



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119061108 A

(43) 申请公布日 2024. 12. 03

(21) 申请号 202411555943.0

(22) 申请日 2024.11.04

(71) 申请人 广东省大湾区华南理工大学聚集诱导发光高等研究院

地址 510700 广东省广州市黄埔区开源大道11号科技企业加速器C3栋401室

(72) 发明人 唐本忠 谭妙英 何柳 王志明  
刘勇 龚晚君

(74) 专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限公司 44102

专利代理师 江裕强

(51) Int. Cl.

C12Q 1/04 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

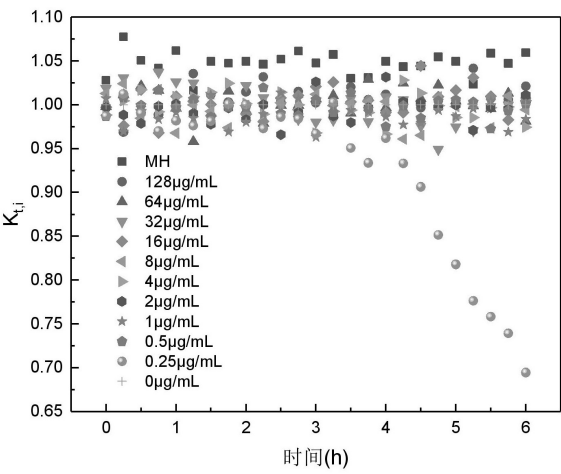
权利要求书3页 说明书10页 附图5页

(54) 发明名称

一种药敏检测方法

(57) 摘要

本发明公开了一种药敏检测方法,包括设置微孔板、培养微孔板和定时收集荧光信号并分析数据。本发明基于细菌生长特点,利用荧光判读的优势,实现实时监测分析,能更快的获取药敏结果,及时终止监测,时间短、效率高;并且对设备要求低,用常用的具有发光检测功能的多功能读板机就能实现监测分析。



1. 一种药敏检测方法, 其特征在于, 包括以下步骤:

(1) 设置微孔板: 微孔板设置阳性对照孔、阴性对照孔和实验孔, 分别以自然数  $i$  进行编号;

阳性对照孔编号  $i=0$ ;

实验孔以  $1 \sim n$  的正整数依次编号, 分别为  $i=1, i=2, \dots, i=n$ ;

阴性对照孔编号  $i=n+1$ ;

其中,  $n$  为大于 2 的正整数;

阳性对照孔、阴性对照孔和实验孔均含有相同浓度的荧光染料, 阳性对照孔和实验孔还含有相同浓度的细菌, 实验孔还含有药物, 实验孔的药物浓度按编号  $i=1, i=2, \dots, i=n$  依次梯度增加;

(2) 培养微孔板, 定时收集荧光信号并分析数据;

分析数据的步骤如下:

步骤一,

令微孔板反应时间  $t=0h$ ;

步骤二,

测得  $t$  时刻各  $i$  孔的荧光值  $F_{t,i}$ ;

$t$  时刻各  $i$  孔的相对生长荧光值为  $K_{t,i}$ ;

其中,  $t$  时刻实验孔的相对生长荧光值为  $K_{t,i} = F_{t,i} / F_{t,i-1}, i=1, i=2, \dots, i=n$ ,

$t$  时刻阳性对照孔的相对生长荧光值为  $K_{t,0} = F_{t,0} / F_{t,0} = 1$ ,

$t$  时刻阴性对照孔的相对生长荧光值为  $K_{t,n+1} = F_{t,n+1} / F_{t,n}$ ;

步骤三,

将  $t$  时刻各  $i$  孔的相对生长荧光值  $K_{t,i}$  与 0.85 比较大小, 同一时刻出现  $K_{t,i} \leq 0.85$  的微孔数目为  $N$ ;

步骤四,

当  $N=0$  时, 令  $t=t+(0.2 \sim 0.5)h$ , 返回步骤二, 进行下一个时间点的分析;

当  $N=1$  时, 取小于等于 0.85 的  $K_{t,i}$  赋值为最小值  $K_{\min}$ , 即  $K_{\min} = K_{t,i}$ ;

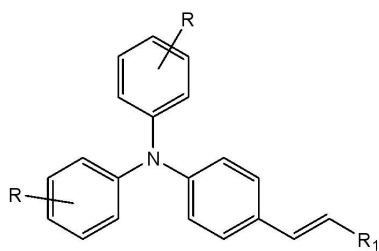
当  $N \geq 2$  时, 取所有小于等于 0.85 的  $K_{t,i}$  比较  $i$  值,  $i_{\max}$  为其中最大值; 如果  $i_{\max} = n+1$ , 则  $K_{\min} = K_{t,n+1}$ ; 如果  $i_{\max} \neq n+1$ , 则取  $K_{t,i_{\max}+1}$  与 0.98 相比较; 如果  $K_{t,i_{\max}+1} \geq 0.98$ , 则将  $K_{t,i_{\max}}$  赋值为最小值  $K_{\min}$ , 即  $K_{\min} = K_{t,i_{\max}}$ ; 如果  $K_{t,i_{\max}+1} < 0.98$  且  $K_{t+0.25,i_{\max}+1} < K_{t,i_{\max}+1}$ , 则将  $K_{t,i_{\max}+1}$  赋值为最小值  $K_{\min}$ , 即  $K_{\min} = K_{t,i_{\max}+1}$ ; 如果  $K_{t,i_{\max}+1} < 0.98$  且  $K_{t+0.25,i_{\max}+1} \geq K_{t,i_{\max}+1}$ , 则令  $t=t+(0.2 \sim 0.5)h$ , 返回步骤二, 进行下一个时间点的分析;

得到  $K_{\min}$  后终止数据收集;

步骤五,

分析  $K_{\min}$  对应的  $i$  值, 如果  $i=2 \sim n$ , 报告 MIC 值 = 【 $i$  孔对应的药物浓度】; 如果  $i=1$ , 报告 MIC 值  $\leq$  【 $i=1$  孔对应的药物浓度】; 如果  $i=n+1$ , 报告 MIC 值  $>$  【 $i=n$  孔对应的药物浓度】。

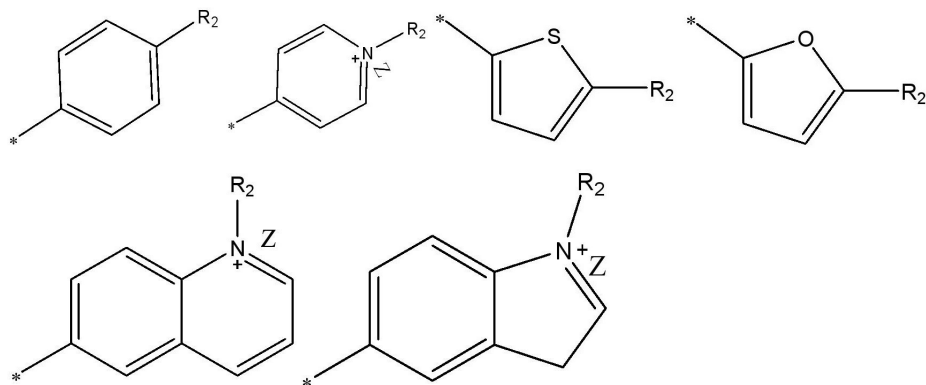
2. 根据权利要求 1 所述的药敏检测方法, 其特征在于, 所述荧光染料为 AIE 荧光染料; 所述 AIE 荧光染料包括 AIE-1 分子, 所述 AIE-1 分子选自式 1 中的至少一种;



式1

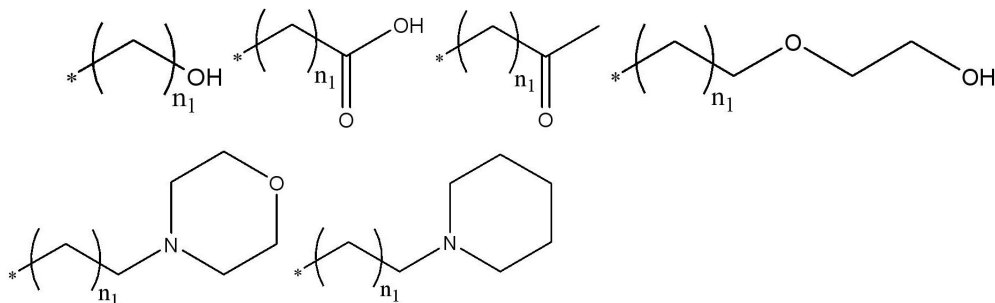
式1中,R各自独立选自氢、氨基、具有1~20个碳原子的烷基、具有2~20个碳原子的不饱和烃基、具有1~20个碳原子的杂烷基、具有3~20个碳原子的环烷基、具有2~20个碳原子的杂环烷基、具有6~30个碳原子的芳基和具有5~30个碳原子的杂芳基;

$R_1$ 选自以下结构中的一种:



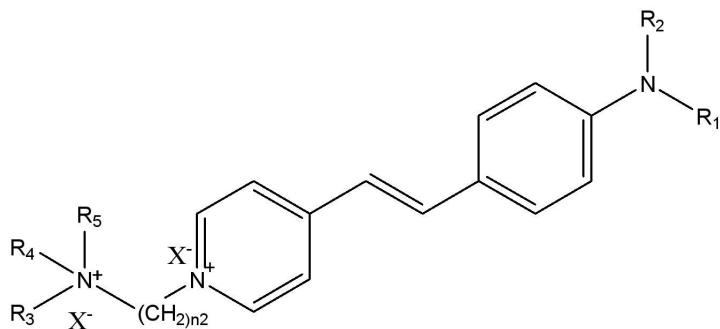
Z为阴离子;

$R_2$ 选自以下结构中的一种:



$n_1$ 为1-5的整数。

3. 根据权利要求2所述的药敏检测方法,其特征在于,所述AIE荧光染料还包括AIE-2分子,所述AIE-2分子选自式2中的至少一种;



式2

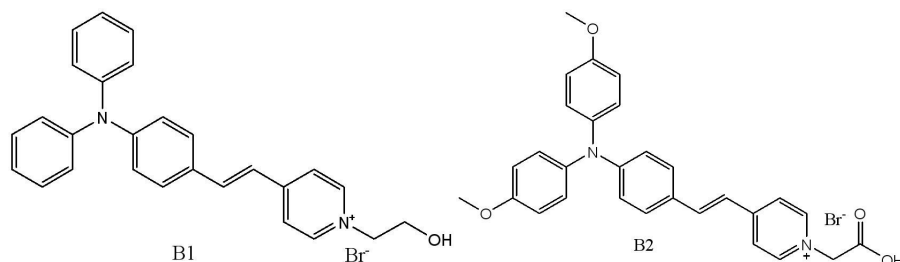
式2中, $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_5$ 各自独立的选自取代或未取代的具有1~20个碳原子的直链烷基、取代或未取代的具有3~20个碳原子的支链烷基、取代或未取代的具有3~20个碳原子的环烷基;

$n_2$ 为2-10的整数;

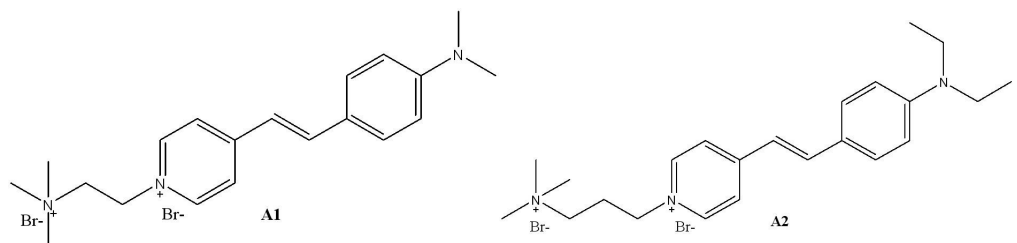
$X^-$ 为阴离子。

4. 根据权利要求3所述的药敏检测方法,其特征在于,所述AIE荧光染料中AIE-1分子与AIE-2分子的摩尔比为1:(5~10)。

5. 根据权利要求3所述的药敏检测方法,其特征在于,AIE-1分子选自以下一种:



AIE-2分子选自以下一种:



6. 根据权利要求1所述的药敏检测方法,其特征在于,细菌为金黄色葡萄球菌、松鼠葡萄球菌、大肠埃希氏菌、沙门氏菌、鲍曼不动杆菌、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌、MRSA、屎肠球菌、无乳链球菌、化脓链球菌、沙雷氏菌或嗜麦芽窄食单胞菌;药物为左氧氟沙星、头孢他啶、氨苄西林、亚胺培南、头孢呋辛、庆大霉素、四环素、哌拉西林/他唑巴坦或复方新诺明。

7. 根据权利要求1所述的药敏检测方法,其特征在于,荧光染料的终浓度为5~12 $\mu$ M;细菌的终浓度为0.5麦氏浊度~0.5麦氏浊度稀释1000倍之间的任意浓度;药物的浓度梯度参照CLSI标准设置。

8. 根据权利要求1所述的药敏检测方法,其特征在于, $n$ 为3~20的正整数。

9. 根据权利要求1所述的药敏检测方法,其特征在于,培养的温度为28~37 $^{\circ}$ C;荧光信号的激发波长460nm,发射波长560nm。

10. 根据权利要求1所述的药敏检测方法,其特征在于,将MIC值与CLSI标准中敏感、中介、耐药的折点进行比较,并输出报告。

## 一种药敏检测方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及药敏检测分析技术领域,具体涉及一种药敏检测方法。

### 背景技术

[0002] 最小抑菌浓度(minimal inhibit concentration,MIC)指用肉汤稀释法测定细菌对药物的敏感性时,完全抑制细菌生长的药物最高稀释浓度中1 mL所含的药量,用于表示被测细菌对该药的敏感度。在使用不同种类的药物对不同种类的细菌的进行药敏检测时,由于细菌耐药机制的差异、生长速度的差异和培养条件的差异,判定结果的时间和数学方法不能完全统一,在传统方法中常采用18~24h培养后肉眼判断浊度的情况或紫外吸收所测结果对MIC值进行判断,无法在培养过程中即时获得细菌对药物的准确敏感度;因此,现有方法检测时间长,效率低、成本高。

### 发明内容

[0003] 针对现有技术存在的上述不足,本发明的目的是提供一种药敏检测方法。

[0004] 相比于现有分析技术,本发明设计于细菌生长的长时间仪器监测中,通过结合细菌生长曲线和荧光变化趋势,实时数据处理分析,在6 h内给出确定的MIC值。

[0005] 本发明的目的至少通过以下技术方案之一实现。

[0006] 一种药敏检测方法,包括以下步骤:

(1) 设置微孔板:微孔板设置阳性对照孔、阴性对照孔和实验孔,分别以自然数*i*进行编号;

阳性对照孔编号*i*=0;

实验孔以1~*n*的正整数依次编号,分别为*i*=1、*i*=2、……、*i*=*n*;

阴性对照孔编号*i*=*n*+1;

其中,*n*为大于2的正整数;

阳性对照孔、阴性对照孔和实验孔均含有相同浓度的荧光染料,阳性对照孔和实验孔还含有相同浓度的细菌,实验孔还含有药物,实验孔的药物浓度按编号*i*=1、*i*=2、……、*i*=*n*依次梯度增加;

(2) 培养微孔板,定时收集荧光信号并分析数据;

分析数据的步骤如下:

步骤一,

令微孔板反应时间*t*=0h;

步骤二,

测得*t*时刻各*i*孔的荧光值 $F_{t,i}$ ;

*t*时刻各*i*孔的相对生长荧光值为 $K_{t,i}$ ;

其中,*t*时刻实验孔的相对生长荧光值为 $K_{t,i}=F_{t,i}/F_{t,i-1}$ ,*i*=1、*i*=2、……、*i*=*n*,

*t*时刻阳性对照孔的相对生长荧光值为 $K_{t,0}=F_{t,0}/F_{t,0}=1$ ,

t时刻阴性对照孔的相对生长荧光值为 $K_{t,n+1}=F_{t,n+1}/F_{t,n}$ ;

步骤三,

将t时刻各i孔的相对生长荧光值 $K_{t,i}$ 与0.85比较大小,同一时刻出现 $K_{t,i} \leq 0.85$ 的微孔数目为N;

步骤四,

当N=0时,  $t=t+(0.2 \sim 0.5)h$ ,返回步骤二,进行下一个时间点的分析;

当N=1时,取小于等于0.85的 $K_{t,i}$ 赋值为最小值 $K_{min}$ ,即 $K_{min}=K_{t,i}$ ;

当 $N \geq 2$ 时,取所有小于等于0.85的 $K_{t,i}$ 比较i值, $i_{max}$ 为其中最大值;如果 $i_{max}=n+1$ ,则 $K_{min}=K_{t,n+1}$ ;如果 $i_{max} \neq n+1$ ,则取 $K_{t,i_{max}+1}$ 与0.98相比较;如果 $K_{t,i_{max}+1} \geq 0.98$ ,则将 $K_{t,i_{max}}$ 赋值为最小值 $K_{min}$ ,即 $K_{min}=K_{t,i_{max}}$ ;如果 $K_{t,i_{max}+1} < 0.98$ 且 $K_{t+0.25,i_{max}+1} < K_{t,i_{max}+1}$ ,则将 $K_{t,i_{max}+1}$ 赋值最小值 $K_{min}$ ,即 $K_{min}=K_{t,i_{max}+1}$ ;如果 $K_{t,i_{max}+1} < 0.98$ 且 $K_{t+0.25,i_{max}+1} \geq K_{t,i_{max}+1}$ ,则令 $t=t+(0.2 \sim 0.5)h$ ,返回步骤二,进行下一个时间点的分析;

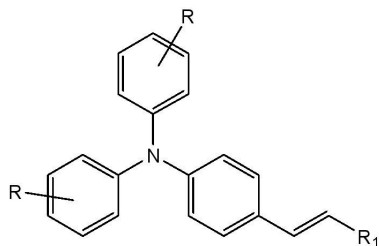
得到 $K_{min}$ 后终止数据收集;

步骤五,

分析 $K_{min}$ 对应的i值,如果 $i=2 \sim n$ ,报告MIC值=【i孔对应的药物浓度】;如果 $i=1$ ,报告MIC值 $\leq$ 【i=1孔对应的药物浓度】;如果 $i=n+1$ ,报告MIC值 $>$ 【i=n孔对应的药物浓度】。

[0007] 优选的,微孔板各孔的检测液体积相等。

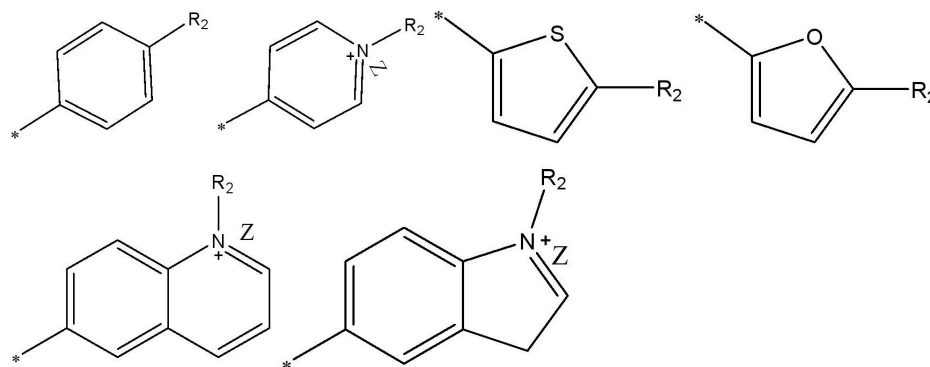
[0008] 优选的,所述荧光染料为AIE荧光染料;所述AIE荧光染料包括AIE-1分子,所述AIE-1分子选自式1中的至少一种;



[0009] 式1

式1中,R各自独立选自氢、氨基、具有1~20个碳原子的烷基、具有2~20个碳原子的不饱和烃基、具有1~20个碳原子的杂烷基、具有3~20个碳原子的环烷基、具有2~20个碳原子的杂环烷基、具有6~30个碳原子的芳基和具有5~30个碳原子的杂芳基;

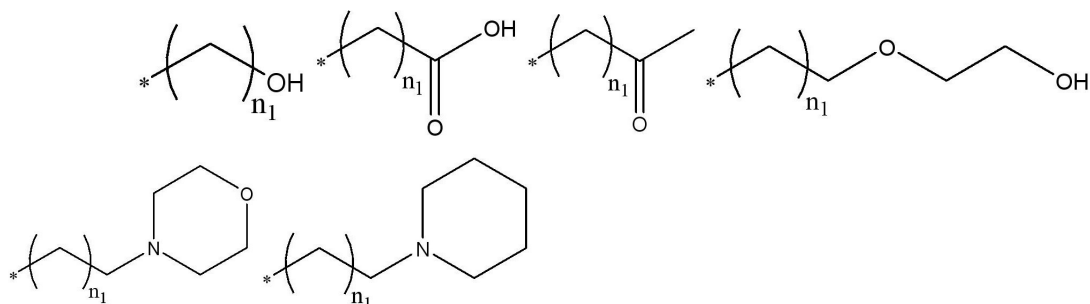
$R_1$ 选自以下结构中的一种:



[0010]

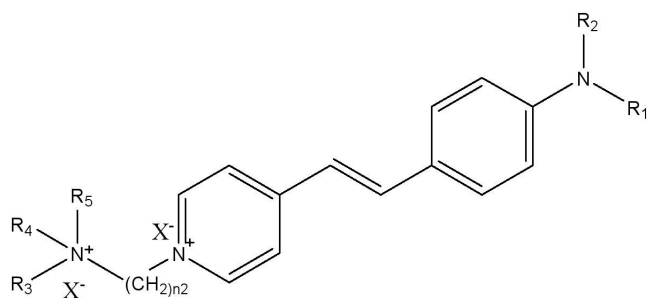
[0011] Z为阴离子;

$R_2$ 选自以下结构中的一种:



[0012]  $n_1$ 为1-5的整数。

[0013] 进一步优选的,所述AIE荧光染料还包括AIE-2分子,所述AIE-2分子选自式2中的至少一种;



[0014] 式2

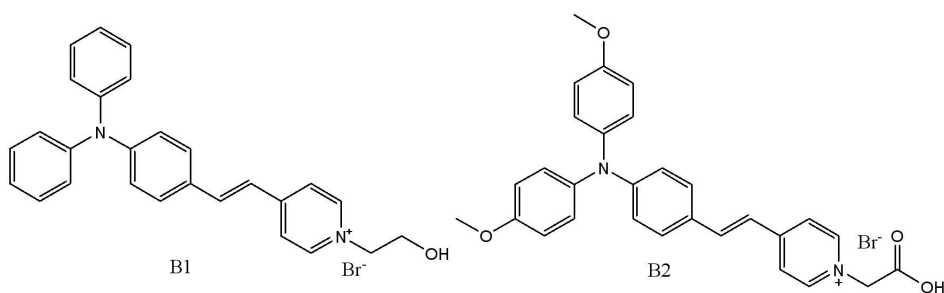
式2中, $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_5$ 各自独立的选自取代或未取代的具有1~20个碳原子的直链烷基、取代或未取代的具有3~20个碳原子的支链烷基、取代或未取代的具有3~20个碳原子的环烷基;

$n_2$ 为2-10的整数;

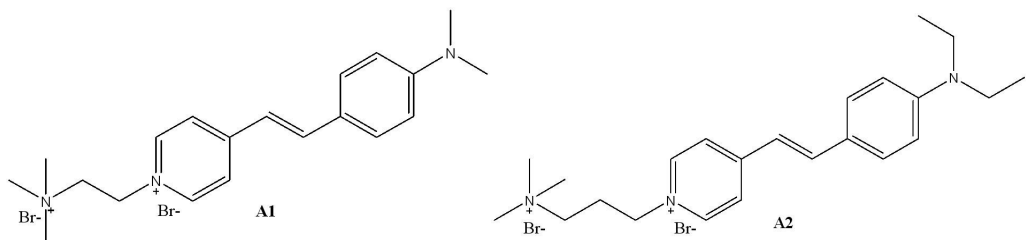
$X^-$ 为阴离子。

[0015] 更优选的,所述AIE荧光染料中AIE-1分子与AIE-2分子的摩尔比为1:(5~10)。

[0016] 进一步优选的,AIE-1分子选自以下一种:



[0017] AIE-2分子选自以下一种:



[0018] 优选的,荧光染料的终浓度为5~12 $\mu$ M。

[0019] 优选的,细菌为金黄色葡萄球菌、松鼠葡萄球菌、大肠埃希氏菌、沙门氏菌、鲍曼不动杆菌、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌、MRSA、屎肠球菌、无乳链球菌、化脓链球菌、沙雷氏菌或嗜麦芽窄食单胞菌。

[0020] 优选的,细菌的终浓度为0.5麦氏浊度~0.5麦氏浊度稀释1000倍之间的任意浓度;进一步优选为0.5麦氏浊度稀释100~500倍之间的任意浓度。

[0021] 优选的,药物为左氧氟沙星、头孢他啶、氨苄西林、亚胺培南、头孢呋辛、庆大霉素、四环素、哌拉西林/他唑巴坦或复方新诺明,药物的浓度梯度参照CLSI标准设置。

[0022] 优选的,n为3~20的正整数(3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20)。

[0023] 优选的,培养的温度为28~37℃。

[0024] 优选的,荧光信号的激发波长460nm,发射波长560nm。

[0025] 优选的,监测时间间隔为0.20~0.50h。

[0026] 进一步优选的,监测时间间隔为0.25~0.50h。

[0027] 优选的,将MIC值与CLSI标准中敏感、中介、耐药的折点进行比较,并输出报告。

[0028] 与现有技术相比,本发明的有益效果在于:

本发明基于细菌生长特点,利用荧光判读的优势,实现实时监测分析,能更快的获取药敏结果,及时终止监测,时间短、效率高;并且对设备要求低,用常用的具有发光检测功能的多功能读板机就能实现监测分析。

## 附图说明

[0029] 图1为本发明数据处理分析流程图;

图2a为实施例1中左氧氟沙星药敏实验中金黄色葡萄球菌ATCC 29213数据处理结果;

图2b为实施例1中左氧氟沙星药敏实验中大肠埃希氏菌ATCC 25922数据处理结果;

图3a为实施例2中头孢他啶药敏实验中临床分离沙门氏菌数据处理结果;

图3b为实施例2中头孢他啶药敏实验中临床分离屎肠球菌数据处理结果;

图4a为实施例3中头孢他啶药敏实验中金黄色葡萄球菌ATCC 29213数据处理结果;

图4b为实施例3中头孢他啶药敏实验中松鼠葡萄球菌ATCC 29061数据处理结果;

图5a为实施例4中头孢他啶药敏实验中铜绿假单胞菌ATCC 27853数据处理结果;

图5b为实施例4中左氧氟沙星药敏实验中临床分离肺炎克雷伯菌数据处理结果。

## 具体实施方式

[0030] 下面结合实施例对本发明进行具体地描述,但本发明的实施方式和保护范围不限于以下实施例。

[0031] 本发明实施例的培养基采用Mueller-Hinton 肉汤培养基(MH肉汤培养基)。

[0032] 本发明实施例采用的荧光检测仪器为Bioteck多功能酶标仪。

[0033] 实施例1:



一种药敏检测方法,包括以下步骤:

(1) 培养待测细菌,稀释至合适浓度得细菌溶液。

[0034] 细菌的培养和稀释参照本领域常规的方法进行。

[0035] 本实施例具体方法如下:

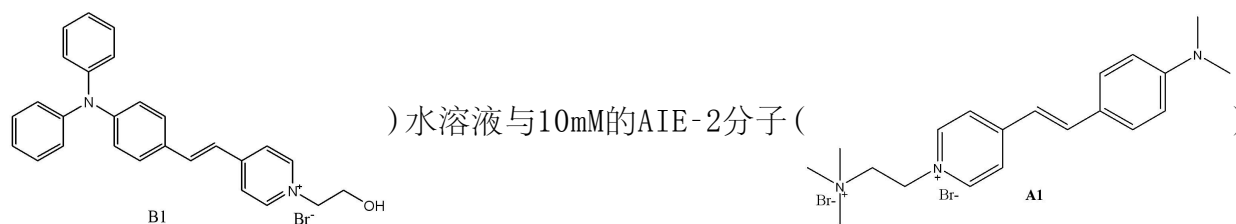
配制MH(Mueller-Hinton)肉汤培养基,121.0 °C高压蒸汽灭菌 15 min,冷却至室温备用;将金黄色葡萄球菌ATCC 29213、大肠埃希氏菌ATCC 25922菌种分别在平板培养皿上37°C培养15-20 h,挑取平板单菌落,用培养基制备成0.5麦氏浊度菌液,再稀释100倍4°C冷藏备用。

[0036] (2) 96孔微孔板的孔分别赋值为*i*, *i*=*n*+1为阴性对照组(MH), *i*=0为阳性对照组, *i*=1、2、...、*n*为实验组,代表依次梯度增加的药物浓度,步骤(1)的细菌溶液和荧光染色液混合得混合溶液1,培养基和荧光染色液混合得混合溶液2(荧光染料的浓度与混合溶液1相同),实验组*i*=1、2、...、*n*孔和阳性对照组*i*=0孔分别加入等量混合溶液1,阴性对照组*i*=*n*+1孔加入等量混合溶液2,然后实验组*i*=1、2、...、*n*孔分别加入等量对应的梯度稀释抗菌药物溶液,阳性对照组*i*=0孔和阴性对照组*i*=*n*+1孔加入等量溶剂。

[0037] *n*值、药物浓度和各试剂用量参照本领域常规的方法进行;荧光染色液可以准确检测细菌浓度即可,没有特殊要求。

[0038] 本实施例具体参数如下:

荧光染色液采用AIE药敏监测双重荧光染色液,由10mM的AIE-1分子(



水溶液按体积比1:5混合配制的染色液。

[0039] 抗菌药物为左氧氟沙星(稀释液为水);

细菌溶液和荧光染色液的用量比为1mL:1.2μL;

混合溶液1加入量100 μL/孔,药物溶液加入量100 μL/孔;

*i*=1、2、...、10孔对应的最终药物浓度:*i*=1为0.25μg/mL, *i*=2为0.5μg/mL, *i*=3为1μg/mL, *i*=4为2μg/mL, *i*=5为4μg/mL, *i*=6为8μg/mL, *i*=7为16μg/mL, *i*=8为32μg/mL, *i*=9为64μg/mL, *i*=10为128μg/mL;

所用试剂和96孔微孔板使用前均4°C冷藏保存。

[0040] (3) 制备的96孔微孔板置于荧光读取仪器(酶标仪等)中培养,定时监测收集荧光信号并分析数据。

[0041] 细菌的培养按照本领域常规方法进行,可以参考待测细菌的最适生长温度;荧光信号收集的时间点按本领域常规设置;激发波长和发射波长按荧光染色液的要求设置。

[0042] 本实施例具体参数如下:

培养温度为37°C;

荧光信号460nm激发,560nm发射;

荧光信号设置15min收集一次。

[0043] 分析数据的步骤如下(流程图见图1):

确定MIC的方法

步骤一,

令微孔板反应时间 $t=0h$ ;即完成微孔板检测液配制后开始培养时的时间点;

步骤二,

测得 $t$ ( $t$ 为每次检测的时间点,单位为小时)时刻各 $i$ 孔的荧光值为 $F_{t,i}$ ,下标 $t$ 为每次检测的时间点,单位为小时;如表1。

[0044] 表1

各孔荧光值情况示例							
$t(h)$	阴性对照 $i=n+1$	$i=n$	$i=4$	$i=3$	$i=2$	$i=1$	阳性对照 $i=0$
$t=0$	$F_{0,n+1}$	$F_{0,n}$	$F_{0,4}$	$F_{0,3}$	$F_{0,2}$	$F_{0,1}$	$F_{0,0}$
$t=0.25$	$F_{0.25,n+1}$	$F_{0.25,n}$	$F_{0.25,4}$	$F_{0.25,3}$	$F_{0.25,2}$	$F_{0.25,1}$	$F_{0.25,0}$
.....							
$t$	$F_{t,n+1}$	$F_{t,n}$	$F_{t,4}$	$F_{t,3}$	$F_{t,2}$	$F_{t,1}$	$F_{t,0}$

[0045]  $K_{t,i}$ 为 $t$ 时刻各 $i$ 孔的相对生长荧光值; $t$ 时刻实验孔的相对生长荧光值为 $K_{t,i}=F_{t,i}/F_{t,i-1}$ ( $i=1,2,\dots,n$ ), $t$ 时刻阳性对照孔的相对生长荧光值为 $K_{t,0}=F_{t,0}/F_{t,0}=1$ ( $i=0$ ), $t$ 时刻阴性对照孔的相对生长荧光值为 $K_{t,n+1}=F_{t,n+1}/F_{t,n}$ ( $i=n+1$ );如表2。

[0046] 表2

各孔相对阳性对照组的相对生长荧光值情况示例							
$t(h)$	阴性对照 $i=n+1$	$i=n$	$i=4$	$i=3$	$i=2$	$i=1$	阳性对照 $i=0$
$t=0$	$K_{0,n+1}$ $=F_{0,n+1}/F_{0,n}$	$K_{0,n}=F_{0,n}$ $/F_{0,n-1}$	$K_{0,4}$ $=F_{0,4}/F_{0,3}$	$K_{0,3}$ $=F_{0,3}/F_{0,2}$	$K_{0,2}$ $=F_{0,2}/F_{0,1}$	$K_{0,1}$ $=F_{0,1}/F_{0,0}$	$K_{0,0}$ $=F_{0,0}/F_{0,0}$
$t=0.25$	$K_{0.25,n+1}$ $=F_{0.25,n+1}/F_{0.25,n}$	$K_{0.25,n}$ $=F_{0.25,n}/F_{0.25,n-1}$	$K_{0.25,4}$ $=F_{0.25,4}/F_{0.25,3}$	$K_{0.25,3}$ $=F_{0.25,3}/F_{0.25,2}$	$K_{0.25,2}$ $=F_{0.25,2}/F_{0.25,1}$	$K_{0.25,1}$ $=F_{0.25,1}/F_{0.25,0}$	$K_{0.25,0}$ $=F_{0.25,0}/F_{0.25,0}$
.....							
$t$	$K_{t,n+1}$ $=F_{t,n+1}/F_{t,n}$	$K_{t,n}$ $=F_{t,n}/F_{t,n-1}$	$K_{t,4}$ $=F_{t,4}/F_{t,3}$	$K_{t,3}$ $=F_{t,3}/F_{t,2}$	$K_{t,2}$ $=F_{t,2}/F_{t,1}$	$K_{t,1}$ $=F_{t,1}/F_{t,0}$	$K_{t,0}$ $=F_{t,0}/F_{t,0}$

[0047] 步骤三,

$t$ 时刻各 $i$ 孔的相对生长荧光值 $K_{t,i}$ 与0.85比较大小,并记录同一个时间点不同 $i$ 孔中 $K_{t,i} \leq 0.85$ 的数目为 $N$ ;

步骤四,

当 $N=0$ 时,即代表细菌均未有明显生长, $t=t+0.25$ ,返回步骤二,进行下一个时间点的数据分析;

当 $N=1$ 时,取小于等于0.85的 $K_{t,i}$ 赋值为最小值 $K_{min}$ ,即 $K_{min}=K_{t,i}$ ;

当 $N \geq 2$ 时,取所有小于等于0.85的 $K_{t,i}$ 比较 $i$ 值, $i_{\max}$ 为其中最大值;如果 $i_{\max} = n+1$ ,则 $K_{\min} = K_{t,n+1}$ ;如果 $i_{\max} \neq n+1$ ,则取 $K_{t,i_{\max}+1}$ 与0.98相比较,如果 $K_{t,i_{\max}+1} \geq 0.98$ ,则将 $K_{t,i_{\max}}$ 赋值为最小值 $K_{\min}$ ,即 $K_{\min} = K_{t,i_{\max}}$ , $i = i_{\max}$ ;如果 $K_{t,i_{\max}+1} < 0.98$ 且 $K_{t+0.25,i_{\max}+1} < K_{t,i_{\max}+1}$ ,则将 $K_{t,i_{\max}+1}$ 赋值最小值 $K_{\min}$ ,即 $K_{\min} = K_{t,i_{\max}+1}$ , $i = i_{\max}+1$ ;如果 $K_{t,i_{\max}+1} < 0.98$ 但 $K_{t+0.25,i_{\max}+1} \geq K_{t,i_{\max}+1}$ ,则 $t = t+0.25$ ,返回步骤二,进行下一个时间点的分析;

得到 $K_{\min}$ 后终止数据收集。

[0048] 步骤五,

分析 $K_{\min}$ 对应的 $i$ 值,如果 $i = 2 \sim n$ ,报告MIC值=【 $i$ 孔对应的药物浓度】;如果 $i = 1$ ,报告MIC值 $\leq$ 【 $i = 1$ 孔对应的药物浓度】;如果 $i = n+1$ ,报告MIC值 $>$ 【 $i = n$ 孔对应的药物浓度】。

[0049] 确定敏感性的方法

将MIC值与CLSI标准中敏感、中介、耐药的折点进行比较,并输出报告。

[0050] (4) 按照CLSI中的标准方法进行相同的药物及细菌的药敏实验,将根据标准方法判读的结果与步骤(4)的结果进行比对。

[0051] 实施例2

本实施例与实施例1的区别如下,未提及的与实施例1相同。

[0052] 步骤(1)中,待测细菌为沙门氏菌、屎肠球菌;

步骤(2)中,药物为头孢他啶;

步骤(2)中, $i = 1$ 为 $0.5 \mu\text{g/mL}$ , $i = 2$ 为 $1 \mu\text{g/mL}$ , $i = 3$ 为 $2 \mu\text{g/mL}$ , $i = 4$ 为 $4 \mu\text{g/mL}$ , $i = 5$ 为 $8 \mu\text{g/mL}$ , $i = 6$ 为 $16 \mu\text{g/mL}$ , $i = 7$ 为 $32 \mu\text{g/mL}$ , $i = 8$ 为 $64 \mu\text{g/mL}$ , $i = 9$ 为 $128 \mu\text{g/mL}$ , $i = 10$ 为 $256 \mu\text{g/mL}$ 。

[0053] 实施例3

本实施例与实施例1的区别如下,未提及的与实施例1相同。

[0054] 步骤(1)中,待测细菌分别为金黄色葡萄球菌ATCC 29213、松鼠葡萄球菌ATCC 29061;

步骤(2)中,药物为头孢他啶;

步骤(2)中, $i = 1$ 为 $0.5 \mu\text{g/mL}$ , $i = 2$ 为 $1 \mu\text{g/mL}$ , $i = 3$ 为 $2 \mu\text{g/mL}$ , $i = 4$ 为 $4 \mu\text{g/mL}$ , $i = 5$ 为 $8 \mu\text{g/mL}$ , $i = 6$ 为 $16 \mu\text{g/mL}$ , $i = 7$ 为 $32 \mu\text{g/mL}$ , $i = 8$ 为 $64 \mu\text{g/mL}$ , $i = 9$ 为 $128 \mu\text{g/mL}$ , $i = 10$ 为 $256 \mu\text{g/mL}$ 。

[0055] 实施例4

本实施例与实施例1的区别如下,未提及的与实施例1相同。

[0056] 步骤(1)中,待测细菌分别为铜绿假单胞菌ATCC 27853、临床分离肺炎克雷伯菌;

步骤(2)中,药物分别为头孢他啶、左氧氟沙星;

步骤(2)中,头孢他啶对应的 $i = 1$ 为 $0.5 \mu\text{g/mL}$ , $i = 2$ 为 $1 \mu\text{g/mL}$ , $i = 3$ 为 $2 \mu\text{g/mL}$ , $i = 4$ 为 $4 \mu\text{g/mL}$ , $i = 5$ 为 $8 \mu\text{g/mL}$ , $i = 6$ 为 $16 \mu\text{g/mL}$ , $i = 7$ 为 $32 \mu\text{g/mL}$ , $i = 8$ 为 $64 \mu\text{g/mL}$ , $i = 9$ 为 $128 \mu\text{g/mL}$ , $i = 10$ 为 $256 \mu\text{g/mL}$ ;左氧氟沙星对应的 $i = 1$ 为 $0.25 \mu\text{g/mL}$ , $i = 2$ 为 $0.5 \mu\text{g/mL}$ , $i = 3$ 为 $1 \mu\text{g/mL}$ , $i = 4$ 为 $2 \mu\text{g/mL}$ , $i = 5$ 为 $4 \mu\text{g/mL}$ , $i = 6$ 为 $8 \mu\text{g/mL}$ , $i = 7$ 为 $16 \mu\text{g/mL}$ , $i = 8$ 为 $32 \mu\text{g/mL}$ , $i = 9$ 为 $64 \mu\text{g/mL}$ , $i = 10$ 为 $128 \mu\text{g/mL}$ 。

[0057] 实施例结果分析

本发明的数据分析过程可通过程序进行,直接得到最终结果;为更清楚说明本发明的技术方案和效果,以下结合过程数据对结果进行分析。

[0058] (1) 实施例1中金黄色葡萄球菌ATCC 29213对左氧氟沙星药敏实验的数据处理结

果如图2a;大肠埃希氏菌ATCC 25922对左氧氟沙星药敏实验的数据处理结果如图2b。

[0059] 从图2a中可以看出,t小于5时, $K_{t,i}$ 与0.85比较, $N=0$ ;不断进入下一个时间点进行监测,t=5时, $K_{t,i}$ 与0.85比较, $N=1$ ,小于等于0.85的 $K_{t,i}$ 对应5h时 $K_{5,1}=0.81791$ 为最小值 $K_{min}$ ,对应*i*=1梯度最低药物浓度0.25 $\mu\text{g/mL}$ 之前的细菌有生长,输出MIC值 $\leq$ 【*i*=1对应的药物浓度】,即 $\text{MIC} \leq 0.25\mu\text{g/mL}$ ,比较CLSI对应标准,同时输出判读为敏感;仅需5h得到药敏检测结果。

[0060] 从图2b中可以看出,t小于2.75时, $K_{t,i}$ 与0.85比较, $N=0$ ;不断进入下一个时间点进行监测,t=2.75时, $K_{t,i}$ 与0.85比较, $N=1$ ,此时小于等于0.85的 $K_{t,i}$ 对应2.75h时 $K_{2.75,1}=0.71137$ 为最小值 $K_{min}$ ,对应*i*=1梯度最低药物浓度0.25  $\mu\text{g/mL}$ 之前的细菌有生长输出MIC值 $\leq$ 【*i*=1对应的药物浓度】,即 $\text{MIC} \leq 0.25\mu\text{g/mL}$ ,比较CLSI对应标准,同时输出判读为敏感;仅需2.75h得到药敏检测结果。

[0061] 以上结果均与表3中通过标准方法得到的MIC结果一致。表3 为标准方法实施的左氧氟沙星药敏实验中金黄色葡萄球菌ATCC 29213的MIC值与左氧氟沙星药敏实验中大肠埃希氏菌ATCC 25922的MIC值。

[0062] 表3

细菌	药物
	左氧氟沙星
金黄色葡萄球菌ATCC 29213	$\text{MIC} \leq 0.25\mu\text{g/mL}$
大肠埃希氏菌 ATCC 25922	$\text{MIC} \leq 0.25\mu\text{g/mL}$

[0063] (2) 实施例2中沙门氏菌对头孢他啶药敏实验的数据处理结果如图3a;屎肠球菌对头孢他啶药敏实验的数据处理结果如图3b。

[0064] 从图3a中可以看出,t小于2.75时, $K_{t,i}$ 与0.85比较, $N=0$ ;不断进入下一个时间点进行监测,t=2.75时, $K_{t,i}$ 与0.85比较, $N=1$ ,此时小于等于0.85的 $K_{t,i}$ 对应2.75h时 $K_{2.75,n+1}=K_{2.75,11}=0.75058$ 为最小值 $K_{min}$ ,对应*i*=11梯度之前药物浓度256  $\mu\text{g/mL}$ 的细菌有生长,输出MIC值 $>$ 【*i*=10对应的药物浓度】,即 $\text{MIC} > 256\mu\text{g/mL}$ ,比较CLSI对应标准,同时输出判读为耐药;仅需2.75h得到药敏检测结果。

[0065] 从图3b中可以看出,t小于4时, $K_{t,i}$ 与0.85比较, $N=0$ ;不断进入下一个时间点进行监测,t=4时, $K_{t,i}$ 与0.85比较, $N=1$ ,此时小于等于0.85的 $K_{t,i}$ 对应4h时 $K_{4,n+1}=K_{4,11}=0.81025$ 为最小值 $K_{min}$ ,对应*i*=11梯度之前药物浓度256  $\mu\text{g/mL}$ 的细菌有生长,输出MIC值 $>$ 【*i*=10对应的药物浓度】,即 $\text{MIC} > 256 \mu\text{g/mL}$ ,比较CLSI对应标准,同时输出判读为耐药;仅需4h得到药敏检测结果。

[0066] 以上结果均与表4中通过标准方法得到的MIC结果一致。表4为根据标准方法实施的头孢他啶药敏实验中临床分离沙门氏菌的MIC值与头孢他啶药敏实验中临床分离屎肠球菌的MIC值。

[0067] 表4

细菌	药物
	头孢他啶
沙门氏菌	MIC>256μg/mL
屎肠球菌	MIC>256μg/mL

[0068] (3) 实施例3中金黄色葡萄球菌ATCC 29213对头孢他啶药敏实验的数据处理结果如图4a;松鼠葡萄球菌ATCC 29061对头孢他啶药敏实验的数据处理结果如图4b。

[0069] 从图4a中可以看出,t小于6时, $K_{t,i}$ 与0.85比较, $N=0$ ;不断进入下一个时间点进行监测,t=6时, $K_{t,i}$ 与0.85比较, $N=1$ ,此时小于等于0.85的 $K_{t,i}$ 对应6h时 $K_{6,5}=0.81639$ 为最小值 $K_{min}$ ,对应 $i=5$ 梯度药物浓度8μg/mL之前的细菌有生长,输出MIC值=【i对应的药物浓度】,即MIC=8μg/mL,CLSI无对应标准,直接输出MIC值;仅需6h得到药敏检测结果。

[0070] 从图4b中可以看出,t小于4时, $K_{t,i}$ 与0.85比较, $N=0$ ;不断进入下一个时间点进行监测,t=4时, $K_{t,i}$ 与0.85比较, $N=1$ ,此时小于等于0.85的 $K_{t,i}$ 对应4h时 $K_{4,6}=0.81982$ 为最小值 $K_{min}$ ,对应 $i=6$ 梯度药物浓度16 μg/mL之前的细菌有生长,输出MIC值=【i对应的药物浓度】,即MIC=16μg/mL,CLSI无对应标准,直接输出MIC值;仅需4h得到药敏检测结果。

[0071] 以上结果均与表5中通过标准方法得到的MIC结果一致。表5 为根据标准方法实施的头孢他啶药敏实验中金黄色葡萄球菌ATCC 29213的MIC值与头孢他啶药敏实验中松鼠葡萄球菌ATCC 29061的MIC值。

[0072] 表5

细菌	药物
	头孢他啶
金黄色葡萄球菌ATCC 29213	MIC=8μg/mL
松鼠葡萄球菌 ATCC 29061	MIC=16μg/mL

[0073] (4) 实施例4中铜绿假单胞菌ATCC 27853对头孢他啶药敏实验的数据处理结果如图5a;肺炎克雷伯菌对左氧氟沙星药敏实验的数据处理结果如图5b。

[0074] 从图5a中可以看出,t小于4.75时, $K_{t,i}$ 与0.85比较, $N=0$ ;不断进入下一个时间点进行监测,t=4.75时, $K_{t,i}$ 与0.85比较, $N=1$ ,此时小于等于0.85的 $K_{t,i}$ 对应4.75h时 $K_{4.75,3}=0.80807$ 为最小值 $K_{min}$ ,对应 $i=3$ 梯度药物浓度2μg/mL之前的细菌有生长,输出MIC值=【i对应的药物浓度】,即MIC=2μg/mL,比较CLSI对应标准,同时输出判读为敏感;仅需4.75h得到药敏检测结果。

[0075] 从图5b中可以看出,t小于3.25时, $K_{t,i}$ 与0.85比较, $N=0$ ;不断进入下一个时间点进行监测,t=3.25时, $K_{t,i}$ 与0.85比较, $N=2$ ,此时小于等于0.85的 $K_{t,i}$ 对应3.25h时 $K_{3.25,8}=0.79620$ 与 $K_{3.25,9}=0.80195$ ,其中 $i=8$ 对应32μg/mL, $i=9$ 对应64μg/mL,取高浓度64μg/mL再高一个浓度梯度的 $K_{t,i_{max}+1}$ 即 $K_{3.25,10}$ 与0.98相比较, $K_{3.25,10}=0.93044<0.98$ 且 $K_{3.50,10}=0.89401<K_{3.25,10}=0.93044$ ,则取 $K_{3.25,10}$ 为最小值 $K_{min}$ ,对应 $i=10$ 梯度药物浓度128μg/mL之前的细菌有生长,输出MIC值=【i对应的药物浓度】,即MIC=128μg/mL,比较CLSI对应标准,同时输出判读为耐药;仅需3.5h得到药敏检测结果。

[0076] 以上结果均与表6中通过标准方法得到的MIC结果一致。

[0077] 表6

细菌	药物	
	头孢他啶	左氧氟沙星
铜绿假单胞菌 ATCC 27853	MIC=2μg/mL	/
肺炎克雷伯菌	/	MIC=128μg/mL

[0078] 表6为根据标准方法实施的头孢他啶药敏实验中铜绿假单胞菌ATCC 27853的MIC值与左氧氟沙星药敏实验中肺炎克雷伯菌的MIC值。

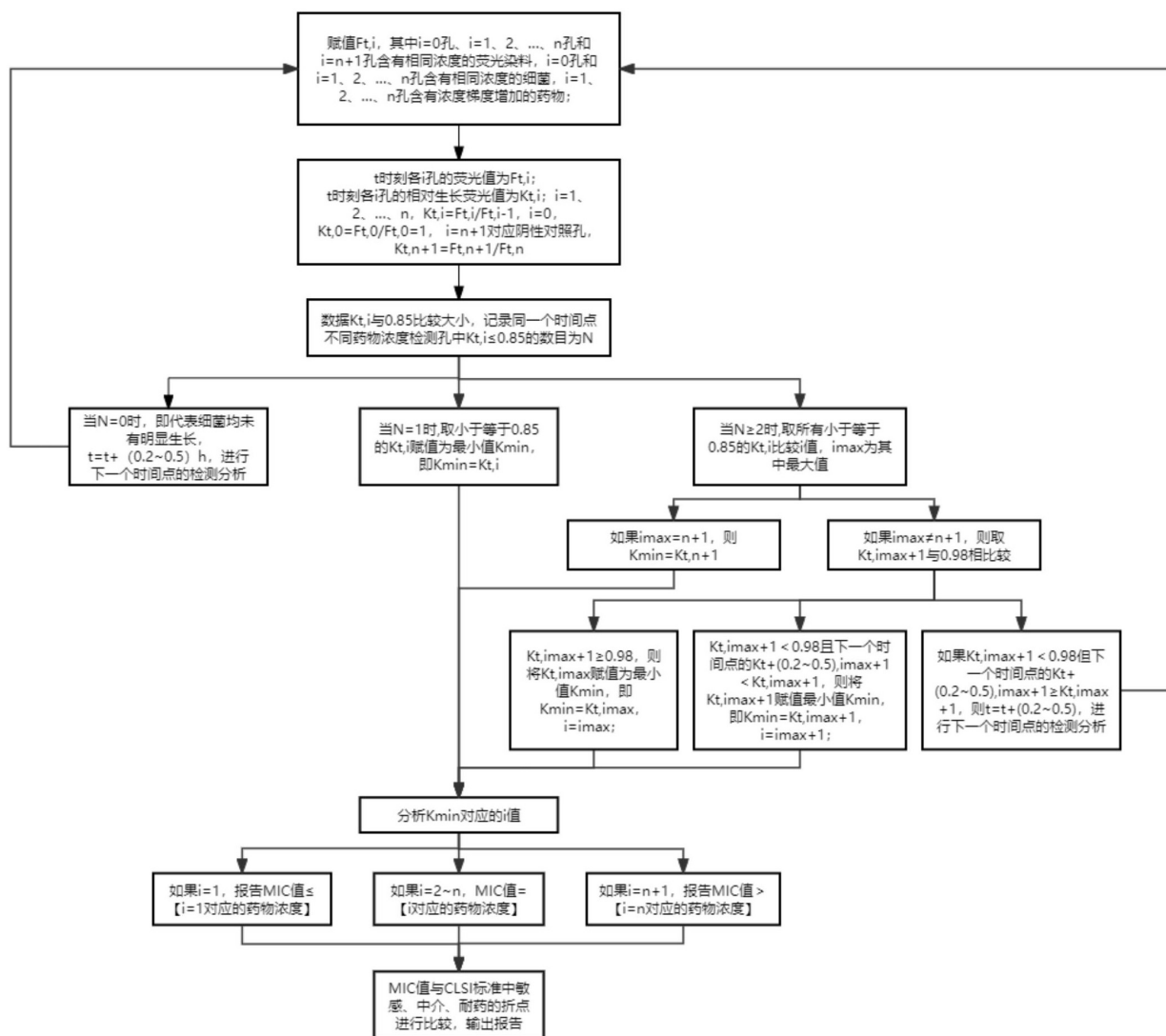


图 1

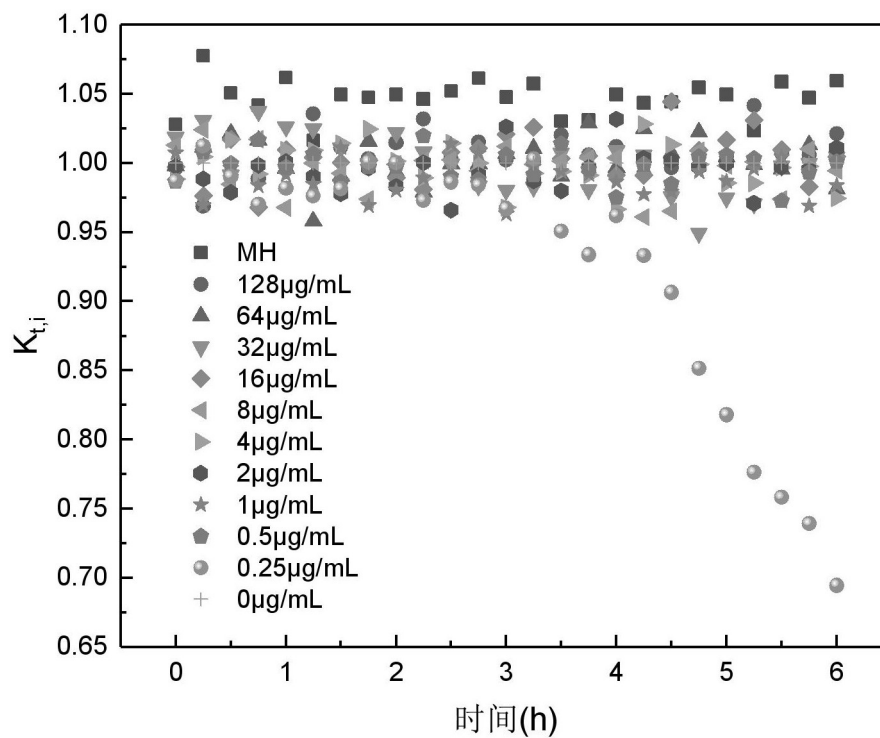


图 2a

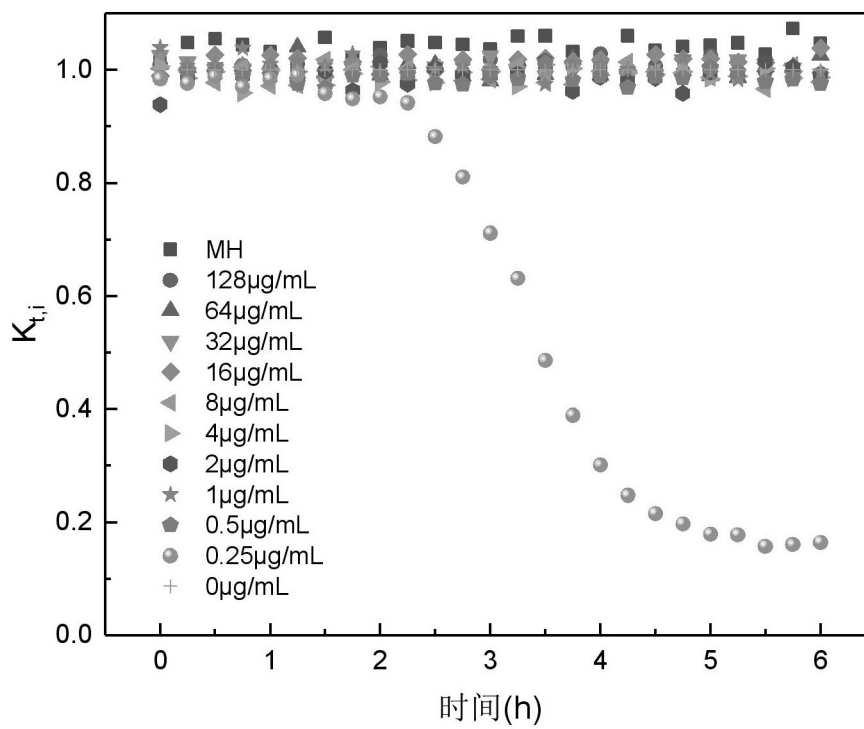


图 2b



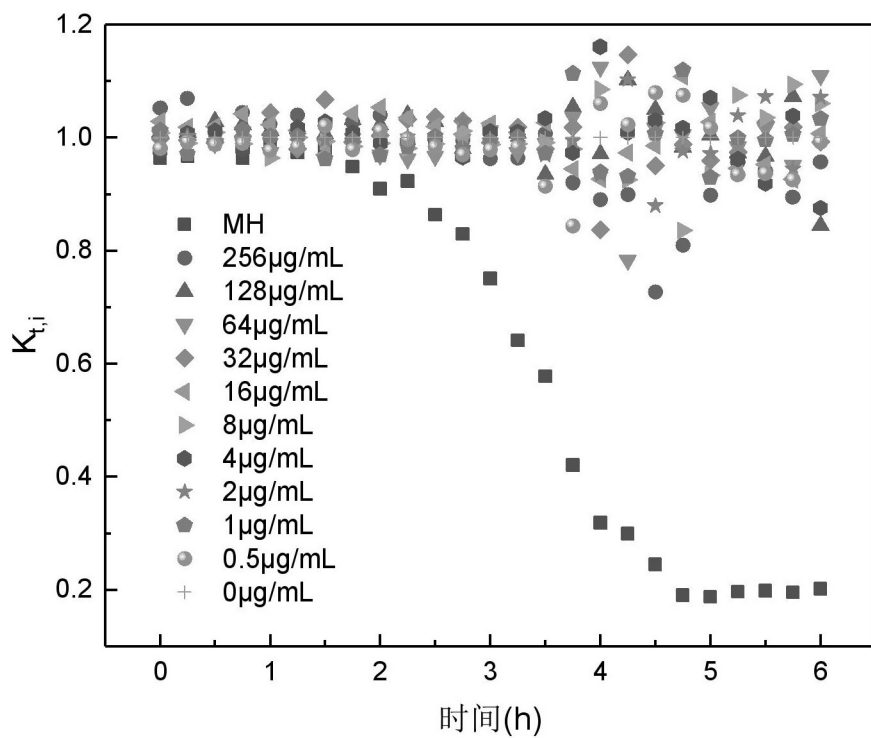


图 3a

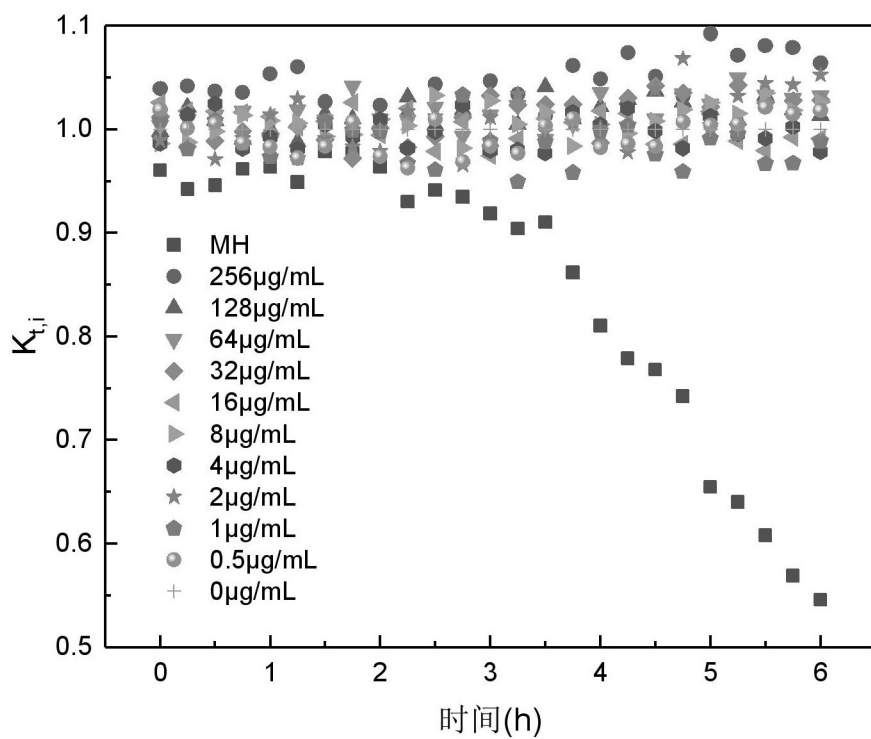


图 3b

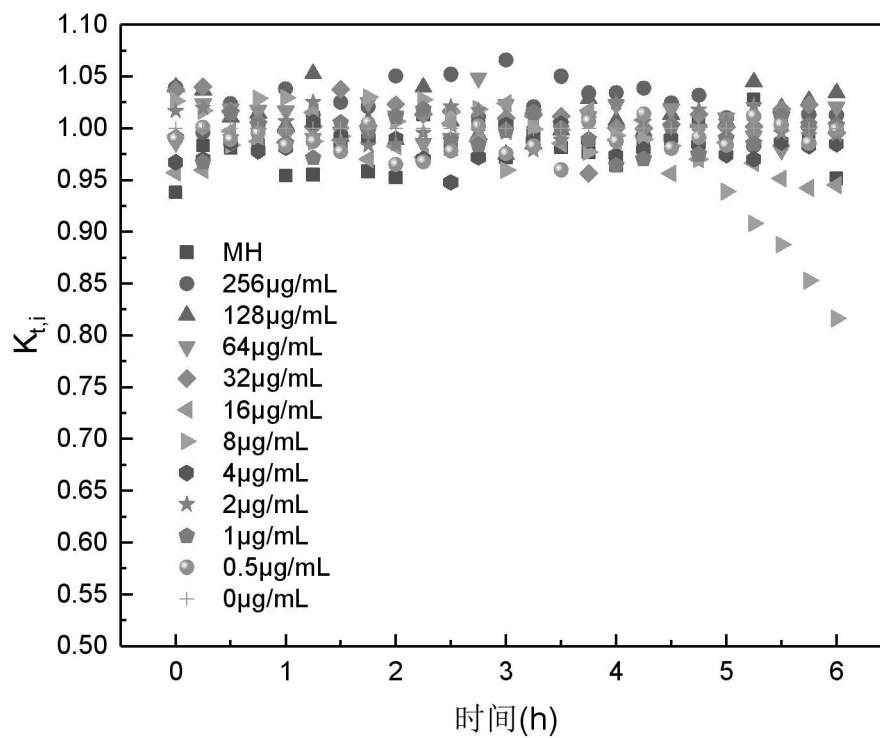


图 4a

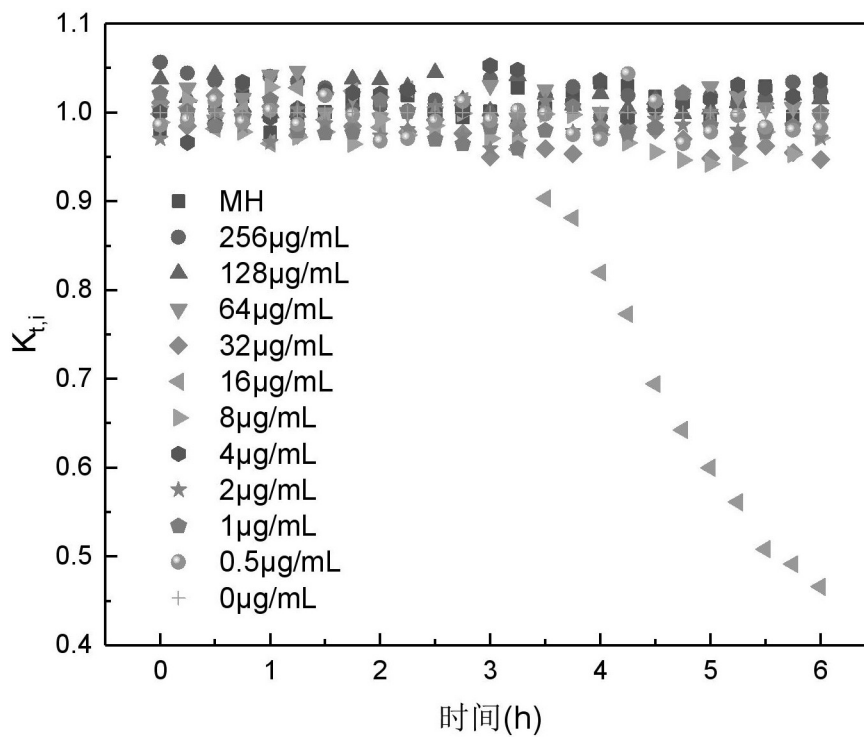


图 4b

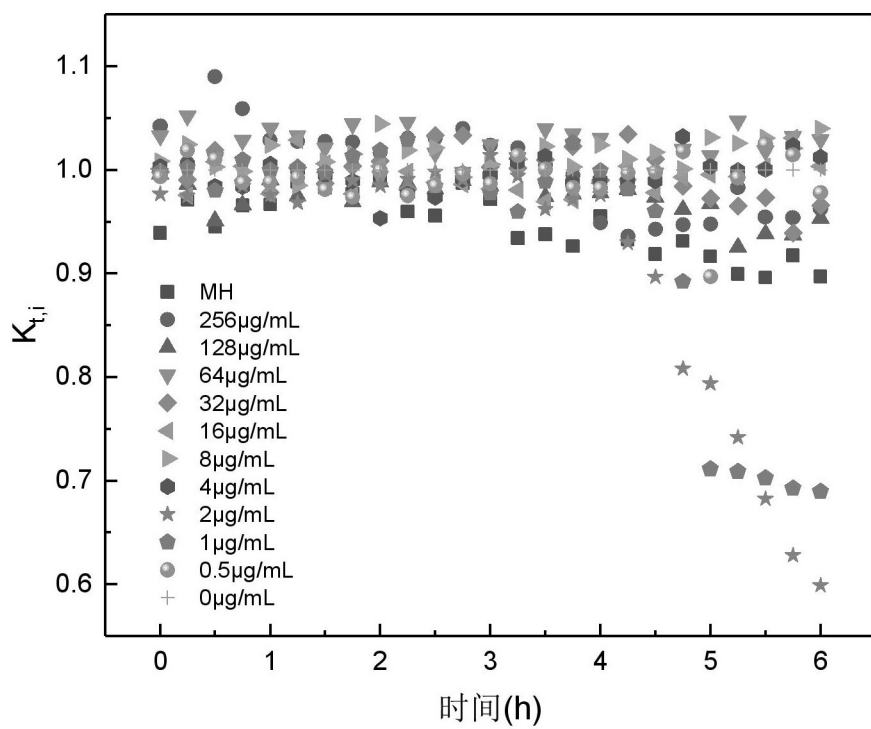


图 5a

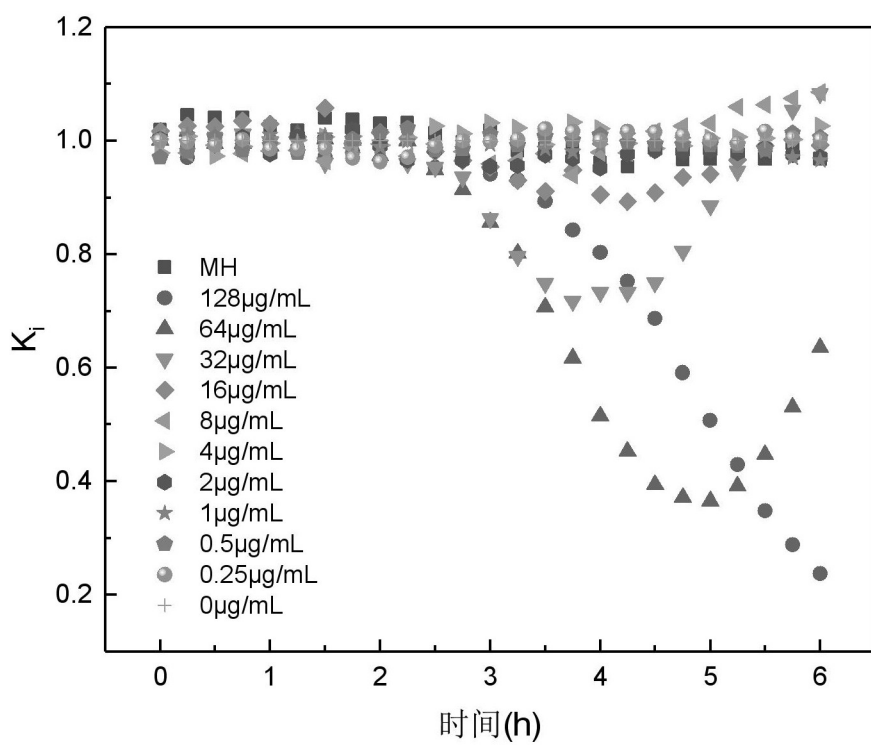


图 5b