



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112534060 A

(43) 申请公布日 2021.03.19

(21) 申请号 201980052246.4

C·C·C·余

(22) 申请日 2019.06.24

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

(30) 优先权数据

代理人 金德善

62/689,419 2018.06.25 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(51) Int.Cl.

2021.02.05

C12Q 1/18 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

C12Q 1/24 (2006.01)

PCT/US2019/038644 2019.06.24

G01N 1/28 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2020/005792 EN 2020.01.02

(71) 申请人 BD科斯特公司

地址 荷兰,德拉赫滕

申请人 T·R·汉森

(72) 发明人 T·R·汉森 M·凯乐斯达

M·博伊斯 T·M·威尔斯

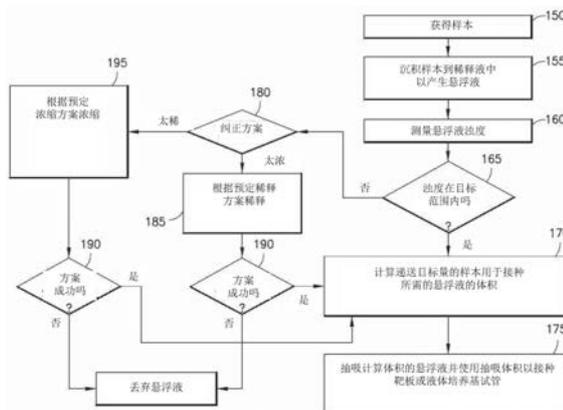
权利要求书2页 说明书10页 附图8页

(54) 发明名称

来自源悬浮液的液体培养基的直接接种方法

(57) 摘要

制备样本悬浮液的自动化方法。样本悬浮液既可用于MALDI,又可用于抗微生物剂敏感性(AST)。制备悬浮液,以及为第一分析(例如,MALDI)去除一部分该悬浮液,留下剩余体积。测量剩余体积的浊度。如果浊度低于第一阈值,则悬浮液不用于第二分析(例如,AST),并且经受浓缩方案以提高悬浮液的浊度。如果浊度在预定范围内,则计算将使预定量的样本递送到容器用于第二分析的悬浮液的体积。如果悬浮液的浊度高于预定范围,并且悬浮液未被稀释预定倍数,则根据稀释方案对悬浮液进行稀释。



1. 用于制备样本悬浮液以提供目标量样本的方法,所述方法包括:
通过将怀疑含有一种或多种微生物的生物样本与样本稀释液混合,在样本悬浮液容器中制备样本悬浮液;
测量所述制备的样本悬浮液的浊度;
确定所述测量的浊度是否在预定范围内;
基于用于培养基接种的悬浮液的预定目标浊度与所述测量的浊度的比率,乘以将预定量的生物样本递送到所述培养基中所需的所述制备的样本悬浮液的体积,计算接种所述培养基所需的制备的悬浮液的体积;以及
将所述计算的体积的所述样本悬浮液沉积到所述培养基上。
2. 根据权利要求1所述的方法,所述方法进一步包括:
如果所述制备的样本悬浮液的所述测量的浊度低于所述预定范围,则执行浓缩方案以增加所述制备的样本悬浮液的浊度并重新测量所述制备的样本悬浮液的浊度;以及
如果所述测量的浊度高于所述预定范围,则执行稀释方案以降低所述制备的样本悬浮液的浊度以及重新测量所述制备的样本悬浮液的浊度。
3. 根据权利要求2所述的方法,其中所述浓缩方案包括在重新测量所述制备的样本悬浮液的所述浊度之前,将额外样本添加到所述制备的样本悬浮液。
4. 根据权利要求2所述的方法,其中所述稀释方案包括在重新测量所述制备的样本悬浮液的浊度之前,将额外稀释液添加到所述制备的样本悬浮液。
5. 根据权利要求3所述的方法,其中所述浓缩方案进一步包括:
确定所述制备的样本悬浮液是否高于预定的体积规格;以及
在将所述额外样本添加到所述制备的样本悬浮液之前,从制备的样本悬浮液的容器去除过量的体积以提供在所述预定体积规格内的制备的样本悬浮液。
6. 根据权利要求4所述的方法,其中所述稀释方案进一步包括:
确定所述制备的样本悬浮液是否高于预定的体积规格;以及
在将所述额外稀释液添加到所述制备的样本悬浮液之前,从制备的样本悬浮液的容器去除过量的体积以提供在所述预定体积规格内的制备的样本悬浮液。
7. 根据权利要求5所述的方法,其中如果所述重新测量的浊度在浊度值的预定范围内,则基于用于培养基接种的样本悬浮液的预定目标浊度的比率,并乘以使用具有所述预定目标浊度的制备的样本悬浮液将所述预定量的生物样本递送到所述培养基中所需的所述制备的样本悬浮液的体积,计算接种所述培养基所需的制备的样本悬浮液的体积;以及
将所述计算体积的制备的样本悬浮液沉积到所述培养基上。
8. 根据权利要求6所述的方法,其中如果所述重新测量的浊度在浊度值的预定范围内,则基于用于培养基接种的样本悬浮液的预定目标浊度与所述重新测量的浊度的比率,乘以在将所述预定量的生物样本递送到所述培养基中所需的以所述预定目标浊度制备样本悬浮液的体积,计算接种培养基所需的所述制备的样本悬浮液的体积;以及
将所述计算体积的所述制备的样本悬浮液沉积到所述培养基上。
9. 根据权利要求5所述的方法,其中如果所述重新测量的浊度不在浊度值的预定范围内,则重复所述浓缩方案。
10. 根据权利要求6所述的方法,其中如果所述重新测量的浊度不在浊度值的预定范围

内,则重复所述稀释方案。

11.根据权利要求9所述的方法,进一步包括如果所述浓缩方案已经被重复了预定次数,则丢弃所述制备的样本悬浮液。

12.根据权利要求10所述的方法,进一步包括如果所述稀释方案已经被重复了预定次数,则丢弃所述制备的样本悬浮液。

来自源悬浮液的液体培养基的直接接种方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2018年6月25日提交的申请序列号为62/689,419的权益,其公开内容通过引用并入本文。

背景技术

[0003] 本文公开了一种使用单一悬浮液对生物样本(例如,血液)中的微生物进行鉴定和抗微生物剂敏感性的方法。

[0004] 作为医学诊断的常规做法,将生物样本(如血液)从患者提取并分析。根据指示,可分析样本,以例如通过血液培养(如来自Becton,Dickinson and Company的BACTEC™FX和BACTEC™9000系列)或通过划线到琼脂板上(手动或通过自动化仪器,如Becton,Dickinson and Company出售的Innova™或Inoqula)来确定样本中是否存在微生物。如果确定存在微生物,则存在医学和经济上的理由以鉴定存在的具体微生物,并为便于治疗而鉴定微生物的抗生素抗性/敏感性。

[0005] 多种微生物(其以下也将被称为微生物(microbes))(特别是细菌和单细胞真菌)可以通过质谱(“质谱”(“mass spec”))过程(如基质辅助激光解吸离子化(“MALDI”))来鉴定。在MALDI过程中,将来自以通常方式在营养培养基中培养的菌落的少量微生物转移到称为MALDI板的质谱样本支撑板上,以及然后通常通过MALDI飞行时间(TOF)直接进行质谱分析。质谱分析显示了不同的蛋白质,只要它们以足够的浓度存在于微生物中。然后,通过含有数千个参考谱的谱库(spectral libraries)的计算机化搜索,从微生物的蛋白质图谱确定微生物的身份。由于相关的微生物经常含有许多相同的蛋白质类型,所以如果库中没有用于待检查的微生物的精确物种的参考质谱,则具有较宽松相似度要求的计算机化的库搜索可以至少提供微生物的目、科或属的一些指示。MALDI过程在Ulrich Weller的标题为“体液中的病原体的鉴定”的国际公开号WO-2009/065580A1中进一步详细地描述,其内容通过引用以其整体并入本文。多种质谱仪器可用于鉴定。

[0006] 期望分析抗微生物剂在抑制来自临床样品的微生物分离物生长方面的有效性。这种分析被称为抗微生物剂敏感性试验(“AST”)。背景技术的AST技术是稀释技术,其涉及通过连续两倍稀释将细菌暴露于液体培养基中降低浓度的抗微生物剂中。抗微生物剂的最低浓度(其中没有发生可见细菌生长)被定义为最小抑菌浓度(“MIC”)。MIC是抗微生物剂敏感性的标准量度。既执行鉴定又执行AST的AST仪器(如Becton,Dickinson and Company出售的BD Phoenix™系统)是本领域已知的。

[0007] 背景技术中已知能够为这种AST过程制备样品的器械是可从Becton,Dickinson and Company获得的BD Phoenix™AP。工作流程典型地包括制备接种物,如通过标记适当的管、选择微生物菌落和在ID液体培养基管中制备浓(重,heavy)悬浮液、以及将管放置在装有AST液体培养基管的一个或多个架子中(rack)。接下来的工作流程包括执行自动比浊法以将ID管调节到0.5或0.25麦氏单位(“McF”)、向AST液体培养基添加AST指示剂、将部分样本转移到AST液体培养基、以及混合两个管。工作流程接下来包括让医护人员去除处理过的

ID和AST管、并将它们放置在具有ID/AST板(如Phoenix板)的接种平台上、以及在板中接种样品。还参见美国专利申请公开号2008/0072664A1,其内容通过引用以其整体并入本文。

[0008] 然后将板在具有受控环境(例如,受控的温度、湿度、光照量(light exposure)等)的ID/AST系统(例如,Phoenix仪器)内维持预定的时间量,以在抗微生物剂的存在下促进微生物生长。系统典型地包括分析能力,以在不破坏受控环境的维持的情况下,测量一个或多个微孔中的微生物生长。系统还可以包括将分析结果报告给附加装置以进行进一步处理的能力。这样的系统可以包括ID和AST能力,或者仅ID或仅AST能力。此外,甚至ID/AST系统也可以仅针对ID或仅针对AST结果运行。板参见,例如美国专利号5,922,593、6,096,272、6,372,485、7,115,384和6,849,422,它们的内容通过引用以其整体并入本文。

[0009] 各种实验室器械可以与诸如BD EpiCenter™的数据管理系统交流,以为实验室工作人员提供单个位置以监控来自各种实验室器械的状态和结果。及时监控、分析和交流微生物学数据可以直接影响患者护理。然而,从各种实验室器械获取、组织和交流信息是劳动密集型的。当前的信息系统甚至可能使例行鉴定和AST试验变得困难。微生物学家、感染控制官(infection control officer)、医师和药师需要立即获取聚焦于患者的(patient-focused)信息,以快速鉴定新出现的耐药性或HAI事件并对其做出反应。

[0010] 在美国专利号9,180,448中描述了制备用于MALDI和AST的通用样本悬浮液的方法和器械,该专利于2015年11月10日授权,其来自于2011年7月6日提交的且标题为“细菌鉴定的方法和器械”的申请,其被转让给Becton,Dickinson and Company。在美国专利号9,556,495中描述了为MALDI和AST获取样本并从样本中制成悬浮液的其它系统,该专利于2017年1月31日授权,其来自于2013年4月2日提交的美国专利申请序列号14/388,430,其被转让给BD Kiestra B.V.,且标题为“使用MALDI的微生物的自动选择和鉴定”。在2016年5月27日提交并被转让给BD Kiestra B.V.的WO/2016/034554中描述了另一种系统。‘448专利、‘495专利和‘554专利公开均通过引用被并入。

发明内容

[0011] 在一个实施方式中,本文描述的发明是自动化方法,其中通用样本悬浮液被用作样本源,用于鉴定确定存在于样本中的微生物的系统 and 测试它们的抗微生物剂的耐药性/敏感性的系统两者。该系统具有第一平台,该第一平台为用于微生物鉴定的质谱(例如,MALDI)过程和用于抗微生物剂敏感性试验(AST)两者制备通用悬浮液。

[0012] 根据该方法,将样本接种到稀释液中。在一个实施方式中,从培养板中挑取样本。从培养板中挑取样本对于本领域技术人员是已知的,且本文不详细描述。在WO/2016/034554中描述了从培养板中挑取样本并将样本沉积到稀释液中。

[0013] 挑取的样本被沉积到样本稀释液中。这样的稀释液是公知的,且本文不详细描述。在WO/2016/034554中描述了这样的稀释液。

[0014] 然后测量样本的浊度。比浊计用于获得浊度测量值。在WO/2016/034554中描述了使用比浊计测量浊度。如果测得的浊度在预定范围内,则将悬浮液的第一等分部分用于MALDI,并将悬浮液的第二等分部分递送至液体培养基管中用于抗生素敏感性试验(AST)。用于AST的悬浮液的体积是从悬浮液浊度计算出的,由于AST需要将一定量的CFU(菌落形成单位)的样本递送到AST液体培养基管中,所以基于悬浮液的浊度和接种样本的目标量来计

算体积。因为自动移液器施加的限制,所以预定的浊度范围是必要的。用作营养物或培养基以允许微生物在AST中生长的液体培养基是本领域技术人员公知的,且本文不详细描述。在AST中,没有微生物生长表明被测微生物对与样本悬浮液组合递送的抗生素敏感。AST液体培养基在本文中也称为培养基。

[0015] 被用于接种用于鉴定的板(例如,MALDI板)或用于抗生素敏感性试验(AST)的液体培养基管的悬浮液的量基于每单位体积悬浮液携带的样本量。一旦制成了悬浮液,如果悬浮液中样本的浓度(即,样本浊度)太高,则接种到MALDI板上或AST液体培养基管中的该样本量所需的悬浮液的体积可能会很小。小体积难以准确地移液。相反,为了用目标量的样本接种MALDI板或液体培养基管需要较大体积的非常“稀(轻,light)”的悬浮液。然而,使用常规移液器可被转移的体积是有限的。

[0016] 因此,如果递送到悬浮液中的样本量是使得悬浮液中的样本浓度(以悬浮液浊度测量的)高于预定范围(例如,约0.2麦氏单位至约2麦氏单位)的,则悬浮液经受降低浊度的稀释方案,使得悬浮液的浊度在该预定范围内。如果递送到悬浮液中的样本量是使得悬浮液的浊度低于预定范围的,则悬浮液经受浓缩方案。在一个实施方式中,浓缩方案要求获取额外的样本以增加悬浮液中样本的浓度。然而,如果没有额外的样本可获得,则浓缩方案要求悬浮液被丢弃。

[0017] 在WO/2016/034554中描述了悬浮液的制备和用这样制备的悬浮液接种MALDI板,其通过引用并入本文。MALDI过程发生在第二平台,且AST发生在第三平台。

[0018] 在为MALDI已将悬浮液的等分部分去除后,系统确定悬浮液中的多少被用于接种AST板。待引入到AST液体培养基管中的悬浮液的体积量通过由预定规格要求的样本总量确定。基于悬浮液的已知浊度和用于板接种的样本的目标量,系统计算出接种AST液体培养基管所需的悬浮液体积。然后,系统获取指定的悬浮液体积,并以该体积接种板。本文的系统和方法不需要在从悬浮液管去除用于MALDI的样本的等分部分后,将悬浮液的浊度调节到用于AST的标准麦氏单位值,这使得该方法和系统比需要在使用悬浮液接种AST液体培养基管之前将悬浮液的浊度标准化到目标麦氏单位值的系统和方法更有效且设备密集度低(less equipment-intensive)。

[0019] 该系统具有用户界面和软件,其中样本被跟踪,使得将来自第二和第三平台的测试结果与样本以及患者(从其获得了样本)相关联。系统还包括用于确定样本中是否存在微生物的平台,并且仅对其中确定存在微生物的那些样本进行进一步的处理和测试。

附图说明

[0020] 图1是描述使用悬浮液的方法的流程图,该悬浮液在用于AST的液体培养基管的接种之前不需要浊度标准化。

[0021] 图2是描述使用悬浮液的方法的流程图,该悬浮液在用于AST的液体培养基管的接种之前不需要浊度标准化,但是当初始悬浮液太浓缩时确实提供了用于制备样本悬浮液的稀释方案;

[0022] 图3是描述使用悬浮液的方法的流程图,该悬浮液在用于AST的液体培养基管的接种之前不需要浊度标准化,但是根据本发明另一个实施方式确实提供了用于制备样本悬浮液的稀释方案,其被分为图3A和图3B。图3A示例了该方法的第一部分以及图3B描述了该方

法的第二部分；

[0023] 图4示例了AST液体培养基管中的大肠杆菌 (E.coli) 浓度相对于使用图2中示例的方法的悬浮液的最终浊度；

[0024] 图5示例了AST液体培养基管中的大肠杆菌浓度相对于使用图2中示例的方法(用于仅使用一次浊度测量制成的悬浮液)的悬浮液的最终浊度；

[0025] 图6是通过图4和5的方法制备的悬浮液的AST结果的总结；以及

[0026] 图7是系统示意图。

具体实施方式

[0027] 本文公开的指的是如“Phoenix AP”的样本制备器械(下文称为样本制备或制备平台)、或如BD Phoenix™的AST系统,或指的是如“BD EpiCenter”系统的具有用户界面的数据管理系统,或指的是如“BD BACTEC™”的血液培养分析器械,或指的是如MALDI的质谱系统,但应理解,这些术语的含义不限于具有这些商标名称的器械,而是可以包括具有基本上相似功能的器械。具有基本上相似功能的器械可以包括BacT/Alert (bioMerieux) 和 VersaTREK (Trek) 血液培养系统,以及Vitek (bioMerieux) 和MicroScan (Siemens Healthcare) ID/AST系统。

[0028] 在一个实施方式中,本文描述的系统将MALDI仪器的微生物鉴定能力与实验室分析或处理系统(如Phoenix、Phoenix AP、BACTEC或EpiCenter系统)的AST和数据处理能力集成在一起。

[0029] 在另一个实施方式中,Phoenix AP被修改以不仅为Phoenix板制备AST接种物,而且为MALDI板制备相同的样本。通过确保应用到MALDI板的分离物是来自用于抗微生物剂敏感性试验的完全相同的样本,该特征提供了为在MALDI板上制备的样本进行肯定鉴定(positive identification)的自动化优势。

[0030] MALDI、样本制备、AST系统、和/或血液培养仪器与数据管理系统(如EpiCenter系统)交流。EpiCenter提供了实时数据获取和分析工具,以改善患者护理。EpiCenter能够及时监控、分析和交流微生物学数据,从而直接控制、监控和改善患者护理。Phoenix产生AST结果,且MALDI仪器产生鉴定结果。EpiCenter合并结果,并应用专家规则(expert rules)为样本产生最终的ID/AST结果。这种应用专家规则的系统的实例是BDXpert™。

[0031] 图7示出了根据本发明的实施方式的检测和分析微生物样本的系统100的框图。系统100的各种部件包括样本制备平台102(如Phoenix AP)、质谱仪104(如MALDI-TOF)、AST系统106(如Phoenix)、血液培养系统108(如BACTEC仪器)、制备的平板培养基110(例如,手动制备或由诸如Innova的系统制备)、数据管理系统112(如EpiCenter)、和实验室信息系统116(“LIS”),实验室信息系统116经由ID/AST链路114从数据管理系统112接收数据,并经由PT Info链路118将患者信息提供给数据管理系统112。

[0032] 在系统100中,样本制备系统提供有例如从制备的板挑取或从血液培养小瓶中取出的细菌。在一个实施方式中,用细菌样本过度接种小池。小池有利地被用于ID和AST的样本来源。这样可以确保不仅相同的患者样本,而且相同的分离物都经受ID和AST测试。

[0033] 样本制备平台102为ID和AST两者制备样本,而AST系统106产生AST结果,且质谱仪104产生ID结果。数据管理系统112存储ID结果和AST结果,任选地应用专家规则以产生用于

样本的最终组合的ID/AST结果,并且还与LIS系统交互。

[0034] 参考图1,过程开始于收集样本(典型地来自培养板或培养管)的步骤150,并且在步骤155,将该样本递送到悬浮液中。在步骤160测量悬浮液的浊度,以及然后在步骤165评估浊度以确定测量的浊度是否在预定范围内。因为用于接种MALDI板或液体培养基管的样本的体积受到自动移液器可准确转移的体积的限制,并且在移液器的体积限制内,所以预定范围是必要的。在这方面,当前的移液器被配置以转移不超过约10mL(即,1000 μ L)至约12mL(即1200 μ L)的悬浮液。

[0035] 如果悬浮液的浊度在目标范围内,则基于浊度读数,在步骤170,计算用必要量的样本接种液体培养基管需要的悬浮液的所需体积。在步骤175,使用移液器从悬浮液中抽取计算体积的悬浮液。如果悬浮液太稀,则接种MALDI板或液体培养基管以递送目标量的样本所需的体积将太大,以至于移液器无法容纳(至少在一次转移中)。如果悬浮液太浓(heavy),则仅需小体积的悬浮液用于MALDI板或液体培养基管的接种。小体积的抽吸和分配很难精确控制,这使得难以递送精确量的样本用于MALDI板或液体培养基管的接种。根据图1中示例的方法,在一个实施方式中,预定的浊度在约0.2麦氏单位至约2麦氏单位的范围内。如果悬浮液在该范围之外,则在步骤180指定纠正方案。如果悬浮液太浓缩的,则使悬浮液经受稀释方案185,稀释方案185将浓度降低至目标范围。稀释方案185很大程度上是设计选择的问题,并且典型地由去除一些体积的悬浮液并用稀释液代替它组成。基于浊度测量值选择悬浮液的去除体积。如果稀释方案185成功,则在步骤190,通过使用在步骤170中计算的悬浮液体积,将悬浮液用于接种AST液体培养基管。稀释方案的一个示例性实例在本文后面描述。如果稀释方案不成功,则在步骤191丢弃样本。

[0036] 如果在步骤180确定悬浮液太稀释的,则在步骤195悬浮液经受浓缩方案以增加悬浮液中样本的浓度。这种浓缩方案需要将样本添加到悬浮液中。浓缩方案195在很大程度上是设计选择的问题,并且典型地由向稀释液添加一些额外样本组成。递送到悬浮液中的额外样本的量难以精确控制,因此在浓缩方案完成后,浓缩方案可能需要额外浊度测量以确定悬浮液的浊度。如果在步骤190的方案成功,则通过在步骤170计算将目标量的样本接种到液体培养基管中所需的悬浮液体积,将悬浮液用于接种液体培养基管,并在步骤175抽吸该体积的悬浮液以接种靶板。如果浓缩方案不成功,则在步骤191丢弃样本。

[0037] 稀释方案的一个实例在本文后面描述。预期稀释方案和浓缩方案都需要在悬浮液被浓缩或稀释后进行额外的浊度测量。

[0038] 被用于接种用于鉴定的板(例如,MALDI板)或用于抗生素敏感性试验(AST)的液体培养基管的悬浮液的量基于每单位体积悬浮液携带的样本量。一旦制成了悬浮液,如果悬浮液中样本的浓度(即,样本浊度)太高(例如,约2麦氏单位或以上),则将该量的样本接种到MALDI板上或AST液体培养基管中所需的悬浮液体积可能相当小。小体积难以准确移液。

[0039] 因此,如果递送到悬浮液中的样本量使得悬浮液中的样本浓度(如通过悬浮液浊度测量)高于预定范围的上限阈值(例如,高于2麦氏单位),则悬浮液经受稀释方案以降低浊度,使得悬浮液的浊度在预定范围内。如果递送到悬浮液中的样本量是使得悬浮液的浊度低于预定范围的下限阈值(例如,低于约0.2麦氏单位),则需要额外样本以增加悬浮液中样本的浓度(如果没有额外样本可获得,则将悬浮液搁置(set aside))。

[0040] 在一个实例中,制备的悬浮液的测量的浊度在约3麦氏单位的范围内。在该示例

中,预定的浊度范围是约0.2麦氏单位至约2麦氏单位。基于该浊度测量值,系统确定以使该悬浮液经受稀释方案。

[0041] 预定的浊度范围在很大程度上是设计选择的问题。确定广泛范围的因素包括:i)用于测量浊度的器械(例如,比浊计)的准确性;ii)比浊计的读取窗口;以及iii)移液器的准确性和能力。根据该方法,制成具有较高的麦氏单位值的悬浮液,以及然后稀释以将浊度降低至将目标量的样本递送到ID或AST试验的值。

[0042] 在另一个实例中,获得样本并将其接种到悬浮液稀释液中。测量悬浮液的浊度。确定测得的浊度在预定范围内(例如,约0.2麦氏单位至约2麦氏单位)。基于接种所需的样本量,获得将目标量的样本携带到MALDI板或AST液体培养基管中的悬浮液体积。根据一个实施方式,通过从培养皿挑取一定量的菌落并将挑取的样本递送至悬浮液中来制备悬浮液。

[0043] 在另一个实例中,获得样本并将其接种到悬浮液稀释液中。确定测量的浊度低于预定范围(即,低于约0.2麦氏单位)。在此实例中,获取了额外样本并将其接种到悬浮液中以增加样本的浊度。重新测量悬浮液的浊度。如果浊度在预定范围内,则获得指定体积的悬浮液,以将目标量的样本递送到MALDI板上或AST液体培养基管中。如果调节后的浊度太高,则使用稀释方案以稀释悬浮液。如果调节后的浊度保持太低,则重复该过程(如果有待获取的剩余额外样本)。如果没有额外样本,则不使用悬浮液,并将其置于自动化过程之外。如果进行重复尝试以获得浊度在预定范围内的悬浮液不成功,则将悬浮液置于自动化过程之外。

[0044] 悬浮液稀释液的体积在很大程度上是设计选择的问题。悬浮液的体积不能太低,因为这将导致悬浮液的浊度远远高于目标浊度范围,需要多个稀释步骤以获得具有目标浊度的悬浮液。悬浮液体积的量不能太高,否则接种的悬浮液的浊度将太低,需要多个步骤以获取目标浊度范围内的悬浮液浓度。

[0045] 在一个实施方式中,样本最初被接种到其中的悬浮液稀释液的体积为约200 μ L至约400 μ L。可替代地,悬浮液稀释液体积的范围为约250 μ L至约350 μ L。在一个实例中,样本被接种到其中的悬浮液稀释液的体积为约300 μ L。

[0046] 在图2和图3中示例了具有具体浓缩/稀释方案的工作流程的实例。通常,在步骤200获取样本。在210,如果确定样本为粘液样样本,则在步骤220,将样本与稀释液混合,并在270测量其浊度(以麦氏单位计)。

[0047] 如果样本不是粘液样样本,则在步骤230稀释之前确定样本的浊度。在步骤240,如果常规样本的悬浮液的初始麦氏单位值大于2麦氏单位,或者如果怀疑含有链球菌的样本的悬浮液的初始麦氏单位值大于约1麦氏单位,则悬浮液继续进行到步骤250,其中将去离子水添加到悬浮液并混合悬浮液。如果常规样本的初始麦氏单位值小于或等于约2(或者对于怀疑含有链球菌的样本,如果初始麦氏单位值小于或等于1),则样本准备好混合并且样本继续进行到步骤220。

[0048] 在步骤250,在具有机器人移液器的自动化系统中,机器人移液器拾取1000 μ L的移液器枪头(pipette tip),并将950 μ L的去离子水分配到含有悬浮液的小池中。如果怀疑样本含有链球菌,则机器人移液器拾取1000 μ L的移液器枪头,并将495 μ L去离子水分配到含有悬浮液的小池中。在手动程序中,获得了1000 μ L的移液器枪头,并将上述量的去离子水分配到悬浮液中。

[0049] 在步骤220,获得悬浮液的1000 μ L等分部分,并通过一系列约五(5)次抽吸和约250 μ L悬浮液的分配来用于混合样本。然后将移液器枪头丢弃。

[0050] 在步骤260,将在步骤250中未被分配到悬浮液中的去离子水分配到废物中。另外,如果稀释样本的体积超过体积上限,则将多余体积的悬浮液去除。

[0051] 在步骤270,使用比浊计测量稀释的悬浮液的浊度。测量浊度和用于测量浊度的装置是本领域技术人员公知的,且本文不详细描述。在W0 2016/034554中描述了用于测量浊度的方法和器械。在图2和图3的方案中,由于样本浊度值决定了在图2和图3中示例的工作流程中如何处理悬浮液,所以导致悬浮液中样本浓度变化的任何步骤都需要新的浊度测量。

[0052] 在步骤280,评估测量的样本浊度。如果小池悬浮液的麦氏单位值小于0.2,则该悬浮液不能用于接种AST液体培养基管。系统会将样本与错误标记(error flag)链接,以确保该悬浮液不用于接种AST液体培养基管。系统将用此信息进行更新,并且将悬浮液搁置。如果悬浮液的麦氏单位值大于0.2,则该悬浮液可以潜在地用于接种AST液体培养基管。

[0053] 在步骤290,如果悬浮液的麦氏单位值大于或等于0.2但小于或等于2(如果怀疑样本含有链球菌,则该范围大于或等于0.2但小于或等于1),则该方法继续进行到步骤295,其中计算目标量的样本将被递送到AST液体培养基管中的悬浮液的接种体积。

[0054] 使用以下关系式为常规AST液体培养基计算体积:

[0055] 增加的体积 = $(0.55 \div (\text{悬浮液的测量的麦氏单位值})) \times 47.5\mu\text{L}$ (1)

[0056] 例如,如果悬浮液的测量的浊度为2.3,则用于接种AST液体培养基管的悬浮液的体积为 $(0.55 \div 2.3) \times 47.5\mu\text{L} = 11.36\mu\text{L}$ 。如果样本是链球菌AST样本,则根据以下关系式用一定体积接种液体培养基:

[0057] 增加的体积 = $(0.55 \div (\text{悬浮液的测量的麦氏单位值})) \times 25.00\mu\text{L}$ (2)

[0058] 如果麦氏单位值大于2(如果怀疑悬浮液含有链球菌,则为1),则在步骤296,确定样本已被稀释的次数。如果稀释次数小于三,则将悬浮液返回步骤250以进行进一步稀释和混合(且如果需要进一步稀释,则减少悬浮液的体积)。如果稀释次数为三(3),则由于样本已超过允许的最大稀释步骤数,因此会发出错误消息。

[0059] 图3描述了使用悬浮液接种液体培养基管而不标准化悬浮液的浊度的过程。该过程从制备的悬浮液开始,已从制备的悬浮液去除了少量悬浮液并用于接种MALDI板。参考图3A,在步骤300获得该悬浮液。在步骤310,确定在MALDI点样(spotting)之后的悬浮液的体积。实际体积根据以下关系式确定:

[0060] 实际体积 = V_s (例如,330 μL) - ((目标板点的数量 \times 悬浮液层的数量) $\times V_{\text{点}}$ [例如,3 μL]) - (层数 \times 缓冲余量(buffer margin)) - (蒸发率 \times 甲板寿命(deck life)以小时计)

(3)

[0061] 在以上方程式中, V_s 是悬浮液体积, $V_{\text{点}}$ 是沉积在MALDI板上的悬浮液的每个点体积。例如,含有悬浮液的小池(已经从小池去除足够用于靶板(target plate)上的一个点和4层的体积)的体积将为 $330\mu\text{L} - ((1 \times 4) \times 3\mu\text{L}) - (4 \times 3) - (10 \times 3) = 276\mu\text{L}$ 实际小池悬浮液体积。假设悬浮液的甲板寿命为三个小时。在步骤320,评估样本以确定其是否为粘液样样本。如果样本是粘液样的,则样本继续进行至步骤370,在此稀释样本并将悬浮液混合并测量其浊度。如果样本不是粘液样的,则样本继续进行至步骤330。悬浮液的初始浊度确定被用于

开始初始浓的悬浮液的处理,使得该悬浮液可用于接种用于AST的液体培养基管。

[0062] 在步骤340,如果悬浮液的初始浊度大于或等于预定阈值(例如,0.75麦氏单位),则将去离子水添加到悬浮液,并在步骤350中混合悬浮液。如果悬浮液的初始浊度小于预定阈值(例如,0.75麦氏单位),则方法继续进行至用于该悬浮液的步骤370。如本文其它地方所提到的,在图2和图3的描述中阐述的浊度和体积阈值是示例性的而非限制性的。

[0063] 在步骤350,获得移液器枪头(1000 μ L)并将一定体积的去离子水分配到目标小池中。这可以手动完成,或可以使用安装在构台(gantry)上的机器人移液器完成。被分配的去离子水的体积通过以下公式计算:

[0064] 去离子水的体积 = ((初始麦氏单位值 \div 0.75) \times 实际小池体积) - 实际小池体积

(4) 根据方程式4,实际麦氏单位值与阈值麦氏单位值之比被用于确定添加的去离子水的体积。如果实际麦氏单位值在上限阈值以下,则不向悬浮液添加去离子水。使用上面的实例,初始麦氏单位值为1.4,去离子水的体积为((1.4 \div 0.75) \times 276 μ L) - 276 μ L = 239 μ L。在步骤360,如果计算出的体积小于最大体积(例如,对于1000 μ L的移液器枪头,为950 μ L),则将计算的体积的去离子水添加到样本(在图3A中表明为“使用确定的体积”)。如果待添加的去离子水的量超过950 μ L,则仅添加950 μ L的最大体积(在图3A中表明为“设置最大体积”)。

[0065] 在步骤370,使用移液管枪头(1000 μ L)通过一系列约五(5)次抽吸和约250 μ L悬浮液的分配来混合样本。在第五次循环后,然后将移液器枪头丢弃。

[0066] 在步骤380,确定是否需要向悬浮液添加额外体积(即,去离子水)。如果需要额外体积,则悬浮液继续进行至步骤390,在此将额外稀释液(去离子水)添加到悬浮液。如果增加的体积导致悬浮液超过体积限制,则应去除悬浮液以减少悬浮液体积,使得体积处于或低于体积上限。如果不需要额外的稀释液,则该方法继续进行至步骤400(图3B),在此使用比浊计测量悬浮液的浊度。悬浮液的后续处理由测量的浊度确定(在该实施方式中,测量的浊度以麦氏单位测量)。

[0067] 具体地,如果麦氏单位值小于0.2,则不能使用悬浮液并且产生错误消息。参见图3B中的步骤410。如果麦氏单位值大于或等于0.2,则在步骤420,如果麦氏单位值为0.2至0.3(这是0.25麦氏单位值 \pm 20%),则将悬浮液被用作用于AST板的样本来源。

[0068] 如果麦氏单位值大于0.3,则在步骤430,确定麦氏单位值是否在0.5到0.6的范围内(这是0.55麦氏单位值 \pm 10%)。确定这种悬浮液适合用作用于接种在AST板中使用的液体培养基的样本来源。在步骤430,如果悬浮液的浊度在0.5至0.6麦氏单位的范围之外,则样本继续进行至步骤440,在此悬浮液的先前稀释数确定了悬浮液的进一步处理。如果悬浮液已经被稀释了5次,则对于该悬浮液会发出错误消息,并且其不会被用作用于AST液体培养基接种的样本来源。

[0069] 如果悬浮液已被稀释少于五次,则在步骤450,悬浮液返回步骤360以在步骤370进一步稀释。对于被确定具有在预定范围(使这些悬浮液适合用作AST液体培养基接种的样本来源)内的麦氏单位值的那些悬浮液,可以根据以下表1中的一览表(schedule)稀释悬浮液,而无需进一步浊度测量。

[0070] 表1

[0071]

范围内的麦氏单位值	目标麦氏单位值
0.31 to 0.49	0.25

0.61 to 0.99	0.55
≥ 1.00	0.75

[0072] 为了从具有以上表1所述范围内的浊度的样本获得具有目标麦氏单位体积的悬浮液,根据以下关系式稀释样本:

[0073] 增加的体积 = ((测量的麦氏单位值 (步骤370) \div 目标麦氏单位值) \times 实际体积) - 实际体积 (5)

[0074] 例如,在步骤350使用小池体积,如果悬浮液的初始测量麦氏单位值为1,则添加体积等于 $((1 \div 0.75) \times 276) - 276$,即92 μ L稀释液(例如,去离子水)被添加到悬浮液以产生具有目标麦氏单位值0.75的悬浮液。然而,如果待添加的体积量超过950 μ L,则仅将950 μ L添加到样本。

[0075] 在步骤370,一旦确定增加的体积,则指定体积的稀释液(例如,去离子水)被添加到样本。为此目的获得了1000 μ L的移液器枪头(在自动化环境中,机器人移液器获取移液器枪头,以及然后经由构台平移移液器以将移液器定位在悬浮液上)。使用移液器枪头,通过吸取一定体积的悬浮液以及然后从移液器枪头分配该一定体积的悬浮液,来混合悬浮液。在悬浮液上方用移液器枪头分配最后的五十(例如,50 μ L),以确保移液器枪头完全是空的。

[0076] 如果目标麦氏单位值为0.55或0.25,并且在稀释后小池中的悬浮液的总体积大于1500 μ L,则从悬浮液中去除体积,使得悬浮液不超过最大体积。参照步骤390,根据以下公式去除多余的体积:

[0077] 待去除的体积 = 实际体积 (μ L) - 1500 μ L (6)

[0078] 然而,如果稀释次数超过5次,则样本已被稀释太频繁,且不能用于自动AST跟踪(follow up)。在这种情况下,将产生错误消息。如果先前稀释的次数少于五次,则将悬浮液返回至步骤360用于如前所述的稀释。

[0079] 评估了上述方法,其中根据以上方法(替代调节为MALDI制成的浓悬浮液的麦氏单位值,并基于浊度(例如,麦氏单位)规格用预定体积接种AST板)计算了AST接种物的体积,以确定其对AST液体培养基接种的效力。为了此确定,使用了大肠杆菌QC菌株BACTEC A25922,以测试计算达到在AST液体培养管中可接受的生物体浓度需要的接种物体积的再现性。对于大肠杆菌(BACTEC A25922),浓度的预定范围在 2×10^5 和 8×10^5 CFU/mL之间。BACTEC A25922还用于将本文所述方法(其中评估悬浮液并基于悬浮液浊度确定悬浮液体积)与以下过程进行比较,在该过程中制备用于MALDI的浓悬浮液然后稀释至目标浊度(例如,0.5-0.6麦氏单位或0.2-0.3麦氏单位)并使用一致体积(consistent volume)的该悬浮液以接种AST液体培养管。使用这两种方法测试了二十(20)个样本(总共40个样本),并使用了平板计数以测量AST液体培养管中的细菌浓度。还分析了来自处理过的AST板的AST结果。

[0080] 如图6中报告的,对于不同的麦氏单位起始值,所有40个样本结果为AST液体培养基浓度均在 2×10^5 至 8×10^5 CFU/mL内。对于所有40个样本,所有最小抑菌浓度均完全一致。因此,得出的结论是,稀释浓悬浮液以及然后确定将目标量的样本递送到AST液体培养基中所需的悬浮液体积的过程是可再现的,并且对于该QC菌株,该过程的性能与稀释过程相同,达到标准化浊度值(McFarland)。

[0081] 参考图4,示例了AST液体培养管中的大肠杆菌浓度相对于使用Direct AST来接

种AST液体培养基管的悬浮液的最终浊度。误差条代表为每个样本制备的9个平板计数的标准偏差。顶部和底部虚线表明可接受浓度范围的极限， 2×10^5 至 8×10^5 CFU/mL，且中间的虚线代表范围的中间 (5×10^5 CFU/mL)。

[0082] 参考图5，AST液体培养基管中的大肠杆菌浓度相对于用于接种AST液体培养基管的悬浮液的最终浊度，使用稀释方案将悬浮液稀释至目标麦氏单位值 (0.5-0.6麦氏单位)。误差条代表为每个样本制备的9个平板计数的标准偏差。顶部和底部虚线表明可接受浓度范围的极限， 2×10^5 至 8×10^5 CFU/mL，且中间的虚线代表范围的中间 (5×10^5 CFU/mL)。

[0083] 参考图6，无论是将悬浮液的浊度调节到目标浊度内或无论将接种物的体积调节以将目标量的样本接种到AST液体培养基中，每种抗生素的最小抑菌浓度 (MIC) 都相同。

[0084] 尽管本文已经参考具体实施方式描述了本发明，但是应当理解，这些实施方式仅是本发明的原理和应用的示例。因此，应当理解，在不脱离由所附权利要求限定的本发明的精神和范围的情况下，可以对示例性实施方式进行多种修改，并且可以设计其它布置。

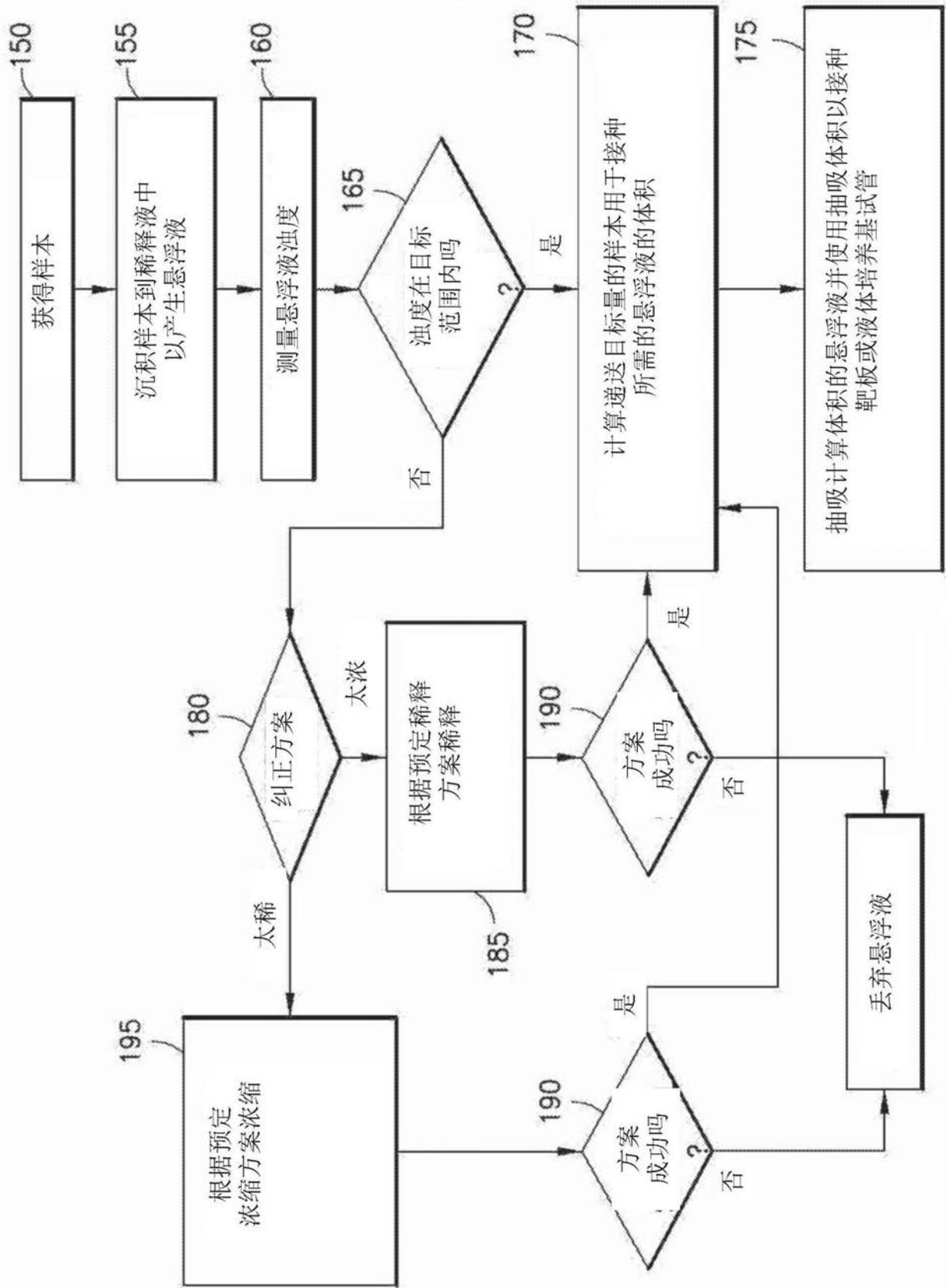


图1

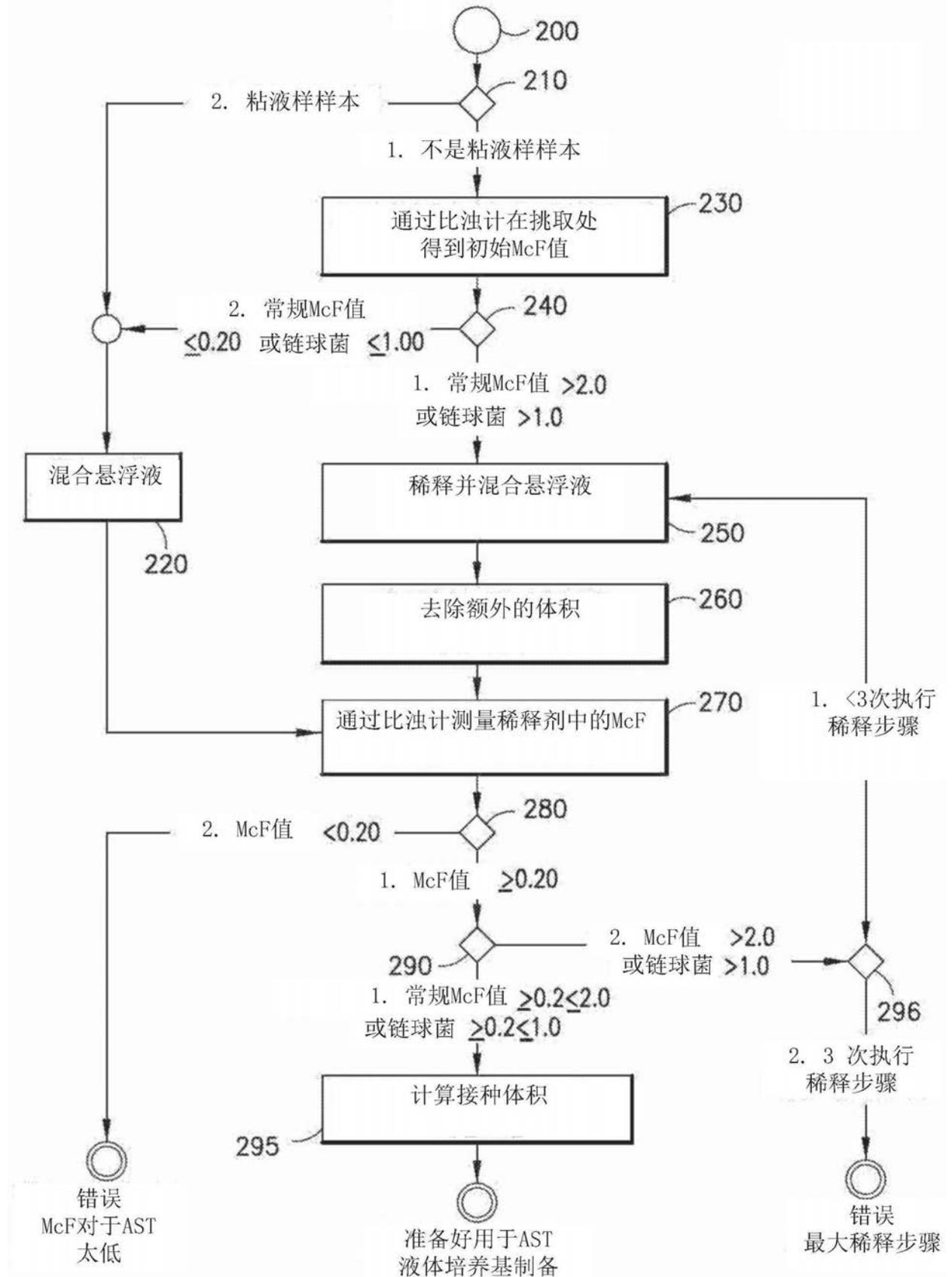


图2

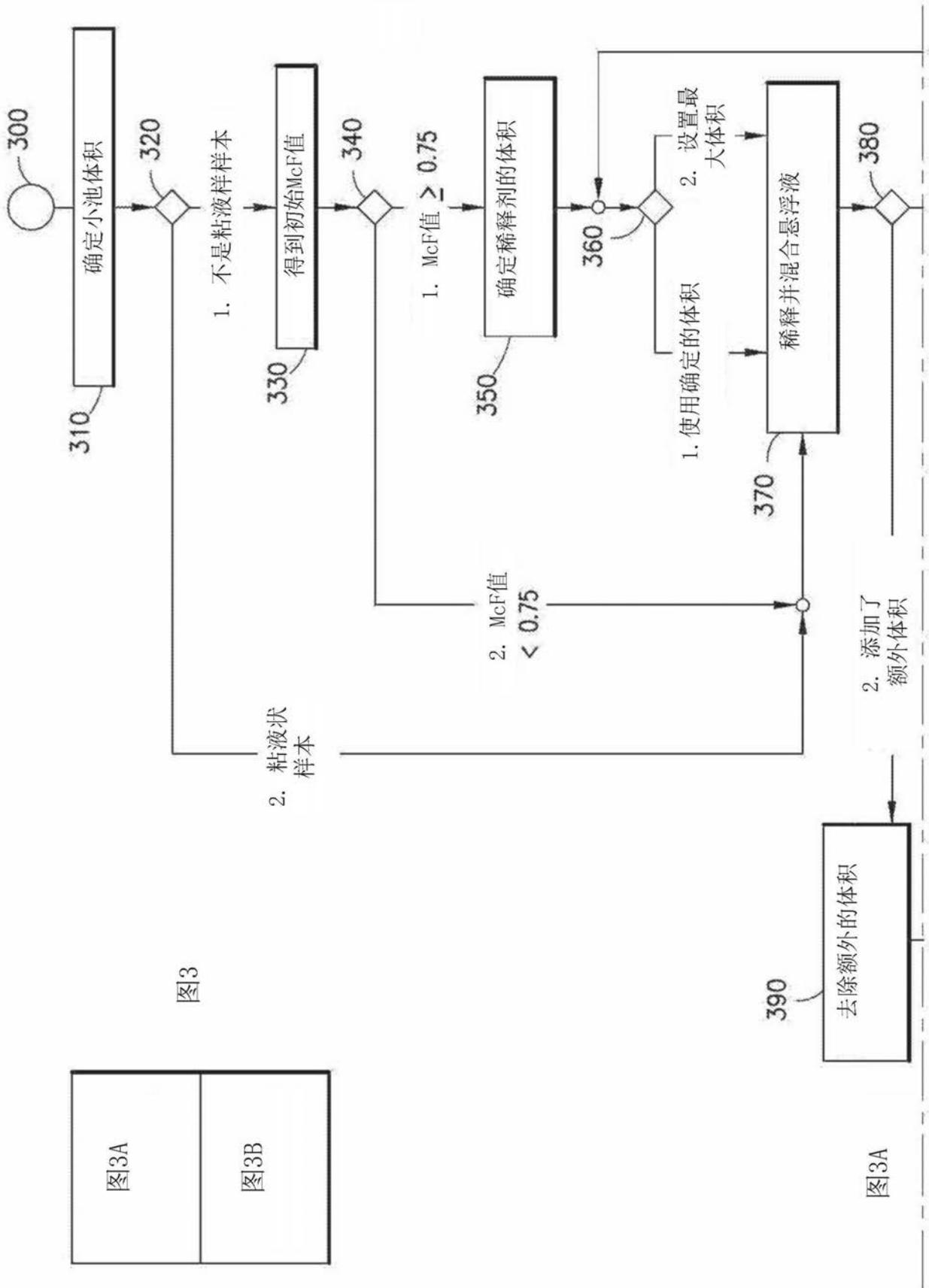
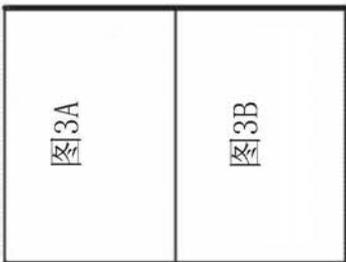


图3



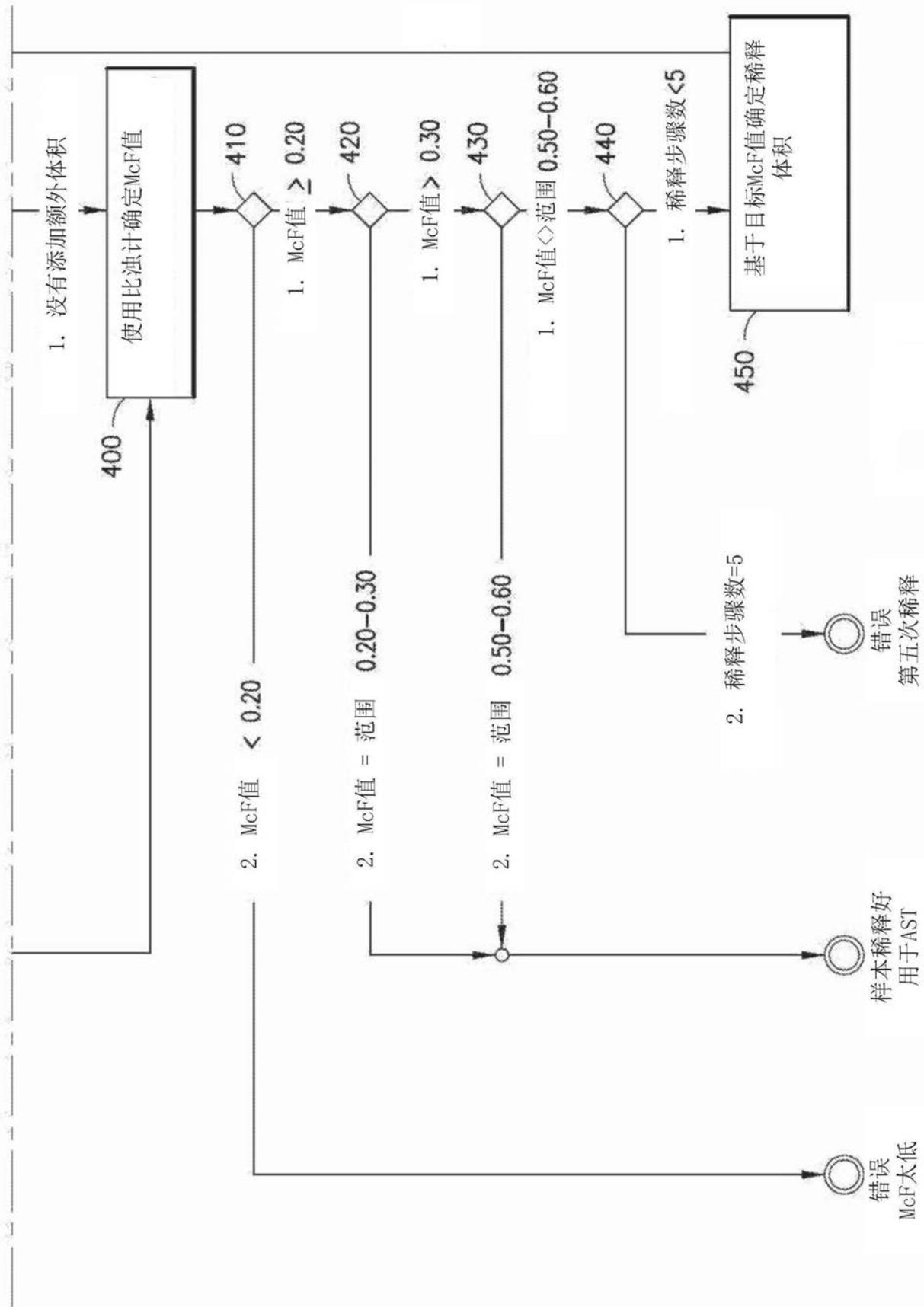
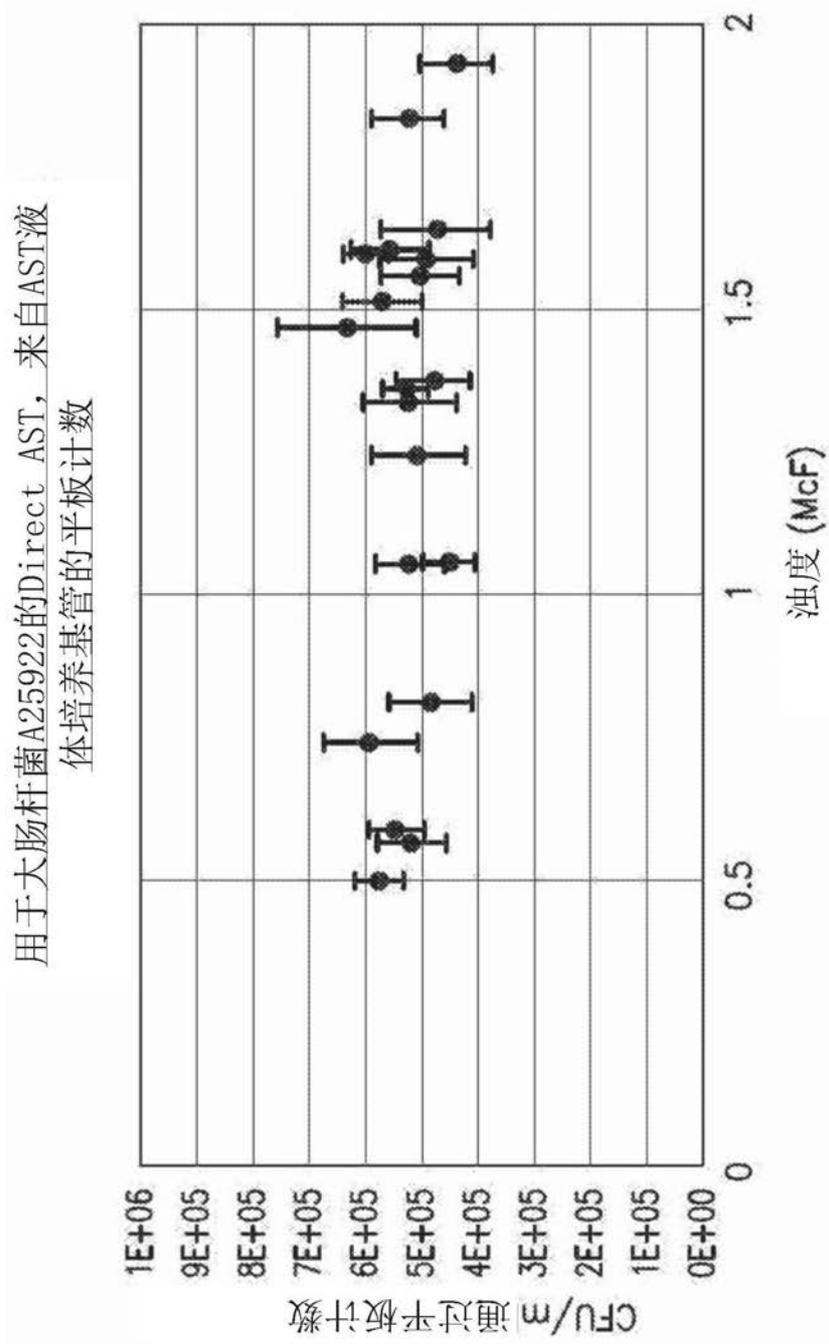


图3B



药物编码	MIC值	MIC	抗微生物剂SIR结果	抗微生物剂最终SIR结果
AMC	8	$\leq 8/4$	S	S
AN	8	≤ 8	S	S
ATM	2	≤ 2	S	S
C	4	≤ 4	S	X
CAZ	1	≤ 1	S	S
CIP	0.5	≤ 0.5	S	S
CL	1	≤ 1		
CRO	1	≤ 1	S	S
CXM	4	≤ 4	S	S
CZ	2	≤ 2	S	X
ETP	0.25	≤ 0.25	S	S
FEP	1	≤ 1	S	S
FF	16	≤ 16	S	S
FM	16	≤ 16	S	S
FOX	4	≤ 4	S	S
GM	2	≤ 2	S	S
IPM	0.25	≤ 0.25	S	S
LVX	1	≤ 1	S	S
MEM	0.125	≤ 0.125	S	S
MI	1	≤ 1	S	S
MXF	0.5	≤ 0.5	S	S
NN	2	≤ 2	S	S
NOR	2	≤ 2	S	S
SAM	4	$\leq 4/2$	S	S
SCP	0.5	$\leq 0.5/8$		
SXT	1	$\leq 1/19$	S	S
TE	2	≤ 2	S	S
TGC	1	≤ 1	S	S
TZP	4	$\leq 4/4$	S	S

图6

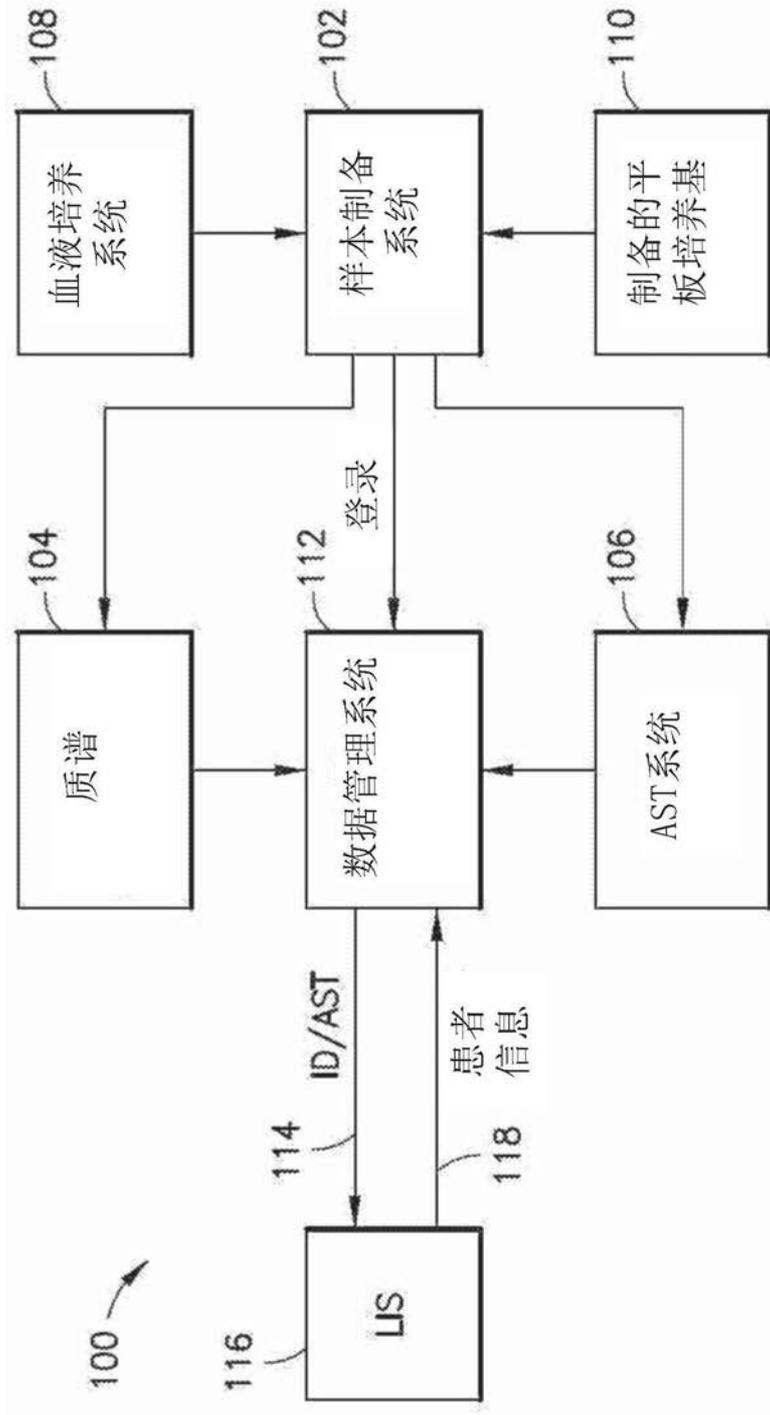


图7