



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102089419 A

(43) 申请公布日 2011.06.08

(21) 申请号 200980126982.6

(22) 申请日 2009.07.09

(30) 优先权数据

61/079,445 2008.07.10 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011.01.10

(86) PCT申请的申请数据

PCT/IL2009/000690 2009.07.09

(87) PCT申请的公布数据

W02010/004567 EN 2010.01.14

(71) 申请人 塔康特精确有限公司

地址 以色列下加利利

(72) 发明人 弗拉迪米尔·格鲁克曼

埃隆·卡普兰

(74) 专利代理机构 北京律盟知识产权代理有限公司

责任公司 11287

代理人 章蕾

(51) Int. Cl.

C12M 1/34 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

权利要求书 4 页 说明书 17 页 附图 2 页

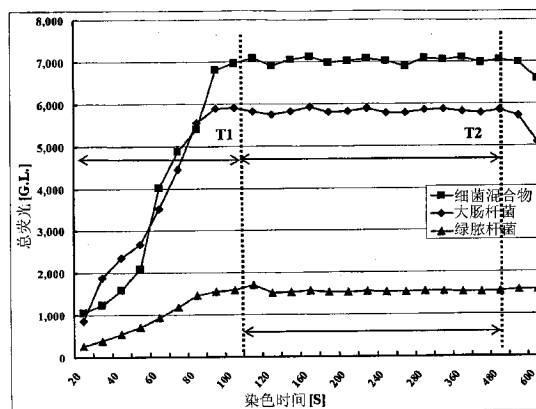
(54) 发明名称

用于进行可培养细胞计数的方法、试剂盒和系统

(57) 摘要

本发明提供用于测定测试样品中指示例如大肠杆菌 (E. Coli)、绿脓杆菌 (Ps. Aeruginosa) 或微生物细胞混合物等可培养的微生物细胞的数目的数量值 (例如总微生物计数) 的方法、试剂盒和系统, 所述方法包含 (i) 使容易携带可培养的微生物细胞的所述测试样品与至少一种能够缔合所述微生物细胞的膜的信号发射剂接触, 所述接触将持续预定的第一时间段 (T1), 所述第一时间段 (T1) 足以使所述信号发射剂内化于所述微生物细胞中, 达到使得由所述样品发射的信号基本上达到平台期的水平; (ii) 从所述测试样品中去除未内化的信号发射剂; (iii) 在所述第一时间段 (T1) 后, 于第二时间段 (T2) 期间, 且在此期间所述信号基本上保持在所述平台期, 由所述样品内信号发射物体检测发射信号的可培养细胞, 所述检测是基于针对所述可培养细胞而预定的选择参数; 和 (iv) 根据所述所选的信号发射物体, 测定所述测试样品中指示可培养细胞的数目的数量值。所述试剂盒包含一种或一种以上所述信号发射剂及其使用说明。本发明还提供一种机器可读的程序存储装置, 其明确地体现可由所述机器执行的指令程序, 以便执行所述方法; 以及一种计算机程序, 其包含用于执行所述方法的计算机程

序代码构件。



1. 一种用于测定测试样品中指示可培养的微生物细胞的数目的数量值的方法,所述方法包含:

(i) 使容易携带可培养的微生物细胞的所述测试样品与至少一种能够缔合所述微生物细胞的膜的信号发射剂接触,所述接触将持续预定的第一时间段(T1),所述第一时间段(T1)足以使所述信号发射剂内化于所述微生物细胞中,达到使得由所述样品发射的信号基本上达到平台期的水平;

(ii) 从所述测试样品中去除未内化的信号发射剂;

(iii) 在所述第一时间段(T1)后,于第二时间段(T2)期间,且在此期间所述信号基本上保持在所述平台期,由所述样品内信号发射物体检测发射信号的可培养细胞,所述检测是基于针对所述可培养细胞而预定的选择参数;和

(iv) 根据所述所选的信号发射物体,测定所述测试样品中指示可培养细胞的数目的数量值。

2. 根据权利要求1所述的方法,其包含在用所述信号发射剂对所述样品进行染色之前,从所述测试样品中去除至少一部分液体。

3. 根据权利要求2所述的方法,其中所述液体去除是借助过滤或离心中的一种或一种以上进行。

4. 根据权利要求1至3中任一权利要求所述的方法,其中所述样品包含一种或一种以上类型的微生物细胞。

5. 根据权利要求1至45中任一权利要求所述的方法,其中所述信号发射剂为发光剂或光发射剂。

6. 根据权利要求1至8中任一权利要求所述的方法,其包含使所述样品与至少一种其它信号发射剂接触,所述其它信号发射剂对怀疑存在于所述样品中的所述微生物细胞具有特异性。

7. 根据权利要求6所述的方法,其包含检测由所述样品中的每一信号发射剂所发射的信号,和由所述信号测定所述样品中指示可培养的特定微生物细胞的数目的数量值。

8. 根据权利要求6或7所述的方法,其用于测定多个数量值,每一个值都将指示所述样品中某一特定微生物细胞或一组特定微生物细胞的数目。

9. 根据权利要求1至8中任一权利要求所述的方法,其中所述选择参数包含两个或两个以上选自以下的参数:由信号发射物体发射的信号强度、所述信号发射物体的尺寸、所述信号发射物体的形态。

10. 根据权利要求9所述的方法,其中仅检测至少一信号强度低于预定上限且尺寸在物体尺寸范围内的信号发射物体。

11. 根据权利要求9所述的方法,其中仅检测至少一信号强度在预定强度范围内且尺寸在物体尺寸范围内的信号发射物体。

12. 根据权利要求9至11中任一权利要求所述的方法,其包含针对所述所选的物体计算所述数量值。

13. 根据权利要求12所述的方法,其中所述数量值包含所述所选物体的均方根强度。

14. 根据权利要求12或13所述的方法,其中将所述数量值标准化以与菌落形成单元(CFU)计数对应,所述经标准化的数量值为CFU当量。

15. 根据权利要求 14 所述的方法,其中所述标准化包含用所述数量值乘以预定的细胞特异性标准化因子,得到所述 CFU 当量。

16. 一种用于测定等效于测试样品中可培养的微生物细胞的数目的数量值的试剂盒,所述试剂盒包含:

(i) 至少一种能够缔合微生物细胞的膜的信号发射剂,

(ii) 有关使所述至少一种信号发射剂与所述样品接触达第一时间段 (T1) 的说明,所述第一时间段 (T1) 足以使所述信号发射剂内化于所述微生物细胞中,达到使得由所述样品发射的信号基本上达到平台期的水平;

(iii) 有关从所述样品中去除未缔合的信号发射剂的说明;

(iv) 有关由所述样品内信号发射物体检测和选择发射信号的可培养细胞的说明,所述检测是基于针对所述可培养细胞而预定的选择参数,所述检测和选择是在所述 T1 后于第二时间段 (T2) 期间进行,并且在此期间,所述信号基本上保持在所述平台期;

(v) 有关使用所述所选的信号发射物体来由此测定所述测试样品中指示可培养细胞的数目的数量值的说明。

17. 根据权利要求 16 所述的试剂盒,其包含有关在用所述信号发射剂对所述样品进行染色之前,从所述样品中去除至少一部分所述液体的说明。

18. 根据权利要求 16 或 16 所述的试剂盒,其包含超过一种信号发射剂。

19. 根据权利要求 16 至 18 中任一权利要求所述的试剂盒,其中所述信号发射剂为发光剂或光发射剂。

20. 根据权利要求 19 所述的试剂盒,其中所述信号发射剂为荧光染料。

21. 根据权利要求 16 至 20 中任一权利要求所述的试剂盒,其包含选择参数,和有关使用至少两个所述选择参数从所述样品内信号发射物体中选出发射信号的可培养的微生物细胞的说明。

22. 根据权利要求 21 所述的试剂盒,其中所述选择参数包含预定的信号强度上限、信号强度范围、在预定的信号发射物体的尺寸范围内的尺寸和信号发射形态。

23. 根据权利要求 22 所述的试剂盒,其包含有关使用至少两个所述选择参数仅选择信号强度低于预定的上限或在物体尺寸范围内并且尺寸在预定尺寸范围内的信号发射物体的说明。

24. 根据权利要求 15 至 23 中任一权利要求所述的试剂盒,其包含有关由所述所选的物体计算所述数量值的说明。

25. 根据权利要求 24 所述的试剂盒,其中所述说明包含计算所述所选物体的均方根强度,以便由此获得所述数量值。

26. 根据权利要求 16 至 25 中任一权利要求所述的试剂盒,其包含有关用标准化因子使所述数量值标准化以获得菌落形成单元 (CFU) 计数当量的说明。

27. 根据权利要求 26 所述的试剂盒,其包含一个或一个以上预定的标准化因子,以及有关使用所述预定的标准化因子,由测量的数量值推导出所述 CFU 当量的说明。

28. 一种用于测定测试样品中指示可培养的微生物细胞的数目的数量值的系统,所述系统包含:

(i) 载体,其用于固定所述样品,并允许样品与一种或一种以上信号发射剂接触;

(ii) 检测器,其用于检测所述样品内信号发射物体,并输出其对应的数据;

(iii) 存储单元,其包含具有预定的选择参数和多个预定的标准化因子的数据库,每一选择参数和每一标准化因子对于某一微生物细胞或对于某一组微生物细胞具有特异性;

(iv) 处理单元,其用于接收来自所述检测器的输出数据、来自所述存储单元的一个或一个以上所述参数和所述标准化因子,并用所述参数和所述标准化因子处理所述输出数据,以测定所述样品中指示所述可培养的微生物细胞的数目的所述数量值。

29. 根据权利要求 28 所述的系统,其中所述载体包含用于从所述样品中滤出至少一部分液体的过滤器。

30. 根据权利要求 28 或 29 所述的系统,其中所述检测器包含用于捕捉所述测试样品内信号发射物体的影像的照相机。

31. 根据权利要求 30 所述的系统,其中所述处理单元经配置以由从所述检测器接收的数据测定所检测的每一信号发射物体的信号强度、信号发射物体的尺寸、信号发射物体的形态。

32. 根据权利要求 28 至 31 中任一权利要求所述的系统,其中所述处理单元经配置以选择信号强度低于预定的强度阈值且尺寸在预定尺寸范围内的信号发射物体。

33. 根据权利要求 28 至 31 中任一权利要求所述的系统,其中所述处理单元经配置以选择信号强度在预定强度范围内且尺寸在预定范围内的信号发射物体。

34. 根据权利要求 32 或 33 所述的系统,其中所述处理单元经配置以基于由所述所选的信号发射物体所发射的强度的均方根输出数量值。

35. 根据权利要求 28 至 34 中任一权利要求所述的系统,其中所述处理单元经配置以用从所述数据库检索到的标准化因子使所述数量值标准化。

36. 根据权利要求 28 至 35 中任一权利要求所述的系统,其包含具有一种或一种以上信号发射剂的卡匣,所述系统经过预先编程,从而允许所述卡匣将所述一种或一种以上信号发射剂释放到所述载体中,并允许所述一种或一种以上信号发射剂与所述载体中的测试样品接触。

37. 根据权利要求 28 至 35 中任一权利要求所述的系统,其包含卡匣阵列,所述卡匣各自携带信号发射剂,所述系统经过预先编程,从而允许将一种或一种以上信号发射剂从所述卡匣阵列释放到所述载体中。

38. 一种机器可读的程序存储装置,其明确地体现可由所述机器执行的指令程序,以执行用于测定测试样品中指示可培养的微生物细胞的数目的数量值的方法,所述方法包含:

(i) 使容易携带可培养的微生物细胞的所述测试样品与至少一种能够缔合所述微生物细胞的膜的信号发射剂接触,所述接触将持续预定的第一时间段 (T1),所述第一时间段 (T1) 足以使所述信号发射剂内化于所述微生物细胞中,达到使得由所述样品发射的信号基本上达到平台期的水平;

(ii) 从所述测试样品中去除未内化的信号发射剂;

(iii) 在所述第一时间段 (T1) 后,于第二时间段 (T2) 期间,且在此期间所述信号基本上保持在所述平台期,由所述样品内信号发射物体检测和选择发射信号的可培养细胞,所述检测是基于针对所述可培养细胞而预定的选择参数;和

(iv) 根据所述所选的信号发射物体,测定所述测试样品中指示可培养细胞的数目的数

量值。

39. 根据权利要求 38 所述的程序存储装置,其可由所述机器执行以执行根据权利要求 1 至 15 中任一权利要求所述的方法。

40. 一种计算机程序,其包含当所述程序在计算机上运行时执行根据权利要求 1 至 15 中任一权利要求所述的所有步骤的计算机程序代码构件,所述计算机程序是在程序存储装置中体现。

用于进行可培养细胞计数的方法、试剂盒和系统

技术领域

[0001] 本发明涉及用于定量测量样品中的细胞量的方法、试剂盒和系统。

现有技术

[0002] 以下是被认为与描述本发明所属领域中的技术状态有关的技术的清单。

[0003] (1) 国际专利申请公开案第 W006/065350 号 (金佰利国际公司 (Kimberly Clark Worldwide Inc.))

[0004] (2) 欧洲专利申请案第 0612850 号 (日本密理博株式会社 (Nihon Millipore Kogyo KK))

[0005] (3) 美国专利第 5,258,285 号 (福斯电器控股公司 (Foss Electric Holding AS))

[0006] (4) 美国专利申请公开案第 2008014607 号

[0007] (5) 国际专利申请公开案第 W092/02632 号 (新锐尔公司 (Sierra Cytometry))

[0008] (6) 琼斯 D. L. (Jones, D. L.), M. A. 布莱斯福德 (M. A. Brailsford) 和 J. -L. 多克特 (J. -L. Drocourt). 1999. 固相激光扫描细胞术:用于计数制药用水中的微生物的新两小时方法 (Solid-phase, laser-scanning cytometry: a new two-hour method for the enumeration of microorganisms in pharmaceutical water). 药典论坛 (Pharmacop. Forum) 25:7626-7645

[0009] 背景技术

[0010] 样品、尤其是液体样品中生物实体的定量测量对于测定污染和感染的程度、疾病状态等极为重要。例如,在微生物学中是利用菌落形成单位 (CFU/ml) 来度量细菌或真菌数量。

[0011] 尽管微生物包括孢子、无活性 (不可培养) 微生物和可繁殖微生物等形式,但仅定量可繁殖微生物的方式具有重要意义。例如,在食品和饮料工业的质量控制过程、与消费者接触的物品 (例如医药品和个人护理品) 的制造、水生系统 (例如河流湖泊和海洋) 的环境保护、公共安全性 (例如,城市供水系统;水井;例如水池温泉和海滩等娱乐用水的细菌监测) 各种工业生产过程、保健相关性感染和医疗护理规定中,可繁殖微生物的定量是一个重要问题。

[0012] 分裂的 (可培养) 微生物的定量通常是基于细菌培养物生长的专业的实验室程序。需要在较长的培育时间内维持使微生物在固体和液体培养基上生长的特定条件,并在培育结束时,测定 CFU (CFU/ml)。在实验室中,CFU 通常是根据稀释次数和样品体积使计数的菌落的总数量标准化来计算。这种方法需要实验室设备、有资质的工作人员以及可能持续一天到一个月的较长的时间。尽管此方法涉及耗人力且耗时的工作,但 CFU 仍是目前管理机构认可的进行微生物计数的标准。

[0013] 此项技术中提供了多种方法来检测测试样品中的微生物,作为细胞计数的替代方法,这些方法中利用了颜色或荧光标记。

[0014] 例如,国际专利申请公开案第 W006/065350 号 (金佰利国际公司 (Kimberly Clark

Worldwide Inc.)) 描述了一种半定量或定量检测所提供的样品中微生物的存在的方法。此方法利用了一种测试染料,其在一种或一种以上微生物存在下会出现可检测的颜色改变。例如,所述测试染料是一种会对微生物组分(例如细胞膜、细胞质等)与细胞外部的环境之间的极性差异起反应的溶剂化变色染料(solvatochromic dye)(例如雷查特氏染料(Reichardt's dye))。

[0015] 欧洲专利第 EP0612850 号描述了一种测定样品溶液中活的微生物细胞的数量方法,其包含使样品溶液滤过具有疏水性的滤膜,以将微生物截留在疏水障壁内;向其中施加 ATP 提取剂的细雾以提取出微生物中的发光成分;向其中再施加针对所提取的发光成分的液体发光诱导剂的细雾,以使所述成分发光;和使用能够测量发光量的构件,测量发光量。

[0016] 美国专利第 5,258,285 号描述了一种测定包含细菌和体细胞的细胞群中细菌数量的方法。

[0017] 美国专利申请公开案第 US2008/014607 号描述了一种用于检测和计数液体样品中可能存在的指定种类的活细胞的基于生物发光的方法,其包含测量指定的非病毒种类的活细胞中以 ATP 形式表达的总游离细胞内腺嘌呤核苷酸(adenyl nucleotide,AN)的含量。

[0018] 国际专利申请公开案第 W092/20263 号描述了一种用于检测、鉴别和/或计数牛奶中活细胞的方法,其中用荧光染料(例如酯酶依赖性染料、核酸结合性染料,和检测细胞内氧化活性的染料)选择性标记活细胞,随后进行鉴别和/或计数。

[0019] 美国专利第 7,312,073 号描述了一种用于定量活细胞的方法,其中将并入标记物的溶胶-凝胶液体前体贯穿固定于载玻片上作为薄层涂层。在培育期间,使所述载玻片与含有从测试样品中分离的微生物的过滤器接触。在培育过程中,微生物将摄取一个或一个以上标记物。随后照射载玻片,并检测由微生物中所含的标记物发射的信号,由此产生影像以供微生物的检测计数。

[0020] 另外,用于计数制药用水中微生物的两小时方法描述于琼斯(Jones)等人(药典论坛(Pharmacop. Forum) 1999,25,7626-7645))中。

发明内容

[0021] 本发明是基于细胞膜动力学的利用,根据细胞膜动力学,可培养(分裂的)细胞将持续进行膜运输。本发明者现设想,在可培养的微生物细胞中,细胞膜内化,与内部的膜隔室融合,随后以比非分裂细胞高得多的速率再并入膜中。

[0022] 具体点说,本发明是基于以下发现:利用能够缔合膜并内化于微生物细胞的细胞内隔室中的荧光染料对微生物细胞染色,使得所述染料在细胞内积累。此内化过程具有一个特有的特征,即,在第一时间段 T1 后,积累达到平稳的平台期,并且在特有的第二时间段 T2 中,积累量稳定保持此平台期。

[0023] 另外,本发明是基于以下发现:对于指定的微生物细胞类型或一组微生物细胞,第一时间段 T1 与第二时间段 T2 是某一(某些)细胞类型所特有的。换句话说,对于指定的细胞类型(或一组细胞),当在相同的预定条件下测量时,T1 与 T2 将基本上保持恒定。

[0024] 因此,根据本发明的第一方面,本发明提供一种测定指示测试样品中可培养的微生物细胞的数目的数量值的方法,所述方法包含:

[0025] (i) 使容易携带可培养的微生物细胞的测试样品与至少一种能够缔合所述微生物细胞的膜的信号发射剂接触,所述接触将持续预定的第一时间段(T1),所述第一时间段(T1)足以使所述信号发射剂内化于所述微生物细胞中,达到使得由所述样品发射的信号基本上达到平台期的水平;

[0026] (ii) 从所述测试样品中去除未内化的信号发射剂;

[0027] (iii) 在所述第一时间段(T1)后,于第二时间段(T2)期间,且在此期间所述信号基本上保持在所述平台期,由所述样品内信号发射物体检测发射信号的可培养细胞,所述检测是基于针对所述可培养细胞而预定的选择参数;和

[0028] (iv) 根据所述所选的信号发射物体,测定所述测试样品中指示可培养细胞的数量值的数量值。

[0029] 本发明也提供一种用于测定测试样品中等于可培养的微生物细胞数目的数量值的试剂盒,所述试剂盒包含:

[0030] (i) 至少一种能够缔合微生物细胞的膜的信号发射剂,

[0031] (ii) 有关使所述至少一种信号发射剂与所述样品接触达第一时间段(T1)的说明,所述第一时间段(T1)足以使所述信号发射剂内化于所述微生物细胞中,达到使得由所述样品发射的信号基本上达到平台期的水平;

[0032] (iii) 有关从所述样品中去除未缔合的信号发射剂的说明;

[0033] (iv) 有关由所述样品内信号发射物体检测和选择发射信号的可培养细胞的说明,所述检测是基于针对所述可培养细胞而预定的选择参数,所述检测和选择是在所述T1后于第二时间段(T2)期间进行,并且在此期间,所述信号基本上保持在所述平台期;

[0034] (v) 有关使用所述所选的信号发射物体来测定测试样品中指示可培养细胞的数量值的数量值的说明。

[0035] 本发明还提供一种用于测定测试样品中指示可培养的微生物细胞的数量值的系统,所述系统包含:

[0036] (i) 载体,其用于保存样品,并允许样品与一种或一种以上信号发射剂接触;

[0037] (ii) 检测器,其用于检测样品内信号发射物体,并输出其对应的数据;

[0038] (iii) 存储单元,其包含具有预定的选择参数和多个预定的标准化因子的数据库,每一选择参数和每一标准化因子对于某一微生物细胞或对于某一组微生物细胞具有特异性;

[0039] (iv) 处理单元,其用于接收来自所述检测器的输出数据、来自所述存储单元的一个或一个以上所述参数和所述标准化因子,并用所述参数和所述标准化因子处理所述输出数据,以测定所述样品中指示所述可培养的微生物细胞的数量值的数量值。

[0040] 本发明还提供一种机器可读的程序存储装置,其明确地实施可由所述机器执行的指令程序,以执行用于测定测试样品中指示可培养的微生物细胞的数量值的方法,所述方法包含:

[0041] (i) 使容易携带可培养的微生物细胞的所述测试样品与至少一种能够缔合所述微生物细胞的膜的信号发射剂接触,所述接触将持续预定的第一时间段(T1),所述第一时间段(T1)足以使所述信号发射剂内化于所述微生物细胞中,达到使得由所述样品发射的信号基本上达到平台期的水平;

[0042] (ii) 从所述测试样品中去除未内化的信号发射剂；

[0043] (iii) 在所述第一时间段 (T1) 后, 于第二时间段 (T2) 期间, 且在此期间所述信号基本上保持在所述平台期, 由所述样品内信号发射物体检测和选择发射信号的可培养细胞, 所述检测是基于针对所述可培养细胞而预定的选择参数; 和

[0044] (iv) 根据所述所选的信号发射物体, 测定所述测试样品中指示可培养细胞的数量值。

[0045] 此外, 也提供一种计算机程序, 其包含当所述程序在计算机上运行时执行本发明所有步骤的计算机程序代码构件, 所述计算机程序是在程序存储装置中实施。

附图说明

[0046] 为了解本发明并且看其实际上如何进行, 现将仅通过非限制性实例, 参考附图来描述实施例。

[0047] 图 1 是展示作为样品的时间函数的荧光强度的图, 所述样品包含来源于城市用水的细菌细胞 (- ■ -)、分离的大肠杆菌 (- ◆ -) 和绿脓杆菌 (- ▲ -) 的混合物, 其荧光染料 FM1-43 染色。

[0048] 图 2 是绘制样品中微生物细胞的 CFU/ml 计数相对于同一样品中微生物细胞的量的定量测量的图, 所述定量测量是通过本发明的方法来获得。

[0049] 图 3A-3B 是展示通过常规方法所获得的 CFU/ml 计数 (标准 CFU/ml) 与根据本发明的一个实施例所获得的 CFU 当量之间的相关性 (图 3A) 以及每一测试样品各值 (CFU 当量与常规 CFU/ml) 之间的相关性 (图 3B)。

[0050] 表 2 中的结果也绘制成图, 以图 3A (◆ 表示 CFU 当量, ■ 表示标准 CFU) 提供, CFU 当量与标准 CFU 之间的相关性在图 3B 中呈现。

具体实施方式

[0051] 本发明大体提供在用常规信号发射剂对样品染色之后在数分钟内定量测量样品 (通常为液体样品) 中可培养微生物细胞的量的方法、试剂盒和系统。

[0052] 常规微生物细胞计数技术, 例如下文论述的异向板计数器 (Heterotrophic Plate Count, HPC), 通常需要培养微生物细胞若干小时以区别死细胞与可培养微生物细胞且仅计数培养的细胞。一些可培养微生物细胞鉴别为菌落形成单位 (CFU/ml)。为此, 本发明允许在几分钟内仅计数可培养微生物细胞以得到等于 CFU 的数量值。因此, 本发明得到 CFU 当量, 同时与常规方法相比, 缩短所需的时间且降低所需的成本。虽然本发明的 CFU 当量与常规菌落形成单位测量 (例如 HPC) 相关, 但可能存在一些不同且任何所述不同的差异都不会超过 30% 以上、优选不大于 10% 且更优选不大于 5%。

[0053] 在本发明的情况下, 术语“可培养微生物细胞”或“可培养细胞”用于表示当放置在合适的受控培养基上时可分成两个 (子) 细胞的显微镜或超显微镜尺寸的任何细胞 (例如母细胞)。因此, 术语“非可培养微生物细胞”表示即使有活力, 当放置在培养条件下时也不且不能分成子细胞的细胞。

[0054] 微生物细胞可包括 (但不限于) 细菌, 例如大肠菌类细菌 (Coliforming bacteria) (大肠杆菌 (E. Coli))、肠细菌 (沙门菌属 (salmonella)、李斯特菌属

(listeria)、志贺菌属 (shigella))、假单胞菌群 (Pseudomonas group) (铜绿假单胞菌 (pseudomonas auriginosa)、荧光假单胞菌 (pseudomonas fluorescensa))、葡萄球菌群 (Staphylococcus group) (金黄色葡萄球菌 (staphilococus aureus)、粪链球菌 (streptococcus fecalis))、链球菌群 (Streptococcus group) 和甲烷菌等;霉菌,例如黑曲霉 (Aspergillus niger)、青霉菌群 (penicillium group) 等;酵母,例如念珠菌群 (Candida group)、Sachramises group 等;原虫,例如隐孢子虫群 (Cryptosporidium group)、贾地虫群 (Giardia group)、变形虫 (Amoeba) 等;藻类,例如绿藻 (green algae) 等;嗜酸细菌 (Acidophylic bacteria, TAB);军团菌群 (legionella group);弧菌 (Vibrio) 物种等。

[0055] 本发明可获得各种应用,优选但非排他性地为在需要基本上立即鉴别和定量样品中的微生物污染(例如引起疾病(病原性)因子)时。举例来说,本发明方法可适用于定量测量饮用水中微生物细胞的量。一些其它应用可能与工业微生物学(例如存在于食物或饮料中的细胞、个人护理、工业工艺和卫生保健相关感染)、水生系统(饮用水、工艺用水、废水、天然水源、改水,例如游泳池、矿泉疗养地和海滩等)、医学微生物学(血浆、唾液、尿、咽喉样品、胃肠液)、环境微生物学(土壤、空气表面)等相关。

[0056] 如上文所指示,本发明提供的用于几乎实时测定样品中可培养微生物细胞的量的解决方案是基于膜运输的利用或细胞膜向细胞间隔室的移动,这些在可培养细胞中发生的程度是在有活力但非可培养细胞中发生的程度的 1.5、3、6、12 且甚至高达 20 倍。非可培养细胞可包括例如孢子、合成代谢细胞等。因而,发明者因此假设如果可用与膜缔合的膜信号发射剂对细胞的膜染色且发生膜运输,那么与非可培养细胞相比,信号发射剂在可培养细胞中积聚的程度更高,从而从这些可培养细胞中产生更强的信号。

[0057] 术语“基本上立即”或“立即”或“几乎实时”表示从起始本发明方法到捕捉到测试样品的至少一个可推断(通常且优选通过影像处理,将在下文进一步论述)根据本发明的 CFU 当量的影像的时间窗不到 20 分钟,优选不到 15 分钟,更优选不到 10 分钟。换句话说,本发明方法是瞬时的,不需要长期(数小时)培养细胞以测定测试样品中可培养细胞的数目。

[0058] 因此,根据本发明的第一方面,本发明提供一种测定指示测试样品中可培养的微生物细胞的数目的数量值的方法,所述方法包含:

[0059] (i) 使容易携带可培养微生物细胞的测试样品与至少一种能够缔合所述微生物细胞的膜的信号发射剂接触,所述接触将持续预定的第一时间段 (T1),所述第一时间段 (T1) 足以使所述信号发射剂内化于所述微生物细胞中,达到使得由所述样品发射的信号基本上达到平台期的水平;

[0060] (ii) 从所述测试样品中去除未内化的信号发射剂;

[0061] (iii) 在所述第一时间段 (T1) 后,于第二时间段 (T2) 期间,且在此期间所述信号基本上保持在所述平台期,由所述样品内信号发射物体检测信号发射可培养细胞,所述检测是基于针对所述可培养细胞而预定的选择参数;和

[0062] (iv) 根据所述所选的信号发射物体,测定所述测试样品中指示可培养细胞的数目的数量值。

[0063] 根据本发明的方法包含提供易具有可培养微生物细胞和允许培养所述细胞的条

件的样品。所述条件可由所属领域的技术人员基于可用技术容易地确定且通常将视怀疑样品中存在的微生物细胞或微生物细胞群的类型而定。所述条件可例如与 HPC 所需的条件相似或相同。

[0064] 测试样品可为液体、半液体以及干物质。当样品是液体样品时,可在起始测定分析之前加以干燥。样品不需要达到完全干燥,而是从其中去除至少一部分液体,以浓缩样品中的细胞得到细胞浓缩物。

[0065] 浓缩液体样品中的微生物细胞可使用生物实验室中可用的任何方法。这些方法包括(但不限于)经由合适的过滤器过滤样品、离心和其它干燥技术。

[0066] 用一种或一种以上信号发射剂对样品(原样或从其中去除至少一部分液体之后的样品)染色。如本文所使用的术语“信号发射剂”表示在适当条件下发射可检测信号的任何化学实体。信号发射剂可为光发射剂(例如比色剂)或发光发射剂,后者为例如光致发光(包括荧光或磷光)、化学发光、辐射发光、热发光;或细胞标记领域熟知的任何其它信号发射剂。

[0067] 根据本发明可使用的发光发射部分的实例包含(但不限于)生物发光剂,包括基于荧光素的试剂(6-0- β -吡喃半乳糖基荧光素)、荧光剂,包括 Alexa Fluor 家族(英杰公司(Invitrogen))的成员、PromoFluor 染料(普莫金公司(PromoKine))HiLyte Fluors(安纳斯派克公司(AnaSpec))、DyLight Fluors(皮尔斯(Pierce),赛默飞世尔科技(Thermo Fisher Scientific))和 ATTO 染料系列(ATTO-TEC 和西格玛-阿尔德里奇(Sigma-Aldrich))。所属领域的技术人员应了解,根据本发明可使用多种荧光剂或其它发光剂。

[0068] 在一个实施例中,所述试剂包含发光剂,优选结合于亲脂性连接子的荧光部分,从而允许缔合,例如用可培养细胞膜包埋至少一部分所述试剂,从而通过膜运输将所述试剂内化于细胞中。

[0069] 信号发射剂缔合于可培养细胞的细胞膜通常是非特异性的且是试剂亲脂性的结果(例如归因于发光部分连接于亲脂性连接子)。因此,非特异性信号发射剂通常用于获得总可培养细菌计数(TCBC)。

[0070] 本发明还允许即使样品具有微生物混合物,也能获得样品中特异性类型的可培养微生物细胞的细胞计数。此举可使用各种特异性信号发射剂单独或与非特异性信号发射剂组合实现。

[0071] 术语“特异性的”或“特异性”在术语“特异性信号发射剂”的情况下用于表示对膜或特异性细胞类型(需要在样品中检测的细胞)的细胞内组分具有亲和力和/或选择性结合的试剂。

[0072] 特异性信号发射剂可包含靶向实体,即对细胞的细胞外组分具有结合特异性的配体。在一个实施例中,靶向信号发射剂使得其可内化于可培养细胞中,从而允许仅检测那些已内化有信号发射剂的细胞。

[0073] 在另一实施例中,靶向(特异性)信号发射剂不内化于其靶向的细胞中,且由这一特异性信号发射剂与非特异性信号发射剂的组合检测这些细胞。为此目的,非特异性信号发射剂提供总可培养细菌计数,且特异性信号发射剂提供细胞类型(信号特异性结合的细胞类型)的总计数。然后叠加从用两种信号发射剂获得的影像发射的信号,以便从仅那些

发射两个信号的细胞,即满足可培养标准与能够结合特异性试剂的细胞推断。

[0074] 信号发射剂的特异性还可使用酶促实现(例如在酶活化对某一细胞类型具有特异性的细胞内反应时)。所述酶可包括(但不限于)作用于邻硝基苯基- β -D-吡喃半乳糖苷以产生信号发射降解产物的酶。其可有助于鉴别样品中的具有产生信号发射降解产物的特异性酶的特异性细胞群体。

[0075] 在又一实例中,特异性(靶向)可通过使用细胞特异性抗体(单克隆以及多克隆)来实现。抗体实例可包括抗沙门菌属 LPS 抗体、抗 CD18 抗体、大肠杆菌 LPS 抗体(例如大肠杆菌 J5 LPS 抗体)、抗沙门菌属鞭毛抗原抗体、抗大肠杆菌 K99 附着因子抗体。作为另一实例,抗体可为免疫脂质体(连接于脂质体的抗体)。

[0076] 在又一实例中,特异性可使用噬菌体(例如荧光噬菌体)来实现。因为本发明方法在数分钟内提供数量值,所以有可能在荧光噬菌体损害细胞之前完成分析。举例来说,可使用噬菌体兰巴噬大肠菌体(Lamba Coliphage 1, LG1)检测大肠杆菌并定量。

[0077] 非特异性与特异性信号发射剂的组合的实例可为(但不限于)结合于霍乱 B 毒素结合蛋白质以检测霍乱物种的发光部分,同时可使用连接于大肠杆菌特异性膜脂多糖的发光部分定量大肠杆菌,各与非特异性信号发射剂(例如实例中使用的 FM1-43)组合使用。

[0078] 应注意,所述试剂可不断发射信号,或所述信号可通过诸如细胞内隔室内所发生的酶促过程(所述酶促反应操纵所述试剂发射信号或酶促降解产物发射信号(如上所述))的刺激、辐射刺激等产生。

[0079] 接触期期间,信号发射剂缔合细胞的膜。在本发明的情况下,术语“缔合”表示试剂与细胞的膜的任何类型的相互作用;其包括(但不限于)静电键结、离子键结、共价键结、包埋标记物的至少一部分于细胞的膜中、抗原-抗体键结、受体-配体键结等。在本发明的情况下,术语“缔合”还涵盖已内化于细胞中的任何信号发射剂。

[0080] 易携带可培养微生物细胞的样品的接触时间应足以使信号发射剂内化于细胞中且足以细胞内积聚信号发射剂。发明者已发现,归因于可培养细胞中发生的膜运输的程度大于非可培养细胞,所述可培养微生物细胞在细胞内具有较大量的积聚试剂。在给定条件下,非可培养细胞与可培养细胞之间的积聚试剂的量可相差 1.5、3、6、12 且甚至高达 20 倍。发明者另外确定,细胞内试剂的积聚达到平台期。

[0081] 试剂达到平台期所需的时间在本文中定义为“T1”。时间 T1 是细胞类型的特征且是预定的。T1 的预定可通过用信号发射剂对所选细胞类型染色且检测信号强度随时间的变化直到信号强度基本上无变化来达成。信号强度无明显变化的时间点即定义为达到平台期的时间。如本文所使用的术语“平台期”表示细胞内积聚的信号发射剂的水平保持同一值达至少 50、250 且甚至长达 900 秒。

[0082] 为了说明起见,提及本文提供的实例,所述实例显示含有分离的大肠杆菌的样品经非特异性信号发射剂 FM1-43(分子探针公司(Molecular probes)制造)染色需要约 90 至 110 秒的 T1 来使捕捉的信号的水平达到稳态水平;而也经 FM1-43 染色的含有分离的绿脓杆菌(*Ps. aeruginosa*)的样品需要约 70 至 100 秒的 T1 来达到稳态水平。

[0083] 因为易处于测试样品中的细胞(或细胞群)的 T1 是事前确定的,所以有可能确定洗涤除去未缔合且优选未内化信号发射剂的时间点。所述试剂的洗涤可利用所属领域中已知的任何技术达成。所述技术可包括(但不限于)过滤(例如用常规微生物过滤器)、离心

(例如 4500rpm 以上) 和允许分离细胞与溶解或悬浮于样品液体中的未缔合试剂的任何其它技术。

[0084] 检测缔合有信号发射剂的细胞作为信号发射物体。然而,应了解,信号发射剂也可缔合样品中的不为完整可培养细胞的细胞组分或其它人工产物,且可提供假信号。类似地,信号可来自聚集的信号发射剂(即未充足溶解于样品中)。因此,所述方法提供检测及选择仅那些起源于缔合有试剂且内部内化有试剂的细胞的信号发射物体的工具。在本发明的情况下,术语“信号发射物体”表示测试样品中的发射信号的任何光学点。信号发射物体不必要具有细胞尺寸,且实际上可能归因于由从细胞发射的信号形成的环绕细胞的晕圈而较大,特别是当成像的细胞在焦点外(“模糊圈”)时。此由当将信号发射细胞成像时,透镜的光射线锥未聚焦于完美焦点引起。检测 and 选择在信号达到平台期之后在第二时间段 T2 进行。这一时间段 T2 表示从信号发射物体发射的信号基本上稳态地保留在平台期期间的时间窗。

[0085] 在 T2 期间,检测数个信号参数。这些参数包括从信号发射物体发射的信号**的强度**、测试样品内信号发射物体的尺寸、信号发射物体的形态。

[0086] 微生物细胞或微生物细胞群的选择标准要求从检测物体发射的信号**的强度至少低于预定上限**,且在一些实施例中,在预定强度范围内。因此,舍弃例如从细胞片段(死亡和损害的细胞)发射的低于预定最低水平的信号强度或例如从试剂聚集体发射或从样品中的非细胞体发射的高于预定最大水平(上限)的信号强度。

[0087] 选择标准还要求信号发射物体具有预定尺寸范围。其包括舍弃低于最低阈值(例如与细胞片段相关)或高于最大阈值(例如来自样品中的大型体)的物体。

[0088] 另外,选择标准可要求信号发射物体具有预定形态。应了解,细胞形态一般表示给定细菌物种的特征且所述细胞具有多种形态。这些形态可包括基本上圆形(例如球菌(Coci))、基本上细长形(例如杆状菌(Bacilli))、杆状形态等。信号发射物体通常将具有对应于(类似于)发射所述信号的细胞的形状。举例来说,细长形信号发射物体通常将来源于细长形微生物细胞。物体形状的检测不仅允许舍弃非微生物信号发射物体(即人工产物),而且可有助于鉴别发射信号的细胞的类型。

[0089] 在一个实施例中,需要至少满足强度参数和尺寸参数,以便检测和选择信号发射物体。

[0090] 应注意,所述选择参数可随应用而变化。例如,对于测试饮用水,范围、阈值和所选形状都不同于测试例如湖水的水质而预定者。

[0091] 以下非限制性实例显示,对于至少包含大肠杆菌和绿脓杆菌的微生物混合物,测定的尺寸范围为直径 0.8–2 μm ,且测定的强度参数低于 254GL(且在 60–254GL 的范围内,实例中未显示)。

[0092] 在一个实施例中,需要达到至少两个参数,较佳强度参数和尺寸参数,以便鉴别信号发射物体。一旦鉴别出信号发射物体达到了预定的选择标准,即选出这些物体,并由其推算出数量值。在一个实施例中,将其强度的均方根值相加;较佳用预定的标准化因子使此相加得到的强度值标准化(例如,通过使用预定的等式(参看下文的材料与方法)),由此得到指示样品中可培养的微生物细胞的数目的数量值(即,CFU 当量)。标准化因子对于某一细胞类型或每一测试样品类型(即,每一应用)的某一组细胞具有特异性,并且是基于事先

在每一应用的控制条件下测量的测试样品中所述细胞的量测定。例如,先在对照条件下并通过将如所述从捕捉的影像获得的值与借助于例如 HPC 等常规方法得到的细胞计数 (CFU/ml) 相关,来测定某一地理位置的饮用水的标准化因子。随后,使用此标准化因子将来在所述位置进行饮用水质量的测定 (参看材料与方法)。

[0093] 根据本发明一个实施例,测定包含大肠杆菌与绿脓杆菌的混合物的测试样品的标准因子 (等式) $0.025x + 0.3375$ (x 为总荧光值的对数坐标)。

[0094] 本发明还提供测定等于测试样品中可培养微生物细胞的数目的数量值的试剂盒,所述试剂盒包含:

[0095] - 至少一种能够缔合微生物细胞的膜的信号发射剂,

[0096] - 有关使所述至少一种信号发射剂与所述样品接触达第一时间段 (T1) 的说明,所述第一时间段 (T1) 足以使所述信号发射剂内化于所述细胞中,达到使得由所述样品发射的信号基本上达到平台期的水平;

[0097] - 有关从所述样品中去除未缔合的信号发射剂的说明;

[0098] - 有关由所述样品内信号发射物体检测和选择发射信号的可培养细胞的说明,所述检测是基于针对所述可培养细胞而预定的选择参数,所述检测和选择是在所述 T1 后于第二时间段 (T2) 期间进行,并且在此期间,从样品发射的信号基本上保持在所述平台期;

[0099] - 有关使用所述所选的信号发射物体来测定测试样品中指示可培养细胞的数目的数量值的说明。

[0100] 试剂盒还可包含说明在用所述信号发射剂对样品染色之前从所述样品中去除至少一部分液体的说明。

[0101] 根据本发明的一个实施例,试剂盒包含多个信号发射剂。因此,为某一应用 (即专用于测试家用市政水的质量的试剂盒) 所特有的所述多个试剂将包括对市政水中通常发现的微生物细胞具有特异性的试剂。

[0102] 在一个实施例中,说明书包括选择待检测细胞或细胞群的指南,而且包括为所述细胞或细胞群预定的信号强度上限和 / 或信号强度范围、欲检测的物体的尺寸范围和预定的信号发射物体的形态以及选择那些满足所述指南的物体的说明。

[0103] 此外,根据这一特定方面,试剂盒可包含一个或一个以上预定细胞特异性标准化方程式,各方程式对于细菌细胞类型、真菌或其它微生物类型具有特异性;和用于由其推断 CFU 当量数量值的所述预定方程式的使用说明书。

[0104] 本发明还提供一种用于测定指示测试样品中可培养微生物细胞的数目的数量值的系统,所述系统包含:

[0105] - 载体,其用于保存样品和用于允许所述样品与一种或一种以上信号发射剂接触;

[0106] - 检测器,其用于检测样品中的信号发射物体和输出其相应数据;

[0107] - 存储单元,其包含具有预定选择参数和一个或一个以上预定细胞特异性标准化因子的数据库,各选择参数各标准化因子对于微生物细胞或一组微生物细胞具有特异性;

[0108] - 处理单元,用于从所述检测器接收输出数据和用于从所述存储单元接收选择参数和对于微生物细胞或一组微生物细胞具有特异性的所述标准化因子并且用所述参数和所述标准化因子处理所述输出数据,以由其测定等效于样品中所述可培养微生物细胞的数

目的数量值。

[0109] 所述载体可以是可保存生物学细胞的任何容器。在一个实施例中,载体包含用于从所述样品中滤除至少一部分液体并且保存半干或干燥样品的过滤器。

[0110] 本发明的检测器通常包含发光成像系统,例如能够捕捉由测试样品发射的发光信号的一个或一个以上影像的照相机。可根据本发明使用的照相机的非限制性实例包括电荷耦合装置(charge-coupled device; CCD)、CMOS检测器、光电二极管(PD)检测器、光电倍增管(photomultiplier tube; PMT)、 γ 粒子计数器、闪烁计数器或发光物体成像领域中已知的任何其它信号捕捉装置。

[0111] 影像处理单元配置成接收由测试样品发射的一个或一个以上影像并且基于信号发射物体的选择参数对其鉴别样品中可培养细胞的数目。

[0112] 如本文中所使用,术语“处理单元”表示经预编程以由样品中的信号发射物体收集测量信号参数并且进行数据分析的任何数据处理和分析实用程序,其由根据预定条件选择信号参数和基于所选选择参数输出数量值组成。为此目的,所述处理单元带有配置成进行所述分析的以电脑为基础的程序。

[0113] 在一个实施例中,影像处理单元是配置成在整个信号发射物体中选择信号强度在预定范围内、大小在预定范围内并且具有预定形态的那些物体;并且对所选信号发射物体测定均方根值强度。处理单元进一步配置成基于由所选物件发射的均方根值强度输出数量值。

[0114] 在另一实施例中,影像处理单元配置成用从数据库得到的标准化因子标准化数量值以获得等效于CFU/ml计数的标准化值。

[0115] 本发明已以说明性方式进行描述,并且应了解已使用的术语打算具有描述而非限制的词语的性质。显然,根据上述教导,本发明的许多修改和变化是可能的。因此,应了解除下文具体所述外,本发明可在随附权利要求书的范围内实践。

[0116] 除非本文另外明确指示,否则如说明书和权利要求书中所使用,形式“一(a/an)”和“所述”包括单数以及复数指示物。举例来说,术语“信号参数”包括一个或一个以上参数。

[0117] 此外,如本文中所使用,术语“包含”打算是指方法、试剂盒和系统包括所述要素,但不排除其它要素。类似地,“基本上由.....组成”用于定义方法试剂盒和系统包括所述要素,但排除在本发明的执行方面可能具有基本有效性的其它要素。“由.....组成”的意思应是排除超过微量要素的其它要素。由这些转换术语各自定义的实施例都在本发明的范围内。

[0118] 此外,所有数值(例如浓度或剂量或其范围)都是近似值,其是规定值正负变化至多20%,有时至多10%。应了解,即使不一定总是明确地规定,所有数值符号也应当作之前加上术语“约”。还应了解,尽管未必明确地规定,本文所述的试剂也仅为示范性的并且其等效物为所属领域所已知。

[0119] 非限制性示范性实施例的描述

[0120] 概要

[0121] 在以下非限制性实例中,使用包含城市用水(自来水)与预定浓度的细菌混合的样品来测定本发明的方法的效率。

[0122] 在各样品中,使用本发明的方法以及标准 CFU 计数(检查水和废水的标准方法(Standard Methods for Examination of Water & Wastewater)(勒诺 S. 克雷斯尔(Lenore S. Clescerl)(编辑),阿诺德 E. 格林堡(Arnold E. Greenberg)(编辑),安德鲁 D. 伊顿(Andrew D. Eaton)(编辑). 第 18 版,2002.)定量有活力的可繁殖微生物的量。比较结果并且本发明的方法的功效与 CFU 方法的相关性为 $R^2 = 0.997$ 。

[0123] 材料与方法

[0124] 微生物细胞:

[0125] 提供三种微生物细胞原料制剂:

[0126] 从自来水中分离出大肠杆菌(第一种制剂)和绿脓杆菌(第二种制剂)的天然形式,用于大肠杆菌、胰蛋白胍胆汁 X-葡萄糖苷酸(Tryptone Bile X-Glucuronide;TBX)培养基(普洛麦格公司(Promega)制造)和用于绿脓杆菌溴化十六烷基三甲铵琼脂(Cetrimide agar)(普洛麦格公司(Promega)制造)。第三种制剂含有常规自来水并称为微生物混合物制剂(因为其通常含有微生物混合物)。

[0127] 将培养和分离的大肠杆菌和绿脓杆菌以及自来水制剂各转移到肉汤生长培养基中并通过使用溶菌肉汤(Lysogeny broth;LB)培养基(普洛麦格公司(Promega),目录号 7290A)震荡来培育。

[0128] 用于三种制剂的培育条件:

[0129] 大肠杆菌 -35°C, 18 小时;

[0130] 绿脓杆菌 -30°C, 40 小时;

[0131] 水微生物细胞混合物 -30°C, 72 小时。

[0132] 通过离心(6,000RPM, 5 分钟),使用 Iso 标准 PBS 将培养的制剂冲洗三次。在此阶段,如通过微生物过滤 CFU 计数所测定的微生物浓度测定为约:

[0133] 10^{10} CFU/ml, 大肠杆菌;

[0134] 10^9 CFU/ml, 绿脓杆菌;和

[0135] 10^8 CFU/ml, 来源于水的微生物混合物。

[0136] 随后,用无菌 PBS 稀释微生物制剂(大肠杆菌和绿脓杆菌),同时按原样使用自来水细菌混合物制剂或用无菌自来水(通过过滤自来水通过 $0.22\mu\text{m}$ 微生物过滤器(密理博公司(Milipore)制造)制备)稀释。使用微生物过滤($0.45\mu\text{m}$ 过滤器)程序,用范围为 0.01 毫升到 1 公升的悬浮液测试体积制备异养菌平板计数(Heterotrophic Plate Count; HPC)(Standard Methods for Examination of Water & Wastewater)/勒诺 S. 克雷斯尔(Lenore S. Clescerl)(编辑),阿诺德 E. 格林堡(Arnold E. Greenberg)(编辑),安德鲁 D. 伊顿(Andrew D. Eaton)(编辑). 第 18 版,2002.)。在 PCA(普洛麦格公司(Promega),目录号 7157A)培养基上使用如下培育条件培育过滤器:

[0137] 大肠杆菌 -35°C, 24 小时;

[0138] 绿脓杆菌是 30°C, 48 小时;

[0139] 细菌混合物是 30°C, 72 小时。

[0140] CFU 计数的结果标准化为 1 公升测试体积。

[0141] 荧光染型:

[0142] 在以下实验中,使用浓度为 $1\mu\text{g/ml}$ PBS 溶液的 FM1-43 苯乙烯基染料(西川

S. (Nishikawa S.) 佐佐木 F. (Sasaki F.) 苯乙烯基染料 FM1-43 在非洲爪蟾的侧线器官的毛细胞中的内在化 (Internalization of styryl dye FM 1-43 in the hair cells of lateral line organs in *Xenopus* larvae), 组织化学与细胞化学 (Histochem Cytochem), 1996 44(7) :733-41)。

[0143] 染色方法:

[0144] 在室温 (约 25℃) 下使用 FM1-43 苯乙烯基染料进行微生物细胞制剂的荧光染色。使用细胞的单层制剂测定染色的时间和工作时间窗, 且确定信号需要 2 分钟达到信号平台期 (T1, 参见下文 T1 和 T2 的测定) 并且所述平台期在稳定状态下保持约 600 秒时间 (T1, 参见下文 T1 和 T2 的测定)。在染色结束时, 用 iso 标准 PBS 冲洗培养物三次。应注意对于过滤器表面粘着的培养物或悬浮的培养物使用相同染色方法 (即这对于单层制剂不具有特异性)。

[0145] 荧光成像:

[0146] 使用 Axiovert 200 显微镜 (卡尔蔡司公司 (Karl Zeiss)), 1.3NA Plan Neofluor X10 物镜 (BP450-490 激发过滤器 (激发: 450-490nm; 光束分离器: FT 510nm; 发射: 515-565nm; 卡尔蔡司公司 (Karl Zeiss)) 获得信号发射样品的荧光影像。

[0147] 影像捕捉:

[0148] 使用标准 Sensicam qe (柯克公司 (Cooke Corp.)) 512×512CCD 捕捉影像。

[0149] 影像处理:

[0150] 使用 ImagePro+ 软件 (2002) 进行影像处理和数据收集。

[0151] T1 和 T2 的测定:

[0152] 为测定 T1, 由原料制剂制备三种样品, 即包含天然存在于自来水中的细菌混合物的自来水样品 (在如上文所述培养于培养基上和用 PBS 洗涤后); 分离的大肠杆菌的第二样品 (在如上文所述培养和用 PBS 洗涤后); 和分离的绿脓杆菌的第三样品 (在如上文所述培养和用 PBS 洗涤后)。

[0153] 根据 HPC 方法分析来自各原料制剂的样品, 获得相应常规 CFU/ml 计数。

[0154] 随后用 PBS 稀释各样品, 获得约 1000CFU/ml 浓度的样品。随后用 FM1-43 对各样品染色并且每 10 秒以单层成像 (如上文所述) 直到由单层发射的信号达到平台期。信号达到平台期的时刻测定为 T1。

[0155] T2 的测定

[0156] 在另一组从三种制剂稀释的三种所述样品中, 在样品染色后约 110 秒, 用 PBS 洗涤样品, 并且在 10 秒的时间顺序以单层成像, 直到信号开始消退。信号开始消退的时间点测定为 T2。

[0157] 以上程序重复三次。绘制在测量阶段期间捕捉的信号强度并且结果在图 1 中展示。

[0158] CFU 当量的测定:

[0159] 为鉴别 CFU 当量 (即用标准 CFU/ml 计数校准本发明的测量), 收集和使用来自三处不同地理位置 (A、B 和 C) 的自来水的总共三种样品。如上文关于 T1 测定所述制备来自各位置的制剂, 获得分离的大肠杆菌和绿脓杆菌样品以及细菌混合物样品。对于各位置, 基于 HPC 方法推测各细菌细胞的浓度或各制剂的总细菌计数 (即获得稀释前的 TBC), 接着用

无菌水稀释来自细菌混合物制剂的样品（即来自各位置，总共 3 个），获得四个近似浓度，1000CFU/ml、100CFU/ml、10CFU/ml 和 1CFU/ml，即总共 12 个样品。

[0160] 根据 HPC 方法并且也根据本发明的方法分析 12 个样品的每一者。在后者情况下，如上文所述用 FM1-43 对各样品染色，120 秒后用无菌水洗涤（即在平台期开始时）并且立即成像（在约 150-180 秒时）。根据信号选择参数处理影像。具体来说，一旦捕捉到影像，就对满足选择参数的物体计数，并且测定其均方根强度。选择的结果在下表 1A-1B 中提供。

[0161] 将从以上制备的样品中分离的大肠杆菌和绿脓杆菌确切地处理成细菌混合物样品。观察到变化的动力学类似于细菌混合物，并且由类似浓度的细菌混合物样品获得的信号不存在显著变化（数据未显示）。

[0162] 本发明的方法的验证

[0163] 由如上文所述的三处不同位置制备总共 48 个微生物测试样品（每一位置得到 4 个样品，每一样品一式三份）。具体来说，用无菌水 $\times 10$ 、 $\times 100$ 稀释或不稀释来自各位置的制剂（细胞浓度未知）。同样，从各位置，通过用 0.22 μm 筛网过滤器（硝基纤维素，密理博 (Milipore) 制造）对原料制剂的一个样品灭菌。

[0164] 随后用 FM1-43 对各测试样品染色，用无菌水洗涤并使用常规 HPC 方法或如上文所述的本发明的方法分析。结果在下表 2 中展示。

[0165] 荧光测量

[0166] 所有荧光测量和相应 CFU 计数都在室温（约 25°C）下进行。

[0167] 成像和信号处理

[0168] 出于影像分析目的，当通过对应于 12-28 像素（在这些非限制性实例中所用的特定设置下）的光学显微镜观察时，微生物信号发射物体（即计数用的物体）测定为大小为 0.8-1.5 μm 。这些是选择标准。

[0169] 在本文所提供的非限制性实例中，除非另有规定，否则样品在染色后 150 到 180 秒（即在染色 2 分钟后不久）成像。此外，对于 254 灰度级（或介于 60-254GL 之间）的“微生物物体”的最大荧光强度校准曝光时间。曝光时间调整为 0.8 秒。

[0170] 使用平均计算和标准偏差（以 % 表示）测定数量值。

[0171] 结果

[0172] 本发明是基于以下了解：可繁殖（可培养）微生物细胞可将细胞外细胞壁的脂质部分内化于细胞内并进行浓缩一段时间（比不可培养的微生物细胞快）。膜运输速率和其细胞内浓度水平与细胞活性有关，在可繁殖微生物中极高。因此，发明者已设想这一现象可用于区别样品中有活力的可繁殖细胞和定量所述细胞的量。

[0173] T1 和 T2 的测定：

[0174] 图 1 展示直到信号达到平台期时 FM1-43 的累积是在染色后约 120 秒。因此这个时间点标记为 T1。

[0175] 稳定细胞内染料累积在平台期开始 115 到 550 秒的时间窗内维持稳定。换句话说，细胞混合物的细胞内隔室内的荧光染料累积在 115 秒后变得稳定且照那样保持至少 550 秒。因此，已确定，对于液体样品中的大肠杆菌和 / 或铜绿假单胞菌 (*Sp. Aeruginosa*) 的定量测定，约 115 至约 550 秒的时间窗是有效测量窗 T2。

[0176] CFU 当量的测定：

[0177] 处理如上文所述用于测定 CFU 当量的 12 个微生物样品的影像,从其中选择满足预定选择标准的物体(即当通过对应于 12-28 像素、254 灰度级的最大强度的光学显微镜观察时,大小为 0.8-1.5 μm)。

[0178] 所选物件的强度的所测定均方根值以及通过常规 HPC 方法获得的 CFU/ml 计数包括在表 1A-1B 中。基于对于原料制剂获得的 CFU/ml 计数测定近似浓度。通过位置 (A、B 或 C) 和每一位置的样品数目 (X1、X2 或 X3) 鉴别不同样品。

[0179] 表 1A :细菌混合物样品的分析

[0180]

近似浓度	样品识别符	强度 (GL)	所选物件的数目	常规 CFU/ml 计数
1000	A1	64, 195	599	157
1000	B1	67, 375	624	170
1000	C1	65, 772	628	169
100	A2	6, 797	62	15
100	B2	7, 818	71	24
100	C2	6, 608	60	14
10	A3	878	8	3
10	B3	946	9	5
10	C3	639	6	2
1	A4	73	0	0
1	B4	78	0	0
1	C4	24	0	0

[0181] 表 1B :大肠杆菌或绿脓杆菌的分析

	微生物细胞类型	近似浓度	强度 (GL)	所选物体的数目	常规 CFU/ml 计数
[0182]	大肠杆菌	1000	48,572	641	336
	大肠杆菌	100	5,827	77	45
	大肠杆菌	10	543	8	3
	大肠杆菌	1	42	1	0

[0183]

绿脓杆菌	1000	18, 366	167	88
绿脓杆菌	100	1, 660	15	9

绿脓杆菌	10	118	2	10
绿脓杆菌	1	7	0	5

[0184] 表 1A 中所提供的结果也在图 2 中呈现,图 2 展示通过标准 HPC 方法获得的 CFU/ml 值与通过本发明的方法获得的数量值之间的相关性。图 2 具体展示两种测量方法之间的相关性可通过以下方程式呈现:

[0185] $y = 0.025x + 0.3375$,

[0186] 因此,这一方程式确定为定量测定来自城市用水系统的自来水样品中的微生物混合物的标准化因子。

[0187] CFU 当量法的验证

[0188] 为验证以上方程式对于未知自来水样品的准确性,使用来自如上文所述的不同位置的城市用水的样品进行另一测定,然而不推测细菌浓度。从每一位置获得三个样品。所有样品都如材料与方法中所述进行稀释(用于验证步骤的制剂)并且平行测试以根据本发明的方法使用以上所鉴别的标准化方程式测定 CFU 当量计数和测定标准 CFU 计数。应注意通过一式三份组的样品位置、稀释和样品数目来鉴别样品,即对于各位置 A、B 或 C,和对于各稀释度,例如 A₁、A₂、A₃、A₄,使用一式三份, A1_a、A1_b、A1_c。因此,举例来说,样品 A1a 表示来自位置 1 并且未稀释的三个样品之一。

[0189] 结果在表 2 中呈现,其提供 CFU 当量计数(本发明的方法)和各种液体样品的标准 CFU 计数之间的比较。

[0190] 表 2:CFU 当量和标准 CFU 计数

[0191]

稀释度	样品识别符	总强度 (GL)	CFU 当量*	标准 CFU/ml 计数
1 : 1	A1a	61,286	153.5525	161
1 : 1	A1b	59,178	148.2825	152
1 : 1	A1c	89787	224.805	230
1 : 1	B1a	74897	187.58	192
1 : 1	B1b	65423	163.895	175
1 : 1	B1c	88002	220.3425	214
1 : 1	C1a	55987	140.305	135
1 : 1	C1b	54254	135.9725	141
1 : 1	C1c	61,120	153.1375	149
1 : 10	A2a	10021	25.39	22

1 : 10	A2b	8, 547	21. 705	24
1 : 10	A2c	7, 589	19. 31	17
1 : 10	B2a	14, 250	35. 9625	39

[0192]

1 : 10	B2b	11, 240	28. 4375	27
1 : 10	B2c	9, 520	24. 1375	24
1 : 10	C2a	9, 054	22. 9725	22
1 : 10	C2b	8, 041	20. 44	18
1 : 10	C2c	7, 560	19. 2375	21
1 : 100	A3a	758	2. 2325	4
1 : 100	A3b	658	1. 9825	1
1 : 100	A3c	589	1. 81	2
1 : 100	B3a	890	2. 5625	4
1 : 100	B3b	509	1. 61	1
1 : 100	B3c	787	2. 305	3
1 : 100	C3a	587	1. 805	3
1 : 100	C3b	541	1. 69	1
1 : 100	C3c	657	1. 98	4

[0193] * 使用以上所鉴别的方程式测定 : $y = 0.025x + 0.3375$

[0194] 如图所示,对于所有测试样品来说,通过本发明的方法获得的数量值(即 CFU 当量)与通过常规 HPC 方法获得的值之间的差都小于 10%。测得相关性为 $R^2 = 0.9978$,这证实根据本发明的方法的 CFU 当量计数可可靠地用于几乎实时 CFU 计数。

[0195] 表 2 中的结果也绘制成图,以图 3A(◆表示 CFU 当量,■表示标准 CFU)提供,CFU 当量与标准 CFU 之间的相关性在图 3B 中呈现。

[0196] 用于可繁殖微生物定量的标准 CFU 计数和 CFU 当量的测定的比较

[0197] 根据本发明的 CFU 当量提供液体样品中微生物的快速且几乎实时定量的平均值。不仅 CFU 当量耗时比标准 CFU 计数法短,而且接收结果的时间几乎是实时(5 到 10 分钟,相比之下,使用标准 CFU 计数时是数天)。

[0198] 此外, 获得 CFU 当量计数将成本更低, 可以是自动化过程, 其不需要大量工作空间并可在测试区域附近进行测定。比较结果在图 3A 和图 3B 中展示。具体来说, 图 3A 展示两种测量技术之间存在接近线性相关性, 即 $R^2 = 0.9978$, 且图 3B 展示对于各样品, 通过各方法 (HPC 或本发明的方法) 获得的值几乎重叠。因此, 推断本发明的方法可以可靠地提供 CFU 当量值。

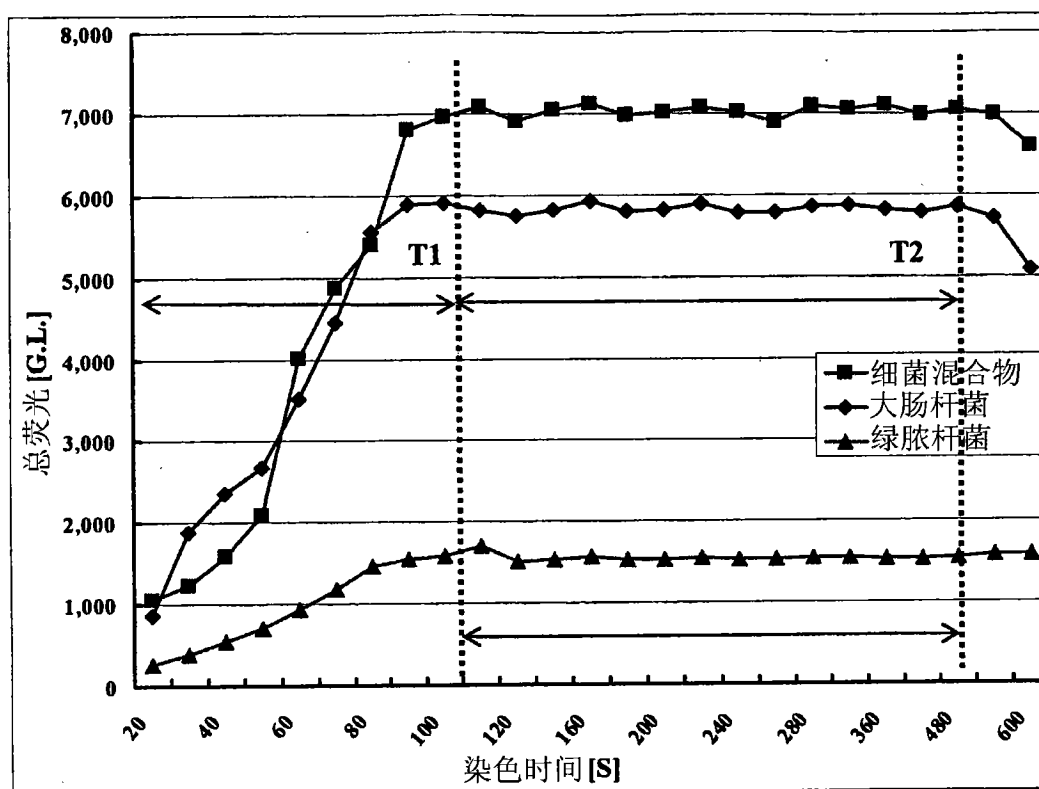


图 1

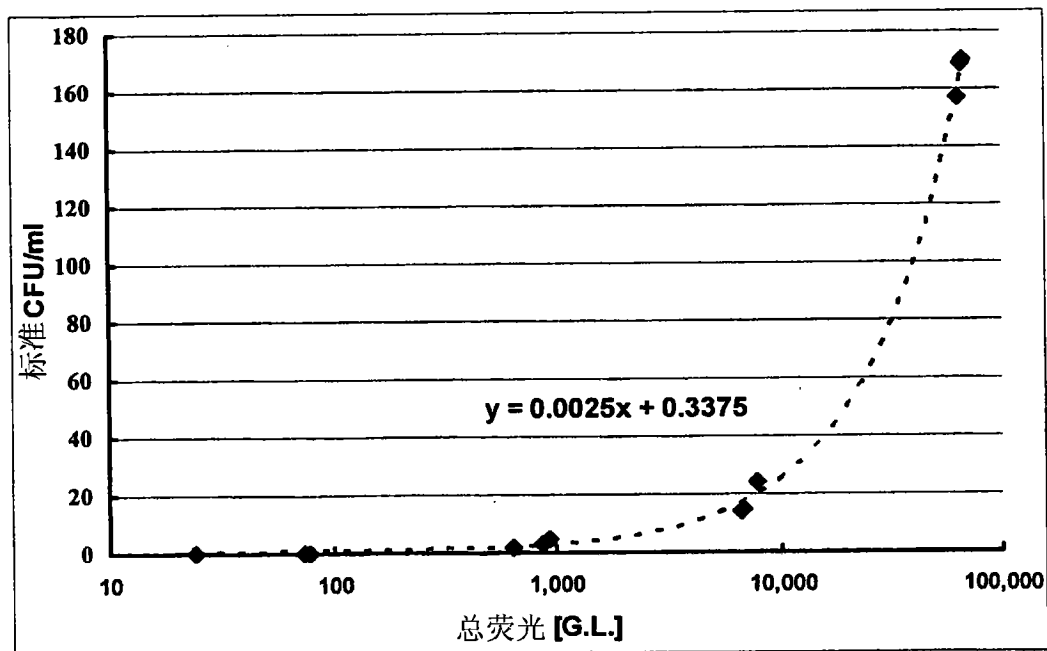


图 2

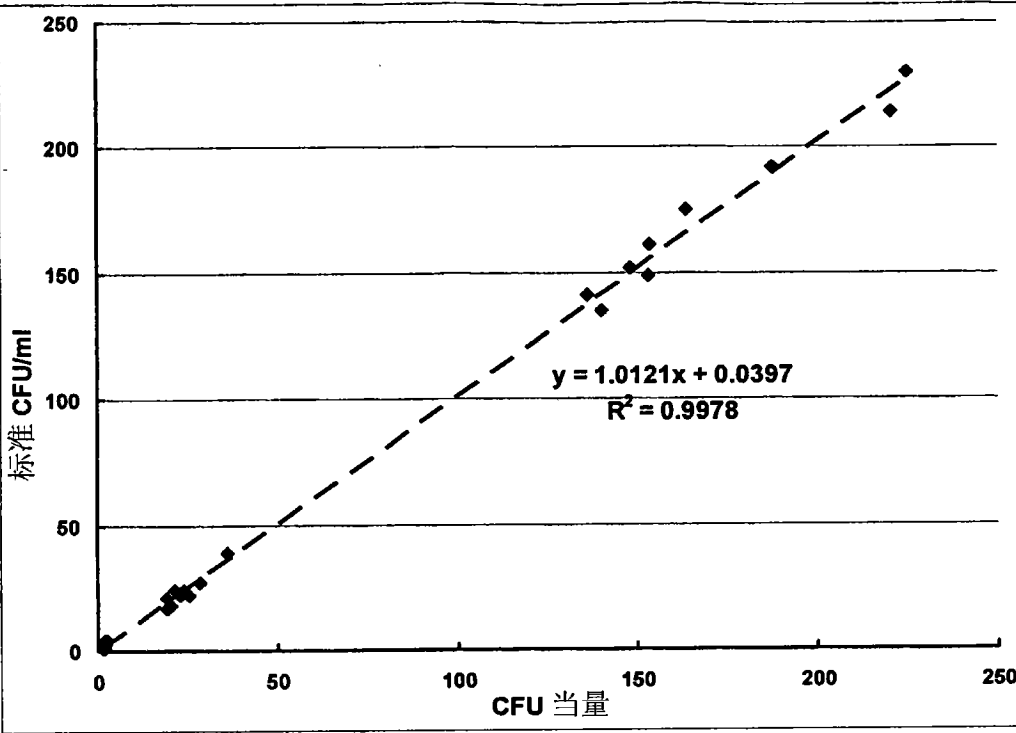


图 3A

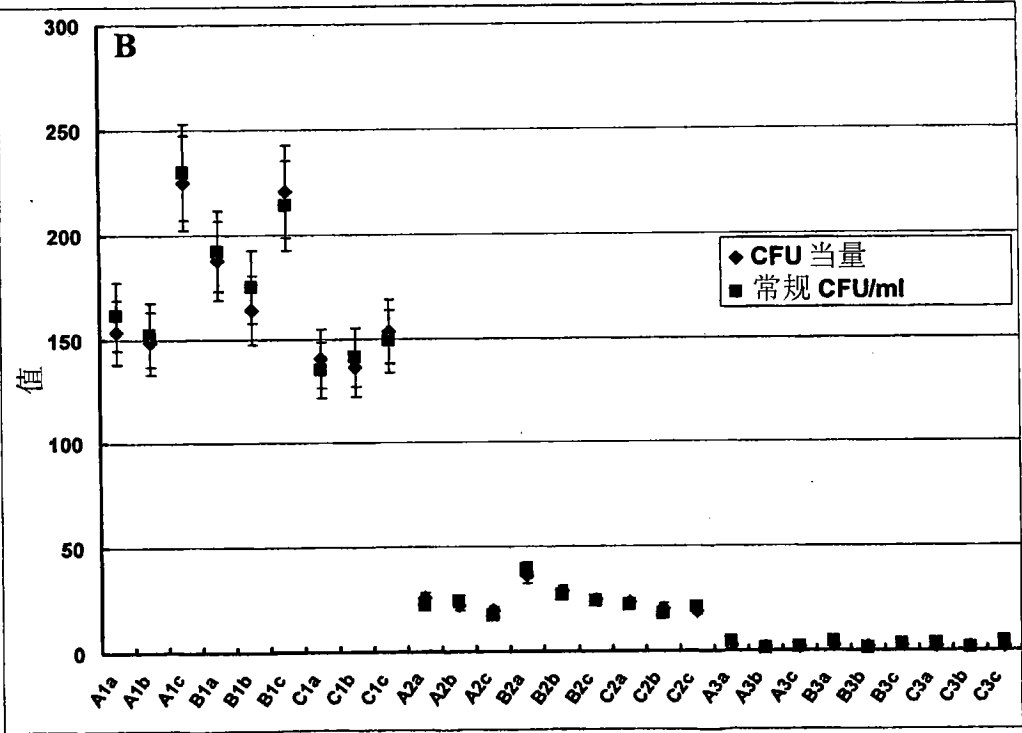


图 3B