



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113710168 A

(43) 申请公布日 2021. 11. 26

(21) 申请号 202080027067.8

(22) 申请日 2020.02.03

(30) 优先权数据

62/800,328 2019.02.01 US

62/867,595 2019.06.27 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.09.30

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2020/016445 2020.02.03

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/160555 EN 2020.08.06

(71) 申请人 马斯公司

地址 美国弗吉尼亚州

(72) 发明人 L·J·霍尔库姆 C·V·沃利斯

A·K·鲁帕尔 F·E·马尔斯

(74) 专利代理机构 北京市路盛律师事务所

11326

代理人 冯云 李宓

(51) Int.Cl.

A61B 10/00 (2006.01)

G01N 33/48 (2006.01)

C12Q 1/00 (2006.01)

A61B 10/02 (2006.01)

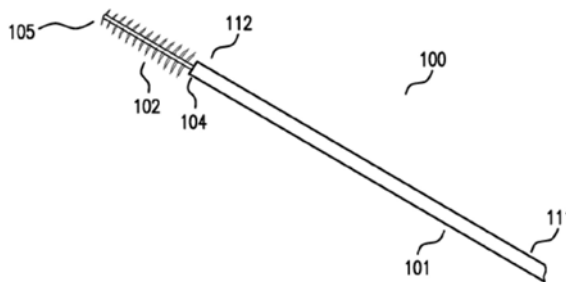
权利要求书7页 说明书28页 附图17页

(54) 发明名称

用于采样口腔微生物组的试剂盒、方法和装置

(57) 摘要

本申请公开了用于测试动物口腔微生物组的试剂盒和相关方法,用于测试从动物采集的样本中一种或多种细菌的存在,该一种或多种细菌例如与口腔疾病或紊乱(如牙周病)相关的细菌、良好口腔健康相关的细菌,或与两者均相关的细菌。该试剂盒包括具有手柄和与手柄相对的头部的样本采集装置。该试剂盒还包括用于储存样本采集装置的干燥容器。所述容器具有打开位置和关闭位置,所述打开装置用于接收所述头部的至少一部分。



1. 一种用于测试动物口腔微生物组的试剂盒,所述试剂盒包括:
样本采集装置,所述样本采集装置具有手柄和与手柄相对的头;和
用于储存样本采集装置的干燥容器,所述容器具有打开位置和关闭位置,所述打开位置用于接收至少一部分所述头部,其中所述干燥容器限定允许干燥容器内部与外部环境之间的连通的孔。
2. 根据权利要求1所述的试剂盒,其中所述头部的纵轴相对于所述手柄的纵轴布置成约90度至170度之间的角度。
3. 根据权利要求1或2所述的试剂盒,其中所述头部具有圆柱形。
4. 根据权利要求1-3中任一项所述的试剂盒,其中所述头部具有沿纵轴测量的长度尺寸,其中所述长度尺寸介于约1.5cm和2.5cm之间。
5. 根据权利要求1-4中任一项所述的试剂盒,其中所述头部包含拭子、棉花、泡沫、尼龙、聚酯、人造丝及它们的组合中的至少一种。
6. 根据权利要求1-5中任一项所述的试剂盒,其中所述头部包括刷毛。
7. 根据权利要求6所述的试剂盒,其中所述刷毛被配置为在其之间捕获样本。
8. 根据权利要求6或7所述的试剂盒,其中所述刷毛延伸至所述头部的外表面大致360度。
9. 根据权利要求6-8中任一项所述的试剂盒,其中所述刷毛的长度尺寸介于约1.5mm和5mm之间。
10. 根据权利要求6-9中任一项所述的试剂盒,其中所述刷毛的长度尺寸基本相似。
11. 根据权利要求6-10中任一项所述的试剂盒,其中靠近所述手柄的所述头部的第一端的刷毛比远离所述手柄的所述头部的第二端的刷毛长。
12. 根据权利要求11所述的试剂盒,其中长度尺寸从所述头部的第一端到所述头部的第二端逐渐变细,刷毛限定基本上呈圆锥形的形状。
13. 根据权利要求1-12中任一项所述的试剂盒,其中所述样本采集装置包括细胞刷。
14. 权利要求1-13中任一项所述的试剂盒的用途,所述用途包括用所述样本采集装置擦拭所述动物的口以采集样本和干燥所述头部并将所述样本采集装置储存一段时间 t_1 。
15. 根据权利要求14所述的用途,进一步包括对样本执行测定以测量微生物核酸的量从而检测和/或测量样本中一或多种细菌的量。
16. 根据权利要求14或15所述的用途,其中所述头部在收集所述样本后被风干。
17. 根据权利要求16所述的用途,其中所述头部在室温下风干。
18. 根据权利要求14-17中任一项所述的用途,其中擦拭所述动物的口包括刷拭或擦拭牙龈、牙龈线、牙齿、舌头、上颚和/或口腔的另一部分中的至少一个。
19. 根据权利要求14-18中任一项所述的用途,其中 t_1 最多是在样本收集后的约14天。
20. 根据权利要求14-19中任一项所述的用途,其中所述样本采集装置储存在最高约40°C的温度下。
21. 根据权利要求15-20中任一项所述的用途,其中所述一种或多种细菌在所述动物的口腔微生物组中发现。
22. 根据权利要求15-21中任一项所述的用途,其中所述一种或多种细菌包括与口腔疾病或紊乱相关的细菌、与良好口腔健康相关的细菌或与两者均相关的细菌。

23. 根据权利要求15-22中任一项所述的用途,其中所述一种或多种细菌包含消化链球菌科的种、产生挥发性有机化合物的细菌或两者;任选地,其中所述一种或多种细菌包含消化链球菌科COT-030。

24. 根据权利要求14-23中任一项所述的用途,其中所述用途还包括如果检测到的一种或多种细菌指示口腔健康不良或恶化,则诊断动物患有口腔疾病或紊乱的可能性。

25. 根据权利要求14-24中任一项所述的用途,其中所述用途还包括如果检测到的一种或多种细菌指示口腔健康不良或恶化,则建议改变口腔卫生或进行干预。

26. 根据权利要求25所述的用途,其中所述干预包括清洁所述动物的口,从所述动物口中去除斑块,抛光所述动物的牙齿,刮所述牙齿以去除牙垢或牙石,执行牙龈切除术,从所述动物的口中去除一个或多个患病牙齿,施用抗生素、抗炎药和/或止痛药治疗口腔感染,为动物提供牙齿咀嚼或增加牙齿咀嚼频率,引入或增加非食用咀嚼玩具和分配器的频率,引入或增加刷牙频率,增加牙齿饮食的使用,提供牙科治疗水溶液,或它们的任何组合。

27. 根据权利要求14-26中任一项所述的用途,其中所述样本是斑块样本。

28. 根据权利要求14-27中任一项所述的用途,其中所述动物是伴侣动物。

29. 根据权利要求14-28中任一项所述的用途,其中所述动物是狗或猫。

30. 根据权利要求1-13中任一项所述的试剂盒用于评估动物的口腔健康状况,其中所述试剂盒用于使用所述样本采集装置擦拭所述动物的口以采集样本,以及干燥所述头部并将所述样本采集装置储存一段时间 t_1 。

31. 根据权利要求30所述的供使用的试剂盒,进一步包括对所述样本执行测定以测量微生物核酸的量从而检测所述样本中的一或多种细菌和/或测量所述样本中的一或多种细菌的量。

32. 根据权利要求30或31所述的供使用的试剂盒,其中所述头部在收集所述样本后风干。

33. 根据权利要求32所述的供使用的试剂盒,其中所述头部在室温下风干。

34. 根据权利要求30-33中任一项所述的供使用的试剂盒,其中擦拭所述动物的口包括刷拭或擦拭牙龈、牙龈线、牙齿、舌头、上颚和/或口腔的另一部分中的至少一个。

35. 根据权利要求30-34中任一项所述的供使用的试剂盒,其中 t_1 最多是在样本收集后的约14天。

36. 根据权利要求30-35中任一项所述的供使用的试剂盒,其中所述样本采集装置储存在最高约40°C的温度下。

37. 根据权利要求30-36中任一项所述的供使用的试剂盒,其中所述一种或多种细菌在所述动物的口腔微生物组中发现。

38. 根据权利要求31-37中任一项所述的供使用的试剂盒,其中所述一种或多种细菌包括与口腔疾病或紊乱相关的细菌、与良好口腔健康相关的细菌或与两者均相关的细菌。

39. 根据权利要求31-38中任一项所述的供使用的试剂盒,其中所述一种或多种细菌包含消化链球菌科的种、产生挥发性有机化合物的细菌或两者;任选地,其中所述一种或多种细菌包含消化链球菌科COT-030。

40. 根据权利要求30-39中任一项所述的供使用的试剂盒,其中所述的供使用的试剂盒还包括如果检测到的一种或多种细菌指示口腔健康不良或恶化,则诊断动物患有口腔疾病

或紊乱的可能性。

41. 根据权利要求30-40中任一项所述的供使用的试剂盒,其中所述的供使用的试剂盒还包括如果检测到的一种或多种细菌指示口腔健康不良或恶化,则建议改变口腔卫生或进行干预。

42. 根据权利要求41所述的供使用的试剂盒,其中所述干预包括清洁该动物的口,从该动物的口中移除斑块,抛光该动物的牙齿,刮牙齿以移除牙垢或牙石,执行牙龈切除术,从该动物的口中移除一个或多个患病牙齿,施用抗生素、抗炎药和/或止痛药治疗口腔感染,为动物提供牙齿咀嚼或增加牙齿咀嚼频率,引入或增加非食用咀嚼玩具和分配器的频率,引入或增加刷牙频率,增加牙齿饮食的使用,提供牙科治疗水溶液,或它们的任何组合。

43. 根据权利要求30-42中任一项所述的供使用的试剂盒,其中所述样本为斑块样本。

44. 根据权利要求30-43中任一项所述的供使用的试剂盒,其中所述动物是伴侣动物。

45. 根据权利要求30-44中任一项所述的供使用的试剂盒,其中所述动物是狗或猫。

46. 一种从动物口腔采集样本的方法,所述方法包括:

(i) 提供试剂盒,所述试剂盒包括:

(a) 样本采集装置,所述样本采集装置具有手柄和与手柄相对的头部;和

(b) 用于储存所述样本采集装置的干燥容器,所述容器具有打开位置和关闭位置,所述打开位置用于接收至少一部分所述头部,其中所述干燥容器限定允许所述干燥容器的内部与外部环境之间连通的孔;

(ii) 用样本采集装置擦拭动物的口以采集样本;以及

(iii) 干燥所述头部并将所述样本采集装置储存一段时间 t_1 。

47. 根据权利要求46所述的方法,其中所述方法进一步包括(iv)对所述样本执行测定以测量微生物核酸的量从而检测所述样本中的一种或多种细菌和/或测量所述样本中的一种或多种细菌的量。

48. 根据权利要求47所述的方法,其中所述一种或多种细菌在所述动物的口腔微生物组中发现。

49. 一种检测动物口腔微生物组中一种或多种细菌的方法,所述方法包括:

(i) 提供试剂盒,所述试剂盒包括:

(a) 样本采集装置,所述样本采集装置具有手柄和与手柄相对的头部;和

(b) 用于储存所述样本采集装置的干燥容器,所述容器具有打开位置和关闭位置,所述打开位置用于接收至少一部分所述头部,其中所述干燥容器限定允许所述干燥容器的内部与外部环境之间连通的孔;

(ii) 用样本采集装置擦拭动物的口以采集样本;

(iii) 干燥所述头部并将所述样本采集装置储存一段时间 t_1 ;以及

(iv) 对所述样本进行测定以测量微生物核酸的量,从而检测样本中一种或多种细菌和/或测量样本中一种或多种细菌的量。

50. 根据权利要求47-49中任一项所述的方法,其中所述方法还包括如果检测到的一种或多种细菌指示口腔健康不良或恶化,则诊断动物患有口腔疾病或紊乱的可能性。

51. 根据权利要求47-50中任一项所述的方法,其中所述方法还包括如果检测到的一种或多种细菌指示口腔健康不良或恶化,则建议改变口腔卫生或进行干预。

52. 根据权利要求51所述的方法,其中所述干预包括清洁该动物的口,从该动物的口中移除斑块,抛光该动物的牙齿,刮牙齿以移除牙垢或牙石,执行牙龈切除术,从该动物的口中移除一个或多个患病牙齿,施用抗生素、抗炎药和/或止痛药治疗口腔感染,为动物提供牙齿咀嚼或增加牙齿咀嚼频率,引入或增加非食用咀嚼玩具和分配器的频率,引入或增加刷牙频率,增加牙齿饮食的使用,提供牙科治疗水溶液,或它们的任何组合。

53. 一种监测动物口腔健康的方法,该方法包括:

(i) 提供第一试剂盒和第二试剂盒,第一试剂盒和第二试剂盒中的每一个都包括:

(a) 样本采集装置,所述样本采集装置具有手柄和与手柄相对的头;和

(b) 用于储存样本采集装置的干燥容器,所述容器具有打开位置和关闭位置,所述打开位置用于接收至少一部分所述头,其中所述干燥容器限定允许所述干燥容器的内部与外部环境之间连通的孔;

(ii) 使用第一试剂盒的样本采集装置擦拭动物的口,以在第一时间采集第一样本,并使用第二试剂盒的样本采集装置擦拭动物的口,以在第二时间采集第二样本;

(iii) 干燥所述头并将所述样本采集装置储存一段时间 t_1 ;

(iv) 测试所述第一样本以检测第一数量的一种或多种细菌,并且测试所述第二样本以检测第二数量的一种或多种细菌,其中所述一种或多种细菌与口腔疾病或紊乱、良好口腔健康或两者中的至少一种相关;和

(v) 比较第一数量和第二数量,以确定第一数量和第二数量之间的差异。

54. 根据权利要求53所述的方法,其中所述方法还包括如果所述第一样本和所述第二样本之间的差异指示口腔健康不良或恶化,则诊断所述动物患有口腔疾病或紊乱的可能性。

55. 根据权利要求53或54所述的方法,其中所述方法还包括,如果所述第一样本和所述第二样本之间的差异指示口腔健康不良或恶化,则建议改变口腔卫生或进行干预。

56. 根据权利要求55所述的方法,其中所述干预包括清洁该动物的口,从该动物的口中移除斑块,抛光该动物的牙齿,刮牙齿以移除牙垢或牙石,执行牙龈切除术,从该动物的口中移除一个或多个患病牙齿,施用抗生素、抗炎药和/或止痛药治疗口腔感染,为动物提供牙齿咀嚼或增加牙齿咀嚼频率,引入或增加非食用咀嚼玩具和分配器的频率,引入或增加刷牙频率,增加牙齿饮食的使用,提供牙科治疗水溶液,或它们的任何组合。

57. 一种治疗或预防有需要的动物中口腔疾病或紊乱的方法,该方法包括:

(i) 提供试剂盒,所述试剂盒包括:

(a) 样本采集装置,所述样本采集装置具有手柄和与手柄相对的头;和

(b) 用于储存样本采集装置的干燥容器,所述容器具

有打开位置和关闭位置,所述打开位置用于接收至少一部分所述头部,其中所述干燥容器限定允许干燥容器内部与外部环境之间的连通的孔;

(ii) 通过以下方法诊断患有口腔疾病或紊乱的动物和/或确定所述动物发展成口腔疾病或紊乱的可能性:

(a) 用样本采集装置擦拭动物的口以采集样本;

(b) 干燥所述头部并将所述样本采集装置储存一段时间 t_1 ;和

(c) 对样本进行测定以测量微生物核酸的量,从而检测和/或测量指示口腔疾病或紊乱或指示口腔健康不良或恶化的一种或多种细菌的量;和

(iii) 通过建议改变口腔卫生或进行干预治疗或预防动物的口腔疾病或紊乱。

58. 一种治疗或预防有需要的动物中口腔疾病或紊乱的方法,所述方法包括:

(i) 提供第一试剂盒和第二试剂盒,第一试剂盒和第二试剂盒中的每个包括:

(a) 样本采集装置,所述样本采集装置具有手柄和与手柄相对的头部;和

(b) 用于储存样本采集装置的干燥容器,所述容器具有打开位置和关闭位置,所述打开位置用于接收至少一部分所述头部,其中所述干燥容器限定允许干燥容器内部与外部环境之间的连通的孔;

(ii) 通过以下方法诊断患有口腔疾病或紊乱的动物和/或确定所述动物发展成口腔疾病或紊乱的可能性:

(a) 使用第一试剂盒的样本采集装置擦拭动物的口,以在第一时间采集第一样本,并使用第二试剂盒的样本采集装置擦拭动物的口,以在第二时间采集第二样本;

(b) 干燥所述头部并将所述样本采集装置储存一段时间 t_1 ;

(c) 测试所述第一样本以检测第一数量的一种或多种细菌,并测试所述第二样本以检测第二数量的一种或多种细菌,其中所述一种或多种细菌包括与口腔疾病或紊乱相关的细菌、与良好口腔健康相关的细菌或与两者均相关的细菌;和

(d) 比较第一数量与第二数量以确定第一数量与第二数量之间的差异,其中第一数量与第二数量之间的差异指示口腔疾病或紊乱或指示口腔健康不良或恶化;和

(iii) 通过建议改变口腔卫生或进行干预治疗或预防动物的口腔疾病或紊乱。

59. 根据权利要求57或58所述的方法,其中所述干预包括清洁该动物的口,从该动物的口中移除斑块,抛光该动物的牙齿,刮牙齿以移除牙垢或牙石,执行牙龈切除术,从该动物的口中移除一个或多个患病牙齿,施用抗生素、抗炎药和/或止痛药治疗口腔感染,为动物

提供牙齿咀嚼或增加牙齿咀嚼频率,引入或增加非食用咀嚼玩具和分配器的频率,引入或增加刷牙频率,增加牙齿饮食的使用,提供牙科治疗水溶液,或它们的任何组合。

60. 根据权利要求46-59中任一项所述的方法,其中所述头部的纵轴相对于所述手柄的纵轴布置成约90度至170度的角度。

61. 根据权利要求46-60中任一项所述的方法,其中所述头部具有圆柱形的形状。

62. 根据权利要求46-61中任一项所述的方法,其中所述头部具有沿纵轴测量的长度尺寸,其中所述长度尺寸在约1.5cm和2.5cm之间。

63. 根据权利要求46-62中任一项的方法,其中所述头部包含拭子、棉花、泡沫、尼龙、聚酯、人造丝及它们的组合中的至少一种。

64. 根据权利要求46-63中任一项所述的方法,其中所述头部包括刷毛。

65. 根据权利要求64所述的方法,其中所述刷毛被配置为在其之间捕获样本。

66. 根据权利要求64或65所述的方法,其中所述刷毛延伸至所述头部的外表面的大致360度。

67. 根据权利要求64-66中任一项所述的方法,其中所述刷毛的长度尺寸在约1.5mm和5mm之间。

68. 根据权利要求64-67中任一项所述的方法,其中所述刷毛的长度尺寸基本相似。

69. 根据权利要求64-68中任一项所述的方法,其中靠近所述手柄的头部第一端的刷毛比远离所述手柄的头部第二端的刷毛长。

70. 根据权利要求69所述的方法,其中所述长度尺寸从所述头部的第一端到所述头部的第二端逐渐变细,刷毛限定基本上呈圆锥形的形状。

71. 根据权利要求46-70中任一项所述的方法,其中所述样本采集装置包括细胞刷。

72. 根据权利要求46-71中任一项所述的方法,其中所述头部在收集所述样本后风干。

73. 根据权利要求72所述的方法,其中所述头部在室温下风干。

74. 根据权利要求46-73中任一项所述的方法,其中擦拭所述动物的口包括刷拭或擦拭牙龈、牙龈线、牙齿、舌头、上颚和/或口腔的另一部分中的至少一个。

75. 根据权利要求46-74中任一项所述的方法,其中t1最多是在样本收集后的约14天。

76. 根据权利要求46-75中任一项所述的方法,其中所述样本采集装置储存在最高约40°C的温度下。

77. 根据权利要求46-76中任一项所述的方法,其中所述一种或多种细菌与口腔疾病或紊乱相关、与良好口腔健康相关或与两者均相关。

78. 根据权利要求46-77中任一项所述的方法,其中所述一种或多种细菌包括消化链球菌科的种、产生挥发性有机化合物的细菌或两者。

79. 根据权利要求46-78中任一项所述的方法,其中所述一种或多种细菌包含消化链球菌科COT-030。

80. 根据权利要求46-79中任一项所述的方法,其中所述口腔疾病或紊乱为牙周病、牙龈口炎、牙折吸收性病变和/或口腔异味。

81. 根据权利要求46-80中任一项所述的方法,其中所述样本是斑块样本。

82. 根据权利要求46-81中任一项所述的方法,其中所述样本是动物是伴侣动物。

83. 根据权利要求46-82中任一项所述的方法,其中所述样本是动物是狗或猫。

84. 一种用于测试动物口腔微生物组的试剂盒,所述试剂盒包括:
样本采集装置,所述样本采集装置具有手柄和与手柄相对的头;和
用于储存样本采集装置的干燥容器,所述容器具有打开位置和关闭位置,所述打开位置用于接收至少一部分所述头,其中所述干燥容器还包括吸湿装置。

85. 一种试剂盒,所述试剂盒包括:
样本采集装置,所述样本采集装置具有手柄和与手柄相对的头;和
用于储存所述样本采集装置的干燥容器,所述容器具有打开位置和关闭位置,所述打开位置用于接收至少一部分所述头,其中所述干燥容器限定允许干燥容器内部与外部环境之间连通的孔;

其中,所述样本采集装置用于从动物的牙龈、牙龈线、牙齿、舌头和/或上颌采集样本,并且其中所述样本包含一种或多种与口腔疾病或紊乱相关的细菌、与良好口腔健康相关的细菌或与两者均相关的细菌。

86. 根据权利要求85所述的试剂盒,其中所述一种或多种细菌包含消化链球菌科COT-030。

用于采样口腔微生物组的试剂盒、方法和装置

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2019年2月1日提交的美国申请号62/800,328和2019年6月27日提交的美国申请号62/867,595的优先权,两者均通过引用整体并入本申请。

技术领域

[0003] 当前公开的主题涉及用于从动物口腔采样细菌的试剂盒、方法和工具。当前公开的主题进一步涉及一种用于从动物口腔中采样细菌的样本采集装置,以及相关的诊断方法。

背景技术

[0004] 牙龈疾病,如牙周病,在兽医治疗中很常见,估计此类疾病的患病率在9%到20%之间[1,2]。对麻醉狗的研究并通过对尸检样本的检查报告了更高的患病率,在44%到100%之间[3-6]。这些数据表明该疾病在兽医治疗中诊断不足,其中大部分检查是在有意识的狗身上进行的。

[0005] 本领域已知牙斑块中与牙周健康和疾病相关的细菌种类[7-12]。例如,通过引用全部并入本申请的国际公布号W0 2008/137506描述了来自狗的口的样本中存在或不存在至少一种微生物,其中,与狗的牙周病相关的微生物是一种或多种与疾病相关的微生物,选自:消化链球菌属的种(*Peptostreptococcus* sp.)、共生菌属的种(*Synergistes* sp.)、梭菌属的种(*Clostridiales* sp.)、缠结真杆菌(*Eubacterium nodatum*)、硒单胞菌属的种(*Selenomonas* sp.)、拟杆菌属的种(*Bacteroidetes* sp.)、犬牙周臭味菌(*Odoribacter denticanis*)、卵形脱硫微菌(*Desulfomicrobium ovale*)、莫拉菌属的种(*Moraxella* sp.)、口牙拟杆菌(*Bacteroides denticanoris*)、绒毛产线菌(*Fillifactor villosus*)、犬嘴卟啉单胞菌(*Porphyromonas canoris*)、古氏卟啉单胞菌(*Porphyromonas gulae*)、齿垢密螺旋体(*Treponema denticola*)和唾液卟啉单胞菌(*Porphyromonas salivosa*)。通过引用并入本申请的国际公布号W0 2014/199115进一步描述了与疾病相关的细菌,尤其是与牙周疾病相关的细菌,以及与良好的口腔健康相关的细菌。

[0006] 已经开发了许多技术来评估口腔疾病和紊乱,如牙周病。此类技术包括但不限于牙龈探查和获取口腔内牙科放射照片。然而,这种方法和技术需要给动物全身麻醉,需要经过高度训练的个体,而且成本高昂。此外,这种方法对受试动物和受试动物的主人都可能造成压力。因此,开发一种用于诊断清醒动物口腔疾病或紊乱(如牙周病)的设备、试剂盒和方法将吸引兽医和动物主人,并将改善动物福利。

[0007] 诊断检测试剂盒通常需要从受试者身上采集DNA样本。然而,这些测试经常要求将DNA样本储存在缓冲液中,以确保DNA的稳定性。例如,需要缓冲液的市售样本收集试剂盒包括DNA Genotek公司(加拿大渥太华)的OMNIgene • ORAL (OMR-110)和Invitex Molecular公司(德国柏林)的带有DNA稳定剂的粪便收集管。将样本储存在缓冲液等液体中可能会在运输此类样本期间带来安全和方便担忧。在样本采集过程中,将样本储存在缓冲液中对用户

来说也是困难的,因为用户必须注意确保在样本采集过程中缓冲液不会溢出;如果缓冲液溢出,则必须购买另一个试剂盒来采集样本。包含缓冲液也会增加成本并引起对污染的担忧,并且使用缓冲液需要密封或气密容器。

[0008] 因此,需要改进用于诊断动物口腔疾病或紊乱(例如,牙周病)的装置、试剂盒和方法。

发明内容

[0009] 所公开主题的目的和优点将在下面的描述中阐述并从中显而易见,并且将通过所公开主题的实践来学习。公开主题的附加优点将通过在本申请的书面描述和其权利要求中特别指出的方法和系统以及附图来实现和获得。

[0010] 为了实现这些和其他优点,并且根据所公开主题的目的(如具体化和广泛描述的),所公开主题在一个方面包括用于测试动物口腔微生物组的试剂盒。该试剂盒包括:具有手柄和与手柄相对的头部的样本采集装置;以及用于储存样本采集装置的干燥容器,该容器具有打开位置和关闭位置,所述打开位置用于接收至少一部分所述头部,其中该干燥容器限定允许干燥容器内部与外部环境之间的连通(communication)的孔。在一些实施方式中,头部的纵轴相对于手柄的纵轴布置成约90度至170度的角度。在一些实施方式中,头部具有圆柱形。在一些实施方式中,头部具有沿纵轴测量的长度尺寸,其中长度尺寸在约1.5cm和2.5cm之间。在一些实施方式中,头部包括拭子(swab)、棉花、泡沫、尼龙、聚酯、人造丝及它们的组合中的至少一种。

[0011] 在进一步的实施方式中,头部包括刷毛。在一些实施方式中,刷毛被配置成在它们之间捕获样本。在一些实施方式中,刷毛延伸到头部外表面的大致360度上。在一些实施方式中,刷毛的长度尺寸在约1.5mm和5mm之间。在一些实施方式中,刷毛的长度尺寸基本相似。在一些实施方式中,靠近手柄的头部的第一端的刷毛比远离手柄的头部的第二端的刷毛长。在一些实施方式中,长度尺寸从头部的第一端到头部的第二端逐渐变细,刷毛限定基本上呈圆锥形的形状。

[0012] 在进一步的实施方式中,样本采集装置包括细胞刷(cytology brush)。

[0013] 在另一方面,本发明的特征在于本申请所公开的任何试剂盒的用途,其中所述用途包括使用样本采集装置擦拭动物的口以采集样本,干燥头部并将样本采集装置储存一段时间 t_1 。在一些实施方式中,该用途还包括对样本执行分析以测量微生物核酸的量,从而检测样本中的一种或多种细菌和/或测量样本中的一种或多种细菌的量。在一些实施方式中,在采集样本后对头部进行风干。在某些实施方式中,头部在室温下风干。在进一步的实施方式中,擦拭动物的口包括刷拭或擦拭牙龈、牙龈线、牙齿、舌头、上颚(the roof of the mouth)和/或口腔的另一部分中的至少一个。在一些实施方式中, t_1 最多为在采集样本后的约14天。在一些实施方式中,样本采集装置储存在最高为约40°C的温度下。在一些实施方式中,在动物的口腔微生物组中发现一种或多种细菌。在一些实施方式中,一种或多种细菌包括与口腔疾病或紊乱相关的细菌、与良好口腔健康相关的细菌或两者。例如,在一些实施方式中,一种或多种细菌包括消化链球菌科物种(*Peptostreptococcaceae* sp.)、产生挥发性有机化合物的细菌或两者。在特定实施方式中,一种或多种细菌包括消化链球菌科XIII[G-1]的种(*Peptostreptococcaceae* XIII[G-1] sp.)、消化链球菌科COT-030、消化链球菌科

COT-005/004、消化链球菌科COT-047和/或消化链球菌科COT-019。在进一步实施方式中,该用途还包括如果检测到的一种或多种细菌指示口腔健康不良或恶化,则诊断动物患有口腔疾病或紊乱的可能性。在一些实施方式中,如果检测到的一种或多种细菌指示口腔健康不良或恶化,则用途还包括建议改变口腔卫生或进行干预。在一些实施方式中,干预包括清洁动物的口(例如通过刷牙),从动物口中去除斑块,抛光动物的牙齿,刮牙齿以去除牙垢或牙石,执行牙龈切除术,从动物口中去除一颗或多颗病牙,施用抗生素、抗炎药和/或止痛药治疗口腔感染,为动物提供牙齿咀嚼或增加牙齿咀嚼频率,引入或增加非食用咀嚼玩具和分配器的频率,引入或增加刷牙频率,增加牙齿饮食(dental diet)的使用,提供牙科治疗水溶液,或它们的任何组合。在某些实施方式中,样本为斑块样本。在一些实施方式中,动物是伴侣动物。例如,在一些实施方式中,动物是狗或猫。在一些实施方式中,口腔疾病或紊乱是牙周病(periodontal disease)、牙龈口炎(gingival stomatitis)、牙折吸收性病变(odontoclastic resorptive lesions)和/或口腔异味(oral malodor)。

[0014] 在另一方面,本发明的特征在于,本申请所公开的试剂盒用于评估动物的口腔健康状态,其中该试剂盒用于使用样本采集装置擦拭动物的口,以采集样本,并且干燥头部,并且将样本采集装置储存一段时间 t_1 。在一些实施方式中,试剂盒的使用还包括对样本执行分析以测量微生物核酸的量,从而检测样本中一种或多种细菌和/或测量样本中一种或多种细菌的量。在一些实施方式中,在采集样本后对头部进行风干。在一些实施方式中,头部在室温下风干。在一些实施方式中,擦拭动物的口包括刷拭或擦拭牙龈、牙龈线、牙齿、舌头、上颚和/或口腔的另一部分中的至少一个。在一些实施方式中, t_1 最多是在采集样本后的约14天。在进一步的实施方式中,样本采集装置储存在最高约40°C的温度下。在一些实施方式中,在动物的口腔微生物组中发现一种或多种细菌。在一些实施方式中,一种或多种细菌包括与口腔疾病或紊乱相关的细菌、与良好口腔健康相关的细菌或两者。在一些实施方式中,一种或多种细菌包括消化链球菌科物种、挥发性有机化合物产生菌或两者。在特定实施方式中,一种或多种细菌包括消化链球菌科XIII[G-1]的种、消化链球菌科COT-030、消化链球菌科COT-005/004、消化链球菌科COT-047和/或消化链球菌科COT-019。在一些实施方式中,所述供使用的试剂盒还包括如果检测到的一种或多种细菌指示口腔健康不良或恶化,则诊断动物患有口腔疾病或紊乱的可能性。在一些实施方式中,如果检测到的一种或多种细菌指示口腔健康不良或恶化,则供使用的试剂盒还包括建议改变口腔卫生或进行干预。在一些实施方式中,干预包括清洁该动物的口,从该动物的口中移除斑块,抛光该动物的牙齿,刮牙齿以移除牙垢或牙石,执行牙龈切除术,从该动物的口中移除一个或多个患病牙齿,施用抗生素、抗炎药和/或止痛药治疗口腔感染,为动物提供牙齿咀嚼或增加牙齿咀嚼频率,引入或增加非食用咀嚼玩具和分配器的频率,引入或增加刷牙频率,增加牙齿饮食的使用,提供牙科治疗水溶液,或它们的任何组合。在一些实施方式中,样本为斑块样本。在特定实施方式中,该动物是伴侣动物。在某些实施方式中,动物是狗或猫。在一些实施方式中,口腔疾病或紊乱是牙周病、牙龈口炎、牙折吸收性病变和/或口腔异味。

[0015] 所公开的主题还包括使用试剂盒测试动物口腔微生物组的方法。该方法包括提供一种试剂盒,该试剂盒具有样本采集装置,该样本采集装置具有手柄和与手柄相对的头部。该试剂盒还包括用于储存样本采集装置的干燥容器,该容器具有打开位置和关闭位置,所述打开位置用于接收至少一部分所述头部。该方法还包括使用样本采集装置擦拭动物的口

以采集样本,干燥样本采集装置的头部,以及储存样本采集装置。

[0016] 根据所公开的主题,干燥头部可包括在采集样本后对头部进行风干。出于示例而非限制的目的,头部可在室温下风干。此外,或者可替代地,擦拭动物的口可以包括刷拭或擦拭牙龈、牙龈线、牙齿、舌头、上颚和/或口腔的其他部分中至少一个。例如,当擦拭动物的口时,可通过样本采集装置收集擦拭的动物的微生物和组织。收集的微生物可包括例如细菌、真菌和病毒,而收集的动物组织可包括例如口腔上皮细胞。

[0017] 进一步根据所公开的主题,所述方法可包括测试所述样本是否存在细菌。另外,或者可选地,测试样本存在细菌可包括测试样本中至少一种与口腔疾病或紊乱相关的细菌、与良好口腔健康相关的细菌或两者的存在或不存在以及数量。该方法还可包括测试样本中细菌(例如消化链球菌科物种、产生挥发性有机化合物的细菌或两者)、真菌、病毒或其他微生物中的至少一种的存在。在特定实施方式中,所述至少一种细菌为消化链球菌科XIII[G-1]的种。在一些实施方式中,所述口腔疾病或紊乱为牙周病、牙龈口炎、牙折吸收性病变和/或口腔异味。

[0018] 所公开的主题还包括用于监测动物口腔健康的方法。该方法包括提供第一试剂盒和第二试剂盒,第一试剂盒和第二试剂盒中的每一个都包括具有本申请所述特征的样本采集装置和干燥容器。该方法还包括使用样本采集装置擦拭动物的口以在第一时间采集第一样本,以及使用样本采集装置擦拭动物的口以在第二时间采集第二样本。该方法还包括测试第一样本和第二样本中至少一种与口腔疾病或紊乱(例如,牙周病)相关的细菌、与良好口腔健康相关的细菌或两者的存在或不存在以及数量。该方法还包括将第一样本中第一数量的与口腔疾病或紊乱相关的细菌、与良好口腔健康相关的细菌或两者与第二样本中第二数量的与口腔疾病或紊乱相关的细菌、与良好口腔健康相关的细菌或两者进行比较,以确定第一数量和第二数量之间的差异。在一些实施方式中,口腔疾病或紊乱是牙周病、牙龈口炎、牙折吸收性病变和/或口腔异味。

[0019] 在另一方面,本公开的特征在于一种从动物口腔采集样本的方法,该方法包括:(i)提供一种试剂盒,该试剂盒包括:(a)具有手柄和与手柄相对的头部的样本采集装置;和(b)用于储存样本采集装置的干燥容器,该容器具有打开位置和关闭位置,所述打开位置用于接收至少一部分所述头部,其中该干燥容器限定允许干燥容器内部与外部环境之间的连通的孔,(ii)用样本采集装置擦拭动物的口以采集样本;以及(iii)干燥头部并将样本采集装置储存一段时间 t_1 。在一些实施方式中,该方法还包括(iv)对样本执行分析以测量微生物核酸的量从而检测样本中一种或多种细菌和/或测量样本中一种或多种细菌的量。在一些实施方式中,在动物的口腔微生物组中发现一种或多种细菌。

[0020] 在另一方面,本公开的特征在于检测动物口腔微生物组中的一种或多种细菌的方法,该方法包括:(i)提供一种试剂盒,该试剂盒包括:(a)具有手柄和与手柄相对的头部的样本采集装置;和(b)用于储存样本采集装置的干燥容器,该容器具有打开位置和关闭位置,所述打开位置用于接收至少一部分所述头部,其中该干燥容器限定允许干燥容器内部与外部环境之间的连通的孔;(ii)用样本采集装置擦拭动物的口,以采集样本;(iii)干燥头部并将样本采集装置储存一段时间 t_1 ;和(iv)对样本进行分析以测量微生物核酸的量以检测样本中一种或多种细菌和/或测量样本中一种或多种细菌的量。

[0021] 在任何前述方法的一些实施方式中,如果检测到的一种或多种细菌指示口腔健康

不良或恶化,则该方法还包括诊断动物患有口腔疾病或紊乱的可能性。在一些实施方式中,如果检测到的一种或多种细菌指示口腔健康不良或恶化,则该方法还包括建议改变口腔卫生或进行干预。在某些实施方式中,干预包括清洁动物的口(例如通过刷牙),从动物口中去除斑块,抛光动物的牙齿,刮牙齿以去除牙垢或牙石,进行牙龈切除术,从动物口中去除一颗或多颗病牙,使用抗生素、抗炎药和/或止痛药治疗口腔感染,为动物提供牙齿咀嚼或增加牙齿咀嚼频率,引入或增加非食用咀嚼玩具和分配器的频率,引入或增加刷牙频率,增加牙齿饮食的使用,提供牙科治疗水溶液,或它们的任何组合。

[0022] 在另一方面,本公开的特征在于一种监测动物口腔健康的方法,该方法包括:(i)提供第一试剂盒和第二试剂盒,第一试剂盒和第二试剂盒中的每一个包括:(a)具有手柄和与手柄相对的头部的样本采集装置;和(b)用于储存样本采集装置的干燥容器,该容器具有打开位置和关闭位置,所述打开位置用于接收至少一部分所述头部,其中该干燥容器限定允许干燥容器内部与外部环境之间的连通的孔;(ii)使用第一试剂盒的样本采集装置擦拭动物的口,以在第一时间采集第一样本,使用第二试剂盒的样本采集装置擦拭动物的口,以在第二时间采集第二样本;(iii)干燥头部,并将样本采集装置储存一段时间 t_1 ;(iv)测试所述第一样本以检测第一数量的一种或多种细菌,并且测试所述第二样本以检测第二数量的一种或多种细菌,其中所述一种或多种细菌包括与口腔疾病或紊乱相关的细菌、与良好口腔健康相关的细菌或两者;以及(v)比较第一数量与第二数量以确定第一数量与第二数量之间的差异。在一些实施方式中,如果第一样本和第二样本之间的差异指示口腔健康不良或恶化,则该方法还包括诊断动物患有口腔疾病或紊乱的可能性。在一些实施方式中,如果第一样本和第二样本之间的差异指示口腔健康不良或恶化,则该方法还包括建议改变口腔卫生或进行干预。在一些实施方式中,干预包括清洁动物的口(例如通过刷牙),从动物口中去除斑块,抛光动物的牙齿,刮牙齿以去除牙垢或牙石,执行牙龈切除术,从动物口中去除一颗或多颗病牙,施用抗生素、抗炎药和/或止痛药治疗口腔感染,为动物提供牙齿咀嚼或增加牙齿咀嚼频率,引入或增加非食用咀嚼玩具和分配器的频率,引入或增加刷牙频率,增加牙齿饮食的使用,提供牙科治疗水溶液,或它们的任何组合。

[0023] 在另一方面,本公开的特征在于一种治疗或预防有需要的动物的口腔疾病或紊乱的方法,该方法包括:(i)提供试剂盒,所述试剂盒包括:(a)具有手柄和与手柄相对的头部的样本采集装置;和(b)用于储存样本采集装置的干燥容器,该容器具有打开位置和关闭位置,所述打开位置用于接收至少一部分所述头部,其中该干燥容器限定允许干燥容器内部与外部环境之间的连通的孔;(ii)通过以下方法诊断患有口腔疾病或紊乱的动物和/或确定该动物发展成口腔疾病或紊乱的可能性:(a)用样本采集装置擦拭该动物的口以采集样本;(b)干燥所述头部,并将所述样本采集装置储存一段时间 t_1 ;和(c)对样本进行分析,以测量微生物核酸的量,从而检测和/或测量指示口腔疾病或紊乱或指示口腔健康不良或恶化的一种或多种细菌的量;和(iii)通过建议改变口腔卫生或进行干预来治疗或预防动物的口腔疾病或紊乱。在一些实施方式中,干预包括清洁动物的口(例如通过刷牙),从动物口中去除斑块,抛光动物的牙齿,刮牙齿以去除牙垢或牙石,执行牙龈切除术,从动物口中去除一颗或多颗病牙,使用抗生素、抗炎药和/或止痛药治疗口腔感染,为动物提供牙齿咀嚼或增加牙齿咀嚼频率,引入或增加非食用咀嚼玩具和分配器的频率,引入或增加刷牙频率,增加牙齿饮食的使用,提供牙科治疗水溶液,或它们的任何组合。

[0024] 在另一方面,本公开的特征在于一种治疗或预防有需要的动物中口腔疾病或紊乱的方法,该方法包括:(i)提供第一试剂盒和第二试剂盒,第一试剂盒和第二试剂盒中的每一个包括:(a)具有手柄和与手柄相对的头部的样本采集装置;和(b)用于储存样本采集装置的干燥容器,该容器具有打开位置和关闭位置,所述打开位置用于接收至少一部分所述头部,其中该干燥容器限定允许干燥容器内部与外部环境之间的连通的孔;(ii)通过以下方法诊断患有口腔疾病或紊乱的动物和/或确定该动物发展成口腔疾病或紊乱的可能性:(a)使用第一试剂盒的样本采集装置擦拭该动物的口,以在第一时间采集第一样本,使用第二试剂盒的样本采集装置擦拭该动物的口,以在第二时间收集第二样本;(b)干燥所述头部并将所述样本采集装置储存一段时间 t_1 ;(c)测试所述第一样本以检测第一数量的一种或多种细菌,和测试所述第二样本以检测第二数量的一种或多种细菌,其中所述一种或多种细菌包括与口腔疾病或紊乱相关的细菌、与良好口腔健康相关的细菌或两者;和(d)比较第一数量和第二数量以确定第一数量和第二数量之间的差异,其中第一数量和第二数量之间的差异指示口腔疾病或紊乱,或指示口腔健康不良或恶化;和(iii)通过建议改变口腔卫生或进行干预来治疗或预防动物的口腔疾病或紊乱。在一些实施方式中,干预包括清洁动物的口(例如通过刷牙),从动物口中去除斑块,抛光动物的牙齿,刮牙齿以去除牙垢或牙石,执行牙龈切除术,从动物口中去除一颗或多颗病牙,施用抗生素、抗炎药和/或止痛药治疗口腔感染,为动物提供牙齿咀嚼或增加牙齿咀嚼频率,引入或增加非食用咀嚼玩具和分配器的频率,引入或增加刷牙频率,增加牙齿饮食的使用,提供牙科治疗水溶液,或它们的任何组合。

[0025] 在本申请所公开的任何方法的一些实施方式中,所述头部的纵轴相对于所述手柄的纵轴布置成约90度到170度之间的角度。在一些实施方式中,头部具有圆柱形。在一些实施方式中,头部具有沿纵轴测量的长度尺寸,其中长度尺寸在约1.5cm和2.5cm之间。在一些实施方式中,头部包括拭子、棉花、泡沫、尼龙、聚酯、人造丝及它们的组合中的至少一种。

[0026] 在本申请公开的任何方法的进一步实施方式中,头部包括刷毛。在一些实施方式中,刷毛被配置成在它们之间捕获样本。在一些实施方式中,刷毛延伸到头部外表面的大致360度上。在一些实施方式中,刷毛的长度尺寸在约1.5mm和5mm之间。在一些实施方式中,刷毛的长度尺寸基本相似。在一些实施方式中,靠近手柄的头部的第一端的刷毛比远离手柄的头部的第二端的刷毛长。在特定实施方式中,长度尺寸从头部的第一端到头部的第二端逐渐变细,刷毛限定基本上呈圆锥形的形状。

[0027] 在本申请公开的任何方法的一些实施方式中,样本采集装置包括细胞刷。在一些实施方式中,在采集样本后对头部进行风干。例如,在一些实施方式中,头部在室温下风干。

[0028] 在本申请公开的任何方法的进一步实施方式中,擦拭动物的口包括刷拭或擦拭牙龈、牙龈线、牙齿、舌头、上颚和/或口腔的另一部分中的至少一个。在一些实施方式中, t_1 最多是在采集样本后的约14天。在一些实施方式中,样本采集装置储存在最高约40°C的温度下。在一些实施方式中,一种或多种细菌包括与口腔疾病或紊乱(例如,牙周疾病)相关的细菌、与良好口腔健康相关的细菌或两者。在一些实施方式中,一种或多种细菌包括消化链球菌科的种、挥发性有机化合物细菌或两者。在特定实施方式中,至少一种细菌为消化链球菌科XIII[G-1]的种,消化链球菌科COT-030,消化链球菌科COT-005/004,消化链球菌科COT-047和/或消化链球菌科COT-019。

[0029] 在本申请公开的任何方法的一些实施方式中,样本为斑块样本。在本申请所公开的任何方法的一些实施方式中,口腔疾病或紊乱是牙周病、牙龈口炎、牙折吸收性病变和/或口腔异味。

[0030] 在本申请公开的任何方法的进一步实施方式中,该动物是伴侣动物。例如,在一些实施方式中,动物是狗或猫。

[0031] 在另一方面,本发明的特征在于一种用于测试动物口腔微生物组的试剂盒,该试剂盒包括:具有手柄和与手柄相对的头部的样本采集装置;以及用于储存样本采集装置的干燥容器,该容器具有打开位置和关闭位置,所述打开位置用于接收至少一部分所述头部,其中该干燥容器还包括吸湿装置。

[0032] 在另一方面,本发明的特征在于一种试剂盒,该试剂盒包括:具有手柄和与手柄相对的头部的样本采集装置;以及用于储存样本采集装置的干燥容器,该容器具有打开位置和关闭位置,所述打开位置用于接收至少一部分所述头部,其中该干燥容器限定允许干燥容器内部与外部环境之间的连通的孔;其中,样本采集装置用于从动物的牙龈、牙龈线、牙齿、舌头和/或上颌采集样本,并且其中样本包含与口腔疾病或紊乱、良好口腔健康或两者相关的一种或多种细菌。在一些实施方式中,一种或多种细菌包含消化链球菌科COT-030。

[0033] 应当理解,前面的一般描述和下面的详细描述都是示例性的,并且旨在提供对所要求保护的公开主题的进一步说明。

[0034] 包含在本说明书中并构成本说明书一部分的附图用于说明并提供对所公开主题的试剂盒和方法的进一步理解。附图与说明书一起用于解释所公开主题的原理。

附图说明

[0035] 图1A是根据所公开主题的样本采集装置的示例性实施方式的透视图。

[0036] 图1B是根据所公开主题的样本采集装置的另一示例性实施方式的透视图。

[0037] 图1C是示出图1A的样本采集装置的头部的透视局部细节图。

[0038] 图1D是图1A的样本采集装置的前视图。

[0039] 图2A是根据公开主题的处于打开位置的干燥容器的示例性实施方式的前视图。

[0040] 图2B是处于关闭位置的图2A的干燥容器前视图。

[0041] 图2C是根据另一实施方式的处于关闭位置的干燥容器的前视图。

[0042] 图2D是根据另一实施方式的处于打开位置的干燥容器的前视图,干燥容器中有样本采集装置。

[0043] 图2E是根据公开主题的邮寄包的前视图。

[0044] 图3A是描绘使用如实施例1中所述的示例性样品收集装置实施方式A-F收集的样本的UniB定量聚合酶链反应(quantitative polymerase chain reaction,qPCR)测定的由图基(Tukey)比较组标记的定量循环(quantitation cycle,Cq)值的图。

[0045] 图3B是描绘使用如实施例1中所述的示例性样品收集装置实施方式A-F收集的样本的qPCR测定(相对于无归一化为UniB Cq)的由Tukey比较组标记的消化链球菌科物种的Cq值的图。

[0046] 图3C是描绘使用如实施例1中所述的示例性样品收集装置实施方式A-F收集的样本的由Tukey比较组标记的Qubit测量的DNA浓度值的图。

[0047] 图4A是描绘使用如实施例1中所述的示例性储存条件A-F储存的样本的UniB qPCR测定的由Tukey对照组标记的Cq值的图。

[0048] 图4B是描绘使用如实施例1中所述的示例性储存条件A-F储存的样本的消化链球菌科的种qPCR测定(相对于无归一化为UniB Cq)的由Tukey对照组标记的Cq值的图。

[0049] 图4C是描绘使用如实施例1中所述的示例性储存条件A-F储存的样本的由Tukey比较组标记的Qubit测量的DNA浓度值的图。

[0050] 图5是显示在室温下比较样本储存14天与5天时,相对于无归一化为UniB Cq的消化链球菌科物种的Cq的平均值和95%置信区间的图。

[0051] 图6是显示当比较样本在30°C和室温下储存5天时,相对于无归一化为UniB Cq的消化链球菌科物种的Cq的平均值和95%置信区间的图。

[0052] 图7是显示当比较样本在40°C和室温下储存5天时,相对于无归一化为UniB Cq的消化链球菌科物种的Cq的平均值和95%置信区间的图。

[0053] 图8是显示当比较样本在30°C下储存14天与室温下储存5天时,相对于无归一化为UniB Cq的消化链球菌科物种的Cq的平均值和95%置信区间的图。

[0054] 图9是显示当比较样本在40°C下储存14天与室温下储存5天时,相对于无归一化为UniB Cq的消化链球菌科物种的Cq的平均值和95%置信区间的图。

[0055] 图10是显示对每个口腔生态位(颊粘膜、龈上斑块、唾液和舌背粘膜)中确定的操作分类单元的 \log_{10} 比例进行分析得出的主成分分数的图。

[0056] 图11是显示狗口内四个生态位(niches)样本的香农多样性指数的图表。

具体实施方式

[0057] 现在将详细参考公开主题的各种示例性实施方式,其示例性实施方式在附图中示出。将结合系统的详细描述来描述所公开主题的结构和相应的操作方法。

[0058] 本发明公开的主题涉及用于采样口腔微生物组和监测动物口腔健康的试剂盒、方法和装置。本发明公开的主题特别适合于对伴侣动物(例如家养狗)的口腔微生物组进行采样。

[0059] 定义

[0060] 本说明书中使用的术语在本领域内、在本公开的上下文中以及在使用每个术语的特定上下文中通常具有其普通含义。下文或说明书中的其他地方讨论了某些术语,以在描述本公开的方法和组合物以及如何制造和使用它们时向从业者提供额外的指导。

[0061] 在本说明书的整个描述和权利要求中,词语“包括(comprise)”和“包含(contain)”以及词语的变体,例如“包括(comprising)”和“包括(comprises)”,表示“包括但不限于”,并且不排除其他成分、整数或步骤。此外,除非上下文另有要求,否则单数包含复数。特别是,在使用不定冠词的情况下,除非上下文另有要求,否则说明书应理解为考虑了多元性以及单一性。

[0062] 如本申请所用,当在权利要求书和/或说明书中与术语“包括”一起使用时,词语“一个(a)”或“一个(an)”的使用可以表示“一”,但它也与“一个或多个”、“至少一个”和“一个或超过一个”的含义一致。此外,术语“具有”、“包括(including)”、“包含(containing)”和“包括(comprising)”是可互换的,本领域技术人员认识到这些术语是开放式术语。

[0063] 根据本发明使用的术语“动物”指各种各样的动物,例如四足动物、灵长类动物和其他哺乳动物。例如,术语“动物”可指家畜,包括但不限于狗、猫、马、牛、雪貂、兔子、猪、大鼠、小鼠、沙鼠、仓鼠、山羊等。术语“动物”还可指野生动物,包括但不限于野牛、麋鹿、鹿、鹿肉(venison)、鸭、禽、鱼等。在一些实施方式中,动物是伴侣动物。在某些情况下,动物是狗或猫。

[0064] 术语“约”或“大约”是指在由本领域普通技术人员确定的特定值的可接受误差范围内,其将部分取决于如何测量或确定该值,即测量系统的限制。例如,根据本领域的实践,“约”可指在3个或3个以上的标准偏差内。或者,“约”可以是指给定值的高达20%、高达10%、高达5%或高达1%的范围。或者,特别是对于生物系统或过程而言,该术语可以表示值的一个数量级内、5倍内或2倍内。

[0065] 如本申请所用,术语“口腔疾病或紊乱”是指发生在受试者(例如动物)的口腔中且由一种或多种细菌引起或与一种或多种细菌相关的疾病或紊乱。例如,疾病或紊乱会影响受试者的牙齿或牙龈。本发明的示例性口腔疾病或紊乱包括但不限于牙周病、牙龈口炎、牙折吸收性病变和口腔异味。

[0066] 如本申请所用,术语“牙周病”,也称为牙龈疾病,是指影响牙齿周围组织的炎症或感染。牙周病的严重程度可以从牙龈炎(如牙斑块引起的牙龈炎)到牙周炎不等。

[0067] 如本申请所使用的,并且如本领域所熟知的,“治疗”是指用于获得有益的或期望的结果(包括临床结果)的方法。就本主题而言,有益或期望的临床结果包括但不限于缓解或改善一个或多个症状、减少紊乱程度、稳定(即不恶化)紊乱状态、预防紊乱、延迟或减缓紊乱进展,和/或紊乱状态的改善或缓解。减少可以是约0.01%、约0.1%、约1%、约5%、约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%、约95%、约98%或约99%的并发症或症状的严重程度可减少。“治疗”也意味着与不接受治疗的预期生存期相比,延长生存期。本申请使用的术语“预防”是指在紊乱或状况发生前,部分或完成治疗。

[0068] 当前公开的主题的每个方面的优选特征可以如结合任何其他方面所描述的。在本申请的范围内,可以明确的是,在前面的段落、权利要求和/或下面的描述和附图中阐述的各个方面、实施方式、实施例和替代方案,特别是其各个特征,可以独立使用,也可以任意组合使用。即,所有实施方式和/或任何实施方式的特征可以以任何方式和/或组合进行组合,除非这些特征不兼容。

[0069] 口腔微生物组中的细菌

[0070] 本发明尤其涉及用于检测动物口腔微生物组中一种或多种细菌的试剂盒和相关方法。一种或多种细菌可能与口腔疾病或紊乱有关,例如牙周病或良好的口腔健康。动物可以是伴侣动物,如狗或猫。

[0071] 在一些实施方式中,与牙周病相关的一种或多种细菌可以是消化链球菌科的种。在一些实施方式中,与牙周病相关的一种或多种细菌选自消化链球菌属的种、共生菌属的种、梭菌属的种、缠结真杆菌、硒单胞菌属的种、拟杆菌属的种、犬牙周臭味菌、卵形脱硫微生物、莫拉菌属的种、口牙拟杆菌、绒毛产线菌、犬嘴卟啉单胞菌、古氏卟啉单胞菌、齿垢密螺旋体或唾液卟啉单胞菌组成的组。在某些实施方式中,一种或多种细菌包括消化链球菌种、产生挥发性有机化合物的细菌或两者。在进一步的实施方式中,一种或多种细菌包括消化链球菌科XIII[G-1]的种,消化链球菌科COT-030,消化链球菌科COT-005/004,消化链球菌

科COT-047和/或消化链球菌科COT-019。

[0072] 动物口腔微生物组内的细菌群落特征可能因采自动物的样本来源而异。例如，三个离散的口腔生态位(oral niches)可以包括软组织表面，例如嘴唇、脸颊和舌头；硬组织表面，如牙齿；还有唾液。在一些实施方式中，口腔生态位来自硬组织表面，例如一个或多个牙齿。在一些实施方式中，口腔生态位包括牙龈边缘或龈上表面。所公开主题的方法和试剂盒可用于检测多种动物(例如四足动物、灵长类动物和其他哺乳动物)口腔微生物组中的细菌。所公开主题的方法和试剂盒特别适合与伴侣动物(例如狗、猫和其他驯养动物)一起使用。

[0073] 用于测试口腔微生物组的试剂盒

[0074] 本发明提供了用于测试动物口腔微生物组的试剂盒。该试剂盒可用于采集样本，其中检测到一种或多种与口腔疾病或紊乱(如牙周病)或良好口腔健康相关的细菌。如本申请所公开的，用于测试动物口腔微生物组的试剂盒通常包括，除其他外，具有手柄和与手柄相对的头部的样本采集装置。该试剂盒还包括用于储存样本采集装置的干燥容器。该容器具有用于接收头部的至少一部分的打开位置和关闭位置。干燥容器还限定了孔，以允许干燥容器内部与外部环境之间的连通。

[0075] 附图(其中类似的附图标记在整个单独视图中表示相同或功能类似的元件)用于进一步说明各种实施方式，并解释各种原理和优点，所有这些都符合所公开的主题。为了解释和说明而非限制的目的，在图1A至图2B中示出了根据所公开主题的试剂盒的示例性实施方式。

[0076] 出于说明而非限制的目的，参考图1A中所示的样本采集装置100的示例性实施方式。样本采集装置100通常包括手柄101和与手柄相对的头102。头102可以包括靠近手柄101的第一端104和远离手柄的第二端105，在其之间限定纵轴。手柄101还可以包括第一端111和靠近头102的第一端104的第二端112，在其之间限定纵轴。参考图1B中所示的样本采集装置110的示例性实施方式，头102的纵轴可以相对于手柄101的纵轴以角度103布置。出于示例而非限制的目的，角度103可以在约90度到约170度之间。如本申请所体现的，角度103可以是钝角。

[0077] 手柄101和头102各自可以是任何合适的形状，例如矩形或圆柱形。出于示例而非限制的目的，并且如本申请所体现的，手柄101可以具有一般圆柱形，并且头102可以具有一般锥形。采样装置的头102可以是任何合适其使用的动物的大小。出于示例而非限制的目的，头部长度可在约1.5cm至约2.5cm之间，尤其是长度在约1.7cm至约2.3cm之间，尤其是长度在沿头102纵轴测量的约为2cm至2.1cm之间。手柄102也可以是任何合适的尺寸，具体取决于使用样本采集装置的动物。头部和手柄接合处的外表面可以圆角形成凸表面。

[0078] 手柄101可以由任何合适的材料制成。出于示例性目的且如本申请所体现的，手柄101可以由刚性塑料材料制成。手柄101可以具有任何合适的长度或直径。可以选择手柄101的长度，使得用户可以舒适地握住手柄并到达要擦拭的动物的口的后部。出于示例而非限制的目的，并且如本申请所体现的，手柄101的直径可以在大约1.5mm到大约7mm之间。手柄101的外表面可以基本上光滑。另外或可选地，可以对手柄101的部分进行纹理处理以提高抓力。

[0079] 头102可由任何适合样本采集的材料制成。出于示例而非限制的目的，头102可以

是拭子、棉花、泡沫、尼龙、聚酯、人造丝及它们的组合。另外或可选地,如本申请所体现的,头部可包括刷毛。刷毛可以由上述任何材料制成。例如,如本申请所体现的,刷毛可由尼龙制成。如本申请进一步讨论的,刷毛可配置为在其之间捕获样本。

[0080] 刷毛可以以任何适当的模式排列在头部表面。出于示例而非限制的目的,刷毛可覆盖头部的全部或部分表面。例如,在头部为圆柱形的情况下,刷毛可定位在头部表面的至少约50%、至少约60%、至少约70%或至少约80%上方。例如,参考图1D,当沿着头部纵轴在前视图中观察头部102时,刷毛108可覆盖头部外表面的约90度、约135度、约180度、约225度、约270度、约315度或约360度。

[0081] 头部102上的刷毛可以是任何合适的长度。参考图1C中所示头部102的局部细节视图,可从头部102的中心纵轴到每个刷毛108的末端测量长度尺寸107。出于示例目的,而非限制,头部一侧的刷毛长度尺寸可介于约1.5mm和5mm之间,具体取决于样本采集装置的应用和采集样本的动物。头部102上的刷毛可以具有基本相似的长度尺寸。另外或者,刷毛可以具有不同的长度。出于示例的目的且如本申请所述,靠近手柄101的头部102第一端104处的刷毛108可以比远离手柄101的头部102第二端105处的刷毛108长。如本申请进一步所述,刷毛长度尺寸可以从头部102的第一端104到第二端105逐渐变细,以限定基本上呈圆锥形的形状。出于示例而非限制的目的,并且如本申请进一步实施的,刷毛108可以布置在一起以限定围绕头部102的圆周延伸的环。另外,或者可选地,刷毛108可布置成螺旋状图案,围绕头部102的圆周延伸,并从头部102的第一端104延伸至头部102的第二端105。

[0082] 出于说明而非限制的目的,参考图2A和图2B中所示的干燥容器200的示例性实施方式(未按比例绘制)。干燥容器200可被配置成容纳图1A的样本采集装置100。容器200通常用于储存样本采集装置100。参考图2A,容器具有用于接收样本采集装置100的至少一部分的打开位置。参考图2B,容器具有用于将装置100完全容纳在其中的关闭位置。如图2A-图2B所示,容器可包括底部段210和顶部段220。底部段和顶部段可通过卡扣、螺纹连接或本领域已知的其他连接连接在一起。另外,或者可选地,第一部分201和第二部分202可以通过铰接连接或其他合适连接。另外或可选地,容器200可由具有可打开槽的整体件形成,以在其中接收装置。

[0083] 干燥容器可进一步限定至少一个孔205,以允许干燥容器内部与外部环境之间的连通。如本申请进一步所述,所述至少一个孔形成通向外部环境的开口,从而在样本储存在干燥容器200中时,允许在样本采集装置上采集的样本继续风干,这有利于样本的稳定性。至少一个孔205可布置在干燥容器200上的任何适当位置,以便于其中的装置的头部102暴露于环境空气中进行干燥。图2C描绘了处于关闭位置的容器200的示例,其中在顶部段220的顶部设置了多个孔。在这种配置中,具有样本的样本采集装置可在擦拭动物后充分储存在干燥容器中,同时,装置的头部与用于干燥的多个孔相邻。在替代实施方式中,容器不包括至少一个孔,而是包括吸湿装置在其中,以吸收容器内的水分并允许干燥样本采集装置。这种吸湿装置可以是业内已知的任何装置,例如但不限于硅胶。进一步设想,具有至少一个孔的干燥容器的实施方式可进一步包括吸湿装置,以进一步协助从容器内去除水分并协助干燥储存在其中的样本采集装置。图2C的干燥容器包括平底,使得干燥容器可以直立,如图示。

[0084] 图2D描绘了干燥容器200的另一个实施方式,该干燥容器200还包括平衡架250。该

平衡架250可以与干燥容器200一体。或者,该平衡架250可以是可与干燥容器200连接的单独组件。如图所示,支架可为干燥容器200提供额外的稳定性,以允许样本采集装置200在风干时停留在干燥容器内。因此,装置100可以在打开位置时在容器200内风干,或者可替代地,装置100可以在关闭位置时在容器200内风干。

[0085] 容器200可以由任何合适的材料制成。出于示例性目的且如本申请所体现的,容器200可以由塑料材料制成。如本申请所实施的,容器200可以在其中接收整个样本采集装置100。另外,或者可替代地,该容器可以容纳头部102的至少一部分。在采集样本后用于储存样本采集装置的干燥容器可以是用于供应样本采集装置的相同容器。可使用传统的包装灭菌方法对干燥容器进行灭菌。虽然本申请所包含的干燥容器具有塑料构造,但应理解,根据所公开的主题,可以使用由其他合适材料构造的容器。

[0086] 如图2E所示,试剂盒还可以包括封套或套筒300,用于接收容器和其中的装置。该封套可用于储存干燥容器,其中装有装置100,并包括识别从中采集样本的动物的适当标签。随后可接近该封套以获得其中含有该装置的干燥容器,以进一步测试该装置。另外或可选地,封套还可以包括预付邮资305和预寻址标签310,以便将样本采集装置和容器轻松装运到实验室场所,如果在样本采集位置不存在这样的场所的话。实验室设施可进一步测试本申请进一步描述的样本。出于示例性目的,封套或封套可以由纸、塑料、箔或与里面的内容物不交互的任何其他合适材料构成。

[0087] 测试口腔微生物组的方法

[0088] 本申请提供了使用上述试剂盒的方法。所公开的方法包括,例如,采集样本并检测样本中的一种或多种细菌,以及使用本公开的试剂盒监测动物的口腔健康。在所公开的任何方法中,样本可以是斑块样本。在所公开的任何方法中,动物可以是伴侣动物,例如狗或猫。

[0089] 本发明的示例性方法包括从动物口腔采集样本的方法。从动物口腔采集样本的方法包括:提供如本申请所公开的试剂盒,其包括具有手柄和与手柄相对的头部的样本采集装置以及用于储存样本采集装置的干燥容器,所述容器具有用于接收所述头部的至少一部分的打开位置和闭合位置,并且限定允许所述干燥容器的内部与外部环境之间连通的孔;用样本采集装置擦拭动物的口以采集样本;以及干燥所述头部并将所述样本采集装置储存一段时间 t_1 。该方法还可包括对样本进行分析,以测量微生物核酸的量,以检测和/或测量样本中一种或多种细菌(例如,在动物口腔微生物组中发现的细菌)的量。

[0090] 本发明的特征还在于检测动物口腔微生物组中一种或多种细菌的方法。检测动物口腔微生物组中的一种或多种细菌的方法包括:提供如本申请所述的试剂盒,其包括具有手柄和与手柄相对的头部的样本采集装置以及用于储存样本采集装置的干燥容器,所述容器具有打开位置和关闭位置,所述打开位置用于接收至少一部分所述头部,其中所述干燥容器限定允许所述干燥容器的内部与外部环境之间的连通的孔;用样本采集装置擦拭动物的口以采集样本;干燥所述头部并将所述样本采集装置储存一段时间 t_1 ;以及对所述样本执行分析以测量微生物核酸的量以检测所述样本中的一种或多种细菌和/或测量所述样本中的一种或多种细菌的量。

[0091] 本发明的另一示例性方法包括监测动物口腔健康的方法,其包括:提供本申请所公开的第一试剂盒和第二试剂盒,第一和第二试剂盒中的每一个都包括样本采集装置以及

用于储存样本采集装置的干燥容器,样本采集装置具有手柄和与手柄相对的头,干燥容器具有打开位置和关闭位置,所述打开位置用于接收至少一部分所述头,其中,干燥容器限定允许干燥容器内部与外部环境之间的连通的孔;使用第一试剂盒的样本采集装置擦拭动物的口,以在第一时间采集第一样本,并且使用第二试剂盒的样本采集装置擦拭动物的口,以在第二时间采集第二样本;干燥所述头并将所述样本采集装置储存一段时间 t_1 ;测试所述第一样本以检测第一数量的一种或多种细菌,并且测试所述第二样本以检测第二数量的一种或多种细菌,其中所述一种或多种细菌包括与口腔疾病或紊乱(例如,牙周病)相关的细菌、与良好口腔健康相关的细菌或两者;以及将所述第一数量与所述第二数量进行比较以确定所述第一数量与所述第二数量之间的差异。

[0092] 另一种公开的方法包括治疗或预防有需要的动物中口腔疾病或紊乱的方法,其中该方法包括:提供试剂盒,该试剂盒包括样本采集装置和用于储存样本采集装置的干燥容器,该样本采集装置具有一个手柄和一个与手柄相对的头,该容器具有打开位置和关闭位置,所述打开位置用于接收至少一部分所述头,其中所述干燥容器限定允许所述干燥容器的内部与外部环境之间的连通的孔;通过以下方法诊断患有口腔疾病或紊乱的动物和/或确定动物患口腔疾病或紊乱的可能性:用样本采集装置擦拭动物的口以采集样本;干燥所述头并将所述样本采集装置储存一段时间 t_1 ;并且对样本执行分析以测量微生物核酸的量,从而检测和/或测量指示口腔疾病或紊乱(例如,牙周疾病)或指示口腔健康不良或恶化的一种或多种细菌的量;以及通过建议改变口腔卫生或进行干预来治疗或预防动物的口腔疾病或紊乱。

[0093] 此外,本发明还具有治疗或预防有需要的动物中口腔疾病或紊乱的方法,该方法包括:提供第一试剂盒和第二试剂盒,第一试剂盒和第二试剂盒中的每一个都包括具有手柄和与手柄相对的头部的样本采集装置;和用于储存样本采集装置的干燥容器,该容器具有打开位置和关闭位置,所述打开位置用于接收至少一部分所述头,其中该干燥容器限定孔,以允许干燥容器内部与外部环境之间的连通;通过如下方法诊断患有口腔疾病或紊乱的动物和/或确定动物发展成口腔疾病或紊乱的可能性:使用第一试剂盒的样本采集装置擦拭动物的口,以在第一时间采集第一样本,使用第二试剂盒的样本采集装置擦拭动物的口,以在第二时间收集第二样本;干燥所述头并将所述样本采集装置储存一段时间 t_1 ;测试所述第一样本以检测第一数量的一种或多种细菌,以及测试所述第二样本以检测第二数量的一种或多种细菌,其中所述一种或多种细菌包括与所述口腔疾病或紊乱(例如,牙周病)相关的细菌、与良好口腔健康相关的细菌或两者;并且将所述第一数量与所述第二数量进行比较以确定所述第一数量与所述第二数量之间的差异,其中所述第一数量与所述第二数量之间的差异指示所述口腔疾病或紊乱,或指示口腔健康不良或恶化;以及通过建议改变口腔卫生或进行干预来治疗或预防动物的口腔疾病或紊乱。

[0094] 根据本公开,任何方法都可以包括提供本申请所公开的试剂盒,即具有样本采集装置100和干燥容器200的试剂盒。试剂盒的样本采集装置和容器可以具有本申请所述的各种特征中的任何一种。所公开的方法还包括用样本采集装置100擦拭动物的口以采集样本。所公开的方法还包括干燥头部102和将样本采集装置100储存在干燥容器200中。

[0095] 样本采集装置100可以使用任何合适的技术进行干燥。出于示例的目的和如本申请所体现的,样本采集装置100可以风干。出于示例而非限制的目的,样本采集装置100可在

室温下风干。

[0096] 可以使用本领域已知的任何适当技术,使用样本采集装置100擦拭动物的口。出于示例而非限制的目的,擦拭动物口的步骤可包括刷拭或擦拭牙龈、牙龈线、牙齿、舌头、脸颊、上颚和/或口腔的其他部分中的至少一个。擦拭步骤可包括缓慢旋转擦拭棒,以沿头部102将样本涂抹在刷毛109上,以使样本保持在刷毛上。可以控制拭子的旋转速度,以防止样本从刷毛109上脱落或悬挂。在一些实施方式中,擦拭包括擦拭牙龈、牙龈线和/或牙齿。擦拭步骤可用于从动物口腔采集斑块样本。

[0097] 根据本申请公开的方法,检测与口腔疾病或紊乱相关的一种或多种细菌的存在或不存在以及数量可指示口腔健康不良或恶化。例如,可以将检测到的一种或多种细菌的数量与对照数据集进行比较,所述对照数据集提供相同物种的健康动物中相同细菌数量的健康范围。可以确定,如果检测到的一种或多种细菌的数量低于对照数据集中的健康数量,和/或如果检测到的一种或多种细菌的数量大于对照数据集中的健康数量,则所述细菌的数量可以指示动物的口腔健康不良或恶化。例如,在某些实施方式中,当从动物收集样本时,将样本中检测到的一种或多种细菌的数量与对照数据集进行比较,以确定一种或多种细菌是否指示动物的口腔健康不良或恶化。

[0098] 本申请公开的任何一种方法还可包括进一步检测动物口腔微生物组中真菌、病毒和/或其他微生物的存在。

[0099] 如上所述,还提供了监测动物口腔健康的方法。所公开的方法包括提供第一试剂盒和第二试剂盒,每个试剂盒都具有样本采集装置100和干燥容器200。所公开的方法还可以包括提供第三或更多后续试剂盒,每个试剂盒都具有样本采集装置100和干燥容器200。每个试剂盒的样本采集装置和容器可以具有本申请所述的各种特征中的任何一种。每个试剂盒的样本采集装置和容器可以具有基本相同的特征,或者具有基本不同的特征。所公开的方法还包括使用样本采集装置100擦拭动物的口以采集第一样本,以及使用样本采集装置擦拭动物的口以在第二时间采集第二样本。可以使用本申请所述的任何方法擦拭动物的口。

[0100] 所公开的方法还包括测试第一样本和第二样本与口腔疾病或紊乱相关的一种或多种细菌、与良好口腔健康相关的一种或多种细菌或两者的存在或不存在和数量。本领域已知或本申请公开了与口腔疾病或紊乱相关的细菌物种。所公开的方法还包括将第一样本中第一数量的与口腔疾病或紊乱相关的细菌、与良好口腔健康相关的细菌或两者与第二样本中第二数量的与口腔疾病或紊乱相关的细菌、与良好口腔健康相关的细菌或二者进行比较,以确定第一数量和第二数量之间的差异。此外,所公开的方法可以包括获取多个样本和通过将样本与从至少两个样本建立的共识(consensus)进行比较来确定差异。

[0101] 与第一样本相比,第二样本中与口腔疾病或紊乱(例如,牙周病)相关的细菌或其他标记物的存在增加和/或与良好口腔健康相关的细菌或其他标记物的存在减少可能表明口腔健康差劣或恶化。与第一样本相比,第二样本中与口腔疾病或紊乱(例如,牙周病)相关的细菌或其他标记物的存在减少和/或与良好口腔健康相关的细菌或其他标记物的存在增加可表明口腔健康有所改善。

[0102] 本申请公开的方法还可包括提供第三试剂盒和测试第三样本,并将第三样本与第二或第一样本或任何先前样本进行比较。该方法还可进一步包括提供进一步的后续试剂盒

和测试任何后续样本,并将其与第三、第二或第一样本或任何其他先前样本进行比较。如前所述,与良好口腔健康相关的细菌或其他标记物的相对增加或减少可分别指示口腔健康的改善或或恶化。

[0103] 根据本申请公开的任何方法,该方法还可包括在样本或样本变化指示口腔健康不良或恶化的情况下,建议口腔卫生改变或干预的步骤。此类干预可包括,例如,清洁动物的口(例如通过刷牙),从动物口中去除斑块,进行牙龈切除术,去除动物口中的一个或多个患病牙齿,施用抗生素、抗炎药和/或止痛剂治疗口腔感染,为动物提供牙齿咀嚼或增加牙齿咀嚼频率,引入或增加非食用咀嚼玩具和分配器的频率,引入或增加刷牙频率,增加牙齿饮食的使用(例如,改善牙齿健康的饮食),兽医对牙齿进行专业清洁和/或抛光,刮牙齿上的牙垢或牙石,提供牙齿治疗水溶液或它们的任何组合。在本申请公开的任何一种方法的替代实施方式中,该方法包括建议不改变动物的口腔护理惯例。

[0104] 另外,或者可选地,任何当前公开的方法可以包括基于与口腔疾病或紊乱和/或良好的口腔健康相关的一种或多种细菌的存在或不存在以及数量来诊断动物患有口腔疾病或紊乱的可能性。例如,与口腔疾病或紊乱相关的一种或多种细菌的存在可增加动物患口腔疾病或紊乱的可能性。另一方面,与口腔疾病或紊乱相关的一种或多种细菌的不存在可降低动物患口腔疾病或紊乱的可能性。口腔疾病或紊乱可以是,例如牙周病、牙龈口炎、牙折吸收性病变和/或口腔异味。此外,或者可选地,任何当前公开的方法可包括基于与口腔疾病或紊乱和/或良好口腔健康相关的一种或多种细菌的存在或不存在以及数量,诊断动物患有口腔健康不良相关的疾病或紊乱(例如心脏病或肾病)的可能性。

[0105] 储存条件

[0106] 所公开的使用所公开主题的试剂盒的任何方法可以包括将用于转移和分析的样本采集装置储存在干燥容器中。普通技术人员会认识到,从含有DNA的受试者(如动物)身上采集的生物样本通常储存在缓冲溶液中。缓冲溶液通常起到防腐剂的作用,阻止任何进一步的细菌生长,和/或帮助保持DNA的完整性,例如,通过使样本中可能存在的任何脱氧核糖核酸酶失活和防止DNA降解。在环境温度波动期间,缓冲液也有助于保持DNA的完整性,在某些条件下,环境温度波动会影响DNA的稳定性。然而,根据本发明,含有DNA样本的样本采集装置实际上有利地储存在干燥容器中,而不需要任何缓冲液。

[0107] 如下文在实施例1中进一步讨论的,令人惊讶地发现,用于测定样本DNA含量的分析仍然成功地进行而没有任何不利影响,这是由于在没有缓冲液的情况下储存,并且发现干燥储存是测试中的最佳储存条件。由于样本易于维护以及试剂盒易于使用、样本易于运输以及成本较低,干法储存对本公开方法尤其有利。

[0108] 出于示例的目的,并且如本申请所体现的,样本采集装置100可以储存在打开的条件下或关闭的条件下的容器200中。出于示例而非限制的目的,样本采集装置可以在本申请公开的适当温度范围内储存在容器200中。

[0109] 例如,样本采集装置可在室温(约20°C)下储存在容器200中。在进一步的非限制性示例中,样本采集装置可储存在高达约40°C的温度下,包括约20°C、约25°C、约30°C、约35°C或约40°C。在其他非限制性示例中,样本采集装置可在约20°C至约40°C,或约20°C至约25°C,或约25°C至约30°C,或约30°C至约35°C,或约35°C至约40°C,或约25°C至约35°C,或约30°C到约40°C,或约20°C到约35°C,或约25°C到约40°C的温度下储存。在一些实施方式中,样

本采集装置储存在高达约40°C的温度下。在其他实施方式中,样本采集装置储存在约20°C至约40°C的温度下。

[0110] 此外,样本采集装置可在干燥容器中储存一段时间,在此称为t₁。储存样本采集装置的时间段t₁可以是例如样本采集后至多约30分钟、约1小时、约6小时、约12小时、约1天、约2天、约3天、约4天、约5天、约6天、约7天、约8天、约9天、约10天、约11天、约12天、约13天,或约14天。在一些实施方式中,样本采集装置在干燥容器中储存最多约14天的时间段,例如出于示例的目的,从约5天到约14天的时间段。

[0111] 检测细菌的化验方法

[0112] 所公开的使用所公开主题的试剂盒的方法可包括对样本进行分析以测量微生物核酸的量。微生物核酸可以是微生物DNA或RNA,例如16S核糖体DNA (rDNA) 或16S核糖体RNA (rRNA)。在一些实施方式中,所公开的方法包括除微生物核酸外,进一步测量宿主核酸(例如,DNA或RNA)。例如,检测宿主核酸有助于预测牙周病的未来风险或其他可能是牙周病共同发病的遗传条件的可能性。本领域已知用于识别与口腔疾病或紊乱(例如,牙周病)或良好口腔健康相关的细菌或其他标记物的存在的各种分析,例如定量聚合酶链反应(qPCR)分析。本领域普通技术人员可以确定用于执行这种分析的适当方法。

[0113] 出于示例目的,所公开的方法中的任何一种都可以包括进行分析,以测试本申请所公开的任何细菌的存在和/或相对数量,例如但不限于消化链球菌科的种和/或产生挥发性有机化合物的细菌,或口腔健康中公知的任何其他牙周细菌,例如但不限于消化链球菌属的种、共生菌属的种、梭属的种、缠结真杆菌、砾单胞菌属的种、拟杆菌属的种、犬牙周臭味菌、卵形脱硫微菌、莫拉菌属的种、口牙拟杆菌、绒毛产线菌、犬嘴卟啉单胞菌、古氏卟啉单胞菌、齿垢密螺旋体或唾液卟啉单胞菌。根据本发明,在一些实施方式中,细菌为消化链球菌科XIII[G-1]的种。

[0114] 另外或可选地,所公开的任何方法可包括执行通用qPCR分析(UniB),其检测狗口腔微生物组中是否存在细菌DNA。本领域技术人员已知诸如UniB的通用引物,并且示例包括Ott等人(Ott et al.),临床微生物学杂志(J.Clin.Microbiol.) 2004Jun;42(6):2566-2572.doi:10.1128/JCM.42.6.2566-2572.2004中描述的那些,其全部内容通过引用合并。本领域已知用于执行qPCR分析的方法。

[0115] 所述方法还可包括根据本领域普通技术人员在执行qPCR分析的前已知的方法提取核酸的步骤,例如,执行DNA提取。通常,DNA提取可以通过溶解含有DNA的细胞并沉淀和纯化DNA来进行。

[0116] 如本申请所公开的,用于测试样本中细菌的存在或不存在以及数量的程序的一个非限制性示例包括使用Masterpure™革兰氏阳性DNA纯化试剂盒,可选地包括添加过夜裂解(EpiCentre,目录#MGP04100)。在非限制性示例中,将含有DNA的样本在5000x g下离心10分钟,并通过涡流将细菌颗粒重新悬浮在150μL TE缓冲液中。Ready-Lyse™溶菌酶溶液(1μL; Epicentre,目录#R1804M)添加到细菌悬浮液中,然后在37°C下培养18小时。提取DNA后,将DNA颗粒重新悬浮在TE缓冲液(10mM Tris-HCl和0.5mM pH 9.0EDTA)中。然后可以使用Qubit®双链DNA高灵敏度测定试剂盒(dsDNA High Sensitivity Assay Kit)(赛默飞世尔科技公司)确定DNA的数量。然而,对于样本中细菌的存在或不存在以及数量的其他适当测试方法可以由本领域的普通技术人员确定,并且不受本公开或以下示例的限制。

[0117] 另外或可选地,所公开的任何方法都可以包括通过测试样本中存在细菌来检测细菌。出于示例而非限制的目的,测试样本中存在细菌可包括测试样本中本申请公开的一种或多种细菌的存在和/或数量,例如,与口腔疾病或紊乱(例如,牙周病)相关的细菌、与良好口腔健康相关的细菌或两者。检测本申请公开的一种或多种细菌的存在可以例如指示该动物患有或易发展成口腔疾病或紊乱。

[0118] 另外或可选地,所公开的方法中的任何一种都可以包括通过测试样本中不存在细菌来检测细菌。出于示例而非限制的目的,测试样本不存在细菌可包括测试样本不存在在本申请公开的一种或多种细菌,例如,与口腔疾病或紊乱(例如,牙周疾病)相关的细菌。检测与口腔疾病或紊乱相关的一种或多种细菌的不存在可以例如表明该动物没有口腔疾病或紊乱,或者不太可能发展成口腔疾病或紊乱。

[0119] 另外或可选地,所公开的使用所公开主题的试剂盒的方法可包括测试样本中与口腔健康相关的微生物(尤其是细菌)的存在和/或相对数量,可包括测试细菌核酸(例如,DNA或RNA)的存在和/或相对数量;进行生化分析;酶试验;或识别任何其他生物标记物。出于示例而非限制的目的,可通过检测样本中存在的细菌核酸(例如,DNA或RNA)的数量、生化物质、酶或其他生物标记物的数量来检测微生物的数量。

[0120] 在本申请公开的任何方法中,检测细菌或其他标记物的存在可以包括测量细菌或其他标记物的数量,并且可以将该数量与量表进行比较,该量表将细菌或其他标记物的数量与动物患有口腔疾病或紊乱(例如牙周病)或口腔健康不良的可能性相关联。可能性可以用百分比表示。出于示例而非限制的目的,检测与口腔疾病或紊乱(例如牙周病)相关的细菌的核酸(例如,DNA或RNA)的qPCR测试的C_q分数可用于创建用于计算动物患有口腔疾病或紊乱(例如,牙周病)的可能性的量表。较低的C_q分数可指示存在与口腔疾病或紊乱(例如牙周病)相关的较高水平的细菌,并且因此动物患有口腔疾病或紊乱(例如牙周病)的可能性可能高于C_q分数较高的动物。

[0121] 出于示例而非限制的目的,可以生成一份报告,总结样本测试的结果。在某些非限制性实施方式中,电子通信可用于传送报告。例如,可以生成并发送个性化报告,以传达动物的口腔健康状况。在其他实施方式中,报告可以作为硬拷贝提供。个性化报告可以例如包括指示系统,例如交通灯系统,例如绿色、黄色、红色,以传达动物的口腔健康状态。个性化报告还可以包括上述量表的表示,以及动物口腔健康在量表中的位置指示。

[0122] 所公开主题的试剂盒、方法和装置已经证明了通过评估动物口腔健康的常规技术无法实现的期望性能特征。例如,根据所公开主题的试剂盒可用于测试动物的口腔微生物组而无需全身麻醉剂。

[0123] 实施例

[0124] 出于理解而非限制的目的,通过参考以下实施例(作为所公开主题的示例而不是通过限制的方式提供)将更好地理解本公开主题。

[0125] 实施例1:从犬只口腔微生物群中收集细菌样本的方法

[0126] 本实施例公开了从犬科口腔微生物组中采集细菌样本的方法,使用不同的样本采集装置和储存样本的不同储存条件。

[0127] 方法

[0128] 研究队列(Study cohort)

[0129] 研究队列包括30只和31只成年拉布拉多猎犬,分别安置在研究1(评估样本采集装置)和研究2(评估样本采集装置的运输方案)的设施内。狗的年龄在2.6至9.4岁之间。

[0130] 样本采集

[0131] 通过样品采集装置沿着牙齿(犬科动物(04)、第1、第2、第3和第4前磨牙(05-08)和第一磨牙(09))(上部和下部)的外颊面牙龈线从口的一半的扫样采集牙龈边缘斑块样本。对于研究1,使用表1中列出的样本采集装置采集斑块,并且每只狗使用两种不同的样本采集装置(A和B、C和D或E和F)接受斑块采集。对于研究1,在试验的每一天采集完所有样本后,将样本采集装置放置在空的1.5mL微滤管中,用爪夹夹住,然后填充1.5mL Tris-EDTA缓冲液(“TE缓冲液”)。对于研究2,尼龙CytoSoft™细胞刷(表1中的A)用于所有斑块收集。从狗和样本采集器附近移除研究2的样本采集装置,并将其放入含有表2中所列一种缓冲液的1.5mL微量离心管中。将TE缓冲液对照物在-80℃下冷冻,将剩余的样本采集装置在室温下保存5天,然后从如下所述的样本中提取DNA。

[0132] 表1:研究1中的样本采集装置类型和测试的装置的相关供应商

	拭子类型	供应商	产品代码
A	CytoSoft™ 细胞刷 (尼龙)	Medical Packaging 公司	CYB-1
B	棉拭子、木轴 (Dryswab™)	Medical Wire & Equipment (MWE) 有限公司	MW1048
C	泡沫拭子, 塑料轴	Medical Wire & Equipment (MWE) 有限公司	MW941
D	涤纶花蕾(Dacron bud), 塑料轴拭子 (Dryswab™ 标准聚酯)	Medical Wire & Equipment (MWE) 有限公司	MW1028D
E	PurFlock® 超拭子	Medical Wire & Equipment (MWE) 有限公司	MW830
F	人造丝拭子, 塑料轴	Sterilab Services	155C

[0133]

[0134] 表2:研究2中测试的缓冲液类型

	缓冲液类型	供应商
	A Tris-EDTA ¹ (对照)	
	B 干/无缓冲液 ²	N/A
[0135]	C Amies输送培养基 ²	赛默飞世尔科技 (Oxoid™)
	D RNA保护细菌试剂 ²	凯杰 (Qiagen)
	E 核酸稳定液 ²	Omnigene
	F 0.2%氯己啶 ²	西格玛 (Sigma) (100%溶液)

[0136] ¹表示在-80℃下冷冻的储存缓冲液样本。²表示室温下保存的储存缓冲液样本。在提取DNA前,样本采集装置在指定的储存温度下保存5天。

[0137] DNA提取

[0138] 使用Masterpure™革兰氏阳性DNA纯化试剂盒按照制造商说明从斑块样本中提取DNA,添加过夜裂解(来源于EpiCentre,目录#MGP04100)。将斑块样本以5000x g离心10分钟,并通过旋涡将细菌颗粒重新悬浮在150μL TE缓冲液中。将Ready-Lyse™溶菌酶溶液(1μL;来源于Epicentre,目录#R1804M)添加到细菌悬浮液中,然后在37℃下培养18小时。DNA提取后,将DNA颗粒重新悬浮在TE缓冲液中(10mM Tris-Cl和0.5mM pH 9.0EDTA)。使用Nanodrop ND1000分光光度计(由赛默飞世尔科技制造)测定DNA的数量和纯度。

[0139] 定量PCR(qPCR)分析

[0140] 针对消化链球菌科XIII[G-1]的种的16S rRNA基因和检测狗口腔微生物组中是否存在细菌DNA的通用qPCR分析(UniB)开发了各种qPCR分析。本领域技术人员已知类似的通用引物,例如UniB的引物,并且示例包括Ott et al.,临床微生物学杂志(J.Clin.Microbiol.)2004Jun,42(6):2566-2572,Doi:10.1128/JCM.42.6.2566-2572.2004中描述的那些,其全部内容通过引用合并。

[0141] 每个单独的10μL定量PCR(qPCR)反应包含:5μL应用生物系统基因表达Taqman MasterMix(Applied Biosystems Gene Expression Taqman MasterMix)(美国应用生物系统公司生产)、0.5μL 20X浓缩分析、1μL1:10DNA稀释和3.5μL无核酸酶水。每个分析包含每个反应的每个引物的最终浓度为900nM,每个qPCR探针的最终浓度为250nM。实验分三次进行。阳性对照组和阴性对照组,也包括一式三份,分别为0.001ng/μL的CN030的M13纯化扩增子和无核酸酶水。数据在AB7900 HT机器(美国应用生物系统公司制造)上收集,并使用GenEx软件(瑞典MultiD公司开发)进行分析。

[0142] 通过对每个样本的平均、效率校正Cq值执行以下等式: $2^{-(\text{平均COT030 Cq值}-\text{平均UniB Cq值})}$,计算相对于无归一化为UniB的消化链球菌科的种。COT-030是犬口腔分类群030,是消化链球菌科XIII[G-1]属的细菌物种。

[0143] 统计分析

[0144] 对于不同的样本采集装置类型(研究1)和缓冲液(研究2),分析了三种测量方法:

UniB C_q、相对于无归一化为UniB的消化链球菌科的种,以及DNA浓度。使用线性模型分析UniB C_q和DNA浓度,并针对每个配对狗组的样本采集装置类型对log₁₀测量进行建模。COT030相对无有许多观察值标记为“ND”(未检测到)或“检测到”。这些缺失值被插补为最小观察COT030相对无值的0.9倍,并且使用“Tobit”截尾线性模型对log₁₀(COT030相对无)与样本采集装置类型或缓冲液进行建模,将插补值视为左截尾观测值。

[0145] 根据这些模型,估计了平均值和95%置信区间。使用图基(Tukey)的诚实显著性检验(Tukey's honest significance test) (“HSD检验”)与对照组一起计算每对样本采集装置类型或缓冲液之间的对比度。

[0146] 作为二次分析,为了比较用同一组狗测试的样本采集装置类型和缓冲液,使用单独的队列为每个测量建立了三个单独的模型。对于三个模型中的每一个,使用了前面描述的相同的分析方法,只是包括了对狗的随机影响。此外,仅比较了2种样本采集装置类型或2种缓冲液类型。对于每个模型,计算置信区间以及样本采集装置之间的对比。

[0147] 所有的分析都是来自R Foundation的R统计软件版本3.4.3,以及lme4、AER、lme4、multcopp和multcopView库进行的。

[0148] 结果

[0149] 研究队列

[0150] 牙龈边缘斑块细菌群落分别从总数30只和31只狗采样用于研究1和研究2。狗的大小和年龄是牙周炎的假定风险因素,因此也获得了与样本相关的元数据(表3)。

[0151] 表3:样本队列元数据汇总,所示数字为平均值±sd.

	研究 1	研究 2
年龄	6.9 ± 1.5 岁	7.2 ± 1.5 岁
性别	21 只雌性, 9 只雄性	22 只雌性, 9 只雄性
[0152] 绝育状态	29 只是, 1 只否	30 只是, 1 只否
体重	27.3 ± 3.4 kg	27.2 ± 3.2 kg
品种	拉布拉多猎犬	拉布拉多猎犬

[0153] 样本采集装置

[0154] 表4总结了每种样本采集装置类型的样本概述。在通过qPCR分析的60个样本中,只有四个实例未获得UniB水平的定量数据。由于狗队列最近的健康状况未知,因此使用UniB作为主要测量指标。有三个实例未检测到UniB,一个实例检测到UniB,但技术复制是可变的,超出了预定义的范围。这些数据初步表明,所有测试的样本采集装置类型是从狗口里采集龈上斑块的合适候选者。

[0155] 表4:拭子分析概述

	拭子	总样本	“未检测到”的数量	“检测到”的数量
	A 尼龙/CytoSoft™ 细胞刷	10	0	0
	B 棉拭子	10	1	1
[0156]	C 泡沫拭子	10	0	0
	D 涤纶(聚酯)拭子	10	0	0
	E PurFlock® 拭子	10	1	0
	F 人造丝拭子	10	1	0

[0157] “未检测到”表示在qPCR反应的40个周期中未扩增或PCR仪器将“轻微扩增”归类为非扩增,并通过人类检查确认的样本。“检测到”表示三份Cq值不在彼此0.25Cq范围内,但所有值均在定量范围内的样本。

[0158] 图3A-图3C显示了UniB和相对于无归一化为UniB的消化链球菌科的种的qPCR测定的每种样本采集装置类型的平均Cq值和95%置信区间,以及使用Qubit测量的DNA浓度。所用的Qubit试剂盒是带有Qubit®荧光计(由美国Life Technologies制造)的双链DNA高灵敏度(HS)测定(由赛默飞世尔科技公司制造)以及制造商的双链DNA高灵敏度(HS)测定(由赛默飞世尔科技公司制造)。Qubit数据提供校准数据,以便对其他样本中存在的DNA量进行定量。较低的qPCR Cq值表明细菌水平较高。DNA浓度数据可用于了解从特定样本采集装置中提取多少DNA。例如,一些设备可以很好地收集斑块,但在实验室处理方面,可能存在与去除斑块有关的挑战。对于UniB qPCR分析,平均Cq值在11到15之间,表明细菌DNA总浓度相对较高,如图3A所示。泡沫(样本C)、涤纶(样本D)和PurFlock(样本E)样本采集装置被分配到相同的Tukey分组,并且因此与其他三种样本采集装置类型中的任何一种都没有显著差异($p>0.05$)。CytoSoft细胞刷(样本A)与棉花(样本B)和人造丝(样本F)样本采集装置显著不同($p<0.05$)。对于UniB,CytoSoft刷的Cq值最低,并且棉花和人造丝拭子的平均值最高,表明使用CytoSoft刷收获的细菌DNA更多。当消化链球菌科的种相对于无归一化为UniB时,所有样本采集装置类型的表现相似,在图3B所示的任何比较中均未观察到显著差异。所有的样本采集装置类型都使用图3C所提供的Qubit传递可测量的DNA浓度。细胞、泡沫和涤纶样本采集装置传递了最高的DNA浓度,并被分配到一个统计分组。棉花和Purclock装置的DNA浓度较低,但与任何其他的样本采集装置类型没有显著差异。人造丝拭子传递了最低的平均DNA浓度,与CytoSoft、泡沫和涤纶样本采集装置显著不同。

[0159] 如表5所示,技术人员提供了关于采样易用性程序的反馈意见,以及实验室对所测试的样本采集装置处理易用性的反馈意见。

[0160] 表5:从拭子评估中获得的结果/见解总结。

[0161] 与各参数相关的性能评级显示为良好、合理和较差。

	拭子类型	可用性	处理	UniB	DNA 浓度
	A CytoSoft™ 细胞刷(尼 龙)	良好	良好	良好	良好
	B 棉花拭子, 木轴	良好	较差	较差	较差
[0162]	C 泡沫拭子, 塑料轴	合理	较差	合理	合理
	D 涤纶花蕾, 塑料轴拭 子(聚酯)	合理	较差	合理	合理
	E PurFlock 超拭子	较差	较差	较差	合理
	F 人造丝拭子, 塑料轴	较差	较差	较差	合理

[0163] 储存缓冲液

[0164] 为了确定消化链球菌科物种在不同储存条件下是否稳定, 首先确定研究中的狗是否对这种微生物呈阳性反应。作为样本采集装置试验(研究1)的一部分, 使用消化链球菌科物种的qPCR测定对采集的斑块样本进行分析, 结果表明, 所有31只接受评估的狗对该生物体均呈阳性反应。

[0165] 表6总结了每种储存条件的说明性概述。储存在-80℃下的TE缓冲液代表阳性对照。消化链球菌科物种的qPCR测定中“未检测到”和“检测到”的数量表明, 除Amies培养基和RNA保护细菌试剂外, 储存缓冲液的性能大致相同。对于这两种储存缓冲液, 超过50%的总样本未能提供定量qPCR结果, 结果为“未检测到”或“检测到”。

[0166] 表6: 储存缓冲液样本分析概述。

	储存缓冲液	总样本	“未检测到”的 数量	“检测到”的数量
	A TE	11	2	0
	B 干(无缓冲液)	11	1	2
[0167]	C Amies 运输培养基	10	4	4
	D RNA 保护细菌试剂	10	3	3
	E 核酸稳定液(Omnigene)	10	2	1
	F 0.2%氯己定	10	2	1

[0168] “未检测到”表示在qPCR反应的40个周期中未扩增或PCR仪器将“轻微扩增”归类为非扩增,并通过人类检查确认的样本。“检测到”表示三份C_q值不在彼此0.25C_q范围内,但所有值均在定量范围内的样本。

[0169] 图4A-图4B显示了通用细菌引物(UniB)和消化链球菌科的种qPCR测定的每个储存条件的平均C_q值和95%置信区间,以及使用Qubit测量的DNA浓度。UniB C_q值为储存条件传递了最可区分的结果,所有的平均值都在12.5与20C_q之间的可接受范围内,如图4A所示。干燥并在室温下放置5天的样本采集装置传递了UniB的最低C_q值,表明这产生了最高的细菌DNA浓度。干燥样本采集装置的平均C_q值与TE缓冲液对照组无显著差异,后者立即冷冻并在-80℃下储存5天(p>0.05)。然而,其他三种储存条件(RNA保护细菌、Omnigene转运和0.2%氯己定)均比TE缓冲液对照产生更高的平均C_q值(p<0.05)。这表明,与对照相比,在这三种储存条件下,较少的总细菌DNA得到扩增。

[0170] 对于qPCR测定,消化链球菌科物种相对于无归一化为UniB,在所有六种条件下储存经斑块浸渍的样本采集装置传递了可测量的消化链球菌科物种DNA浓度,如图4B所示。统计比较表明,所有储存条件的表现相似,只有TE缓冲液和Amies运输培养基之间的比较存在显著差异(p<0.05),如图4B所示。使用Qubit测量的总DNA产量也得到了类似的结果,即储存条件之间没有显著差异,例外是Amies运输培养基,其产生的DNA少于Omnigene溶液和0.2%氯己定(p<0.05),如图4C所示。基于DNA产量和检测消化链球菌科的种的能力,在示范性试验条件下,表现最好的储存条件是在室温下储存5天的干燥样本采集装置。

[0171] 讨论

[0172] 两项研究中的第一项考虑了六种不同的样本采集装置选项。测试的样本采集装置使用不同材料成分的头,因此具有不同的纹理,并从科学文献中确定为合适的候选者。使用所有测试过的样本采集装置,可以从狗的口中获取斑块。最高数量的DNA,使用Qubit测量的总DNA和使用UniB qPCR测定测量的细菌DNA,是使用Cytosoft细胞刷获得的。然而,使用细胞刷获得的细菌DNA数量与泡沫、涤纶拭子或PurFlock®超拭子没有显著差异。就总DNA产量而言,除了具有最低DNA浓度的人造丝拭子外,样本采集装置之间没有显著差异。使用所有类型的样本采集装置都可以检测到感兴趣的微生物,即消化链球菌科物种。细胞刷在其他参数上也表现良好,包括技术人员采集样本的容易程度以及实验室处理样本的简单程度。细胞刷是唯一用刷毛测试的样本采集装置。刷毛可以使斑块在它们之间被捕获,这是阳性结果的一个解释。

[0173] 第二项研究考虑了转运时间和温度对斑块细菌组成的影响。在某些情况下,采集样本后,样本中的细菌种群可能会继续发生变化而不稳定,而且转运时间和温度可能是影响细菌种群变化的因素。样本采集后,消化链球菌科物种的潜在持续增殖可能对基于该特定物种水平的定量的诊断提出挑战。对六种测试条件的比较表明,风干斑块并随后在室温下储存,可产生大量细菌DNA,这与在-80℃下储存5天的TE缓冲液对照没有显著差异。就Qubit测得的总DNA而言,所测试的样本采集装置之间没有显著差异,但Amies运输培养基除外,该培养基在示例性测试条件下的DNA产量较低。就消化链球菌科细菌的稳定性而言,除Amies运输缓冲液的相对丰度较低外,不同储存条件下的相对丰度没有显著差异。风干样品采集装置并在环境温度下将其运输用于实验室处理,在示例性研究中提供了积极的结果,特别是考虑到与缺乏液体成分的诊断试剂盒有关的整体安全性和易用性。

[0174] 实施例2:犬科口腔微生物组内的细菌多样性

[0175] 本实施例描述了在犬科不同口腔生态位中发现的细菌多样性。

[0176] 方法

[0177] 在一个月内的三个时间点,从14只拉布拉多猎犬的龈上斑块、颊粘膜、舌背粘膜和刺激性唾液中采集口腔微生物组样本。使用MiSeq测序装置(Illumina制造)对16S rRNA基因的V3-V4区域进行测序。通过使用CytoSoft™细胞刷(医疗包装公司Medical Packaging Corporation制造)轻轻刮这些区域来对左右两侧颊粘膜采样。使用CytoSoft™细胞刷对后舌背粘膜进行采样。

[0178] 结果和结论

[0179] 与其他口腔生态位相比,龈上斑块微生物群具有最高的细菌多样性和最大数量的个体分类群显著差异(见例如图11)。刺激性唾液表现出在狗之间的微生物组成中最高的变化性,但在所有生态位中细菌多样性最低。总的来说,颊和舌背粘膜的细菌最为相似(见例如图10)。

[0180] 细菌群落特征表明有三个离散的口腔生态位:软组织表面(颊和舌背粘膜)、硬组织表面(龈上斑块)和唾液。

[0181] 表7:犬科口腔生态位的成对比较显示显著不同的操作分类单元的数量。显示的数字是出自224个OTU中的。

	p-值 <0.05
斑块/颊	125
唾液/颊	86
[0182] 唾液/斑块	104
舌/颊	40
舌/斑块	92
舌头/唾液	55

[0183] 实施例3:不同储存条件对从犬科口腔微生物组中采集的细菌样本的影响

[0184] 该实施例进一步描述了与从犬科口腔微生物组中收集细菌样本的方法相关的各种储存条件。

[0185] 方法

[0186] 研究队列

[0187] 这项研究每周从57只成年狗身上采样斑块,包括拉布拉多猎犬、比格犬、小比赛特格里芬文登犬和诺福克梗,年龄在1.2至8.3岁之间。每周地,研究队列包括18-20只成年狗。狗的大小和年龄是牙周炎的假定风险因素,因此也获得了与样本相关的元数据(表8)。

[0188] 表8:研究队列的元数据汇总;所示数字为平均值±s.d.

[0189]

年龄	4.9 ± 2.2 岁
性别	35 只雌性, 22 只雄性
绝育状态	51 只是, 6 只否
体重	27.3 ± 3.4 kg
品种	拉布拉多猎犬、比格犬、小巴赛特格里 芬文登犬、诺福克梗

[0190] 样本采集

[0191] 牙龈边缘斑块样本是通过在口的一半的上颚和下颚上从犬齿到第四个前磨牙(牙齿编号04-09)在牙齿外颊表面的牙龈线正上方扫拭收集的。在整个研究过程中,所有斑块收集均使用尼龙CytoSoft™细胞刷(Medical Packaging公司)。采样后,将涂有斑块的拭子放回收集拭子的原包装中。本研究使用单独包装的拭子,并且来自每只狗的左侧(LHS)和右侧(RHS)口中的样本是使用两种不同的拭子采集的,分别在下颌处理,如表9所示。从口的左手侧和右手侧收集的斑块通常在每周的目标或调查的测试和对照方面交替进行。拭子在不同的温度和不同的时间长度下进行培养,以反映潜在的实际转运或邮寄条件(表9)。培养后,将拭子放入1.5mL微量离心管中,并使用爪形镊子切割拭子柄,以便在盖子关闭的情况下,将涂有斑块的拭子装入导管中。样本在-80℃下冷冻,DNA提取如下所述。

[0192] 表9:样本采集和处理总结。

[0193]

	培养: 试验	培养: 对照
A	RT, 14天	室温 (RT), 5天
B	30℃, 5天	RT, 5天
C	40℃, 5天	RT, 5天
D	30℃, 14天	RT, 5天
E	40℃, 14天	RT, 5天

[0194] RT表示在室温下进行的样本培养。

[0195] DNA提取

[0196] 使用Masterpure™革兰氏阳性DNA纯化试剂盒按照制造商说明从斑块样本中提取DNA,并添加过夜裂解(EpiCentre,目录#MGPO4100)。将斑块样本以5000x g离心10分钟,并通过旋涡将细菌颗粒重新悬浮在150μL TE缓冲液中。Ready-Lyse™溶菌酶溶液(1μL; Epicentre目录#R1804M)添加到细菌悬浮液中,然后在37℃下培养18小时。DNA提取后,将DNA颗粒重新悬浮在TE缓冲液中(10mM Tris-HCl和0.5mM pH 9.0EDTA)。使用Qubit®双链DNA高灵敏度测定试剂盒(赛默飞世尔科技公司)确定DNA的数量。

[0197] 定量PCR(qPCR)分析

[0198] 针对消化链球菌科物种的16S rRNA基因建立了一种检测方法和一种通用的qPCR

检测方法(UniB)。

[0199] 每个单独的10 μ L定量PCR(qPCR)反应包含:5 μ L应用生物系统基因表达Taqman MasterMix(美国应用生物系统公司),0.5 μ L 20X浓缩测定,1 μ L 1:10稀释DNA和3.5 μ L无核酸酶水。每个测定包含每个反应的每个引物的最终浓度为900nM,并且每个qPCR探针的最终浓度为250nM。实验分三次进行。阳性对照组和阴性对照组(也包括一式三份)分别为0.001ng/ μ L的消化链球菌科物种克隆DNA的M13纯化扩增子和无核酸酶水。数据在AB7900 HT机器(应用生物系统,美国)上收集,并使用GenEx软件(瑞典MultiD)进行分析。

[0200] 通过对每个样本的平均、效率校正C_q值执行以下等式: $2^{-(\text{平均消化链球菌科物种Cq值}-\text{平均UniB Cq值})}$,计算相对于无归一化为UniB的消化链球菌科物种测定。

[0201] 统计分析

[0202] 每周测试不同的拭子条件或不同的采样时间,并按不同的周分割数据。拟合了相对消化链球菌科物种测定在log₁₀标度上线性化为无的线性混合效应模型、单个狗的随机效应和条件变量的固定效应。对系数进行反变换(10[^]),以获得平均估计值。由于对比与对照进行了比较,因此对比采用Dunnett试验。对估计值进行反变换,以获得试验条件和对照之间的差异倍数。

[0203] 所有分析均使用R版本3.6.1进行。使用的库为ggplot2、lme4、DT、multcomp和lme4。

[0204] 结果

[0205] 储存时限的影响

[0206] 先前的研究分析了储存条件对斑块样本的影响,并对样本在室温(RT)下保存约5天进行了相应的qPCR分析。在这里,研究了14天的时间范围,并将其与5天的对照方案进行了比较,两者都在RT下。图5显示了以消化链球菌科的种相对于无归一化为UniB表示的结果。在每种情况下,时间范围之间的差异在14天和5天之间均未发现显著差异(p>0.6)。

[0207] 储存温度的影响

[0208] 在接下来的研究中还探讨了不同温度条件的影响。通过在30 $^{\circ}$ C和40 $^{\circ}$ C下培养斑块样本,同时将培养时间保持在5天,来调查更高的温度。在每种情况下,在冷冻和随后的实验室处理前,对照斑块样本在室温(RT)下保留5天。用于这些调查的qPCR输出的结果比较在图6和图7中所示。发现,与在RT下5天培养相比,试验温度没有影响,在每种情况下观察到的差异不显著(p>0.2)。

[0209] 储存温度和时间范围的综合影响

[0210] 将上述测试的斑块样本时间范围和温度储存条件作为单一条件变化进行整合,以允许对组合变化的潜在影响一起进行评估。将较高的30 $^{\circ}$ C和40 $^{\circ}$ C温度与14天的延长时间段相结合,并在两种情况下使用RT下5天的可比试验对照。这些比较的qPCR输出如图8和9所示。如上文报告的独立单一变化调查中所观察到的,结果表明,组合样本调查的比较与经受RT下5天的样本相比,进一步地没有显著差异(p>0.2)。这意味着在30 $^{\circ}$ C或40 $^{\circ}$ C条件下培养14天对样本没有影响。

[0211] 讨论

[0212] 消化链球菌科物种qPCR测定的结果表明,所测试的时间范围或温度储存条件与先前测试的条件(室温(RT)5天)没有显著差异。结果证明,用于口腔护理诊断的测试而采集的

斑块样本在高达40℃和14天的条件下是稳定的,对测试结果没有负面影响。温度和时间组合试验的结果非常令人惊讶,因为没有预计在40℃的相对极端环境中培养14天与在更低温度和更短时间下培养(即RT下5天)不会有显著差异。例如,推测qPCR测定的结果可能因消化链球菌科物种的持续增殖或其他细菌的样本种群而改变,但本研究未观察到这一点。此外,值得注意的是,干燥容器中拭子上的环境与狗口里的环境非常不同,特别是考虑到拭子上不存在微量营养素。没有人期望狗口里的情况与储存拭子的情况相关。鉴于调查条件从温度角度看大约是原来的两倍,从时间角度看几乎是原来的三倍,这些都是重要的发现。该结果使人们对准确评估针对世界各地牙周病风险而获得的斑块样本的能力充满信心。

[0213] 本申请使用的狗包括拉布拉多猎犬、比格犬、小巴赛特格里芬文登犬、诺福克梗,跨越大、中、小品种类别,以证明该试验对来自不同品种大小范围的分析有效。

[0214] 参考文献

[0215] 1.Lund,E.M.等,在美国私人兽医诊所检查的狗和猫的健康状况和种群特征,美国兽医学会杂志,1999.214(9):p.1336-1341。(Lund,E.M.,et al.,Health status and population characteristics of dogs and cats examined at private veterinary practices in the United States.J Am Vet Med Assoc,1999.214(9):p.1336-1341.)

[0216] 2.O'Neill,D.G.等,在英国参加初级保健兽医诊所的狗中记录的疾病患病率,公共科学图书馆:综合,2014.9(3):p.e90501。(O'Neill,D.G.,et al.,Prevalence of disorders recorded in dogs attending primary-care veterinary practices in England.PLoS One,2014.9(3):p.e90501.)

[0217] 3.Hamp,S.E.等,犬牙齿疾病的宏观和放射学调查,兽医放射学,1984.25(2):p.86-92。(Hamp,S.E.,et al.,A macroscopic and radiological investigation of dental diseases of the dog.Veterinary Radiology,1984.25(2):p.86-92.)

[0218] 4. Butković,V.等,狗的牙科疾病:对放射学数据的回顾性研究,布尔诺兽医学报,2001.70(2):p.203-208。(Butković,V.,et al.,Dental diseases of dogs:a retrospective study of radiological data.Acta Veterinaria Brno,2001.70(2):p.203-208.)

[0219] 5.Kortegaard,H.E.,T.Eriksen和V.Baelum,研究比格犬的牙周病——一项流行病学研究,小动物实践杂志,2008.49(12):p.610-616。(Kortegaard,H.E.,T.Eriksen,and V.Baelum,Periodontal disease in research beagle dogs-an epidemiological study.J Small Anim Pract,2008.49(12):p.610-616.)

[0220] 6.Hoffman,T.和P.Gaengler,贵宾犬牙周病流行病学研究,小动物实践杂志,1996.37:p.309-316。(Hoffman,T.and P.Gaengler,Epidemiology of periodontal disease in poodles.Journal of Small Animal Practice,1996.37:p.309-316.)

[0221] 7.Dewhirst,F.E.等,犬科动物口腔微生物组,公共科学图书馆:综合,2012.7(4):p.e36067。(Dewhirst,F.E.,et al.,The canine oral microbiome.PLoS One,2012.7(4):p.e36067.)

[0222] 8.Dewhirst,F.E.等,猫科动物口腔微生物组:具有全长参考序列的基于16S rRNA基因的临时分类法,兽医微生物学,2015.175(2-4):p.294-303。(Dewhirst,F.E.,et al.,The feline oral microbiome:a provisional 16S rRNA gene based taxonomy with

full-length reference sequences.Vet Microbiol,2015.175(2-4):p.294-303.)

[0223] 9.Riggio,M.P.等,犬科动物牙周病相关细菌的分子鉴定,兽医微生物学,2011.150(3-4):p.394-400。(Riggio,M.P.,et al.,Molecular identification of bacteria associated with canine periodontal disease.Vet Microbiol,2011.150(3-4):p.394-400.)

[0224] 10.Davis,I.J.等,对患有健康牙龈、牙龈炎或轻度牙周炎的客户拥有的狗的牙菌斑中细菌种类的横断面调查,公共科学图书馆:综合,2013.8(12):p.e83158。(Davis,I.J.,et al.,Across-sectional survey of bacterial species in plaque from client owned dogs with healthy gingiva,gingivitis or mild periodontitis.PLoS One,2013.8(12):p.e83158.)

[0225] 11.Wallis,C.等,与犬牙周病发展相关的细菌群落组成变化的纵向评估,兽医微生物学,2015.181(3-4):p.271-82。(Wallis,C.,et al.,A longitudinal assessment of changes in bacterial community composition associated with the development of periodontal disease in dogs.Vet Microbiol,2015.181(3-4):p.271-82.)

[0226] 12.Harris,S.等,健康、牙龈炎和轻度牙周炎中猫科动物龈下微生物群差异的焦磷酸测序研究,公共科学图书馆:综合,2015.10(11):p.e0136986。(Harris,S.,et al.,A Pyrosequencing Investigation of Differences in the Feline Subgingival Microbiota in Health,Gingivitis and Mild Periodontitis.PLoS One,2015.10(11):p.e0136986.)

[0227] ***

[0228] 尽管已经详细描述了当前公开的主题及其优点,但是应当理解,在不脱离所附权利要求所定义的公开主题的精神和范围的情况下,可以在本申请中进行各种改变、替换和变更。此外,本申请的范围不限于说明书中描述的过程、机器、制造、物质组成、手段、方法和步骤的特定实施方式。本领域的普通技术人员将容易从本发明公开的主题的公开内容中理解,目前存在的或以后将开发的与本文公开的对应实施方式执行基本相同的功能或实现基本相同的结果的工艺、机器、制造、物质组成、手段、方法或步骤可以根据当前公开的主题予以利用。因此,所附权利要求旨在在其范围内包括此类工艺、机器、制造、物质组成、手段、方法或步骤。

[0229] 本申请中引用了专利、专利申请、出版物、产品说明和协议,出于所有目的,通过引用将其公开内容并入本申请。

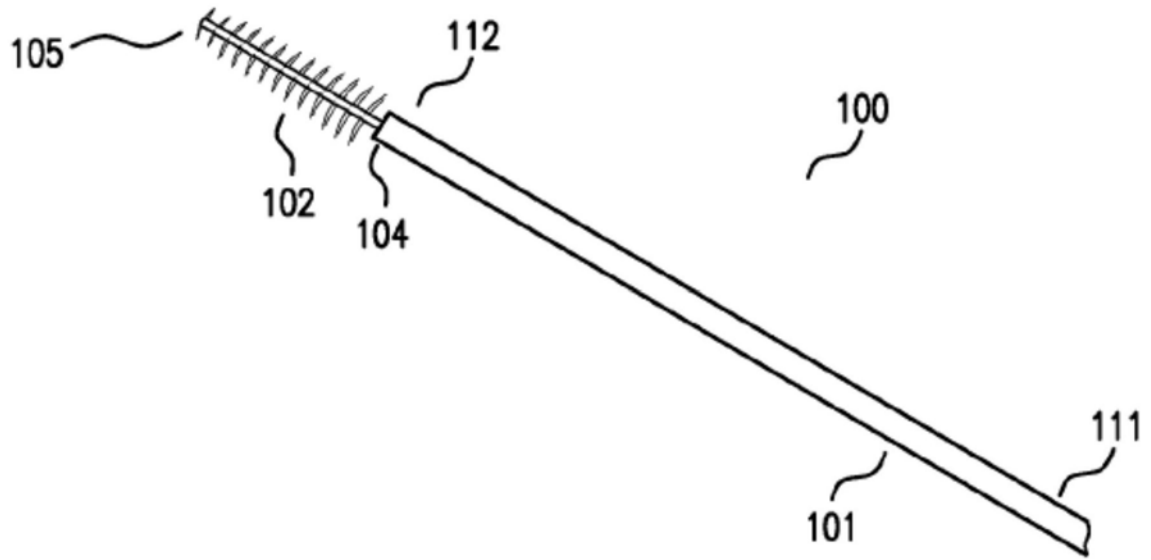


图1A

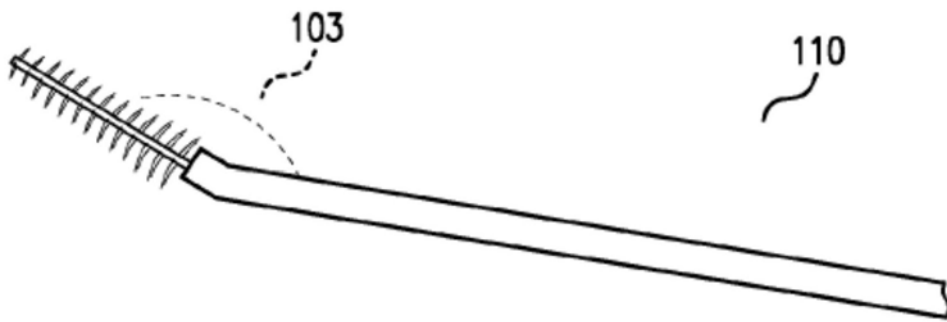


图1B

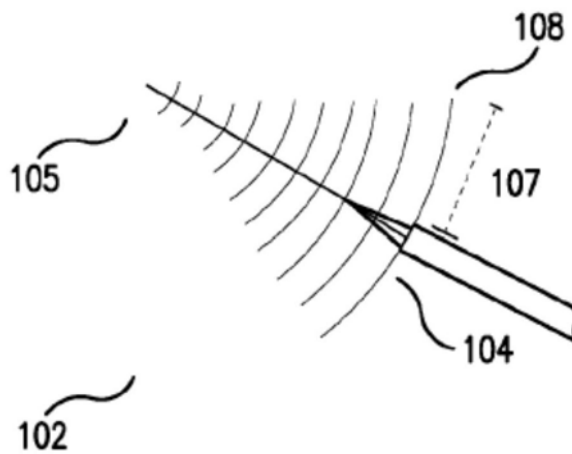


图1C

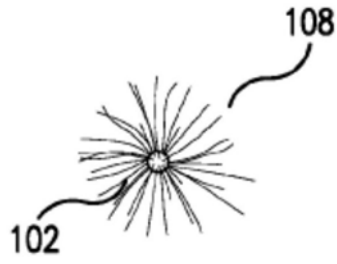


图1D

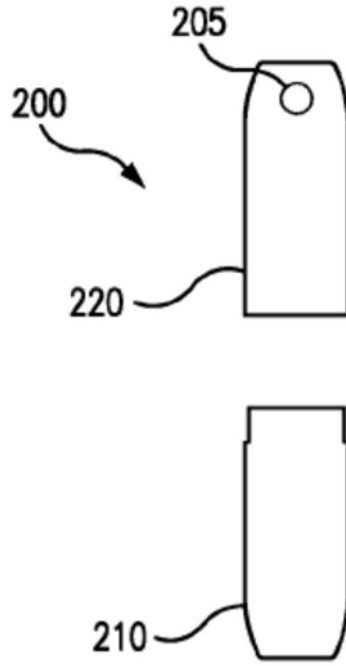


图2A

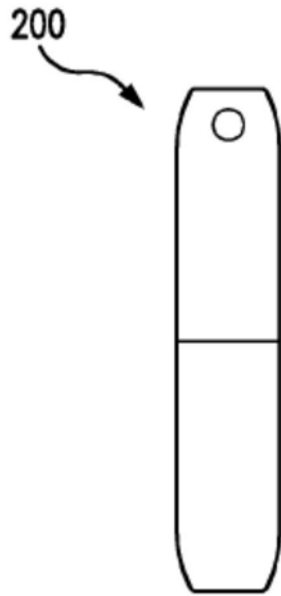


图2B



图2C

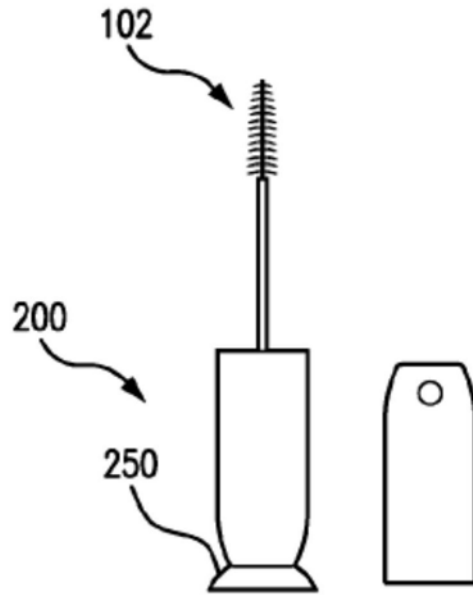


图2D

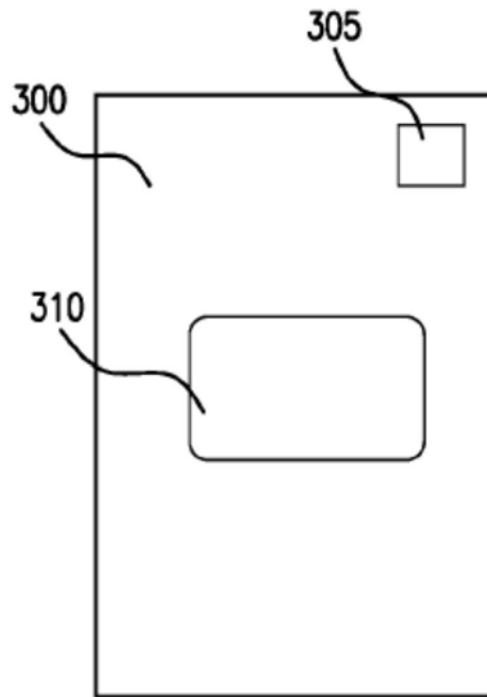


图2E

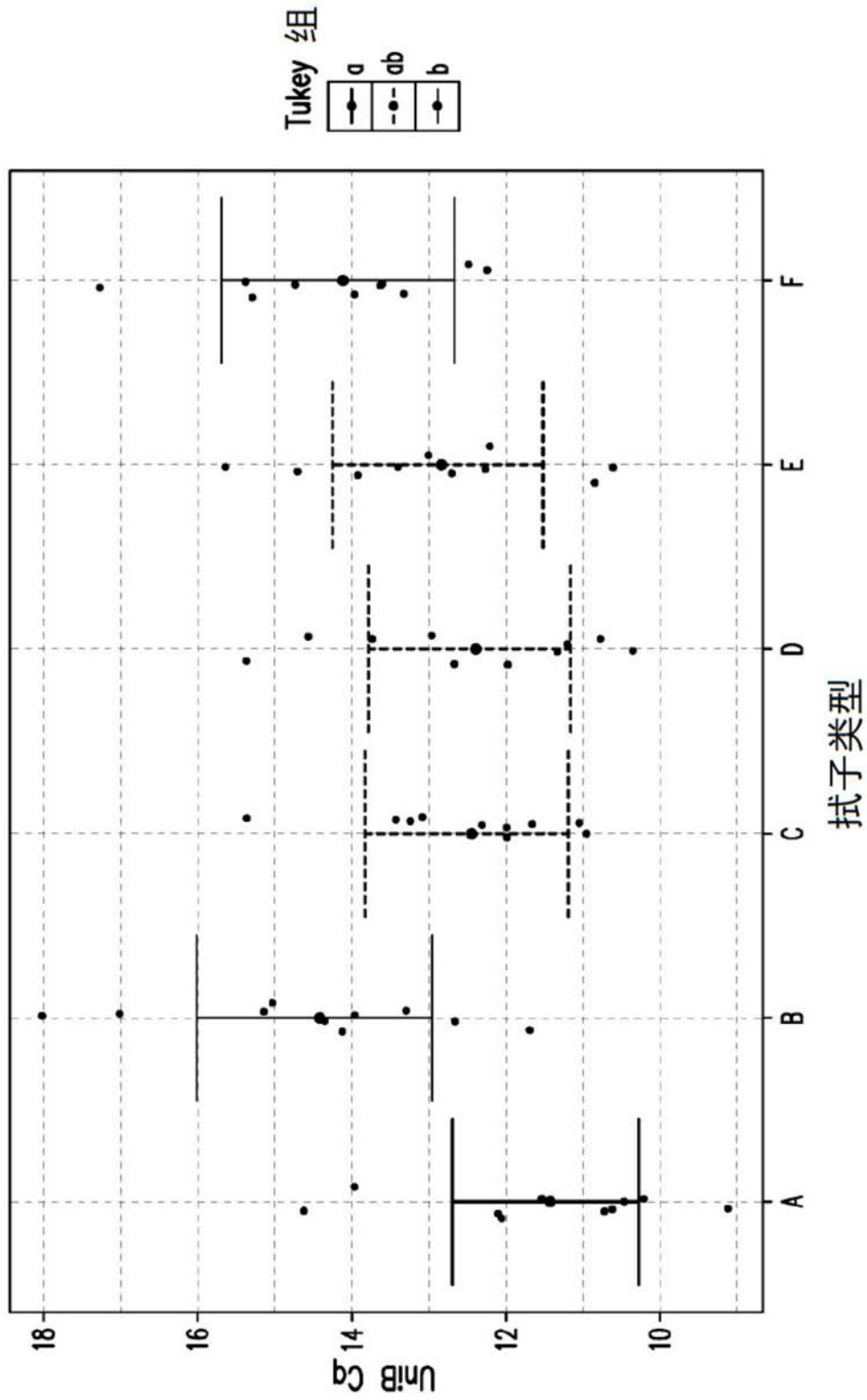


图3A

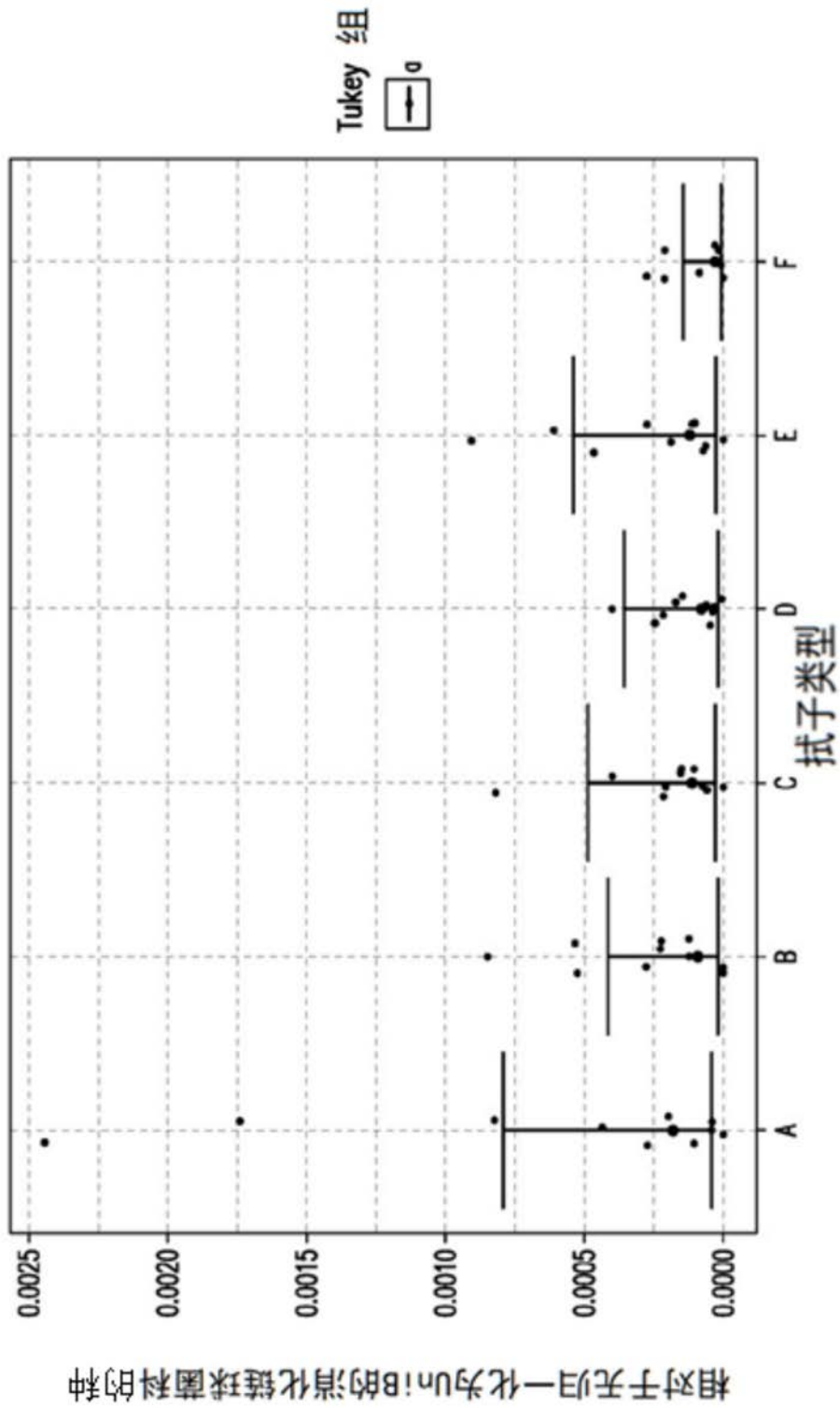


图3B

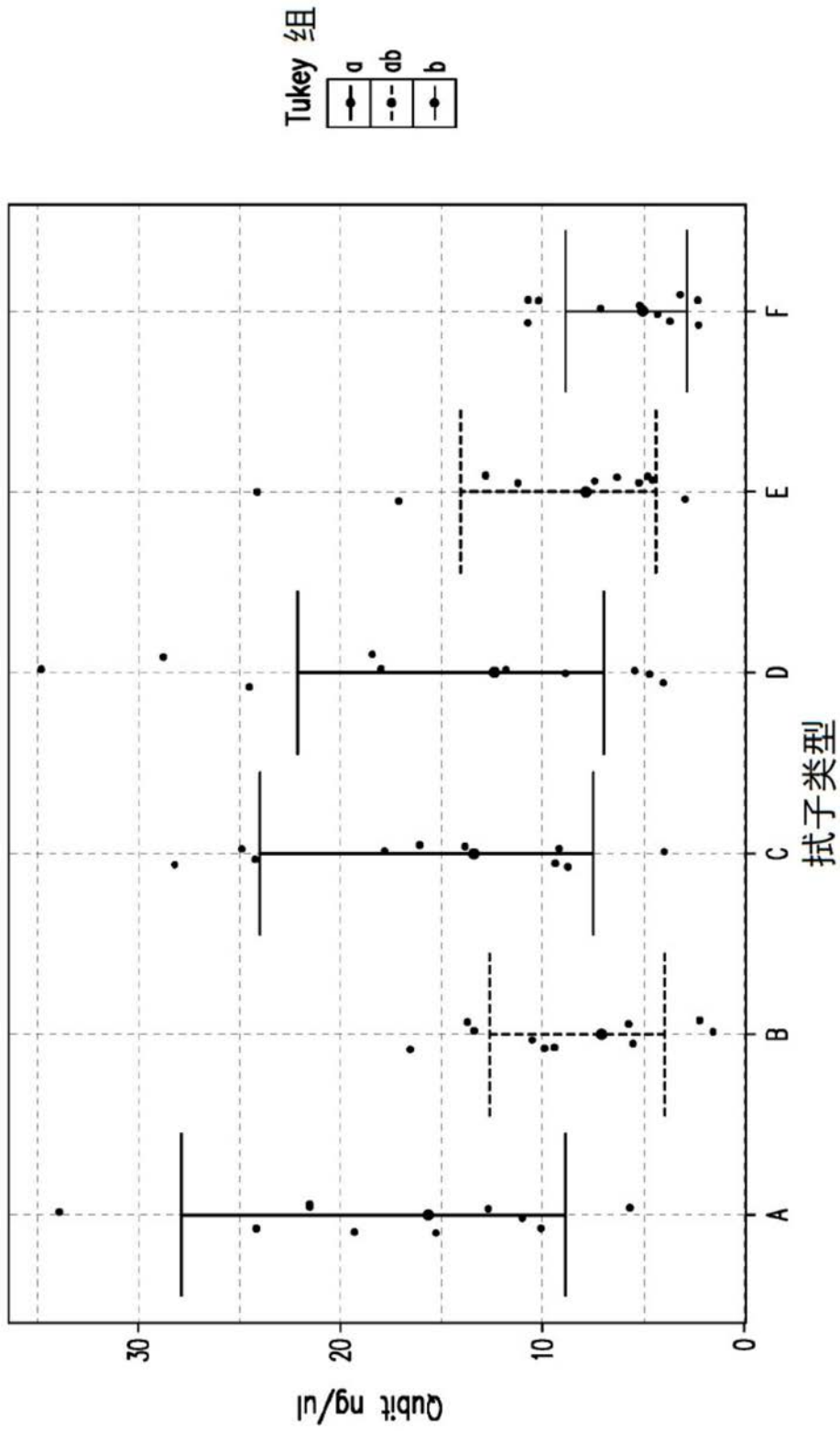


图3C

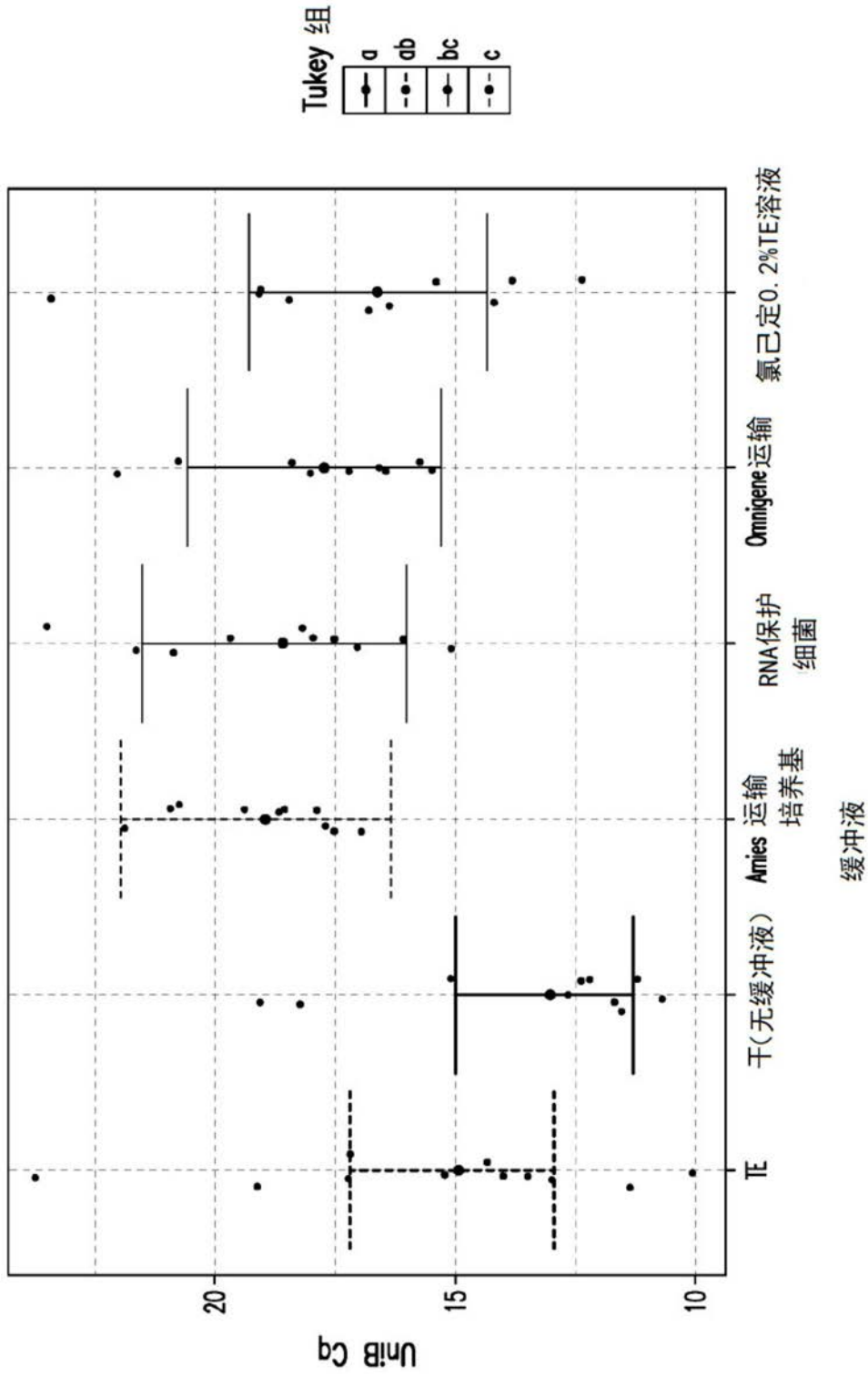


图4A

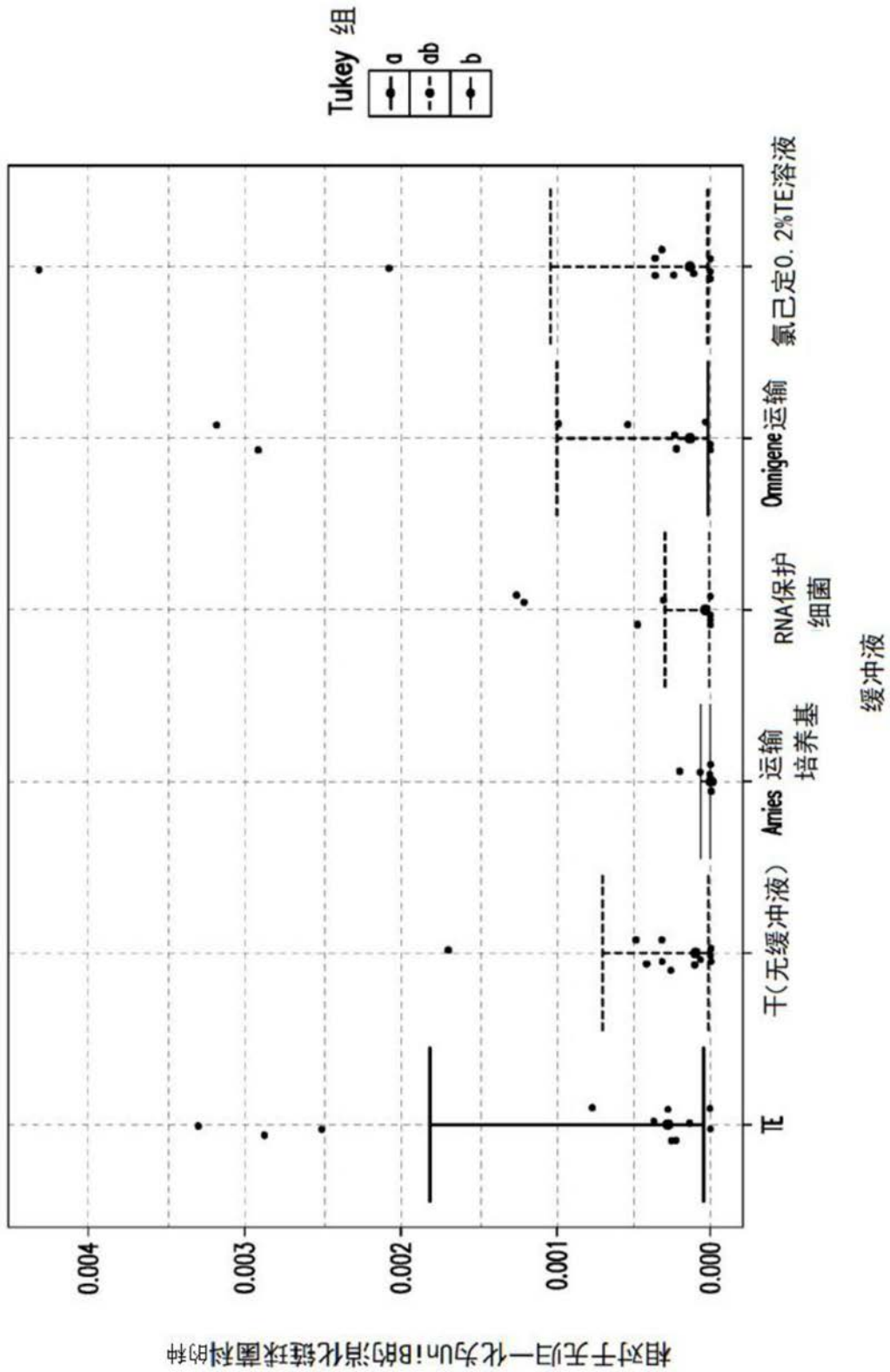


图4B

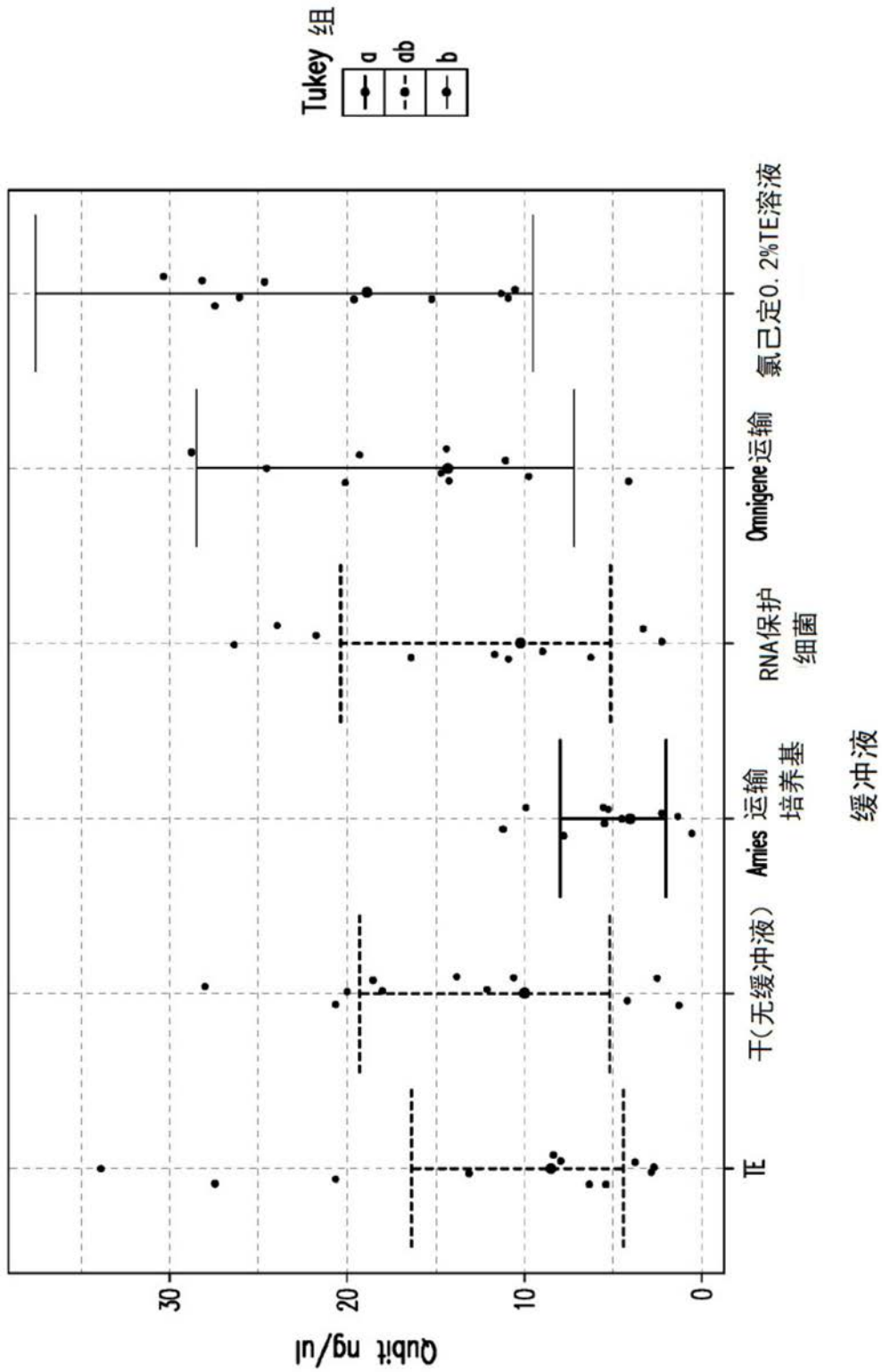


图4C

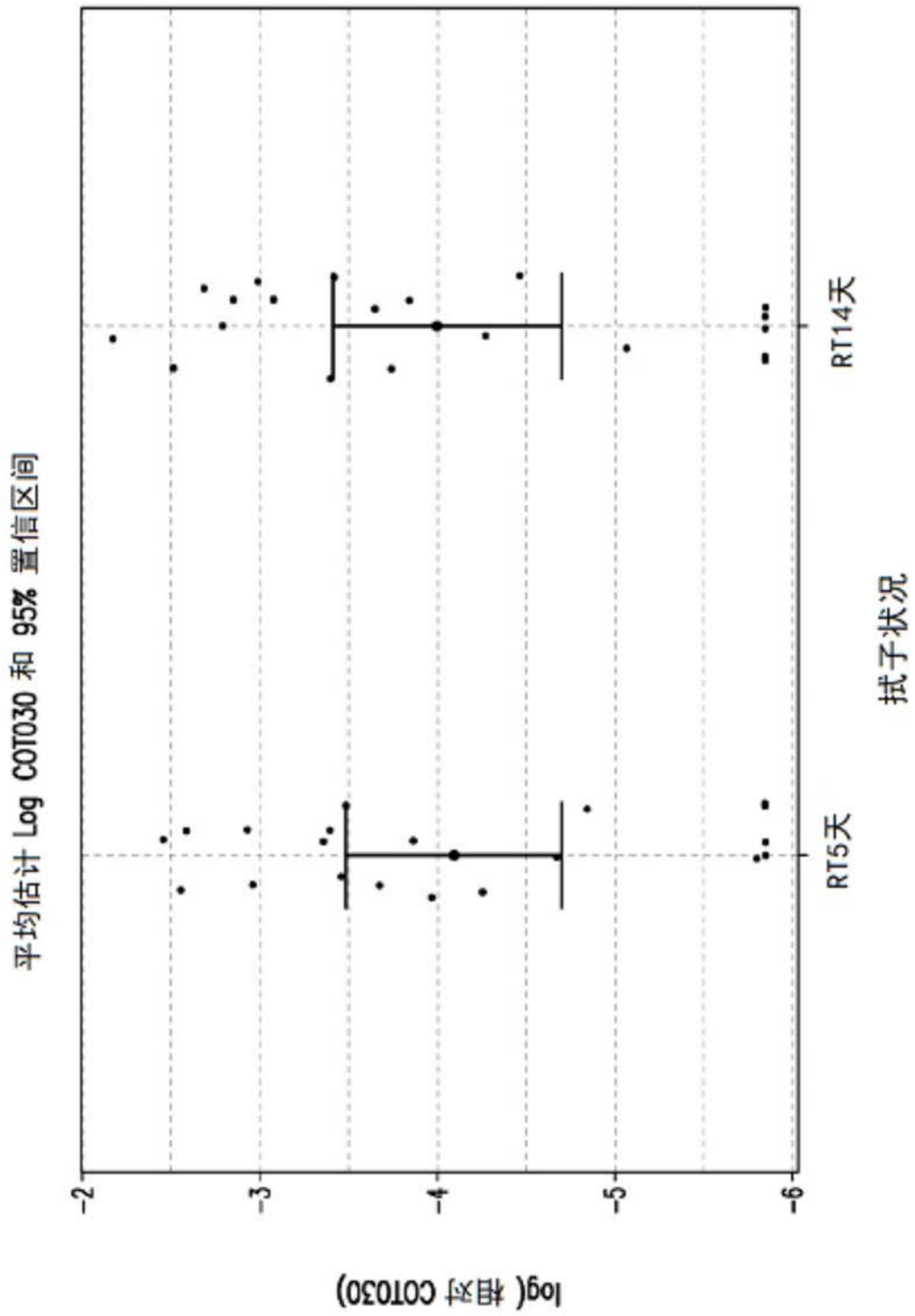


图5

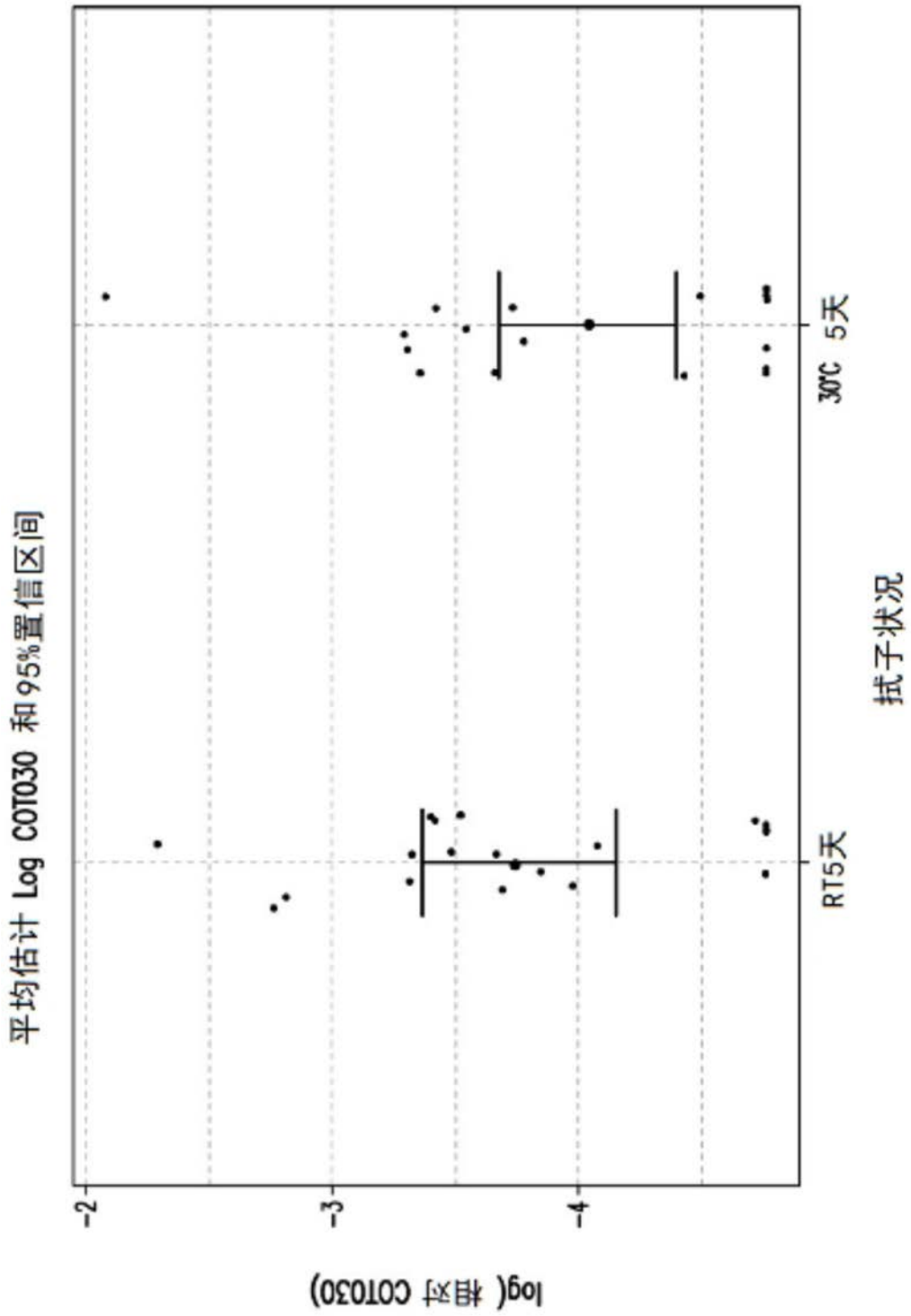


图6

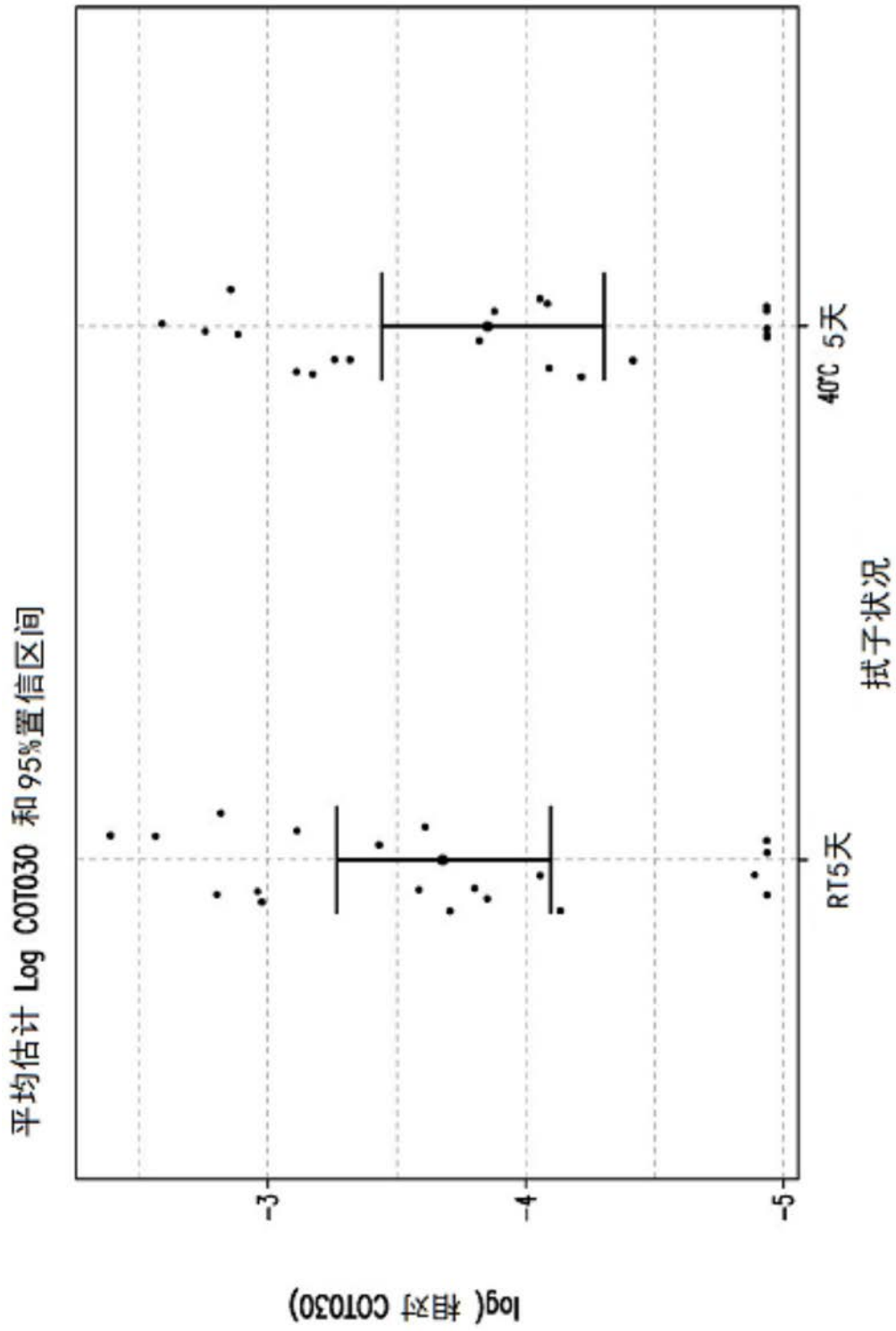


图7

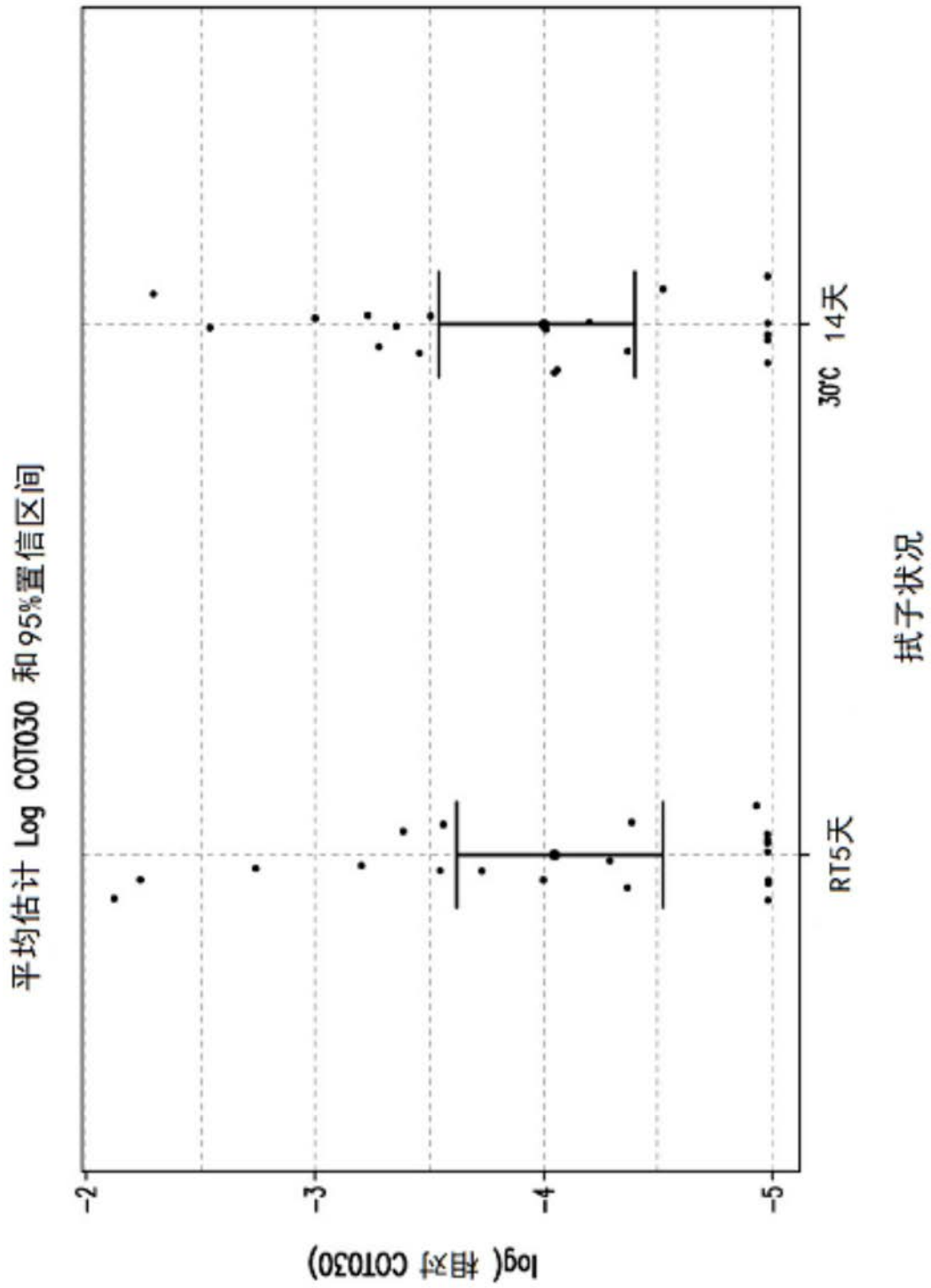


图8

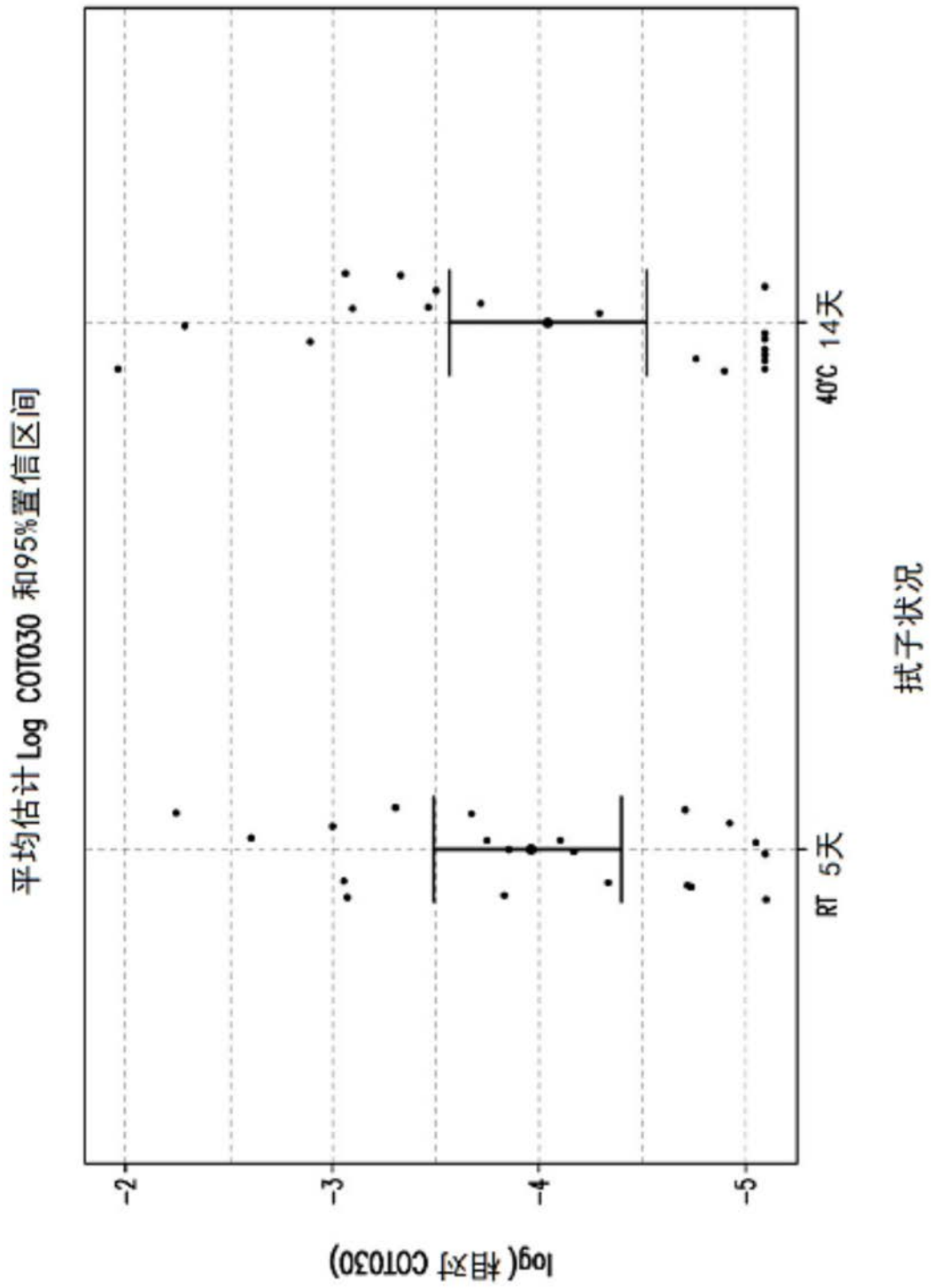


图9

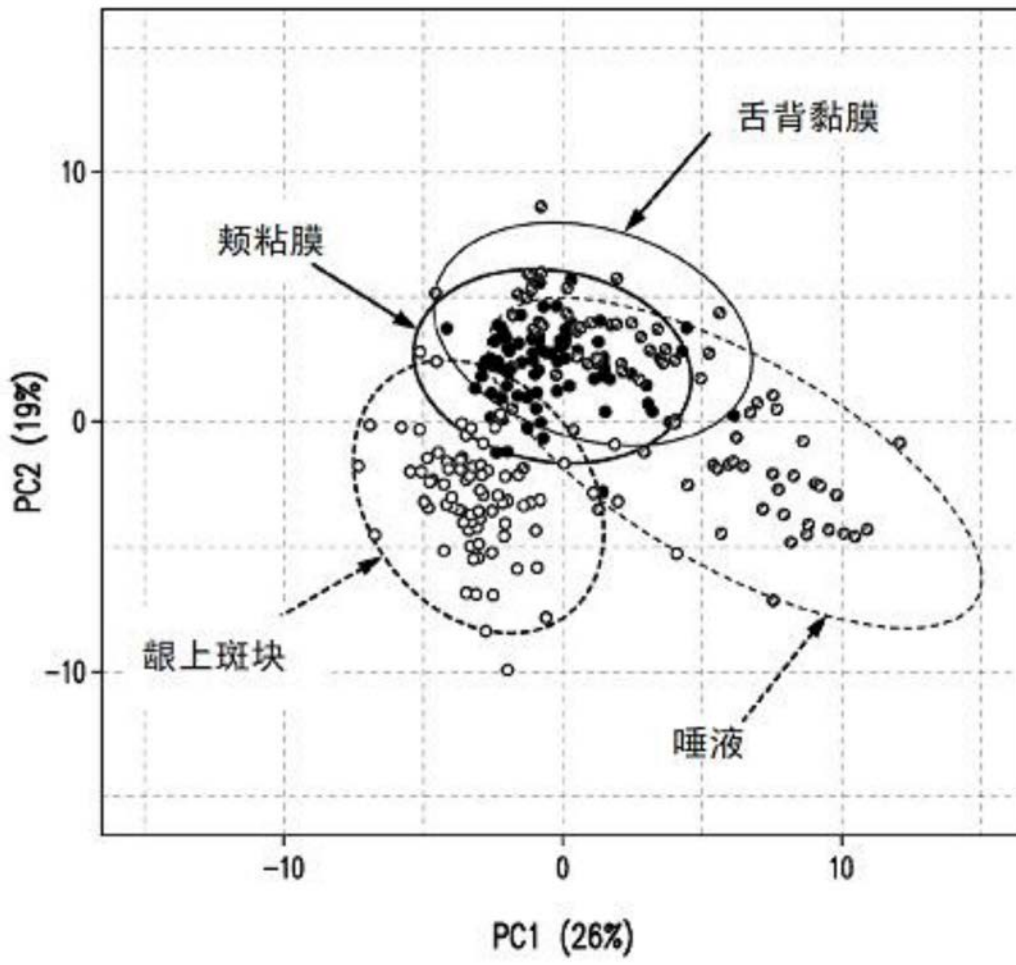


图10

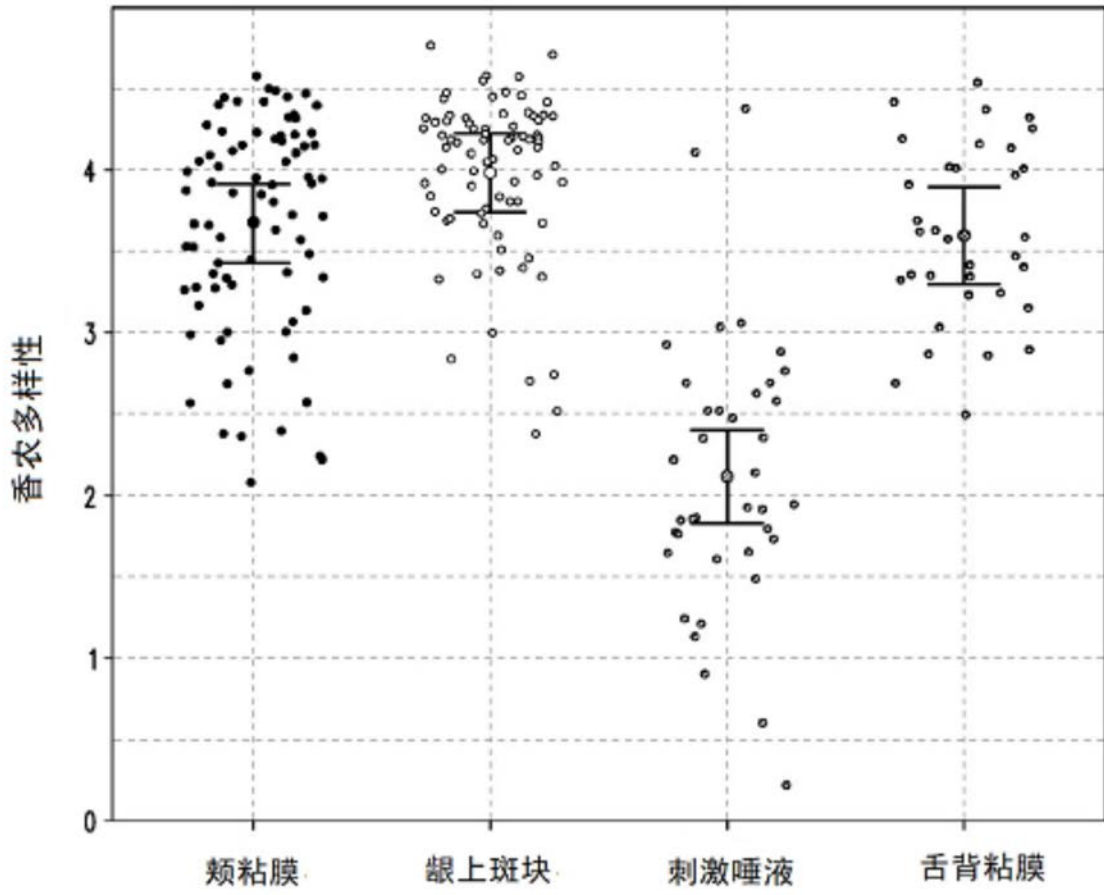


图11