



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110760559 B

(45) 授权公告日 2023. 11. 17

(21) 申请号 201810846586.1

(22) 申请日 2018.07.27

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 110760559 A

(43) 申请公布日 2020.02.07

(73) 专利权人 张元珍

地址 100050 北京市东城区永定门东京东里东10楼3单元302室

(72) 发明人 唐明忠 张元珍

(74) 专利代理机构 北京三聚阳光知识产权代理

有限公司 11250

专利代理师 李敏

(51) Int. Cl.

C12Q 1/18 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 105358982 A, 2016.02.24

US 2015010940 A1, 2015.01.08

US 2018195964 A1, 2018.07.12

US 4236211 A, 1980.11.25

夏晓华等. 流式细胞术应用于金黄色葡萄球菌体外药敏试验的初步研究.《中国人兽共患病杂志》.2003, (第04期),

向丽等. 细菌药敏试验MTT法与常量稀释法比较性研究.《泸州医学院学报》.2006, (第01期),

顾怡明等. 美罗培南的体外抗菌活性研究.《中国抗生素杂志》.2004, (第12期),

高鸣等. 应用流式细胞仪检测结核分枝杆菌对左氧氟沙星的敏感性.《现代医院》.2011, (第11期),

王峰等. 微孔板阿尔玛蓝显色法检测速生长分枝杆菌药物敏感性.《现代医院》.2013, (第07期),

马筱玲等. 流式细胞术检测抗生素最低抑菌浓度.《中华微生物学和免疫学杂志》.2004, (第01期),

审查员 李煦颖

权利要求书1页 说明书7页 附图2页

(54) 发明名称

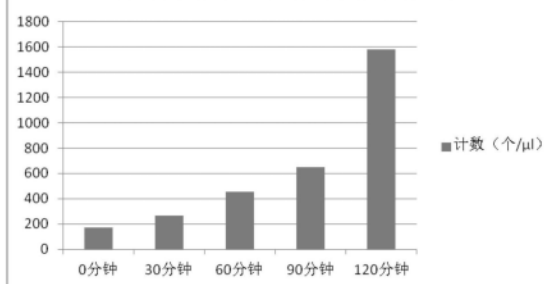
一种快速微生物抗生素敏感性检测方法

(57) 摘要

本发明提供了一种快速微生物抗生素敏感性检测方法,采用不同浓度的待测抗生素分别与待测微生物悬浮液混合并孵育,与不含待测抗生素的阳性对照相比,当活体待测微生物受抗生素抑制细胞个数降低的百分率达到20%以上时,对应的所述待测抗生素的浓度为待测微生物的最小抑菌浓度;本发明提出的上述的快速微生物抗生素敏感性检测方法,所述方法可在3小时内即确定待测微生物的最小抑菌浓度(MIC),且与常规的方法测定的结果一致,测定的结果稳定可靠,可以在短时间内测定微生物对抗生素的敏感性,适合于临床实践,解决了现有技术中的微生物抗生素敏感性检测方法时间长,不适于临床实践的缺陷,且成本低,易操作,应用范围广。

CN 110760559 B

大肠杆菌生长活体细胞个数变化



1. 一种快速微生物抗生素敏感性检测方法,其特征在于,采用不同浓度的待测抗生素分别与待测微生物悬浮液混合并孵育30分-180分,与不含待测抗生素的阳性对照相比,活体待测微生物受抗生素抑制细胞个数降低的百分率达到20%以上时,对应的所述待测抗生素的浓度为待测微生物的最小抑菌浓度;

待测微生物悬浮液的浓度为0.4-0.6个麦氏单位;

采用不同浓度的待测抗生素分别与待测微生物悬浮液混合后,含菌量为 $(4-6) \times 10^5$ cfu/ml。

2. 根据权利要求1所述的快速微生物抗生素敏感性检测方法,其特征在于,活体待测微生物受抗生素抑制细胞个数降低的百分率达到40%以上时,对应的所述待测抗生素的浓度为待测微生物的最小抑菌浓度。

3. 根据权利要求1所述的快速微生物抗生素敏感性检测方法,其特征在于,活体待测微生物受抗生素抑制细胞个数降低的百分率达到50%以上时,对应的所述待测抗生素的浓度为待测微生物的最小抑菌浓度。

4. 根据权利要求1所述的快速微生物抗生素敏感性检测方法,其特征在于,活体待测微生物受抗生素抑制细胞个数降低的百分率达到60%以上时,对应的所述待测抗生素的浓度为待测微生物的最小抑菌浓度。

5. 根据权利要求1-4任一项所述的快速微生物抗生素敏感性检测方法,其特征在于,所述孵育的时间为60分-120分。

6. 根据权利要求5所述的快速微生物抗生素敏感性检测方法,其特征在于,所述孵育的时间为90分。

7. 根据权利要求1所述的快速微生物抗生素敏感性检测方法,其特征在于,待测微生物悬浮液的浓度为0.5个麦氏单位。

8. 根据权利要求1所述的快速微生物抗生素敏感性检测方法,其特征在于,含菌量为 5×10^5 cfu/ml。

9. 根据权利要求1-4任一项所述的快速微生物抗生素敏感性检测方法,其特征在于,采用流式细胞仪或荧光显微仪器检测活体待测微生物细胞个数。

10. 根据权利要求1-4任一项所述的快速微生物抗生素敏感性检测方法,其特征在于,所述孵育的温度为34-36℃。

11. 根据权利要求10所述的快速微生物抗生素敏感性检测方法,其特征在于,所述孵育的温度为35℃。

一种快速微生物抗生素敏感性检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于微生物耐药性检测领域,具体涉及一种快速微生物抗生素敏感性检测方法。

背景技术

[0002] 微生物在抗生素等外部环境压力下的响应特征,对生态安全性评估等十分重要,一直以来受到人们的关注。由于抗生素的滥用,微生物的耐药问题越来越严重,并快速在全球范围内广泛传播,因此,在响应特征中,目前最受关注的是微生物的耐药性。合理使用抗生素是应对微生物耐药的最核心工作,而快速的微生物抗生素敏感性检测是重中之重。因此,人们开发和应用了各种快速检测方法,用于测定抗生素敏感性或者最小抑制浓度(MIC)。

[0003] 抗生素敏感性检测的本质是观察抗生素对细菌生长、新陈代谢和繁殖的影响,根据体外试验观察到的抗生素对细菌生长、新陈代谢和繁殖的影响的情况,结合临床和药代学的情况推断未来用药的有效性。传统方法有扩散法和稀释法,稀释法在培养基中添加不同浓度的抗生素,通过肉眼观察液体培养基浊度或固体培养基上菌落生长情况来评估微生物对抗生素的抑制特性。上述方法的缺点是耗时较长,一般培养需要过夜,样品或试剂消耗量较大。除了上述方法之外,还可以采用E-test抑菌试纸条,通过在试纸条上固定浓度梯度的抗生素,结合平板培养方法,通过抑菌圈与纸条交点读出MIC值。上述抑菌试纸条的缺点是同样是培养时间较长。由上述可知,传统的抗生素敏感性检测方法的检测时间均较长,不能迅速的给予病患有效的治疗方案,限制了其应用广泛性。

[0004] 为了缩短抗生素敏感性检测时间,国内外进行了大量的研究,已经探索了多种抗生素敏感性检测方法,如质谱法、振动悬臂微生物细胞称重法、等温微量产热法、磁珠旋转法、微滴检测法、实时PCR法、微阵列法、RNA测序法和噬菌体法等。但上述的方法目前只处于研究阶段,仅能进行小样本分析,并且都需要专业技术人员操作,仪器昂贵,并且是非传统的专用设备,操作复杂,性能不稳定,成本高,使用不方便,还不能广泛的应用。目前,临床上多采用全自动抗生素敏感性检测方法,其中法国梅里埃公司VITEK系统和美国BD公司Phoenix系统是最快的检测系统,其原理是光学比浊法或比色法,两个系统的可靠性和准确性已被证明,VITEK系统平均检测时间为9.8小时,Phoenix系统平均检测时间为12.1小时。上述两系统的检测时间虽然已经大大缩短,但考虑到医生工作流程和作息时间,实际上医生只能在第二天根据检测结果针对性选择用药,不能尽快的将经验性广谱抗生素治疗切换为靶向治疗,容易延误病情,导致病患死亡或提高医疗成本。鉴于质谱技术和核酸技术临床广泛应用,使细菌鉴定快速化已经基本实现,因此,上述的两系统的抗生素敏感性检测时间制约了临床实践。

[0005] 为此,本发明提出了一种快速微生物抗生素敏感性检测方法,可以在短时间内测定微生物对抗生素的敏感性,适合于临床实践。

发明内容

[0006] 因此,本发明要解决的技术问题在于克服现有技术中的微生物的药敏检测时间长,不适于临床实践的缺陷,从而提供一种快速微生物抗生素敏感性检测方法,可以在短时间内测定微生物对抗生素的敏感性,适合于临床实践。

[0007] 为此,本发明提供了一种快速微生物抗生素敏感性检测方法,采用不同浓度的待测抗生素分别与待测微生物悬浮液混合并孵育,与不含待测抗生素的阳性对照相比,活体待测微生物受抗生素抑制细胞个数降低的百分率达到20%以上时,对应的所述待测抗生素的浓度为待测微生物的最小抑菌浓度。

[0008] 所述的快速微生物抗生素敏感性检测方法,活体待测微生物受抗生素抑制细胞个数降低的百分率达到40%以上时,对应的所述待测抗生素的浓度为待测微生物的最小抑菌浓度。

[0009] 所述的快速微生物抗生素敏感性检测方法,活体待测微生物受抗生素抑制细胞个数降低的百分率达到50%以上时,对应的所述待测抗生素的浓度为待测微生物的最小抑菌浓度。优选的,活体待测微生物受抗生素抑制细胞个数降低的百分率达到60%以上时,对应的所述待测抗生素的浓度为待测微生物的最小抑菌浓度。

[0010] 所述的快速微生物抗生素敏感性检测方法,所述孵育的时间为30分-180分。

[0011] 所述的快速微生物抗生素敏感性检测方法,所述孵育的时间为60分-120分。优选的,所述孵育的时间为90分。

[0012] 所述的快速微生物抗生素敏感性检测方法,待测微生物悬浮液的浓度为0.4-0.6个麦氏单位。优选的,待测微生物悬浮液的浓度为0.5个麦氏单位。

[0013] 所述的快速微生物抗生素敏感性检测方法,采用不同浓度的待测抗生素分别与待测微生物悬浮液混合后,含菌量为 $(4-6) \times 10^5$ cfu/ml。优选的,含菌量为 5×10^5 cfu/ml。

[0014] 所述的快速微生物抗生素敏感性检测方法,采用流式细胞仪或荧光显微仪器检测活体待测微生物细胞个数。

[0015] 所述的快速微生物抗生素敏感性检测方法,所述孵育的温度为34-36℃。优选的,所述孵育的温度为35℃。

[0016] 本发明技术方案,具有如下优点:

[0017] 1. 本发明提供了一种快速微生物抗生素敏感性检测方法,采用不同浓度的待测抗生素分别与待测微生物悬浮液混合并孵育,与不含待测抗生素的阳性对照相比,活体待测微生物细胞个数降低的百分率达到20%以上时,对应的所述待测抗生素的浓度为待测微生物的最小抑菌浓度;本发明研究发现,当向微生物悬浮液中加入抗生素孵育6分钟后,微生物的活体细胞数量具有统计学意义的抗生素效应变化,当与不含待测抗生素的阳性对照相比,活体待测微生物受抗生素抑制细胞个数降低的百分率达到20%以上时,对应的所述待测抗生素的浓度与通过现有的VITEK、Etest法测定的最小抑菌浓度相当,为此本发明提出了上述的快速微生物抗生素敏感性检测方法,所述方法可在3小时内即确定待测微生物的最小抑菌浓度(MIC),且与常规的方法测定的结果一致,测定的结果稳定可靠,可以在短时间内测定微生物对抗生素的敏感性,适合于临床实践,解决了现有技术中的抗生素敏感性检测方法时间长,不适于临床实践的缺陷,且成本低,易操作,应用范围广。

[0018] 2. 本发明提供了一种快速微生物抗生素敏感性检测方法,活体待测微生物受抗生

素抑制细胞个数降低的百分率达到60%以上时,对应的所述待测抗生素的浓度为待测微生物的最小抑菌浓度,所述的最小抑菌浓度与采用常规检测的最小抑菌浓度完全一致,正确率达到了100%。

[0019] 3.本发明提供一种快速微生物抗生素敏感性检测方法,选择孵育时间为90分钟后进行活体待测微生物细胞个数检测,不同的微生物达到活体待测微生物细胞个数降低的百分率达到60%的孵育时间不同,但常见的微生物均可在孵育90分钟后达到与阳性对照相比,待测微生物细胞个数降低的百分率达到60%以上,抗生素敏感性测所用的时间短。

附图说明

[0020] 为了更清楚地说明本发明具体实施方式或现有技术中的技术方案,下面将对具体实施方式或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图是本发明的一些实施方式,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0021] 图1是本发明实验例1中的大肠杆菌不同时间活体菌数变化柱状图;

[0022] 图2是本发明实验例1中的大肠杆菌不同时间浊度变化柱状图;

[0023] 图3是本发明实验例2中的大肠杆菌对氨苄西林敏感性测试结果。

具体实施方式

[0024] 下述实施例中涉及到的主要仪器:用于检测活体待测微生物细胞个数的流式细胞仪(BD公司FACSCantoII),荧光显微仪器(奥林巴斯荧光显微镜BX43),比浊度仪(BD公司PhoenixSpec Nephelometer)。

[0025] 下述实施例中涉及到的抗生素如氨苄西林、肉汤如AST肉汤或MH肉汤、荧光染料均为市售产品,本发明的技术方案采用不同厂家或型号的上述产品均不会产生明显的不同。

[0026] 下述实施例中涉及到的抗生素敏感性检测用菌种的准备:将菌株接种到血琼脂培养基上,并在35℃的环境下孵育18小时,备用。所述菌株分别为ATCC25922大肠杆菌、ATCC25923金黄色葡萄球菌和ATCC27853绿脓杆菌。

[0027] 抗生素敏感性检测用肉汤的制备:准备12个药敏试验管,每个药敏试验管中含有等量的药敏试验用肉汤如AST肉汤或MH肉汤,其中10个药敏试验管中依次含有具有浓度梯度的待测抗生素,不同种类待测抗生素具体浓度指标按照美国CLSL标准文件M100描述的抗生素浓度要求进行。如抗生素氨苄西林,其对应浓度依次为0.5、1、2、4、8、16、32、64、128和256,单位 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。1个药敏试验管中不含待测抗生素,作为阳性对照,1个药敏试验管中在检测时不加入待测微生物悬浮液,作为阴性对照。

[0028] 实施例1

[0029] 本实施例所述的一种快速微生物抗生素敏感性检测方法,包括如下步骤:

[0030] S1、制备待测微生物悬浮液,挑取备用菌种菌落ATCC25922大肠杆菌,配制成浓度为0.4个麦氏单位的菌悬液,将所述待测微生物悬浮液分别与按照美国CLSL肉汤稀释浓度配制的药敏检测用AST肉汤混合,AST肉汤中含有的抗生素为氨苄西林(其对应浓度依次为0.5、1、2、4、8、16、32、64、128和265,单位 $\mu\text{g}/\text{ml}$),控制含菌量为 $4 \times 10^5 \text{cfu}/\text{ml}$,然后将上述混合后待测微生物悬浮液、阳性对照和阴性对照置于36℃的培养箱中孵育30分钟;

[0031] S2、在孵育时间达到30分钟时,采用荧光染料标记步骤S1中混合后的待测微生物悬浮液、阳性对照和阴性对照中的活细胞,通过荧光显微仪器检测上述活体待测微生物细胞个数,与阳性对照相比,活体待测微生物细胞个数降低的百分率,当百分率达到20%以上时,所述待测抗生素所对应的浓度即为最小抑菌浓度。

[0032] 检测结果为4 μ g/ml,与VITEK、Etest法测定的最小抑菌浓度(MIC)(分别为4 μ g/ml和2 μ g/ml)相当。

[0033] 实施例2

[0034] 本实施例所述的一种快速微生物抗生素敏感性检测方法,包括如下步骤:

[0035] S1、制备待测微生物悬浮液,挑取备用抗生素敏感性菌种菌落ATCC25922大肠杆菌,配制成浓度为0.6个麦氏单位的菌悬液,将所述待测微生物悬浮液分别与按照美国CLSL肉汤稀释浓度配制的药敏检测用MH肉汤混合,MH肉汤中含有的抗生素为氨苄西林(稀释浓度同实施例1),控制含菌量为 6×10^5 cfu/ml,然后将上述混合后待测微生物悬浮液、阳性对照和阴性对照置于34 $^{\circ}$ C下孵育180分钟;

[0036] S2、在孵育时间达到180分钟时,采用荧光染料标记步骤S1中混合后的待测微生物悬浮液、阳性对照和阴性对照中的活细胞,通过流式细胞仪检测上述活体待测微生物细胞个数,与阳性对照相比,活体待测微生物细胞个数降低的百分率,当百分率达到40%以上时,所述待测抗生素所对应的浓度即为最小抑菌浓度。

[0037] 检测结果为4 μ g/ml,与VITEK、Etest法测定的最小抑菌浓度(MIC)(分别为4 μ g/ml和2 μ g/ml)相当。

[0038] 实施例3

[0039] 本实施例所述的一种快速微生物抗生素敏感性检测方法,包括如下步骤:

[0040] S1、制备待测微生物悬浮液,挑取备用抗生素敏感性菌种菌落ATCC25922大肠杆菌,配制成浓度为0.5个麦氏单位的菌悬液,将所述待测微生物悬浮液分别与按照美国CLSL肉汤稀释浓度的药敏检测用MH肉汤混合,MH肉汤中含有的抗生素为氨苄西林(稀释浓度同实施例1),控制含菌量为 5×10^5 cfu/ml,然后将上述混合后待测微生物悬浮液、阳性对照和阴性对照置于35 $^{\circ}$ C的培养箱中孵育60分钟;

[0041] S2、在孵育时间达到60分钟时,采用荧光染料标记步骤S1中混合后的待测微生物悬浮液、阳性对照和阴性对照中的活细胞,通过荧光显微仪器检测上述活体待测微生物细胞个数,与阳性对照相比,活体待测微生物细胞个数降低的百分率,当百分率达到50%以上时,所述待测抗生素所对应的浓度即为最小抑菌浓度。

[0042] 检测结果为4 μ g/ml,与VITEK、Etest法测定的最小抑菌浓度(MIC)(分别为4 μ g/ml和2 μ g/ml)相当。

[0043] 实施例4

[0044] 本实施例所述的一种快速微生物抗生素敏感性检测方法,包括如下步骤:

[0045] S1、制备待测微生物悬浮液,挑取备用抗生素敏感性菌种菌落ATCC25922大肠杆菌,配制成浓度为0.5个麦氏单位的菌悬液,将所述待测微生物悬浮液分别与按照美国CLSL肉汤稀释浓度的药敏检测用MH肉汤混合,MH肉汤中含有的抗生素为氨苄西林(稀释浓度同实施例1),控制含菌量为 5×10^5 cfu/ml,然后将上述混合后待测微生物悬浮液、阳性对照和阴性对照置于35 $^{\circ}$ C的培养箱中孵育120分钟;

[0046] S2、在孵育时间达到120分钟时,采用荧光染料标记步骤S1中混合后的待测微生物悬浮液、阳性对照和阴性对照中的活细胞,通过荧光显微仪器检测上述活体待测微生物细胞个数,与阳性对照相比,活体待测微生物细胞个数降低的百分率,当百分率达到55%以上时,所述待测抗生素所对应的浓度即为最小抑菌浓度。

[0047] 检测结果为4 μ g/ml,与VITEK、Etest法测定的最小抑菌浓度(MIC)(分别为4 μ g/ml和2 μ g/ml)相当。

[0048] 实施例5

[0049] 本实施例所述的一种快速微生物抗生素敏感性检测方法,包括如下步骤:

[0050] S1、制备待测微生物悬浮液,挑取备用抗生素敏感性菌种菌落ATCC25922大肠杆菌,配制成浓度为0.5个麦氏单位的菌悬液,将所述待测微生物悬浮液分别与按照美国CLSL肉汤稀释浓度的药敏检测用MH肉汤混合均匀,MH肉汤中含有的抗生素为氨苄西林(稀释浓度同实施例1),控制含菌量为 5×10^5 cfu/ml,然后将上述混合后待测微生物悬浮液、阳性对照和阴性对照置于35 $^{\circ}$ C的培养箱中孵育120分钟;

[0051] S2、在孵育时间达到120分钟时,采用荧光染料标记步骤S1中混合后的待测微生物悬浮液、阳性对照和阴性对照中的活细胞,通过流式细胞仪检测上述活体待测微生物细胞个数,与阳性对照相比,活体待测微生物细胞个数降低的百分率,当百分率达到80%以上时,所述待测抗生素所对应的浓度即为最小抑菌浓度。

[0052] 检测结果为4 μ g/ml,与VITEK、Etest法测定的最小抑菌浓度(MIC)(分别为4 μ g/ml和2 μ g/ml)相当。

[0053] 实施例6

[0054] 本实施例所述的一种快速微生物抗生素敏感性检测方法,包括如下步骤:

[0055] S1、制备待测微生物悬浮液,挑取备用抗生素敏感性菌种菌落ATCC25923金黄色葡萄球菌,配制成浓度为0.5个麦氏单位的菌悬液,将所述待测微生物悬浮液分别与按照美国CLSL肉汤稀释浓度的药敏检测用AST肉汤混合,AST肉汤中含有的抗生素为氨苄西林(稀释浓度同实施例1),控制含菌量为 5×10^5 cfu/ml,然后将上述混合后待测微生物悬浮液、阳性对照和阴性对照置于35 $^{\circ}$ C的培养箱中孵育90分钟;

[0056] S2、在孵育时间达到90分钟时,采用荧光染料标记步骤S1中混合后的待测微生物悬浮液、阳性对照和阴性对照中的活细胞,通过流式细胞仪检测上述活体待测微生物细胞个数,与阳性对照相比,活体待测微生物细胞个数降低的百分率,当百分率达到60%以上时,所述待测抗生素所对应的浓度即为最小抑菌浓度。

[0057] 实验例1本实验例考察采用本发明的快速微生物抗生素敏感性检测方法测定待测微生物生长变化的敏感性,包括如下步骤:

[0058] (1)、制备待测微生物悬浮液,分别挑取备用抗生素敏感性菌种菌落ATCC25922大肠杆菌、ATCC25923金黄色葡萄球菌和ATCC27853绿脓杆菌,分别配制成浓度为0.5个麦氏单位的菌悬液,将所述待测微生物悬浮液分别与按照美国CLSL肉汤稀释浓度的药敏检测用AST肉汤混合均匀,控制含菌量为 5×10^5 cfu/ml,然后将上述混合后待测微生物悬浮液置于35 $^{\circ}$ C的培养箱中孵育;

[0059] (2)、在孵育时间达到0分钟、30分钟、60分钟、90分钟、120分钟,采用荧光染料标记步骤(1)中混合后的待测微生物悬浮液中的活细胞,通过荧光显微仪器检测活体待测微生物

物细胞个数,测两次,取平均值,记录数据,同时通过比浊仪测2次浊度,取平均值,记录数据。

[0060] (3) 检测结果,细菌培养浊度和菌数变化如下表1,大肠杆菌不同时间活体菌数变化柱状图见附图1(图1中纵坐标为大肠杆菌生长活体细胞个数,单位为个/ μ l),大肠杆菌不同时间浊度变化柱状图见附图2(图2中纵坐标为大肠杆菌的浊度值)。由图1和图2比较可知,采用不同的方法观察大肠杆菌变化差异很大,采用浊度变化观察大肠杆菌生长,在120分钟内差异并不明显,检测敏感性较差,而通过检测活体细胞个数观察大肠杆菌生长,在30分钟内可检测出显著的差异,检测敏感性高,说明本发明的微生物抗生素敏感性检测方法检测敏感性高。

[0061] 表1细菌培养浊度和活体菌数变化

[0062]	ATCC25922 大肠杆菌	ATCC25923 金黄色葡萄球菌	ATCC27853 绿脓杆菌
--------	-------------------	----------------------	-------------------

[0063]	浊度值	计数(个/ μ l)	浊度值	计数(个/ μ l)	浊度值	计数(个/ μ l)	
	0 分钟	0.04	172	0.04	211	0.04	141
	30 分钟	0.05	265	0.04	254	0.04	246
	60 分钟	0.05	456	0.05	376	0.04	338
	90 分钟	0.06	647	0.06	697	0.05	668
	120 分钟	0.08	1577	0.06	963	0.06	1013

[0064] 实验例2本实验例考察采用本发明的快速微生物抗生素敏感性检测方法测定待测微生物的最小抑菌浓度与常规方法VITEK、Etest法测定的最小抑菌浓度的一致性,包括如下步骤:

[0065] (1)、制备待测微生物悬浮液,挑取备用抗生素敏感性菌种菌落ATCC25922大肠杆菌,配制成浓度为0.5个麦氏单位的菌悬液,将所述待测微生物悬浮液分别与按照美国CLSL肉汤稀释浓度的药敏检测用MH肉汤混合均匀,MH肉汤中含有的抗生素为氨苄西林(稀释浓度同实施例1),控制含菌量为 5×10^5 cfu/ml,然后将上述混合后待测微生物悬浮液、阳性对照和阴性对照置于35℃的培养箱中孵育;

[0066] (2)、在孵育时间达到0分钟、60分钟、90分钟、120分钟,采用荧光染料标记步骤(1)中混合后的待测微生物悬浮液、阳性对照和阴性对照中的活细胞,然后通过流式细胞仪检测活体待测微生物细胞个数,测两次,取平均值,记录数据,同时通过比浊仪测2次浊度,取平均值,记录数据。

[0067] (3) 检测的结果,大肠杆菌对氨苄西林敏感性测试见附图3(纵坐标为大肠杆菌生

长活体细胞个数,单位为个,横坐标为氨苄西林的浓度,单位为 $\mu\text{g}/\text{ml}$,每个浓度所对应的4个柱,从左至右依次对应0min、60min、90min、120min),由附图3中可知,在孵育到60分钟时,本发明的快速微生物抗生素敏感性检测方法检测,与阳性对照相比,活体待测微生物细胞个数降低的百分率达到60%以上时,所对应的待测抗生素的浓度为 $4\mu\text{g}/\text{ml}$,该浓度为待测微生物的最小抑菌浓度(MIC)。

[0068] 通过VITEK、Etest法测定上述的备用抗生素敏感性菌种菌落ATCC25922大肠杆菌的最小抑菌浓度,结果分别为 $4\mu\text{g}/\text{ml}$ 和 $2\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

[0069] 比较本发明的方法检测的最小抑菌浓度(MIC)与VITEK、Etest法测定的最小抑菌浓度(MIC)可知,本发明的方法检测的最小抑菌浓度(MIC)与VITEK、Etest法测定的最小抑菌浓度(MIC)一致。

[0070] (4) 结论,本发明的快速微生物抗生素敏感性检测方法检测的微生物的最小抑菌浓度与现有的VITEK、Etest法测定的最小抑菌浓度(MIC)一致,且本发明的方法可在60分钟内检测出MIC,可以在短时间内测定微生物对抗生素的敏感性,适合于临床实践。

[0071] 显然,上述实施例仅仅是为清楚地说明所作的举例,而并非对实施方式的限定。对于所属领域的普通技术人员来说,在上述说明的基础上还可以做出其它不同形式的变化或变动。这里无需也无法对所有的实施方式予以穷举。而由此所引伸出的显而易见的变化或变动仍处于本发明创造的保护范围之内。

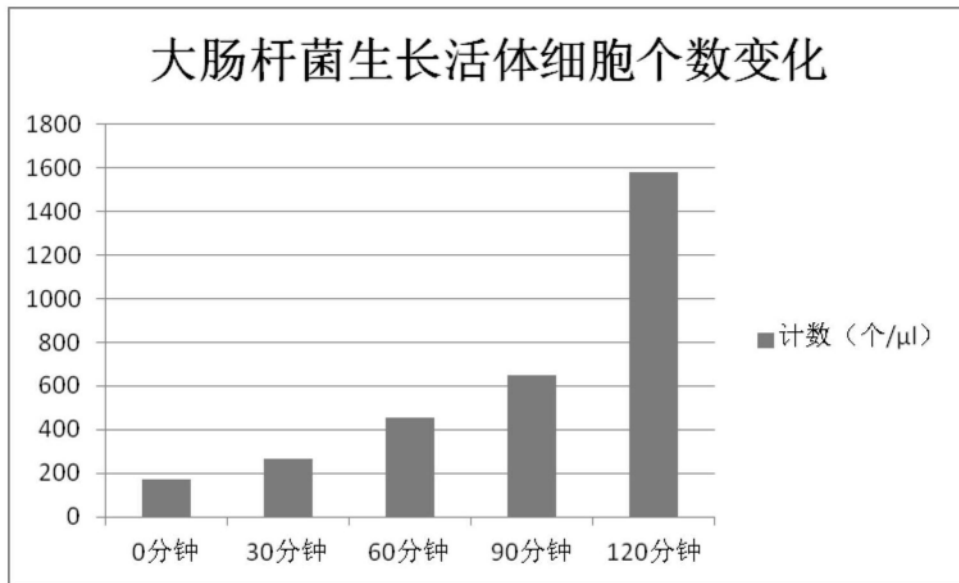


图1

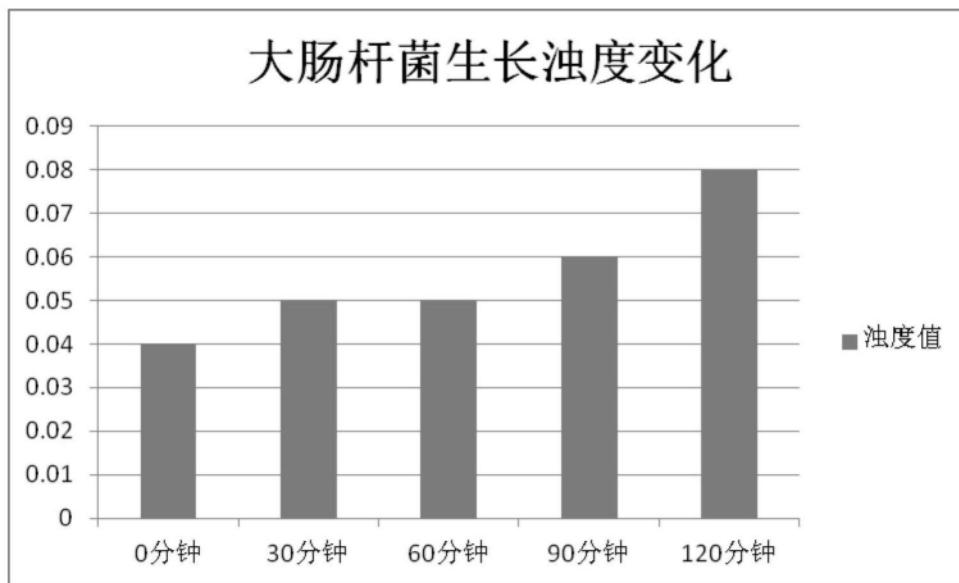


图2

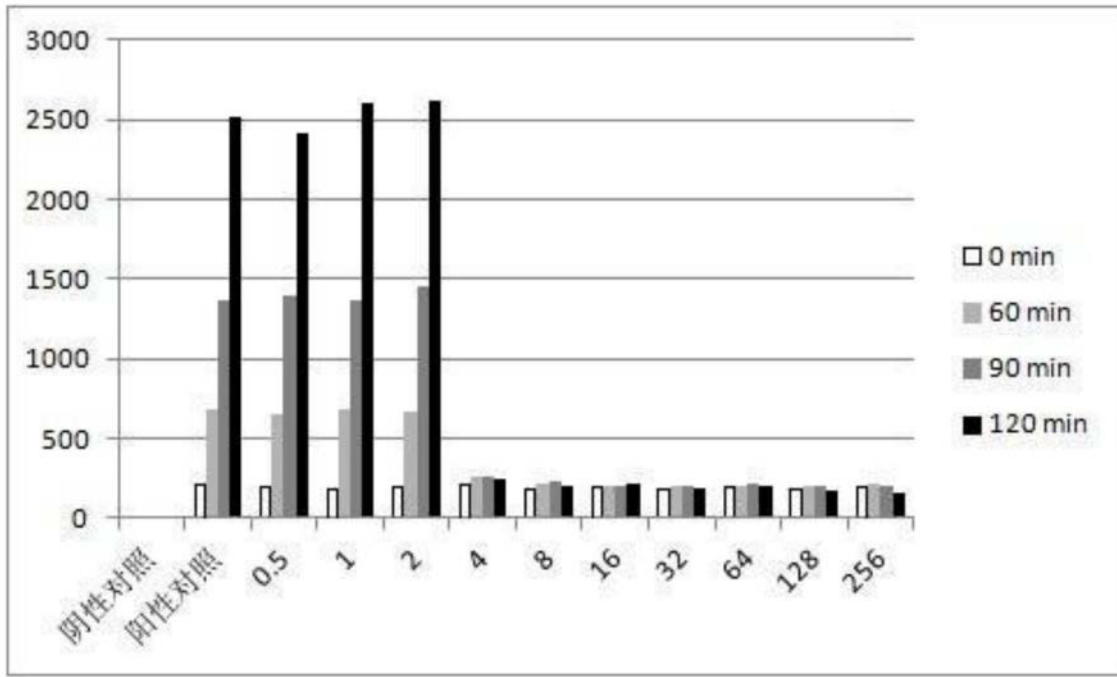


图3