酵母培养物接种MP培养瓶之前,将具有不同的药物的0.5ml常规/旧RF添加到常规BacT/ALERT<sup>®</sup>MP培养瓶(bioMérieux, Inc.)中。还利用Middlebrook 7H10琼脂平板或绵羊血琼脂平板或胰蛋白酶大豆琼脂平板进行菌落计数以验证接种物水平和培养物的纯度。

将接种的MP瓶装载于35℃-37℃下BacT/ALERT<sup>®</sup> 3D (bioMérieux, Inc.) 非摇动系统持续35天以用于分枝杆菌培养物,和持续长达15天用于其他培养物。当BacT/ALERT<sup>®</sup> 仪器表示瓶为阳性时,采集检出时间 (TTD) 数据。结果显示于表4-5和图3-4中。

[0112] 如表4和图3中所示,当与不含抗微生物剂的培养基相比较时,培养基中阿洛西林的使用对胞内分枝杆菌、堪萨斯分枝杆菌、瘰疬分枝杆菌和结核分枝杆菌的生长(如通过生长的TTD所确定的)具有负作用。

[0113] 确定了培养基中使用万古霉素的堪萨斯分枝杆菌、瘰疬分枝杆菌和结核分枝杆菌的生长(即生长的TTD)。

[0114] 如表5和图4中所示,当与不含抗微生物剂的培养基相比较时,培养基中万古霉素的使用对堪萨斯分枝杆菌、瘰疬分枝杆菌和结核分枝杆菌的生长(如通过生长的TTD所确定的)具有负作用。

[0115] 即使以较高浓度被检验,培养基中其他药物的使用也没有对分枝杆菌生长具有任何不利作用(数据未示出)。较高浓度的药物能够对除一些革兰氏阴性菌之外的大部分CRF进行10-15天的阻抑(数据未示出)。

[0116] 表4——在阿洛西林 (AZL) 存在下分枝杆菌属物种的TTD

[0117]

生物体	补充物	平均 TTD	标准差 TTD	最小 TTD	最大 TTD	阳性的 数目	被检验 的数目
鸟分枝杆菌 25291	培养基+AZL 12	20.1	2.2	17.8	22.8	4.0	4.0
	培养基+AZL 24	22.2	1.8	20.7	24.3	4.0	4.0
	培养基+AZL 48	21.2	1.6	19.8	23.0	4.0	4.0
	培养基-无药物	18.6	0.9	17.7	19.5	3.0	3.0
偶发分枝杆菌 6841	培养基+AZL 12	4.0	0.2	3.8	4.2	4.0	4.0
	培养基+AZL 24	4.2	0.3	3.8	4.5	4.0	4.0
	培养基+AZL 48	4.1	0.2	3.8	4.3	4.0	4.0
	培养基-无药物	3.8	0.3	3.5	4.0	3.0	3.0
胞内分枝杆菌 13950	培养基+AZL 12	16.4	1.1	15.3	18.0	4.0	4.0
	培养基+AZL 24	19.8	4.7	16.8	26.8	4.0	4.0
	培养基+AZL 48	20.0	1.1	19.2	20.8	2.0	4.0
	培养基-无药物	8.5	0.2	8.3	8.7	3.0	3.0
堪萨斯分枝杆菌 12478	培养基+AZL 12	18.5	1.1	17.7	19.7	3.0	4.0
	培养基+AZL 24	18.9	1.8	16.5	20.5	4.0	4.0
	培养基+AZL 48	20.5	#DIV/0!	20.5	20.5	1.0	4.0
	培养基-无药物	14.8	1.8	13.0	16.5	3.0	3.0
瘰癧分枝杆菌 19981	培养基+AZL 12	24.2	0.2	24.0	24.3	2.0	4.0
	培养基+AZL 24						4.0
	培养基+AZL 48	21.7	#DIV/0!	21.7	21.7	1.0	3.0
	培养基-无药物	15.4	0.5	15.0	16.0	3.0	3.0
结核分枝杆菌 27294	培养基+AZL 12	15.4	0.8	14.7	16.5	4.0	4.0
	培养基+AZL 24	16.0	0.9	15.3	17.3	4.0	4.0
	培养基+AZL 48	15.4	0.5	14.7	15.8	4.0	4.0
	培养基-无药物	15.5	0.8	14.7	16.2	3.0	3.0
结核分枝杆菌 25177	培养基+AZL 12	22.4	3.7	17.0	24.8	4.0	4.0
	培养基+AZL 24	23.8	4.2	20.8	26.8	2.0	4.0
	培养基+AZL 48	24.8	0.1	24.7	24.8	2.0	4.0
	培养基-无药物	23.6	1.3	22.2	24.8	3.0	3.0

[0118] 表5——在万古霉素 (VAN) 存在下分枝杆菌属物种的TTD

[0119]

生物体	补充物	平均 TTD	标准差 TTD	最小 TTD	最大 TTD	阳性的 数目	被检验 的数目
鸟分枝杆菌 25291	培养基+VAN 1.75	20.6	2.2	18.5	22.8	3.0	4.0
	培养基+VAN 3.5	21.2	1.6	19.8	22.7	4.0	4.0
	培养基+VAN 7	20.6	2.0	18.3	23.2	4.0	4.0
	培养基-无药物	19.4	0.4	19.0	19.8	3.0	3.0
偶发分枝杆菌 6841	培养基+VAN 1.75	4.7	0.3	4.5	5.2	4.0	4.0
	培养基+VAN 3.5	4.1	0.3	3.7	4.5	4.0	4.0
	培养基+VAN 7	4.8	0.5	4.3	5.3	4.0	4.0
	培养基-无药物	4.2	0.3	4.0	4.5	3.0	3.0
胞内分枝杆菌 13950	培养基+VAN 1.75	9.4	0.1	9.2	9.5	4.0	4.0
	培养基+VAN 3.5	9.7	0.3	9.5	10.2	4.0	4.0
	培养基+VAN 7	10.3	0.7	9.7	11.2	4.0	4.0
	培养基-无药物	9.3	0.2	9.2	9.5	3.0	3.0
堪萨斯分枝杆菌 12478	培养基+VAN 1.75	17.7	0.8	17.0	18.8	4.0	4.0
	培养基+VAN 3.5	21.5	0.4	21.2	21.8	2.0	4.0
	培养基+VAN 7						4.0
	培养基-无药物	16.5	0.2	16.3	16.7	3.0	3.0
瘰癧分枝杆菌 19981	培养基+VAN 1.75	14.2	1.0	12.8	15.3	4.0	4.0
	培养基+VAN 3.5	14.0	1.2	12.2	15.0	4.0	4.0
	培养基+VAN 7	15.3	-	15.3	15.3	1.0	1.0
	培养基-无药物	13.9	0.8	13.2	14.8	3.0	3.0
结核分枝杆菌 25177	培养基+VAN 1.75	23.7	0.9	23.0	24.3	2.0	4.0
	培养基+VAN 3.5						4.0
	培养基+VAN 7						4.0
	培养基-无药物	22.6	0.8	21.8	23.3		3.0
结核分枝杆菌 27294	培养基+VAN 1.75	16.3	0.7	15.3	16.8	4.0	4.0
	培养基+VAN 3.5	16.0	0.6	15.5	16.8	4.0	4.0
	培养基+VAN 7	18.3	0.9	17.2	19.0	4.0	4.0
	培养基-无药物	15.4	1.1	14.7	16.7	3.0	3.0

[0120] 实施例4.具有不同的MAS制品时不同分枝杆菌属物种的TTD

[0121] 为改良分枝杆菌的TTD,对不同的药物阻抑污染性呼吸道菌群(CRF)的能力进行筛选。从这些评估中,认为磷霉素是阻抑CRF的最佳选择。

[0122] 进行研究以确定新型MAS混合物(cocktail)的最佳可能制品,对含有不同浓度的TMP、NA、FOS和POLY B的不同的制品进行检验。评估了以下的配方:(1) NS:新型瓶+营养补充物(NS);(2) RF:常规/旧MP瓶+常规/旧重构液体;(3) 配方1:NS+TMP (30 $\mu$ g/ml)、NA (600 $\mu$ g/ml)、POLY B (1250单位/ml)、FOS (600 $\mu$ g/ml)、Amp B (180 $\mu$ g/ml-PI或IFU);(4) 配方2:NS+TMP (30 $\mu$ g/ml)、NA (400 $\mu$ g/ml-PI或IFU)、POLY B (1250单位/ml)、FOS (600 $\mu$ g/ml)、Amp B (180 $\mu$ g/ml-PI或IFU);(5) 配方3:NS+TMP (30 $\mu$ g/ml)、NA (400 $\mu$ g/ml-PI或IFU)、POLY B (1500单位/ml)、FOS (600 $\mu$ g/ml)、Amp B (180 $\mu$ g/ml-PI或IFU);(6) 配方4:NS+TMP (30 $\mu$ g/ml)、NA (600 $\mu$ g/ml)、POLY B (1250单位/ml)、FOS (600 $\mu$ g/ml)、Amp B (180 $\mu$ g/ml-PI或IFU);和(7) 配方5:NS+TMP (50 $\mu$ g/ml)、NA (400 $\mu$ g/ml-PI或IFU)、POLY B (1250单位/ml)、FOS (600 $\mu$ g/ml)、Amp B (180 $\mu$ g/ml-PI或IFU);其中TMP是甲氧苄啶,NA是萘啶酮酸,POLY B是多粘菌素B,FOS是磷霉素,且Amp B是两性霉素B。

[0123] 制备了含有无脂肪酸 (FAF) BSA、5种长链脂肪酸和 $\alpha$ -酮戊二酸的新型补充物,称作营养补充物 (NS), 并如先前所说明的对其进行过滤灭菌。将该新型的、可高压灭菌的MP培养瓶 (如上文所描述的) 用于本研究。表6显示了新型MP培养瓶和营养补充物 (NS) 的组成。

[0124] 表6——新型培养瓶和新型营养补充物制品

[0125]

新型 BacT/ALERT MP 培养瓶		营养补充物 (NS)	
MP 培养瓶		材料描述	每升的质量
原料	g/L	甘油	50g
Middlebrook	4.7	硬脂酸钠 #1	0.113g
		肉豆蔻酸钠盐 #2	0.167g
		棕榈酸钠 #3	0.088g
		油酸钠 #4	0.113g
		亚油酸钠 #5	0.111g
		牛血清白蛋白 (BSA)	210g
		过氧化氢酶	0.064g
		酪蛋白的胰腺消化物	20g
		丙酮酸钠	20g
		苋菜红	0.04g
		$\alpha$ -酮戊二酸	5g

[0126] 对于新型NS, 使用了高压灭菌过的或新型的BacT/ALERT<sup>®</sup>MP瓶 (如上文所描述的), 且对于常规/旧RF, 使用了常规/旧MP瓶 (bioMérieux, Inc.)。在利用分枝杆菌或其他细菌/酵母培养物接种旧的或新型MP培养瓶之前, 将具有不同的药物的0.5ml营养补充物 (新型NS) 或0.5ml常规/旧RF添加到一组BacT/ALERT<sup>®</sup>MP培养瓶中。将常规MAS (使用常规/旧RF) 和新型MAS配方 (使用NS) 添加到第二组MP培养瓶中。利用 $0.5 \times 10^3$ CFU/ml的分枝杆菌属物种和 $0.5 \times 10^5$ CFU/ml的CRF培养物进行实验。还利用Middlebrook 7H10琼脂平板或绵羊血琼脂平板或胰蛋白酶大豆琼脂平板进行菌落计数以验证接种物水平和培养物的纯度。将接种的MP瓶装载于35°C-37°C下BacT/ALERT<sup>®</sup>3D (bioMérieux, Inc.) 非摇动系统持续35天以用于分枝杆菌培养物和持续达15天以用于其他培养物。当BacT/ALERT<sup>®</sup>仪器表示瓶为阳性时, 采集检出时间 (TTD) 数据。结果显示于表7和图5A-5F中。

[0127] 与常规/旧MAS相比较, 所有的新型MAS配方均获得了较好的革兰氏阴性菌阻抑。与常规/旧MAS相比较, 利用新型配方具有葡萄球菌属物种和肠球菌属物种的突破生长。

[0128] 表7和图5A显示了用不同的MAS制品时结核分枝杆菌18283的TTD。当与MAS的常规/旧制品相比较时, 所有5种新型制品均显示了TTD的改良。利用新型MAS制品, 结核分枝杆菌18283的TTD改良为约6-8天。

[0129] 表7和图5B显示了用不同的MAS制品时结核分枝杆菌27294的TTD。当与MAS的常规/旧制品相比较时, 所有5种新型制品均显示了TTD的改良。利用新型MAS制品, 结核分枝杆菌27294的TTD改良为约3-4天。

[0130] 表7和图5C显示了用不同的MAS制品时,鸟分枝杆菌569的TTD。当与MAS的常规/旧制品相比较时,所有5种新型制品均显示了TTD的改良。利用新型MAS制品,鸟分枝杆菌569的TTD的改良为约6-7天。

[0131] 表7和图5D显示了用不同的MAS制品时,胞内分枝杆菌13950的TTD。当与MAS的常规/旧制品相比较时,所有5种新型制品均显示了TTD的改良。利用新型MAS制品,胞内分枝杆菌13950的TTD的改良为约8-9天。

[0132] 表7和图5E显示了用不同的MAS制品时,瘰癧分枝杆菌19981的TTD。当与MAS的常规/旧制品相比较时,所有5种新型制品均显示了TTD的改良。利用新型MAS制品,瘰癧分枝杆菌19981的TTD改良为约6-7天。值得注意的是,对于瘰癧分枝杆菌19981,利用常规/旧MAS制品,所检验的5个样品中的2个显示无生长。

[0133] 表7和图5F显示了利用不同的MAS制品时堪萨斯分枝杆菌12478的TTD。当与MAS的常规/旧制品相比较时,所有5种新型制品均显示了TTD的改良。与利用常规/旧MAS制品检出的无生长相比较,利用新型MAS,堪萨斯分枝杆菌12478的TTD检出为约13-14天。

[0134] 表7——不同物种的TTD

[0135]

生物体	RF	补充物	平均	标准差	最小	最大	阳性的	被检验
鸟分枝杆菌 569	1	NS-无药物	9.2	0.5	8.7	9.7	3.0	3.0
	3	NS+配方 1	9.0	0.6	8.5	10.0	5.0	5.0
	4	NS+配方 2	9.3	0.6	8.8	10.3	5.0	5.0
	5	NS+配方 3	8.4	0.3	8.0	8.7	5.0	5.0
	6	NS+配方 4	8.5	0.2	8.3	8.8	5.0	5.0
	7	NS+配方 5	9.2	0.3	8.7	9.5	5.0	5.0
	8	RF-无药物	9.4	0.4	9.0	9.7	3.0	3.0
	9	RF+旧 MAS	14.6	0.4	14.3	15.0	3.0	3.0
	胞内分枝杆菌 13950	1	NS-无药物	9.2	0.1	9.2	9.3	3.0
3		NS+配方 1	9.5	0.3	9.0	9.7	5.0	5.0
4		NS+配方 2	9.4	0.1	9.3	9.5	5.0	5.0
5		NS+配方 3	9.4	0.3	9.0	9.7	5.0	5.0
6		NS+配方 4	10.0	0.2	9.7	10.3	5.0	5.0
7		NS+配方 5	9.2	0.2	9.0	9.5	5.0	5.0
8		RF-无药物	8.1	0.1	8.0	8.2	3.0	3.0
9		RF+ 旧 MAS	17.2	1.3	15.8	18.2	3.0	3.0
堪萨斯分枝杆菌 12478		1	NS-无药物	12.3	0.6	11.7	12.8	3.0
	3	NS+配方 1	13.7	0.3	13.3	14.2	5.0	5.0
	4	NS+配方 2	13.4	0.7	12.7	14.3	5.0	5.0
	5	NS+配方 3	13.4	0.5	13.0	14.2	5.0	5.0
	6	NS+配方 4	13.9	0.6	13.2	14.8	5.0	5.0
	7	NS+配方 5	14.0	0.8	13.0	15.3	5.0	5.0
	8	RF-无药物	17.3	0.5	16.7	17.7	3.0	3.0
	9	RF+旧 MAS						3.0
	瘰癧分枝杆菌 19981	1	NS-无药物	12.3	0.4	12.0	12.7	3.0
3		NS+配方 1	11.0	0.5	10.3	11.5	5.0	5.0
4		NS+配方 2	11.1	0.1	11.0	11.3	5.0	5.0
5		NS+配方 3	11.1	0.3	10.5	11.3	5.0	5.0
6		NS+配方 4	11.3	0.2	11.2	11.5	5.0	5.0
7		NS+配方 5	10.8	0.3	10.5	11.2	5.0	5.0
8		RF-无药物	12.3	0.2	12.2	12.5	3.0	3.0
9		RF+旧 MAS	17.5	1.1	16.7	18.3	2.0	3.0
结核分枝杆菌 18283		1	NS-无药物	9.3	0.1	9.2	9.3	3.0
	3	NS+配方 1	10.1	0.9	9.2	11.3	5.0	5.0
	4	NS+配方 2	9.5	0.4	9.0	10.0	5.0	5.0
	5	NS+配方 3	9.7	0.3	9.5	10.3	5.0	5.0
	6	NS+配方 4	10.8	0.3	10.5	11.2	5.0	5.0
	7	NS+配方 5	10.1	0.6	9.5	10.8	5.0	5.0
	8	RF-无药物	11.3	0.5	10.8	11.7	3.0	3.0
	9	RF+ 旧 MAS	17.5	0.9	16.5	18.2	3.0	3.0
	结核分枝杆菌 27294	1	NS-无药物	13.6	0.6	13.3	14.3	3.0
3		NS+配方 1	12.9	0.1	12.8	13.0	5.0	5.0
4		NS+配方 2	13.1	0.3	12.7	13.5	5.0	5.0
5		NS+配方 3	13.0	0.3	12.8	13.5	5.0	5.0
6		NS+配方 4	13.2	0.4	12.7	13.7	5.0	5.0
7		NS+配方 5	12.5	0.3	12.2	13.0	5.0	5.0
8		RF-无药物	12.6	0.4	12.2	13.0	3.0	3.0
9		RF+ 旧 MAS	14.8	0.8	14.0	15.5	3.0	3.0

[0136] 实施例5. 先前MAS制品与新型MAS制品关于结核分枝杆菌复合物生长的TTD的比较

[0137] 选择新型MP瓶的配方和营养补充物及新型MAS的配方5用于进一步检验。本研究通过结核分枝杆菌复合物菌株来进行,包括非洲分枝杆菌、牛分枝杆菌、田鼠分枝杆菌和结核分枝杆菌。配方5的组成为:NS+TMP (50 $\mu$ g/ml)、NA (400 $\mu$ g/ml-PI或IFU)、POLY B (1250单位/ml)、FOS (600 $\mu$ g/ml)、Amp B (180 $\mu$ g/ml-PI或IFU)。

[0138] 对于新型MAS配方和NS,使用了新型的、高压灭菌过的BacT/ALERT<sup>®</sup>MP瓶(如上文所描述的),且对于常规/旧RF,使用了常规/旧MP瓶(bioMérieux, Inc.)。在利用分枝杆菌培养物接种旧的或新型MP培养瓶之前,将具有不同的药物的0.5ml营养补充物(新型NS)或0.5ml的常规/旧RF添加到一组BacT/ALERT<sup>®</sup>MP培养瓶。将常规MAS(利用常规/旧RF)和新型MAS配方(使用NS)添加到第二组MP培养瓶中。

[0139] 分枝杆菌接种物为 $0.5 \times 10^3$ CFU/ml。还利用Middlebrook 7H10琼脂平板或绵羊血琼脂平板或胰蛋白酶大豆琼脂平板进行菌落计数以验证接种物水平和培养物的纯度。将接种的MP瓶装载于35 $^{\circ}$ C-37 $^{\circ}$ C下BacT/ALERT<sup>®</sup>3D(bioMérieux, Inc.)非摇动系统持续35天以用于分枝杆菌培养物。当BacT/ALERT<sup>®</sup>仪器表示瓶为阳性时,采集检出时间(TTD)数据。

[0140] 确定结核分枝杆菌复合物菌株的生长(即生长的TTD),比较常规/旧RF和MAS(RF+常规/旧MAS)与新型营养补充物和新型MAS(NS+新型MAS)。确定了RF+常规/旧MAS培养基和NS+新型MAS培养基中的5种结核分枝杆菌复合物菌株中的4种即非洲分枝杆菌、牛分枝杆菌、田鼠分枝杆菌和结核分枝杆菌的TTD。结果显示于表8和图6中。

[0141] 如表8和图6中所示,当与RF+常规/旧MAS相比较时,NS+新型MAS显示了结核分枝杆菌复合物菌株生长的TTD的约1-10天的改良。

[0142] 表8——结核分枝杆菌复合物的TTD

[0143]

生物体	补充物	平均	标准差	最小	最大	阳性的数目	被检验的数目
		TTD (天)	TTD (天)	TTD (天)	TTD (天)		
非洲分枝杆菌 25420	NS+配方 5	14.2	0.3	13.8	14.7	5.0	5.0
	RF+旧 MAS	15.5	0.8	14.8	16.3	3.0	3.0
牛分枝杆菌 8131	NS+配方 5	18.4	1.3	17.2	19.7	5.0	5.0
	RF+旧 MAS	20.4	2.1	18.2	22.3	3.0	3.0
田鼠分枝杆菌 19422	NS+配方 5	15.0	1.4	12.8	16.3	5.0	5.0
	RF+旧 MAS	16.6	0.3	16.2	16.8	3.0	3.0
结核分枝杆菌 18283	NS+配方 5	10.1	0.2	9.7	10.2	5.0	5.0
	RF+旧 MAS	20.9	1.8	19.2	22.7	3.0	3.0
结核分枝杆菌 25177	NS+配方 5	19.9	1.3	18.3	21.2	5.0	5.0
	RF+旧 MAS	32.4	1.6	31.3	34.2	3.0	3.0
结核分枝杆菌 27294	NS+配方 5	14.1	0.4	13.7	14.7	5.0	5.0
	RF+旧 MAS	16.8	0.5	16.3	17.3	3.0	3.0

[0144] 实施例6. 先前MAS制品与新型MAS制品关于非结核分枝杆菌(MOTT)生长的TTD的比较

[0145] 选择新型MP瓶的配方、营养补充物(NS)和新型MAS的配方5用于进一步检验。本研究通过包括鸟分枝杆菌、胞内分枝杆菌、堪萨斯分枝杆菌和瘰疬分枝杆菌的非结核分枝杆菌(MOTT)菌株来进行。配方5的组成为:NS+TMP (50 $\mu$ g/ml)、NA (400 $\mu$ g/ml-PI或IFU)、POLY B

(1250单位/ml)、FOS (600 $\mu$ g/ml)、Amp B (180 $\mu$ g/ml-PI或IFU)。

[0146] 对于新型配方和NS,使用了高压灭菌过的或新型的BacT/ALERT<sup>®</sup>MP瓶(如上文所描述的),且对于常规/旧RF,使用了常规/旧MP瓶(bioMérieux, Inc.)。在利用分枝杆菌培养物接种旧的或新型MP培养瓶之前,将具有不同的药物的0.5ml营养补充物(新型NS)或0.5ml的常规/旧RF添加到一组BacT/ALERT<sup>®</sup>MP培养瓶中。将常规MAS(使用常规/旧RF)和新型MAS配方(使用NS)添加到第二组MP培养瓶中。

[0147] 分枝杆菌接种物为 $0.5 \times 10^3$ CFU/ml。还利用Middlebrook 7H10琼脂平板或绵羊血琼脂平板或胰蛋白酶大豆琼脂平板进行菌落计数以验证接种物水平和培养物的纯度。将接种的MP瓶装载于35 $^{\circ}$ C-37 $^{\circ}$ C下BacT/ALERT 3D(bioMérieux, Inc.)非摇动系统持续35天以用于分枝杆菌培养物。当BacT/ALERT<sup>®</sup>仪器表示瓶为阳性时,采集检出时间(TTD)数据。结果显示于表9和图7中。

[0148] 如表9和图7中所示,当与RF+常规/旧MAS相比较时,NS+新型MAS显示了非结核分枝杆菌(MOTT)的TTD的约1-12天的改良。

[0149] 表9——非结核分枝杆菌(MOTT)的TTD

[0150]

生物体	补充物	平均 TTD (天)	标准差 TTD (天)	最小 TTD (天)	最大 TTD (天)	阳性的 数目	被检 验的 数目
鸟分枝杆菌 25291	NS+配方 5	11.8	0.4	11.5	12.5	5.0	5.0
	RF+旧 MAS	12.9	0.7	12.3	13.7	3.0	3.0
鸟分枝杆菌 569	NS+配方 5	14.2	1.3	12.7	15.7	5.0	5.0
	RF+旧 MAS	20.0	1.8	18.7	21.2	2.0	3.0
胞内分枝杆菌 13950	NS+配方 5	8.6	0.3	8.2	9.0	5.0	5.0
	RF+旧 MAS	16.0	0.9	15.0	16.8	3.0	3.0
胞内分枝杆菌 644	NS+配方 5	13.8	1.0	12.7	14.7	5.0	5.0
	RF+旧 MAS	29.9	2.6	28.0	31.7	2.0	3.0
堪萨斯分枝杆菌 12478	NS+配方 5	13.6	0.6	12.8	14.5	5.0	5.0
	RF+旧 MAS	31.5	2.6	30.0	34.5	3.0	3.0
瘰癧分枝杆菌 19981	NS+配方 5	10.0	0.3	9.7	10.5	5.0	5.0
	RF+旧 MAS	17.9	0.3	17.7	18.2	3.0	3.0

[0151] 实施例7. 先前MAS制品与具有不同FOS浓度的两种新型MAS制品关于结核分枝杆菌菌株的TTD的比较

[0152] 通过将FOS浓度从600 $\mu$ g/ml提高至800 $\mu$ g/ml进一步改进新型MAS的配方5以获得对CRF的更好的阻抑。接下来的研究利用 $0.5 \times 10^3$ CFU/ml的10种结核分枝杆菌的菌株来进行。10种结核分枝杆菌菌株包括4种CDC分离株、5种ATCC强毒株和一个QC参考菌株。

[0153] 对于新型配方和新型NS,使用了高压灭菌过的或新型的BacT/ALERT<sup>®</sup>MP瓶(如上文所描述的),且对于常规/旧RF,使用了常规/旧MP瓶(bioMérieux, Inc.)。在利用分枝杆菌培养物接种旧的或新型MP培养瓶之前,将具有不同的药物的0.5ml营养补充物(新型NS)或0.5ml的常规/旧RF添加到一组BacT/ALERT<sup>®</sup>MP培养瓶中。将常规MAS(使用常规/旧RF)和新型MAS配方(使用新型NS)添加到第二组MP培养瓶中。

[0154] 分枝杆菌接种物为 $0.5 \times 10^3$ CFU/ml。还利用Middlebrook 7H10琼脂平板或绵羊血

琼脂平板或胰蛋白酶大豆琼脂平板进行菌落计数以验证接种物水平和培养物的纯度。将接种的MP瓶装于35°C-37°C下BacT/ALERT® 3D (bioMérieux, Inc.) 非摇动系统中,持续35天以用于分枝杆菌培养物。当BacT/ALERT® 仪器表示瓶为阳性时,采集检出时间(TTD)数据。结果显示于表10中。

[0155] 如表10中所示,当与RF+常规/旧MAS相比较时,新型MAS配方显示了结核分枝杆菌菌株的TTD的约2-8天的改良。

[0156] 表10——利用含600µg/ml的新型MAS配方(MAS 5)和含800µg/ml的新型MAS配方(配方5+FOS 200µg/ml)时结核分枝杆菌的不同菌株的TTD

生物体	菌株 ID	补充物	平均 TTD (天)	标准差 TTD (天)	最小 TTD (天)	最大 TTD (天)	阳性的数目	被检验的数目
结核分枝杆菌	2663	NS+配方 5	15.1	0.8	14.0	16.0	5.0	5.0
		NS+配方 5+FOS 200	15.3	0.3	14.8	15.7	5.0	5.0
		RF+旧 MAS	17.9	0.2	17.7	18.3	5.0	5.0
	2677	NS+配方 5	17.3	0.5	16.7	18.0	5.0	5.0
		NS+配方 5+FOS 200	17.2	0.6	16.5	18.0	5.0	5.0
		RF+旧 MAS	22.1	0.6	21.3	22.8	5.0	5.0
	18283	NS+配方 5	8.9	0.5	8.3	9.5	5.0	5.0
		NS+配方 5+FOS 200	9.5	0.3	9.0	9.7	5.0	5.0
		RF+旧 MAS	17.0	0.8	16.0	18.2	5.0	5.0
	18292	NS+配方 5	13.9	0.7	13.3	14.7	5.0	5.0
		NS+配方 5+FOS 200	14.1	0.3	13.7	14.5	5.0	5.0
		RF+旧 MAS	15.8	0.8	15.2	17.2	5.0	5.0
	25177	NS+配方 5	16.0	0.4	15.5	16.3	5.0	5.0
		NS+配方 5+FOS 200	16.3	0.8	15.2	17.3	5.0	5.0
		RF+旧 MAS	19.1	0.3	18.8	19.5	5.0	5.0
	27294	NS+配方 5	14.1	0.4	13.5	14.5	5.0	5.0
		NS+配方 5+FOS 200	14.5	0.5	13.8	15.2	5.0	5.0
		RF+旧 MAS	16.3	0.4	15.7	16.7	5.0	5.0
	35822	NS+配方 5	15.0	0.8	13.7	16.0	5.0	5.0
		NS+配方 5+FOS 200	15.7	0.3	15.3	16.2	5.0	5.0
		RF+旧 MAS	17.9	0.6	17.2	18.8	5.0	5.0
	35837	NS+配方 5	14.8	1.0	13.5	16.3	5.0	5.0
		NS+配方 5+FOS 200	15.2	0.2	15.0	15.3	5.0	5.0
		RF+旧 MAS	17.8	0.4	17.2	18.2	5.0	5.0
35838	NS+配方 5	15.5	0.6	14.8	16.2	5.0	5.0	
	NS+配方 5+FOS 200	15.7	0.4	15.2	16.2	5.0	5.0	
	RF+旧 MAS	17.0	0.6	16.2	17.5	5.0	5.0	

[0157] 实施例8. 先前的MAS制品与具有不同的FOS浓度的两种新型MAS制品关于污染性呼吸道菌群(CRF)的阻抑的比较

[0159] 通过将FOS浓度从600µg/ml提高至800µg/ml而进一步改进新型MAS的配方5以获得

对CRF的更好的阻抑。通过比较常规/旧RF和MAS (RF+常规/旧MAS) 与新型营养补充物和新型MAS制品NS+新型MAS), 确定了不同的革兰氏阳性菌培养物或革兰氏阴性菌培养物和酵母培养物的生长或无生长(NG)。新型MAS制品含有配方5+200µg/ml FOS(总计800µg/ml FOS)。以 $0.6 \times 10^4$ CFU/ml检验CRF。还利用绵羊血琼脂平板或胰蛋白酶大豆琼脂平板进行菌落计数以验证接种物水平和培养物的纯度。将接种的MP瓶装载于35°C-37°C下BacT/ALERT® 3D (bioMérieux, Inc.) 非摇动系统中持续15天以用于所有培养物。当BacT/ALERT® 仪器表示瓶为阳性时, 采集检出时间 (TTD) 数据。

[0160] 表11显示了当与常规/旧MAS制品相比较时, MAS的新型制品是阻抑CRF生长的更好的制品。

[0161] 表11——显示污染性呼吸道菌群 (CRF) 的阻抑的表格

[0162]

生物体	菌株 ID	补充物	突破污染
白色念珠菌	11006	NS + 配方 5	NG
		NS + 配方 5 + FOS 200	NG
		RF + 旧 MAS	NG
	302876	NS + 配方 5	NG
		NS + 配方 5 + FOS 200	NG
		RF + 旧 MAS	1/5
粪肠球菌	8711	NS + 配方 5	5/5
		NS + 配方 5 + FOS 200	1/5
		RF + 旧 MAS	NG
	8340 (VRE)	NS + 配方 5	5/5
		NS + 配方 5 + FOS 200	NG
		RF + 旧 MAS	3/5
肺炎克雷伯氏菌	109241	NS + 配方 5	NG
		NS + 配方 5 + FOS 200	NG
		RF + 旧 MAS	NG
铜绿假单胞菌	27853	NS + 配方 5	NG
		NS + 配方 5 + FOS 200	NG
		RF + 旧 MAS	1/5
	106159	NS + 配方 5	NG
		NS + 配方 5 + FOS 200	NG
		RF + 旧 MAS	NG
金黄色葡萄球菌	12535	NS + 配方 5	5/5
		NS + 配方 5 + FOS 200	NG
		RF + 旧 MAS	NG
	25923	NS + 配方 5	5/5
		NS + 配方 5 + FOS 200	2/5
		RF + 旧 MAS	NG
	13305 (MRSA)	NS + 配方 5	5/5
		NS + 配方 5 + FOS 200	NG
		RF + 旧 MAS	NG
表皮葡萄球菌 ( <i>Staphylococcus epidermidis</i> )	7104	NS + 配方 5	5/5
		NS + 配方 5 + FOS 200	1/5
		RF + 旧 MAS	NG
嗜麦芽糖寡养单胞菌	13637	NS + 配方 5	NG
		NS + 配方 5 + FOS 200	NG
		RF + 旧 MAS	NG
	106259	NS + 配方 5	5/5
		NS + 配方 5 + FOS 200	NG
		RF + 旧 MAS	2/5
口腔链球菌 ( <i>Streptococcus oralis</i> )	12975	NS + 配方 5	NG
		NS + 配方 5 + FOS 200	NG
		RF + 旧 MAS	NG
肺炎链球菌 ( <i>Streptococcus pneumoniae</i> )	6305	NS + 配方 5	5/5
		NS + 配方 5 + FOS 200	NG
		RF + 旧 MAS	NG



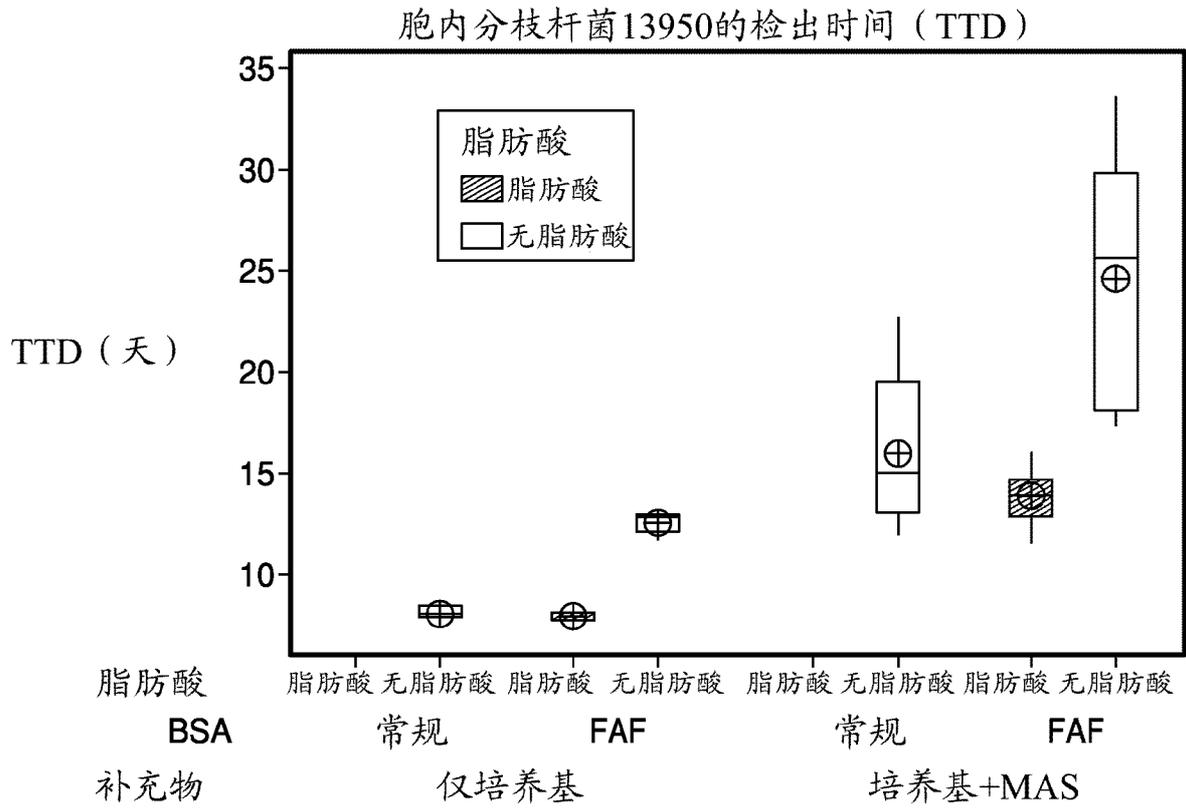


图1B

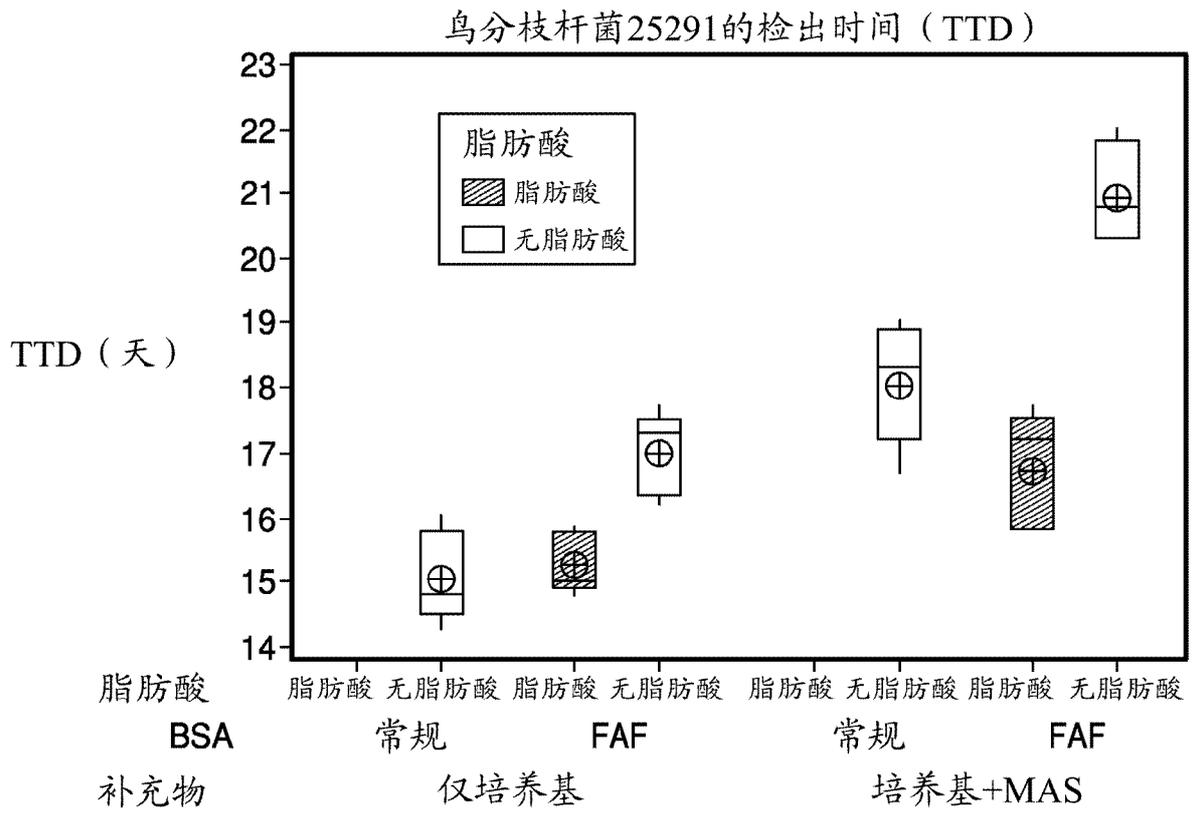


图1C

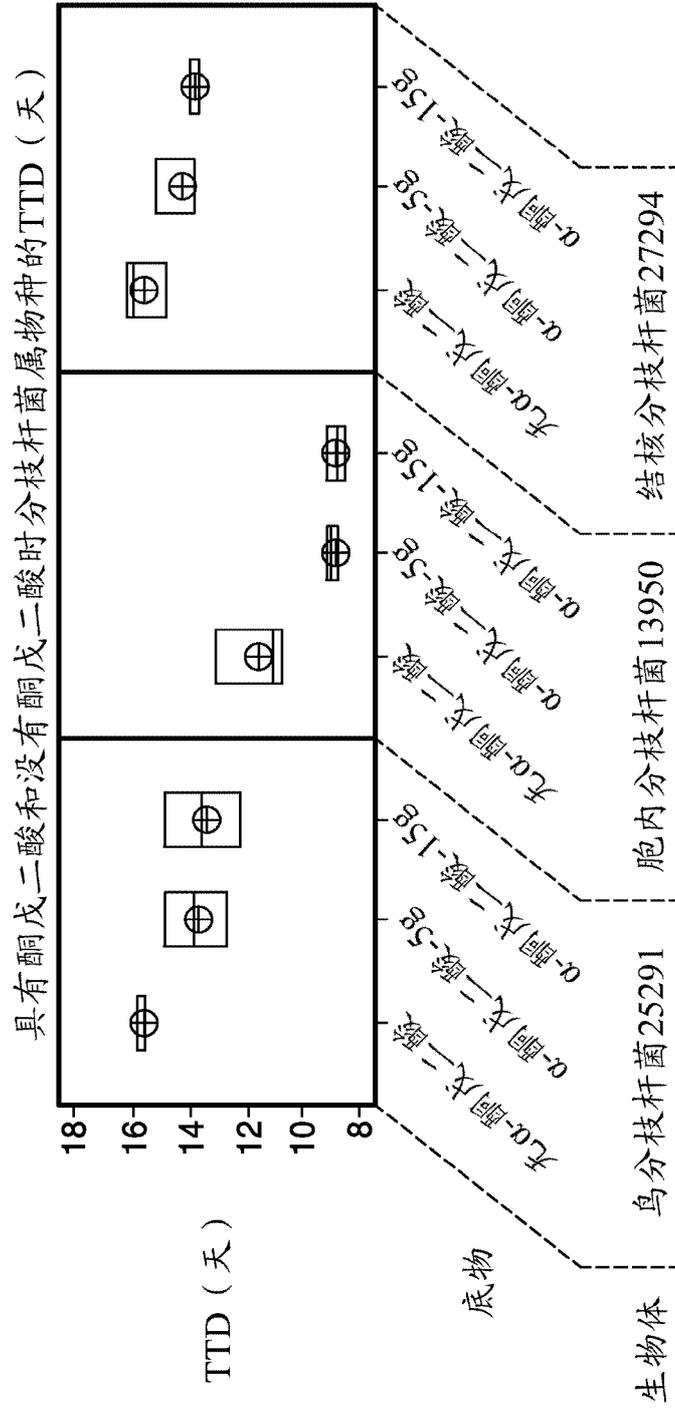


图2



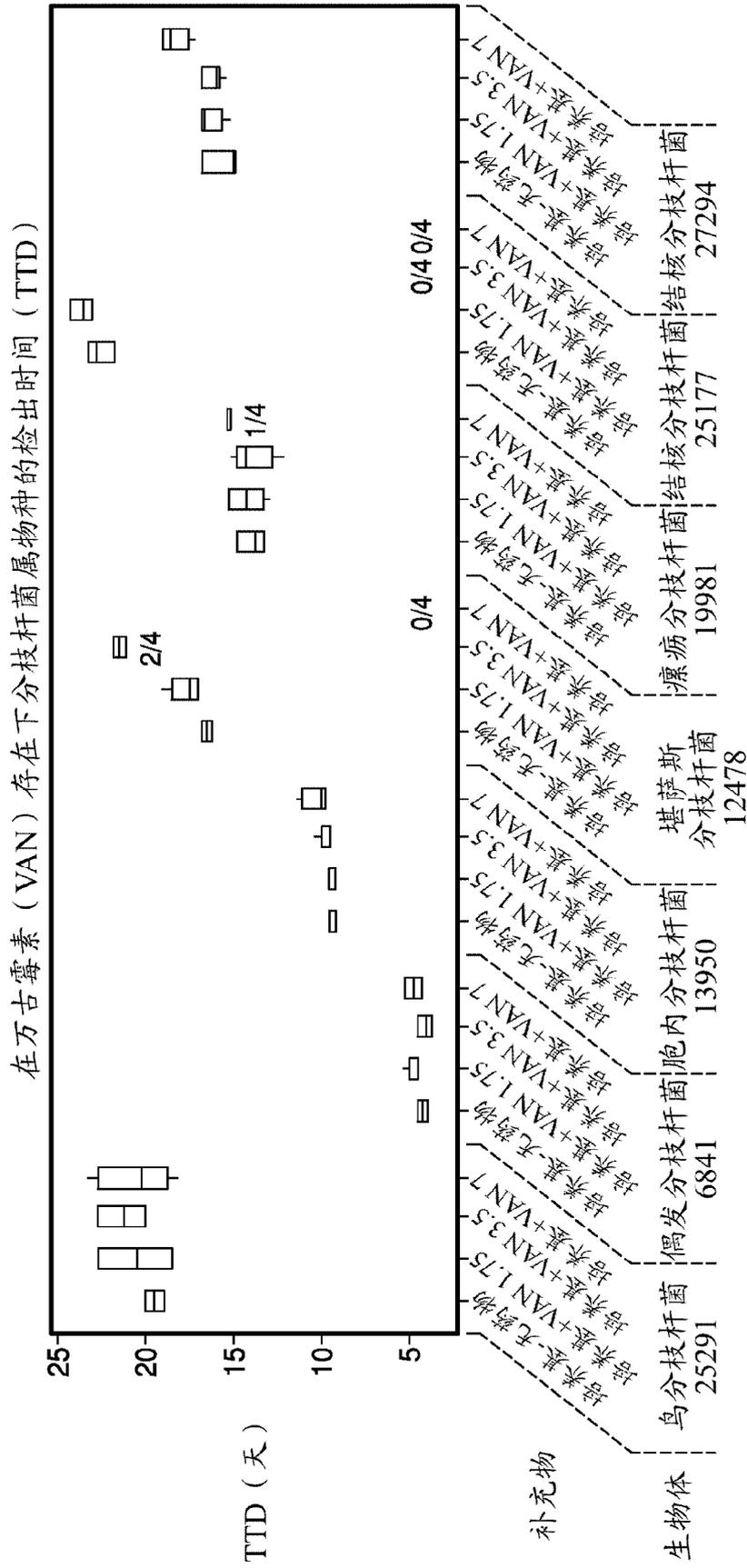


图4

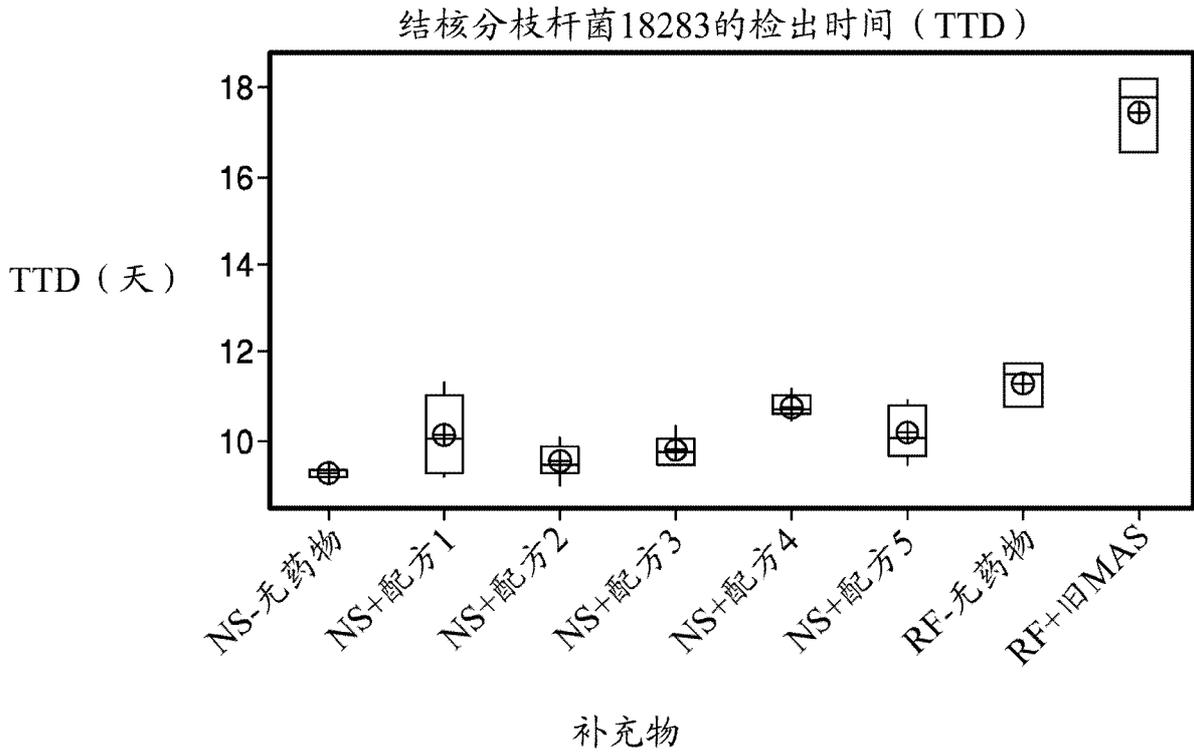


图5A

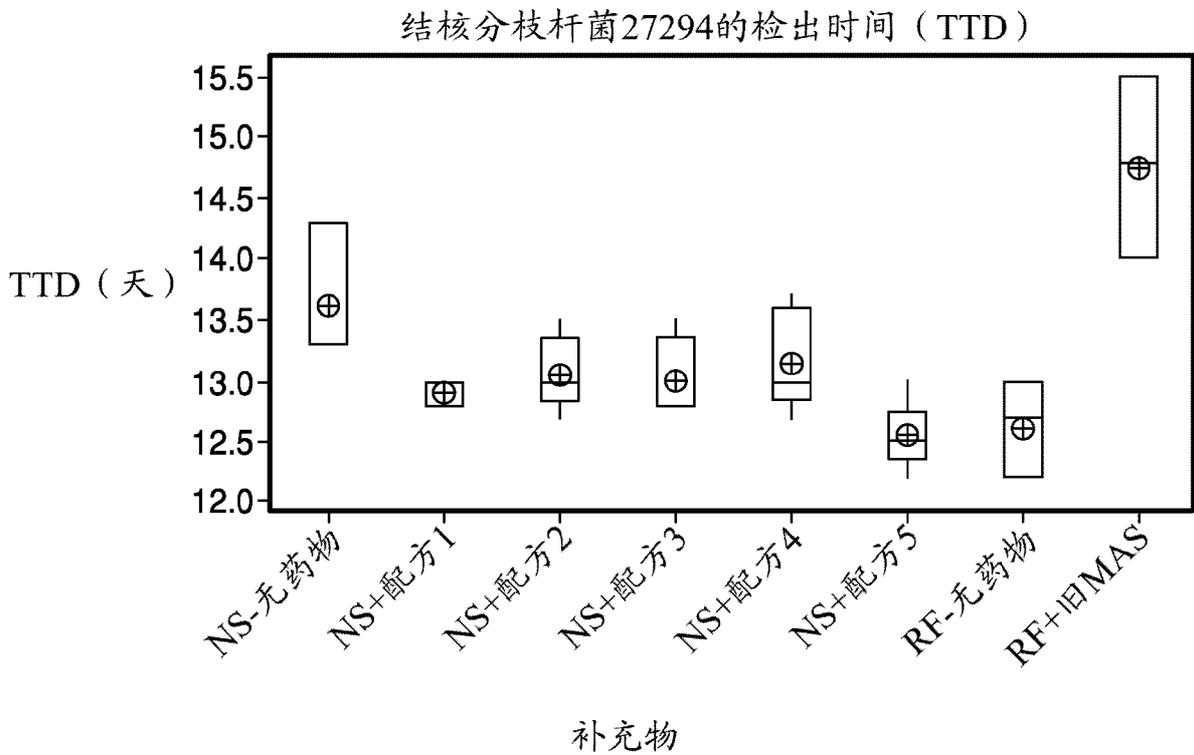


图5B

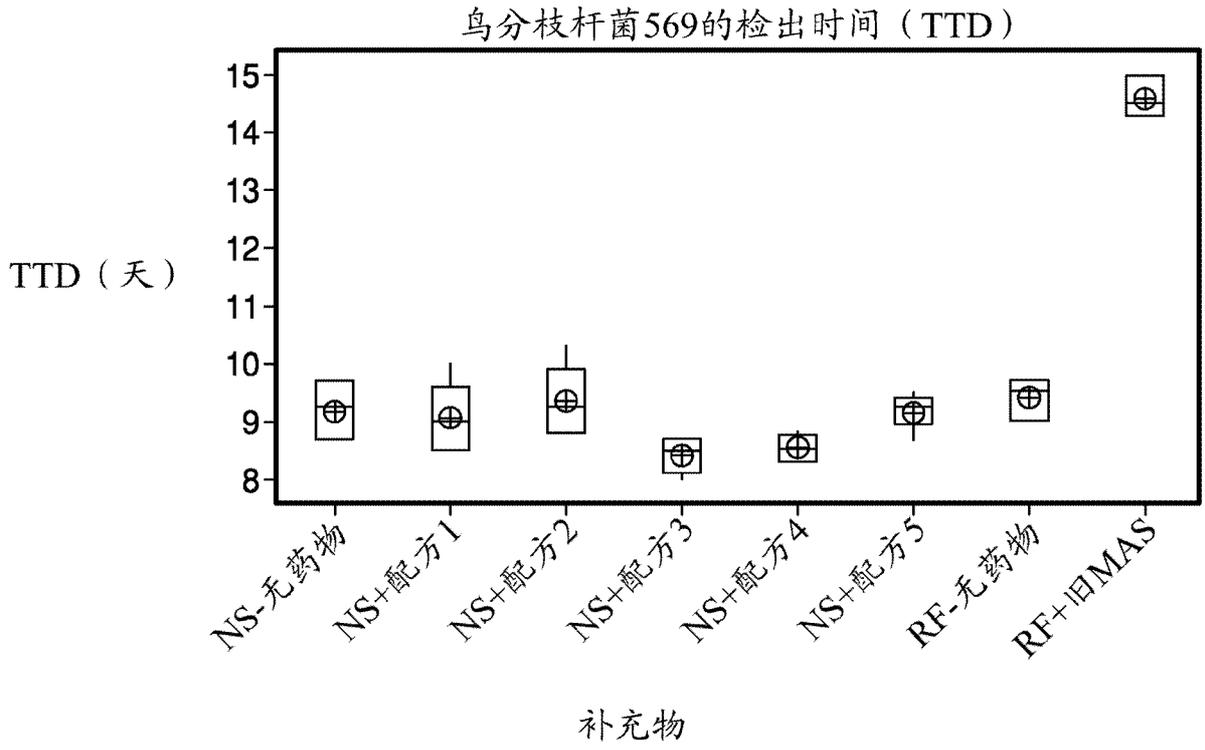


图5C

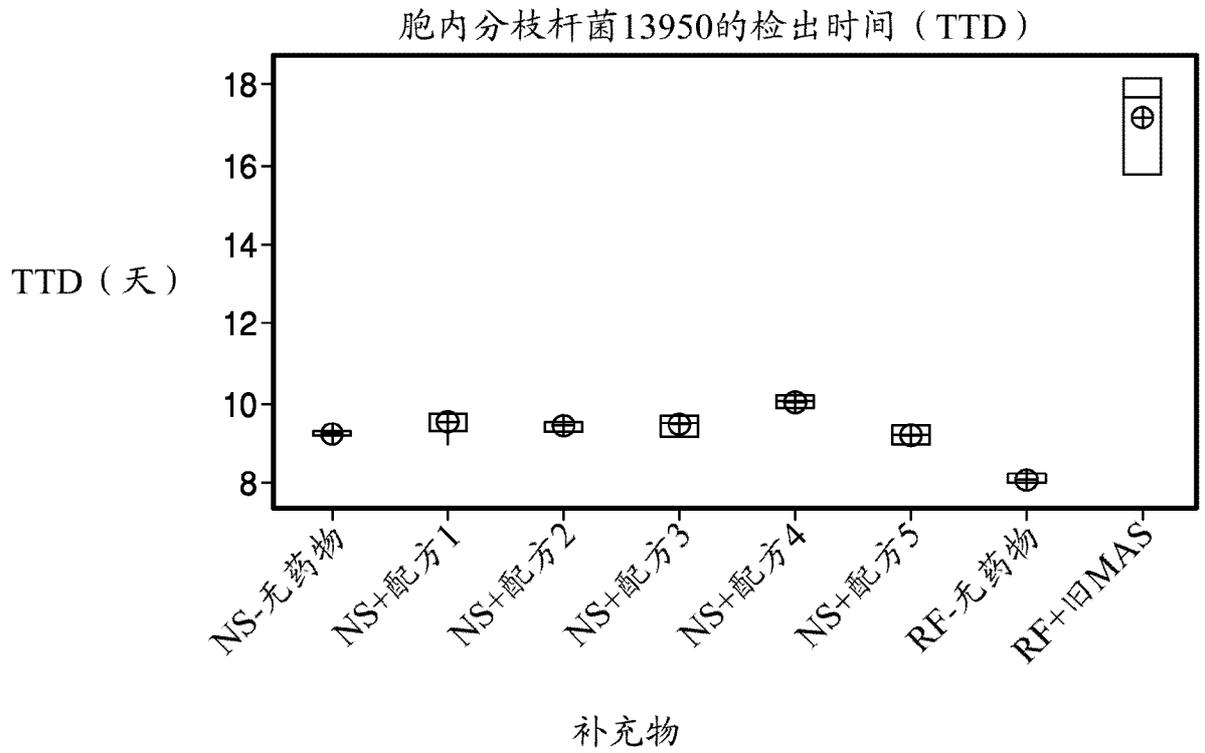


图5D

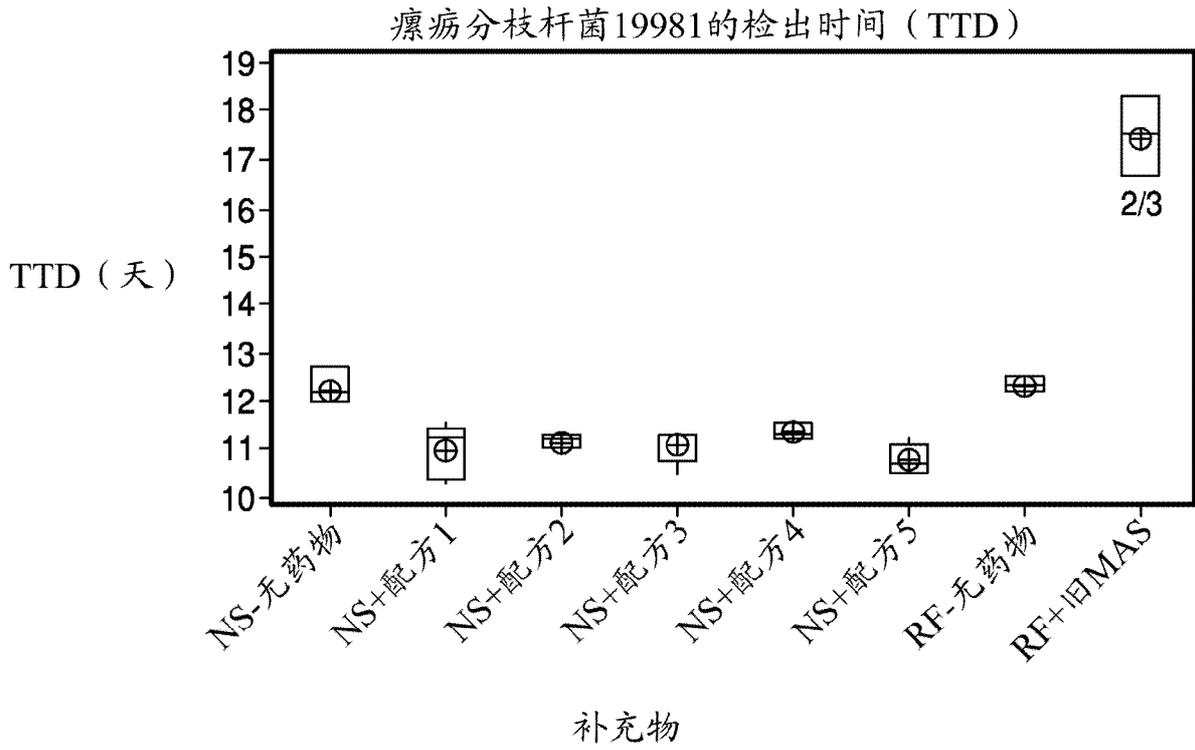


图5E

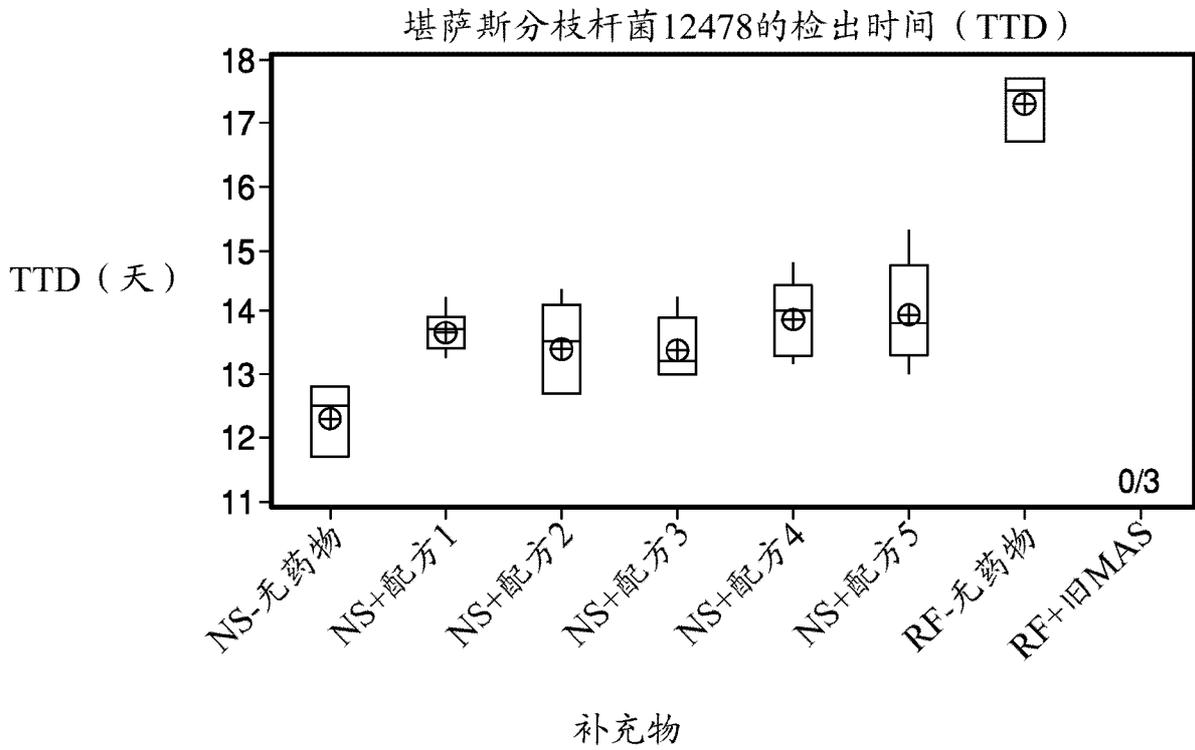


图5F

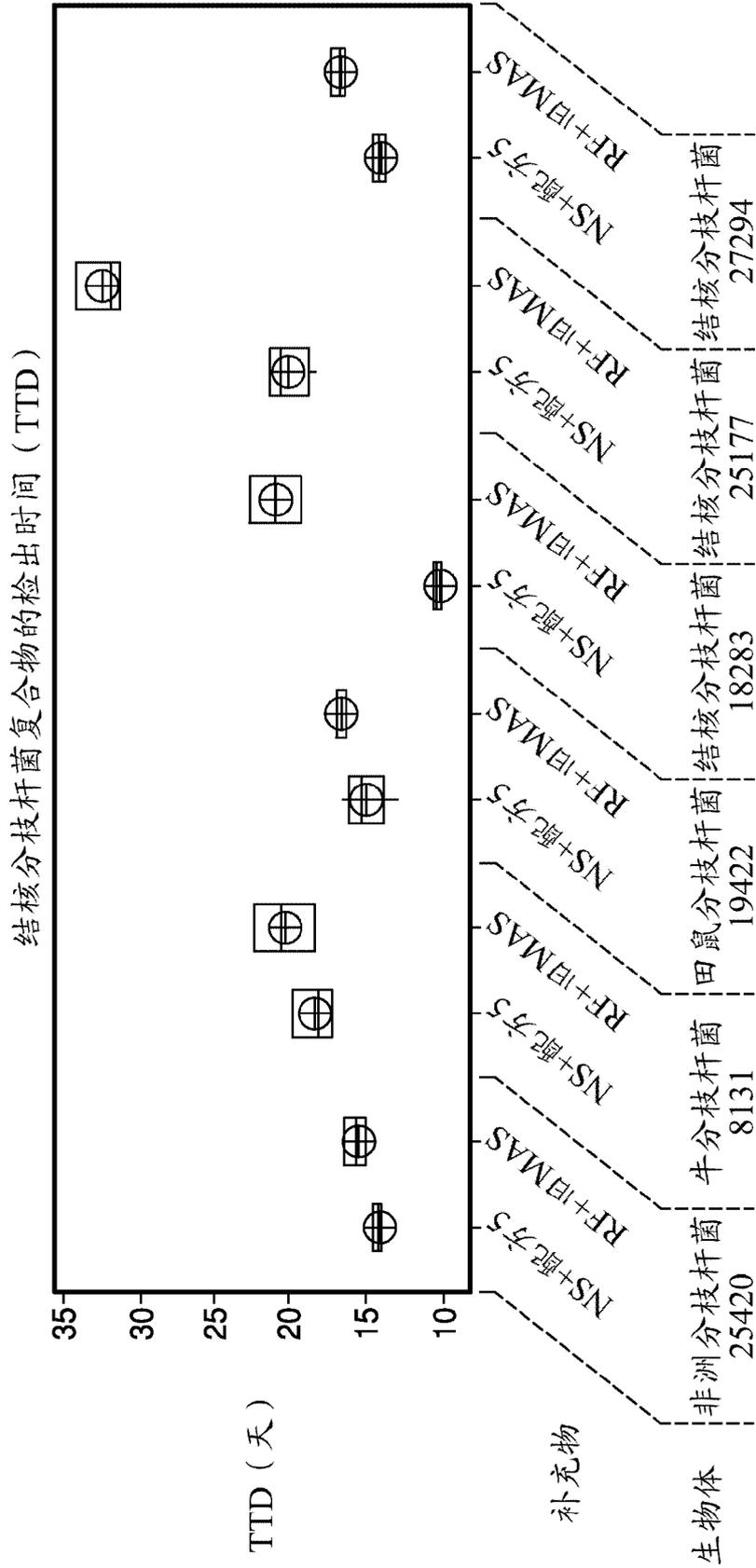


图6

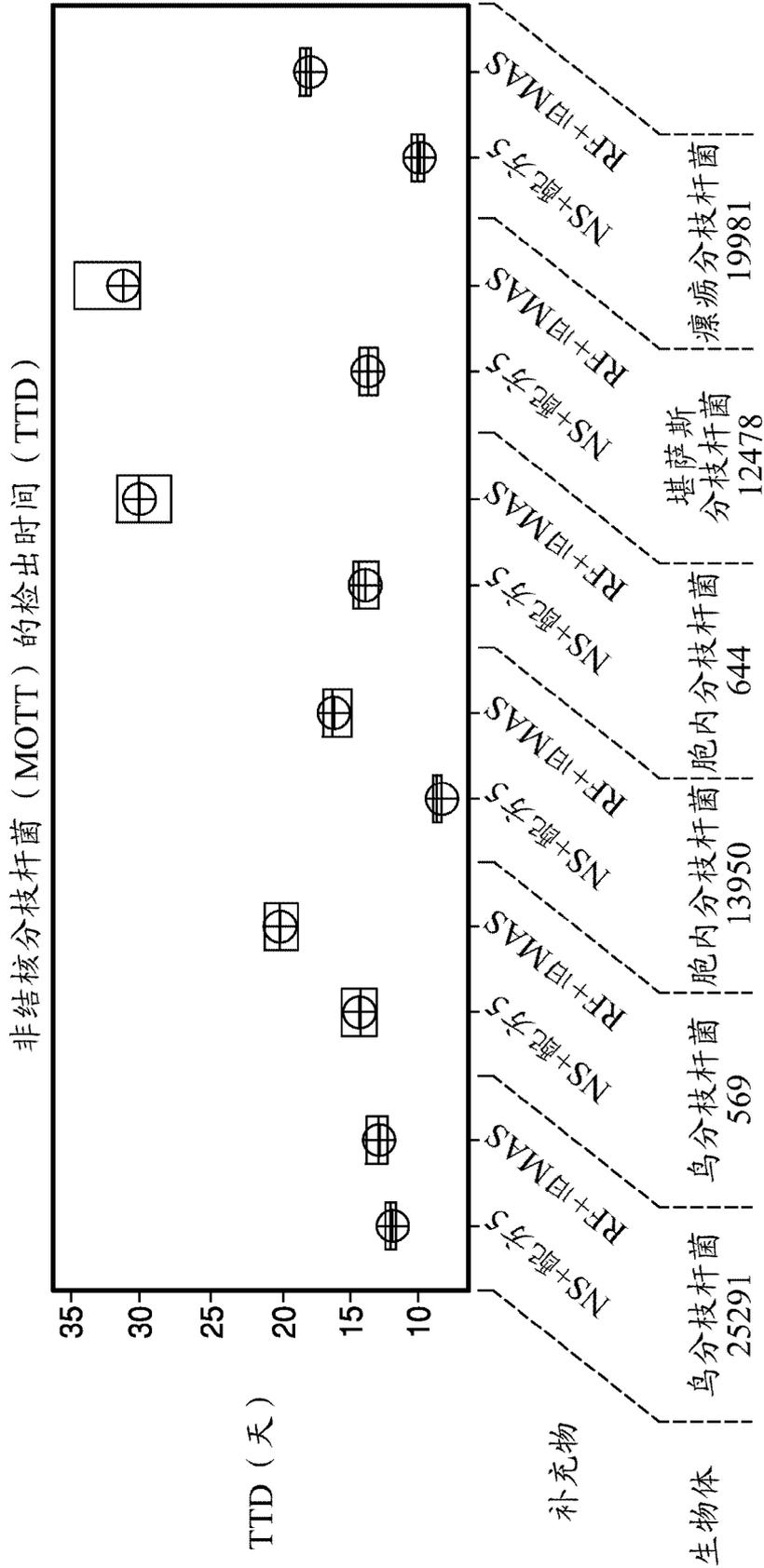


图7