



# 基于原位延时成像算法的快速抗菌药物敏感性测试方法

高千惠<sup>1,2</sup>, 徐亦雯<sup>2</sup>, 陈弘毅<sup>1,2</sup>, 胡慧杰<sup>2</sup>, 蒙思宇<sup>2</sup>, 张长松<sup>3</sup>, 王婷<sup>3</sup>, 张志强<sup>1,2\*</sup>, 宋一之<sup>1,2\*</sup>

1 中国科学技术大学 生物医学工程学院(苏州), 安徽 合肥 230026

2 中国科学院苏州生物医学工程技术研究所, 江苏 苏州 215163

3 南京大学医学院附属苏州医院(苏州科技城医院)检验科, 江苏 苏州 215163

高千惠, 徐亦雯, 陈弘毅, 胡慧杰, 蒙思宇, 张长松, 王婷, 张志强, 宋一之. 基于原位延时成像算法的快速抗菌药物敏感性测试方法[J]. 微生物学报, 2024, 64(9): 3533-3546.

GAO Qianhui, XU Yiwen, CHEN Hongyi, HU Huijie, MENG Siyu, ZHANG Changsong, WANG Ting, ZHANG Zhiqiang, SONG Yizhi. Rapid antimicrobial susceptibility test based on *in-situ* time-lapsed imaging of microcolonies[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(9): 3533-3546.

**摘要:**【目的】每年有 700 多万人因抗生素使用不当或不及时而死于细菌感染。抗菌药物敏感性测试(antimicrobial susceptibility test, AST)在临床上被用于指导抗生素治疗, 传统的临床检测方法至少需要 16–20 h 才能获得检测结果, 存在局限性。开发基于细菌形态分析的新型快速 AST 方法, 有助于提高诊断效率, 为危急重症的细菌感染患者提供及时的治疗。【方法】开发一种原位微菌落延时成像技术, 将细菌孵育、抗生素给药、显微成像和图像处理算法相结合。通过成像设备和算法两个维度对齐图像, 原位追踪不同浓度抗生素作用下菌落的形态变化, 从而判断药敏结果。【结果】经过实验验证, 该技术对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌均有效, 可在 2 h 内测定最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC), 与临床金标准方法结果一致。【结论】本研究的快速 AST 方法显著缩短了获得 AST 报告的时间, 并且有望用于更广泛的菌株和抗生素组合。

**关键词:** 霍夫变换; 细菌形态; 图像识别; 快速药敏; 原位孵育

资助项目: 国家重点研发计划(2022YFC2403300); 国家自然科学基金(32170173)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFC2403300) and the National Natural Science Foundation of China (32170173).

\*Corresponding authors. E-mail: SONG Yizhi, songyz@sibet.ac.cn; ZHANG Zhiqiang, zhangzq@sibet.ac.cn

Received: 2024-02-23; Accepted: 2024-05-13; Published online: 2024-05-30

# Rapid antimicrobial susceptibility test based on *in-situ* time-lapsed imaging of microcolonies

GAO Qianhui<sup>1,2</sup>, XU Yiwen<sup>2</sup>, CHEN Hongyi<sup>1,2</sup>, HU Huijie<sup>2</sup>, MENG Siyu<sup>2</sup>, ZHANG Changsong<sup>3</sup>, WANG Ting<sup>3</sup>, ZHANG Zhiqiang<sup>1,2\*</sup>, SONG Yizhi<sup>1,2\*</sup>

1 School of Biomedical Engineering (Suzhou), University of Science and Technology of China, Hefei 230026, Anhui, China

2 Suzhou Institute of Biomedical Engineering and Technology, Chinese Academy of Sciences, Suzhou 215163, Jiangsu, China

3 The Affiliated Suzhou Hospital of Nanjing University Medical School (Suzhou Science and Technology Town Hospital), Suzhou 215163, Jiangsu, China

**Abstract: [Objective]** Over 7 million people die from bacterial infections every year due to the inappropriate or untimely use of antibiotics. Antimicrobial susceptibility test (AST) is a routine method guiding antibiotic therapy in clinical practice, while the existing methods have limitations as they require at least 16–20 h to get the results. We aimed to develop a novel rapid AST method based on bacterial morphology analysis, which can improve the diagnosis efficiency and provide timely treatment for the patients with bacterial infections, especially for urgent cases. **[Methods]** We developed an *in-situ* time-lapsed imaging (ISM-TLI) technique for microcolonies by combining bacterial incubation, *in vitro* antibiotic treatment, microscopic imaging, and image processing algorithm. The combination of the imaging device with the algorithm enabled the tracing of the morphological changes of colonies treated with different concentrations of antibiotics *in-situ* and the rapid obtainment of AST results. **[Results]** This technique worked effectively for both Gram-positive and Gram-negative bacteria and could determine the minimum inhibitory concentration (MIC) within 2 h, with the results in agreement with those obtained with the clinical gold standard method. **[Conclusion]** Our rapid AST technique significantly reduced the turn-around-time for obtaining the AST profile and had great potential for AST of a wide range of other strains.

**Keywords:** Hough transform; bacterial morphology; image recognition; rapid antimicrobial susceptibility test; *in-situ* incubation

抗生素的滥用和误用,导致抗生素耐药细菌在感染病例中不断增多,例如耐甲氧西林金黄色葡萄球菌和耐万古霉素肠球菌等已经成为全球公共卫生健康的严峻威胁<sup>[1-6]</sup>。由于原有抗生素有效性下降,而且新型抗生素的研发进展缓慢,抗生素耐药细菌感染状况不断恶化,一些感染病例及食源性疾病,如肺炎、结核病、败血症、

食物中毒、肠道传染病等,变得越来越难医治,甚至有时难以找到有效的治疗方案<sup>[7-8]</sup>。以上因素使得患者住院时间延长,并且预后恶化,这两者都导致医疗费用的增加,进一步加重患者负担<sup>[9]</sup>。

为了防止抗生素的滥用,医院普遍采用细菌药敏测试来指导抗生素的合理使用。最常见的细

菌药敏测试方法,如微量肉汤稀释法、纸片扩散法、抗生素浓度梯度法<sup>[10-12]</sup>,是基于抗生素存在下观察细菌宏观可见的生长情况。传统抗菌药物敏感性测试(antimicrobial susceptibility test, AST)基于细菌培养物的光密度检测, $OD_{600}$ 检测限为 $10^7$  CFU/mL<sup>[10-11]</sup>,因此细菌种群需经过16-20 h才能达到最低可检测的生长水平。一些新型的细菌耐药检测方法,例如全基因组测序和PCR检测,通过检测细菌的耐药基因来判别细菌的耐药特性<sup>[13-15]</sup>,但基因检测无法准确反应细菌的表型异质性,而且单细菌中基因的表达也具有随机性<sup>[16]</sup>,因此上述方法也存在一些局限性。

单个细菌是研究细菌耐药性的最小单位,单个细菌在琼脂表面生长和复制会形成团状的微菌落。通过在显微镜下观察细菌成像,可以在单

个微菌落水平上直观地估计细菌生长和分裂带来的面积变化,这比传统的AST方法更加直观和灵敏。另一方面,单菌落的显微成像可以避免常规AST所需的大量细菌,因此极大地缩减了细菌培养时间。

对此,本研究基于不同抗生素浓度作用下的菌落生长形态变化,设计了一种基于微菌落原位延时成像的快速AST。如图1所示,在不同剂量的抗生素作用下,细菌在96孔琼脂糖的上表面自然生长。通过延时成像算法,计算出生长菌落面积的增加量。采用逐一计算单个微菌落的面积变化方案,可以减少统计误差。通过这种方法,可以对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌进行AST检测,并在2 h内测定最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)。

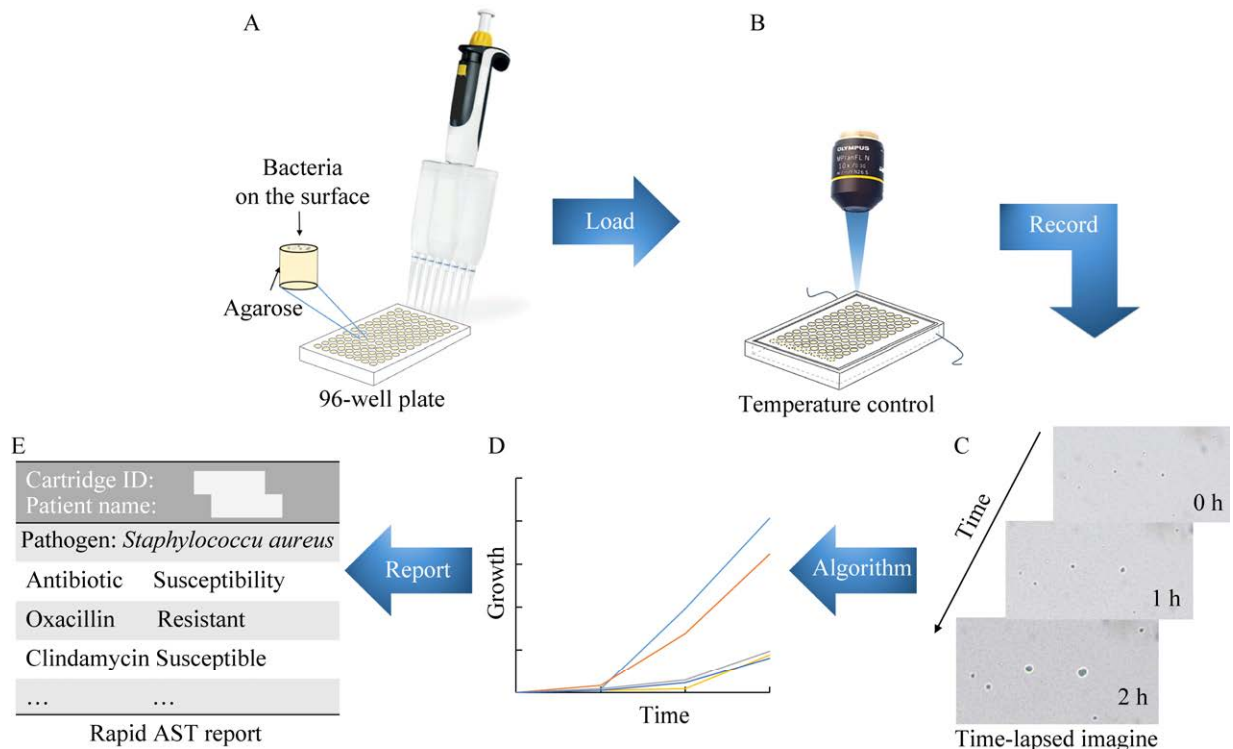


图1 原位微菌落延时成像技术的示意图 A: 样品制备. B: 显微镜下成像. C: 延时成像的数据集. D: 微菌落随时间变化的生长曲线. E: 快速AST报告

Figure 1 The schematic process of *in-situ* microcolony time-lapsed imaging (ISM-TLI) technique. A: Sample preparation. B: Imaging under a microscope. C: Recording time-lapsed imagines. D: Microcolonies growth curves over time. E: Rapid AST report.

# 1 材料与amp;方法

## 1.1 菌种和实验耗材

采用 3 株美国临床实验室标准化协会 (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)<sup>[17]</sup>标准菌株, 包括 2 株革兰氏阳性菌株和 1 株革兰氏阴性菌株, 所有标准菌株均购自中国普通微生物菌种保藏管理中心。采用 4 株临床分离菌株, 包括 2 株革兰氏阳性菌株和 2 株革兰氏阴性菌株, 所有临床分离菌株均来自南京大学医学院附属苏州医院(苏州科技城医院)检验科。本研究涉及的所有菌株见表 1。

LB 肉汤和 MH (Mueller-Hinton) 肉汤, Sigma-Aldrich 公司; 各种抗生素, 上海麦克林生化科技股份有限公司; 琼脂糖, BIOWESTE 公司; 细菌培养皿和细菌培养管, 北京兰杰柯科技有限公司; 96 孔板和其他塑料耗材, 无锡耐思生命科技股份有限公司。

## 1.2 温度控制模块

为了满足恒温孵育的需求, 设计了一种

金属接触式导热的恒温孵育槽。温度控制系统采用高精度 PT1000 热敏电阻(北京聚英翱翔电子有限公司)作为传感器, 采用 STM32F1 微控制器(广州市星翼电子科技有限公司)进行加热和保温反馈控制。将装有琼脂糖和样品的 96 孔培养板置于恒温孵育系统中, 反馈系统设计时以样本所在的凝胶表面温度为温控目标, 能够将样品温度保持在(36.5±0.5) °C。该温控系统的设计紧密贴合了本研究的需求, 具备操作简单、响应速度快、超调量小、可实时监测样本温度等特点。

## 1.3 样本制备

将 2.5%琼脂糖粉末与 LB 肉汤粉末混合溶解后, 在高温蒸汽锅里制备液体琼脂糖。将含有不同浓度抗生素的 MH 肉汤与液体琼脂糖在 45 °C下混合, 然后加载到 96 孔板的孔中。使用载玻片将琼脂糖的上表面压平, 琼脂糖冷却为固体后, 取下载玻片, 琼脂糖上表面为细菌生长环境同时作为显微成像的焦平面。在肉汤中制备菌株以形成接种细菌悬浮液(约 1×10<sup>6</sup> CFU/mL), 用移液枪移取 3 μL 滴加在琼脂糖(孔中心)表面。

表 1 本研究包含的菌株汇总

Table 1 A summary of the strains included in this experiment

细菌种类	来源	革兰氏阳性/阴性
Bacterial species	Source	Gram-positive/Gram-negative
金黄色葡萄球菌 ATCC 29213	标准质控菌株	阳性
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	Standard CLSI strain	Positive
粪肠球菌 ATCC 29212	标准质控菌株	阳性
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Standard CLSI strain	Positive
铜绿假单胞菌 ATCC 27853	标准质控菌株	阴性
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Standard CLSI strain	Negative
苯唑西林敏感金黄色葡萄球菌	临床分离株	阳性
Oxacillin-susceptible <i>Staphylococcus aureus</i>	Clinical isolate	Positive
苯唑西林耐药金黄色葡萄球菌	临床分离株	阳性
Oxacillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>	Clinical isolate	Positive
左氧氟沙星敏感铜绿假单胞菌	临床分离株	阴性
Levofloxacin-susceptible <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Clinical isolate	Negative
左氧氟沙星耐药铜绿假单胞菌	临床分离株	阴性
Levofloxacin-resistant <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Clinical isolate	Negative

## 1.4 图像拍摄

使用与加热系统集成的正置显微镜, 利用奥林巴斯公司的 MPlanFLN 10×/0.30 镜头进行微菌落成像。成像区域的大小为 800 μm×800 μm。使用自制的自动定位和对焦系统在同一区域拍摄延时图像, 工业相机(深圳市迈德威视科技有限公司)的分辨率为 5 488×3 672 像素。以 1 h 的间隔拍摄延时图像, 并在 1 s 内拍摄单张照片。通过调节相机参数, 确保获得曝光度、白平衡、环境光线等一致性较好的照片。

## 1.5 图像处理

使用 MATLAB R2016a (MathWorks)编写图像处理与分析的算法。由于得到的原始微菌落图像中含有较多的干扰噪声, 因此, 对原始图像进行 RGB 图像转换为灰度值、高斯滤波等预处理, 提高图像一致性并降低噪音, 得到高斯滤波后的初始图像。对比了多种边缘检测算法, 最后选择了效果最佳的 Canny 算法, 并选择了最优的二值化阈值。

Canny 算法通过找寻图像中灰度强度变化最大的位置, 得到最优的边缘检测结果。该算法核心思路如下: 首先, 计算图像的梯度, 通过非极大值抑制, 过滤非边缘像素, 保留梯度强度的极大值; 然后通过双阈值方法搜索潜在的边界, 高阈值被视为强边界, 低阈值被视为弱边界, 当某一弱边界的像素位置和强边界相邻, 将其归为边界, 否则被抑制。

## 1.6 特征提取和菌落识别

本研究的图像背景噪音及目标检测物(微菌落)的情况适合通过霍夫变换进行特征提取, 但由于菌落边缘模糊, 往往导致对同一菌落进行了多次拟合, 造成菌落重复计数。针对重复拟合的问题, 我们对霍夫变换的算法进行了优化, 对每一个菌落的边缘拟合进行了去重复的算法操作, 每一个菌落均被圆圈标识出且仅标识出一次, 菌

落计数做到不重不漏。同时, 算法中排除了远小于或远大于微菌落的杂质。与人工计数对照, 本算法对疑似菌落的检出率达到 97.11%, 对面积变化的菌落检出率达到 99.02%, 完全满足后续观测与统计的需要。

## 1.7 微量肉汤稀释法

采用微量肉汤稀释法作为对照组, 将抗生素加入 MH 肉汤中, 并连续稀释到所需的浓度(本研究浓度分别设置为 8、4、2、1、0.5、0.25、0.125、0 μg/mL)。随后将本研究所提及的菌株制成细菌悬浮液(约  $1 \times 10^6$  CFU/mL, 3 μL)接种到抗生素孔内, 放置在 37 °C 下孵育 20–24 h 判断结果。当无抗生素的孔明显浑浊, 最低抗生素浓度的明显无菌落呈清亮状态的孔, 读抗生素浓度值为该组实验的 MIC。

# 2 结果与分析

## 2.1 抗生素敏感性微菌落的生长

为了获得不同抗生素剂量下原位生长微菌落的延时图像, 构建了带有光学显微镜系统的恒温培养设备用于细菌生长, 实验操作流程如图 1 所示。微菌落在梯度浓度抗生素的固体琼脂糖表面生长。每个琼脂糖孔的质地具有均一性, 表面平坦且透光, 可用作成像的聚焦平面。

为了研究抗生素对细菌形态的影响, 记录了用苯唑西林处理的金黄色葡萄球菌 ATCC 29213 微菌落的形态变化, 如图 2 所示。将单个微菌落与前一时刻的自身面积进行比较, 菌落的面积随细菌的生长而逐渐增大。同时, 也有一些菌落的面积保持不变, 即死亡或被抗生素抑制。结果表明, 随着抗生素浓度的增加, 微菌落的生长速度减慢, 并且菌落的生长比例明显降低。作为对照, 同时记录了更长时间的菌落生长情况, 当抗生素浓度小于 MIC 时, 经历 20 h 的细菌生长, 整个成像视野被大量的细菌完全覆盖。

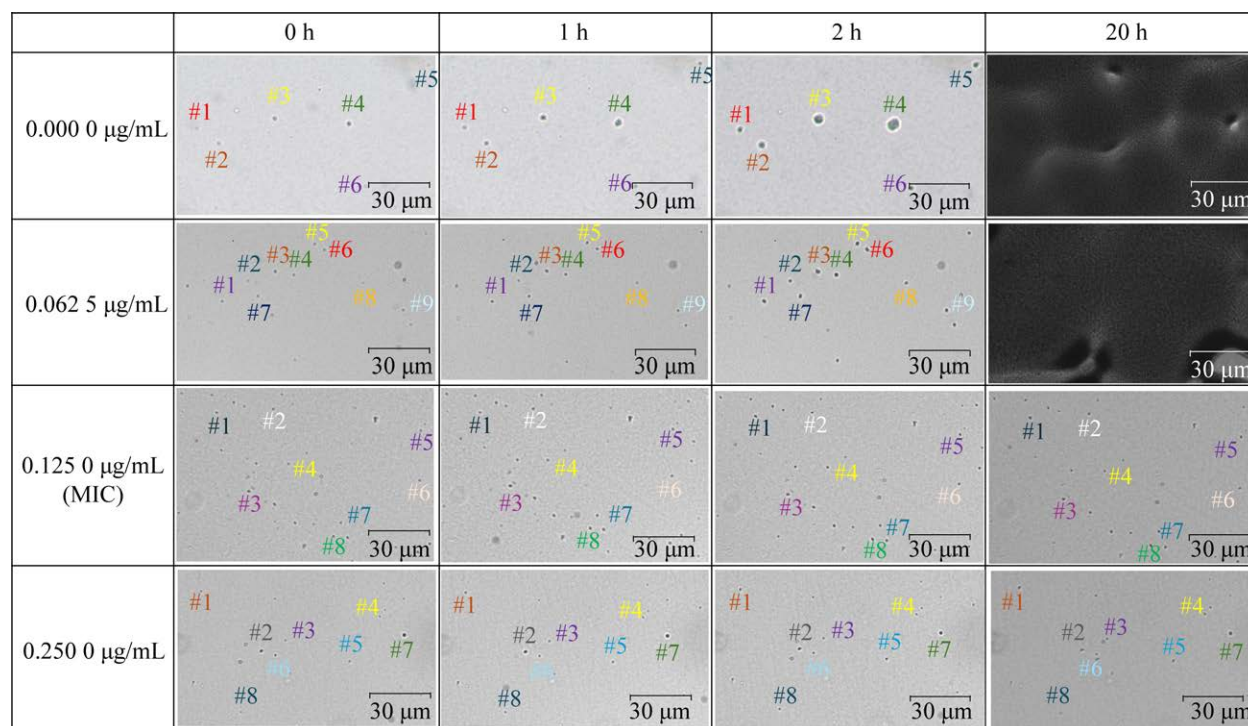


图2 金黄色葡萄球菌 ATCC 29213 在苯唑西林梯度浓度下的差异形态变化 相同的数字对应于相同的菌落. 稀释法测得的 MIC 为 0.125 0 µg/mL

Figure 2 Differential morphological changes of *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 under gradient concentrations of oxacillin. The same number corresponds to the same colony. The MIC measured by BMD was 0.125 0 µg/mL.

## 2.2 微菌落的原位形态识别

由于微菌落被固定在琼脂糖表面, 并且在其生长过程中  $x$ - $y$  坐标无显著变化, 因此它能够原位监测微菌落生长的变化过程。在这种情况下, 具有匹

配坐标的微菌落代表前一时刻的相同微菌落。

为了量化同一位置微菌落面积的变化, 通过算法提取了微菌落的轮廓, 并进一步提取了位置和面积信息, 如图 3 所示。

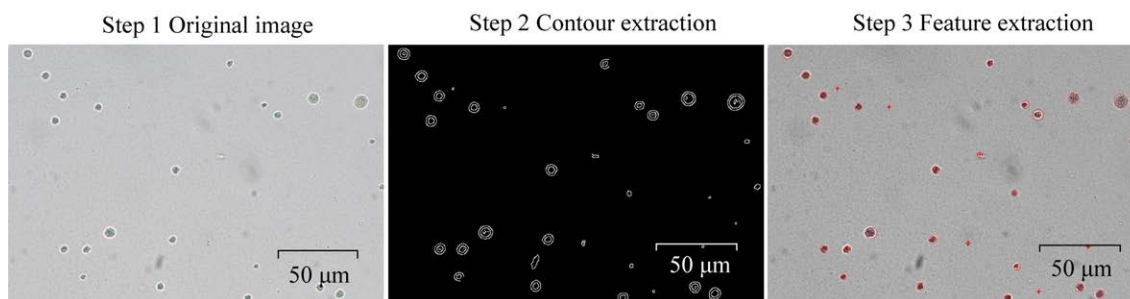


图3 微菌落的原位延时成像算法处理

Figure 3 Algorithm processing of *in-situ* microcolony time-lapsed image.

对于每个微菌落, 使用公式(1)计算其归一化生长程度(normalized growth level)。 $S_t$  表示  $t$  时刻该位置单个微菌落的面积,  $S_0$  表示初始时刻该位置单个微菌落的面积。

$$\text{Normalized growth level} = \frac{S_t - S_0}{S_0} \quad (1)$$

为研究整个图像中大量菌落生长面积变化率的分布, 基于公式(1)绘制了不同时间间隔

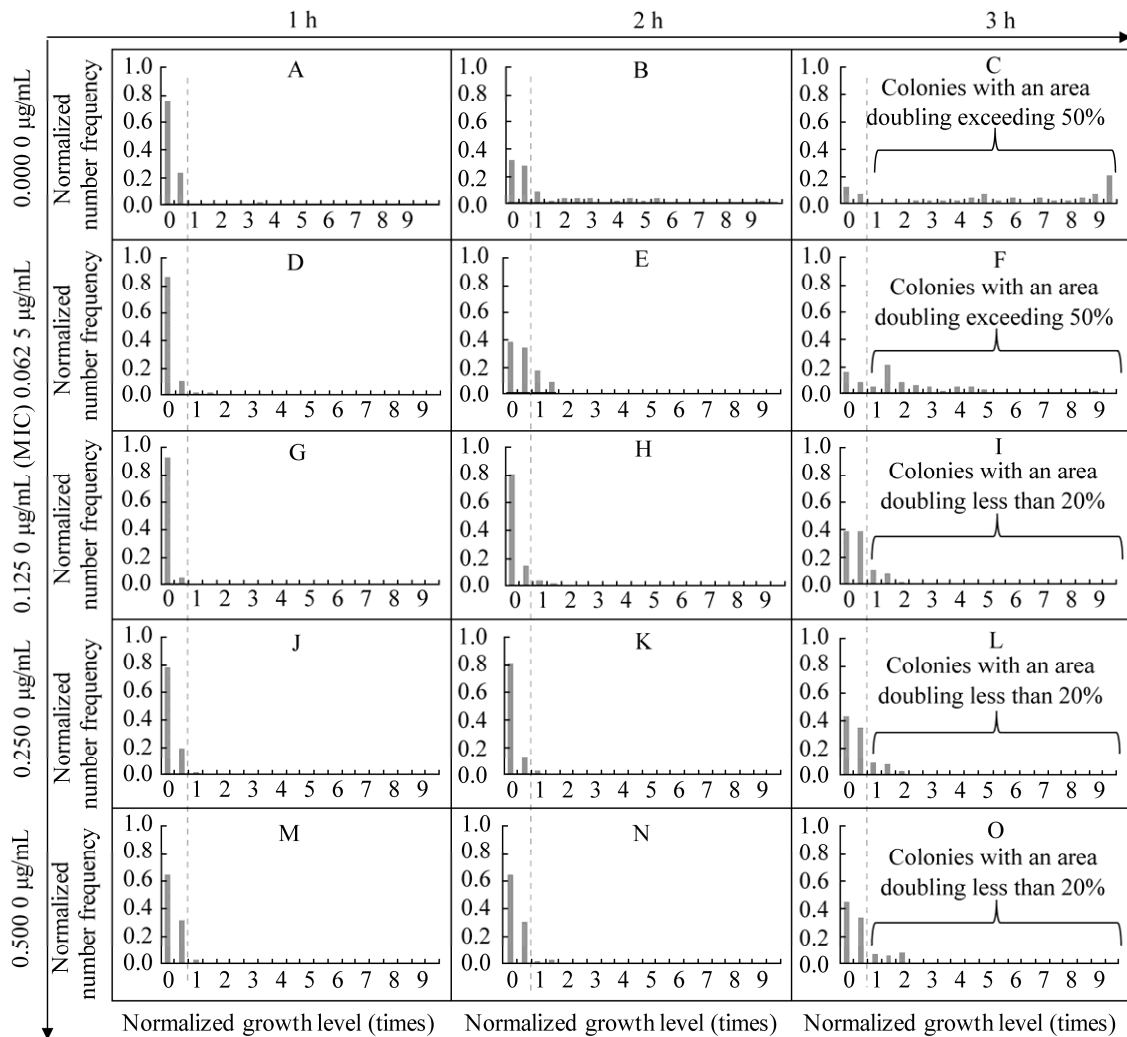


图 4 不同浓度苯唑西林下、不同时间间隔的金黄色葡萄球菌 ATCC 29213 菌落归一化生长程度直方图 A: 无抗生素, 1 h. B: 无抗生素, 2 h. C: 无抗生素, 3 h. D: 0.062 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  苯唑西林, 1 h. E: 0.062 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  苯唑西林, 2 h. F: 0.062 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  苯唑西林, 3 h. G: 0.125 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  苯唑西林, 1 h. H: 0.125 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  苯唑西林, 2 h. I: 0.125 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  苯唑西林, 3 h. J: 0.250 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  苯唑西林, 1 h. K: 0.250 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  苯唑西林, 2 h. L: 0.250 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  苯唑西林, 3 h. M: 0.500 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  苯唑西林, 1 h. N: 0.500 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  苯唑西林, 2 h. O: 0.500 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  苯唑西林, 3 h.

Figure 4 Under different concentrations of oxacillin antibiotics, histograms of normalized growth level of *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 colonies at different time intervals. A: Antibiotic-free, 1 h. B: Antibiotic-free, 2 h. C: Antibiotic-free, 3 h. D: 0.062 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  oxacillin, 1 h. E: 0.062 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  oxacillin, 2 h. F: 0.062 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  oxacillin, 3 h. G: 0.125 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  oxacillin, 1 h. H: 0.125 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  oxacillin, 2 h. I: 0.125 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  oxacillin, 3 h. J: 0.250 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  oxacillin, 1 h. K: 0.250 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  oxacillin, 2 h. L: 0.250 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  oxacillin, 3 h. M: 0.500 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  oxacillin, 1 h. N: 0.500 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  oxacillin, 2 h. O: 0.500 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  oxacillin, 3 h.

(0–1 h、0–2 h、0–3 h)原位菌落面积变化的直方图。如图 4 所示, 每个子图的水平坐标表示归一化生长程度(菌落面积增长的倍数), 而垂直坐标表示菌落面积增长相应倍数下的菌落数量的累积计数, 然后将其归一化为相对于总数的频率。

图 4 展示了苯唑西林抗生素作用下, 金黄色葡萄球菌 ATCC 29213 的归一化生长程度分布直方图。从上到下对应 0.000 0、0.062 5、0.125 0 和 0.500 0  $\mu\text{g/mL}$  浓度的苯唑西林抗生素作用, 从左到右对应 0–1 h、0–2 h 和 0–3 h 的归一化生长程度分布直方图。

根据稀释法测得质控菌株的 MIC 结果, 金黄色葡萄球菌 ATCC 29213 在苯唑西林抗生素浓度为 0.125 0  $\mu\text{g/mL}$  时显示出抗生素敏感性。相应地, 直方图中浓度为 0.125 0  $\mu\text{g/mL}$  的一行子图(图 4G–4I), 相比于上方的一行子图, 菌落的归一化生长程度降低。在图 4C、4F 中, 即苯唑西林的浓度为 0.000 0  $\mu\text{g/mL}$ 、0.062 5  $\mu\text{g/mL}$  时, 菌落的归一化生长程度达到 3 倍以上, 甚至 8 倍以上; 在图 4I 中, 即苯唑西林的浓度达到 0.125 0  $\mu\text{g/mL}$  时, 绝大多数菌落的归一化生长程度小于 1 倍。

在 2 h 观察期内, 从直方图的变化可以看出, 如果抗生素浓度低于 MIC, 即抗生素剂量不足时, 较多菌落以更快的速度复制和生长(图 4B、4E)。如果抗生素浓度超过 MIC, 菌落不会完全死亡或停止生长, 少量菌落以缓慢的速度生长(图 4H、4K、4N)。同时, 如果抗生素浓度超过 MIC, 则与低于 MIC 的抗生素浓度相比, 相应直方图中归一化生长程度较高的菌落占总数的比例大幅降低。因此, 生长速度较快的菌落总数的比例可用于随后确定图片数据集中的细菌是否处于抗生素耐药状态。

### 2.3 基于菌落形态测定的最小抑菌浓度

根据从 0、1、2、3 h 捕获的样本区域的延

时图像中获得的结果, 观察到每个时间点的菌落生长速度高度多样化, 并呈现广泛的分布。在 2 h 的归一化生长程度直方图中, 选择不同的归一化生长程度, 绘制受试者工作特征曲线(receiver operating characteristic curve, ROC curve), 得到在不同阈值下的灵敏度及特异性差异。如图 5 所示, 在归一化生长程度为 1 时, 分类评估指标(area under the curve, AUC)的效果最佳。为了简化分析, 考虑整个观测过程中的菌落生长情况及 ROC 曲线的结果, 我们定义图 4 中横坐标读数超过 1 倍的菌落为生长程度较高的菌落。

图 6 展示了归一化生长程度超过 1 倍的菌落占菌落总数的比例。如图 6A 所示, 随着时间的推移, 在无抗生素和 0.062 5  $\mu\text{g/mL}$  苯唑西林作用下, 大量的金黄色葡萄球菌 ATCC 29213 菌落在生长(归一化生长程度超过 1 的菌落在 2 h 占比大于 25%, 在 3 h 占比大于 50%); 在 0.125 0、0.250 0、0.500 0  $\mu\text{g/mL}$  苯唑西林作用下, 仅有少量菌落在生长(归一化生长程度超过 1 的菌落在 2 h 占比少于 15%, 在 3 h 占比少于 20%)。

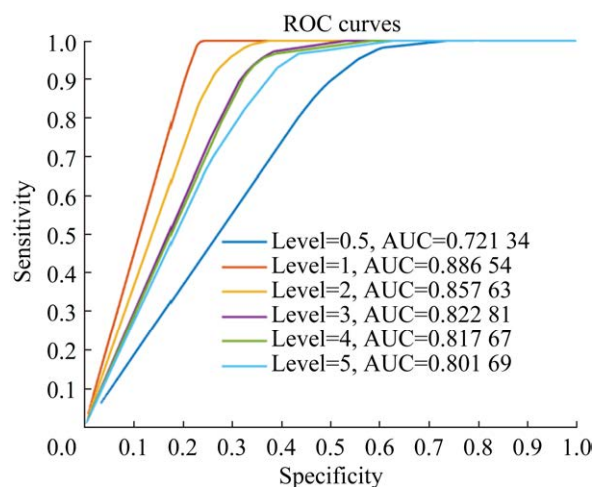
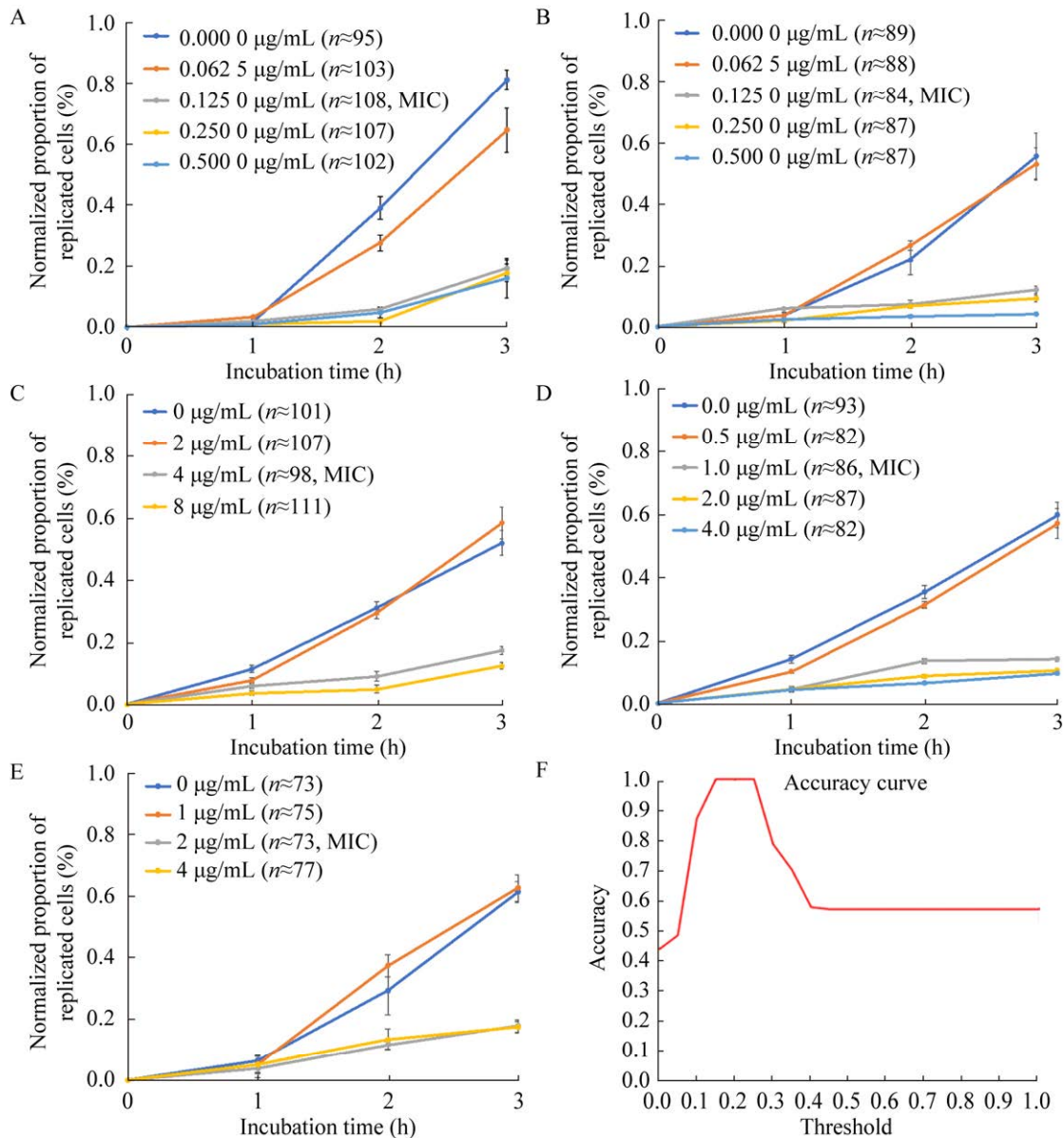


图 5 不同的归一化生长程度下的 ROC 曲线  
Figure 5 ROC curves at different normalized growth levels





**图 6** 面积倍增的菌落比例随时间变化 每个测试设置 3 组平行, 实线为 3 组平行结果的均值, 误差限小于 7.53%。A: 不同浓度的苯唑西林处理金黄色葡萄球菌 ATCC 29213。B: 不同浓度的克林霉素处理金黄色葡萄球菌 ATCC 29213。C: 不同浓度的克林霉素处理粪肠球菌 ATCC 29212。D: 不同浓度的利福平处理粪肠球菌 ATCC 29212。E: 不同浓度的左氧氟沙星处理铜绿假单胞菌 ATCC 27853。F: 在 2 h 不同阈值对应的分类结果准确率。

**Figure 6** The proportion of colonies with doubling areas *in-situ* changes over time. Each test was performed in triplicate. The solid line is the mean of the three sets of parallel results, the error limit is less than 7.53%. A: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 with different oxacillin concentrations treatment. B: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 with different clindamycin concentrations treatment. C: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 with different clindamycin concentrations treatment. D: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 with different rifampin concentrations treatment. E: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 with different levofloxacin concentrations treatment. F: The accuracy of classification results corresponding to different thresholds at 2 h.

为了进一步探究细菌形态学算法的 MIC 测定,测试了几种常见的菌株和抗生素组合,包括革兰氏阳性菌金黄色葡萄球菌 ATCC 29213、粪肠球菌 ATCC 29212 和革兰氏阴性菌铜绿假单胞菌 ATCC 27853,其他细菌和抗生素组合折线图如图 6B–6E 所示。根据面积倍增菌落比例和其对应的稀释法药敏结果,绘制出不同的比例阈值下 MIC 判别结果的准确率曲线,如图 6F 所示,据此选取 2 h 阈值为 20%用于在折线图中判别 MIC,即当空白对照组的菌落生长比例高于 20%时,读取生长比例小于 20%的最低抗生素浓度作为 MIC。例如,应用该阈值可读出图 6A 中抑制金黄色葡萄球菌生长的有效苯唑西林抗生素浓度为 0.125 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,与稀释法测得的 MIC 结果一致。

与图 6 相对应的 AST 报告结果(表 2)清楚地表明,延时成像算法所得到的 MIC 结果与稀释法测得的 MIC 结果一致,满足 CLSI 的质控范围。因此,细菌形态学算法对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌均适用。

## 2.4 临床分离株的检测

本研究方法的最终检测目标为临床样本,因此,接下来使用临床分离株对该方法进行验证,选取 1 株苯唑西林敏感的金黄色葡萄球菌、1 株苯唑西林耐药的金黄色葡萄球菌、1 株左氧氟沙星敏感的铜绿假单胞菌、1 株左氧氟沙星耐药的铜绿假单胞菌共 4 种临床样本菌株。该临床分离株在医院经过平板培养,再在实验室内摇菌并制备获得细菌悬浮液(约  $1 \times 10^6$  CFU/mL)。

使用本研究的原位微菌落延时成像技术,对临床分离株进行检测。如图 7 所示,在抗生素浓度低于 MIC 时,临床分离株在 0–3 h 的生长程度较高,而且生长程度较高所占的比例较大。图 7 中的每一张延时成像的图像下方展示了其对应菌落的归一化生长程度频率直方图。

分别绘制出 4 种临床分离菌株的“面积倍增的菌落比例随时间变化”的折线图,如图 8 所示。根据 2.3 节中数据结果的规律,将 2 h 20%的阈值作为划分值,将折线图的结果进行读数,并与微量肉汤稀释法的结果进行对比(表 3)。

表 2 延时成像算法与金标准方法判断的标准菌株 MIC 值对比

Table 2 Comparison of MIC values of standard CLSI strains by ISM-TLI algorithm and gold standard method

细菌种类	抗生素	延时成像算法的 MIC	稀释法的 MIC	CLSI 的 MIC
Bacterial species	Antibiotic	MIC from ISM-TLI ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	MIC from BMD ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	MIC from CLSI ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
金黄色葡萄球菌 ATCC 29213	苯唑西林 Oxacillin	0.125 0	0.125 0	0.120 0–0.500 0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	克林霉素 Clindamycin	0.125 0	0.125 0	0.062 5–0.250 0
粪肠球菌 ATCC 29212	克林霉素 Clindamycin	4.000 0	4.000 0	4.000 0–16.000 0
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	利福平 Rifampin	1.000 0	1.000 0	0.500 0–4.000 0
铜绿假单胞菌 ATCC 27853	左氧氟沙星 Levofloxacin	2.000 0	2.000 0	0.500 0–4.000 0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853				

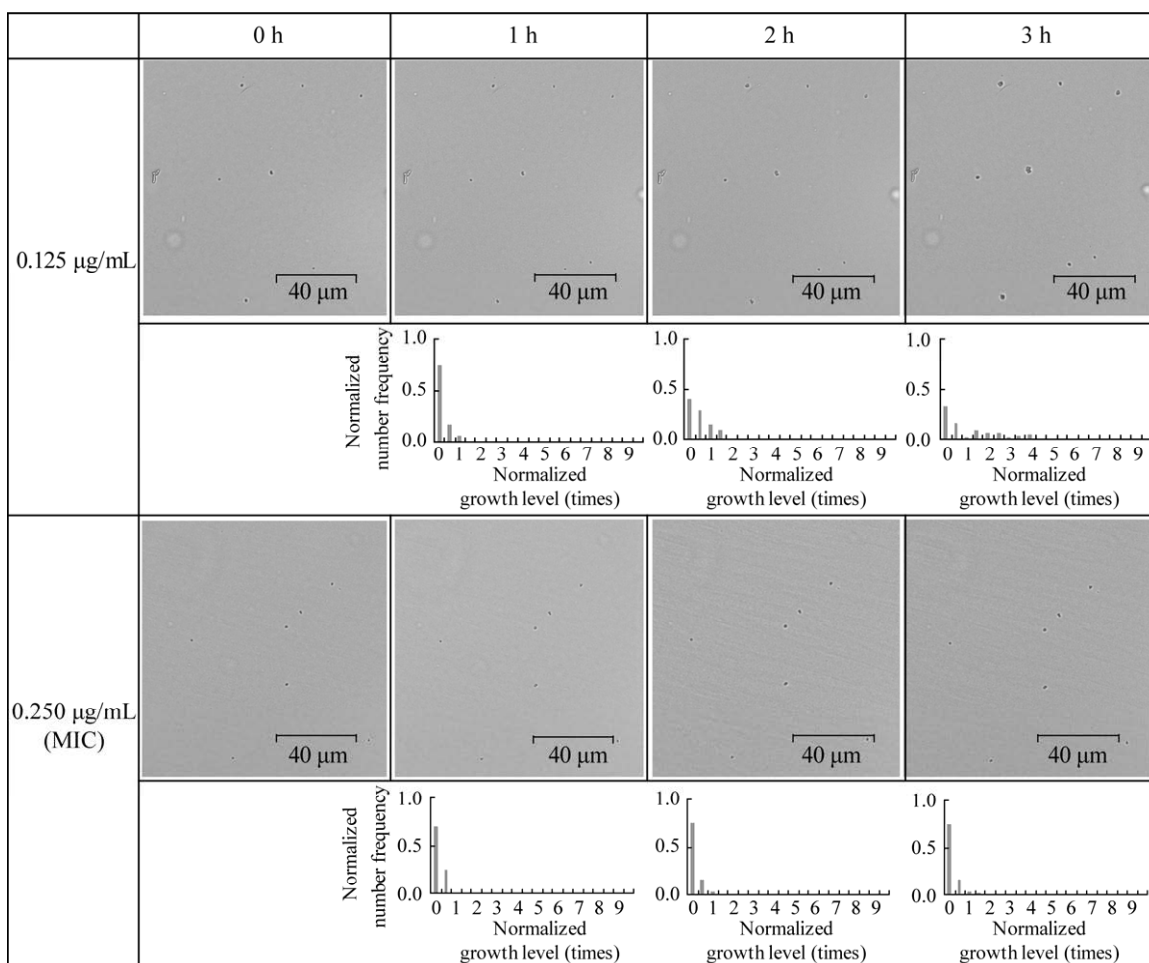


图7 苯唑西林抗生素浓度为  $0.125 \mu\text{g/mL}$  和  $0.250 \mu\text{g/mL}$  时, 苯唑西林敏感金黄色葡萄球菌的延时成像及其归一化生长程度的频率直方图

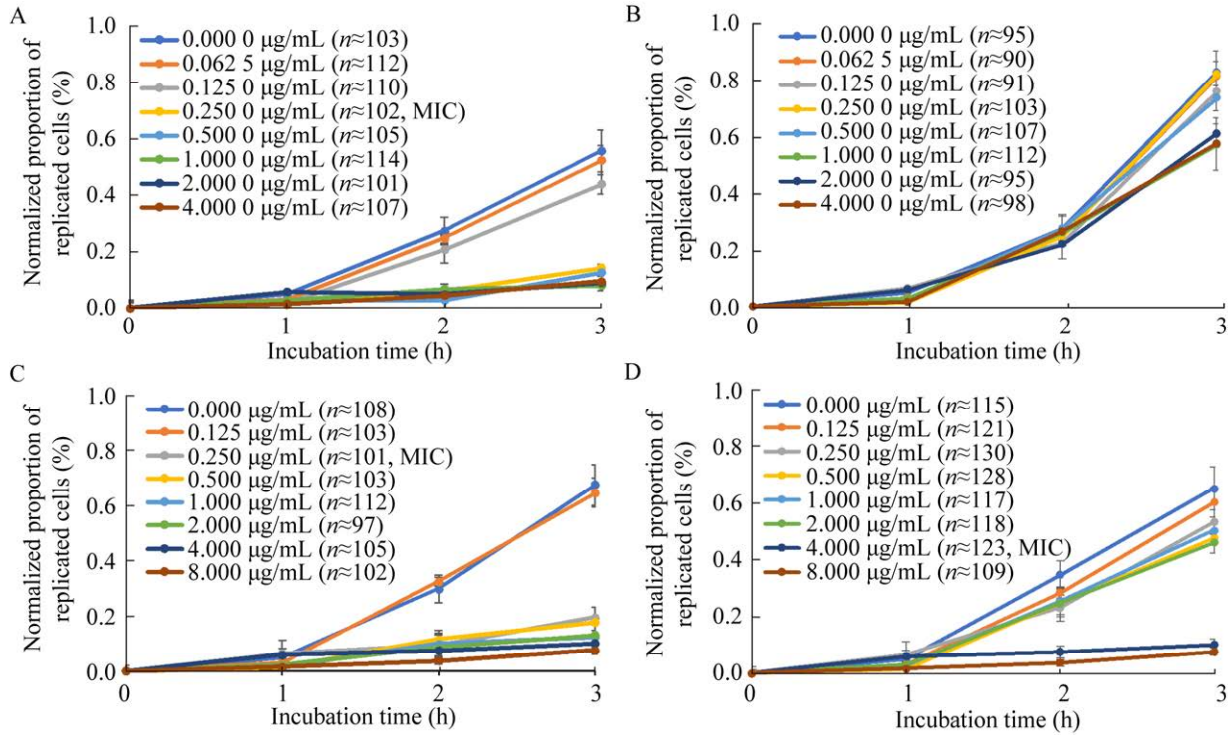
Figure 7 Time-lapse imaging of oxacillin-susceptible *Staphylococcus aureus* and frequency histograms of normalized growth level in colony area at oxacillin antibiotic concentrations of  $0.125 \mu\text{g/mL}$  and  $0.250 \mu\text{g/mL}$ .

本研究的细菌形态算法获得的 MIC 与金标准方法的结果具有一致性, 适用于临床分离菌株。与传统金标准方法和人工标注相比, 本课题的细菌形态算法具有替代肉眼观测和评判的潜力, 能够降低不同操作人员和识别人员的误差, 同时减少工作量。

### 3 讨论与展望

为了证明原位微菌落延时成像技术的多功能性, 本研究使用了 3 种最常见的病原体。金黄色葡萄球菌是人类化脓性感染中最常见的病原

体, 它与乙型肝炎感染、艾滋病一起列为全球形势最严峻 3 种的传染病<sup>[18-19]</sup>, 估计有 21%–30% 的人群是金黄色葡萄球菌的长期携带者<sup>[20]</sup>。粪肠球菌是一种共生细菌, 约占人类肠道的 90%–95%。粪肠球菌因具有产生耐药物质的能力, 使其不易被抗生素杀死, 因此近年来已成为临床感染中的重要致病菌之一<sup>[21]</sup>。铜绿假单胞菌是一种极为常见的机会性病原体<sup>[22]</sup>, 具有复杂的耐药机制、多重耐药性和交叉耐药性, 通常会导致危重感染, 成为患者死亡的致命原因。因此, 本研究选择了上述典型细菌。



**图 8** 面积倍增的菌落比例随时间变化 每个测试设置三组平行，实线为三组平行结果的均值，误差限小于 9.30%。A：不同浓度的苯唑西林处理苯唑西林敏感金黄色葡萄球菌。B：不同浓度的苯唑西林处理苯唑西林耐药金黄色葡萄球菌。C：不同浓度的左氧氟沙星处理左氧氟沙星敏感铜绿假单胞菌。D：不同浓度的左氧氟沙星处理左氧氟沙星耐药铜绿假单胞菌

Figure 8 The proportion of colonies with doubling areas *in-situ* changes over time. Each test was performed in triplicate. The solid line is the mean of the three sets of parallel results, the error limit is less than 9.30%. A: Oxacillin-susceptible *Staphylococcus aureus* with different oxacillin concentrations treatment. B: Oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* with different oxacillin concentrations treatment. C: Levofloxacin-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* with different levofloxacin concentrations treatment. D: Levofloxacin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with different levofloxacin concentrations treatment.

**表 3** 延时成像算法与金标准方法判断的临床分离菌株 MIC 值对比

Table 3 Comparison of MIC values of clinical isolates by ISM-TLI algorithm and gold standard method

临床分离株 Clinical isolates	抗生素 Antibiotic	延时成像算法的 MIC MIC from ISM-TLI ( $\mu\text{g/mL}$ )	稀释法的 MIC MIC from BMD ( $\mu\text{g/mL}$ )	临床报告结果 Clinically reported results ( $\mu\text{g/mL}$ )
苯唑西林敏感金黄色葡萄球菌 Oxacillin-susceptible <i>Staphylococcus aureus</i>	苯唑西林 Oxacillin	0.25	0.25	0.25
苯唑西林耐药金黄色葡萄球菌 Oxacillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>		>4.00	>8.00	>2.00
左氧氟沙星敏感铜绿假单胞菌 Levofloxacin-susceptible <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	左氧氟沙星 Levofloxacin	0.25	0.25	<1.00
左氧氟沙星耐药铜绿假单胞菌 Levofloxacin-resistant <i>Pseudomonas aeruginosa</i>		4.00	4.00	4.00

原位微菌落延时成像技术对不同作用机制的抗生素显示出适用性。苯唑西林是一种耐青霉素酶的 $\beta$ -内酰胺类药物,它可以与具有 $\beta$ -内酰胺环的青霉素结合蛋白共价,从而抑制细菌细胞壁的合成<sup>[23]</sup>。克林霉素是一种林可酰胺类抗生素,可抑制核糖体易位。利福平是一种安沙霉素抗生素,通过抑制细菌DNA依赖性RNA聚合酶来抑制细菌DNA依赖性RNA的合成<sup>[24]</sup>。左氧氟沙星是一种广谱抗生素,对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌均有活性。与所有喹诺酮类药物一样,它通过抑制DNA旋转酶和拓扑异构酶IV(两者皆属细菌IIA型拓扑异构酶)发挥作用<sup>[25]</sup>。

结果表明,本研究的方法可以将AST周期缩短至2 h。在琼脂糖表面进行细菌培养,使得细菌可以自然生长和复制,不会因空间限制、氧气扩散受限对细菌形态造成影响。同时,96孔板中的琼脂糖平面易于制备,有利于广泛的推广和商业化。此外,我们的原位微菌落延时成像技术可用于多种细菌,包括革兰氏阴性菌或革兰氏阳性菌,厌氧菌或需氧菌,也适用于不同形状或大小的微生物。

然而,在初步探索中,我们发现一些抗生素在前2 h内对细菌无明显的抑制作用。同时,自然细菌分裂倍增所需的时间存在显著差异,如结核分枝杆菌约为24 h<sup>[26]</sup>,梅毒螺旋体约为40 h<sup>[27]</sup>。考虑到临床用药的复杂性和细菌抗生素组合的多样性,仍需更深入的研究来明确数百种细菌抗生素组合在形态学变化上的差异。同时,在临床的实际检测流程中,仍然需要从病人的痰液、血液、尿液等样本中分离并富集细菌,本研究提到的方法并未对这一环节进行时间的缩减。未来的工作将集中在探索样本分离与富集等前处理的时间优化方法,建立大量的实际临床样本数据库,将本研究方法扩展到更广泛的抗生素和细菌组合的应用中。

## 参考文献

- [1] ROTELLO VM. Nanomaterials for fighting multidrug-resistant biofilm infections[J]. BME Frontiers, 2023, 4: 0017.
- [2] GAJDÁCS M. The continuing threat of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. Antibiotics, 2019, 8(2): 52.
- [3] AHMED MO, BAPTISTE KE. Vancomycin-resistant enterococci: a review of antimicrobial resistance mechanisms and perspectives of human and animal health[J]. Microbial Drug Resistance, 2018, 24(5): 590-606.
- [4] AMSTERDAM D. Perspective: limiting antimicrobial resistance with artificial intelligence/machine learning[J]. BME Frontiers, 2023, 4: 0033.
- [5] PATERSON DL, BONOMO RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2005, 18(4): 657-686.
- [6] JEAN SS, LEE NY, TANG HJ, LU MC, KO WC, HSUEH PR. Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* infections: Taiwan aspects[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 2888.
- [7] GAJDÁCS M. The concept of an ideal antibiotic: implications for drug design[J]. Molecules, 2019, 24(5): 892.
- [8] GWYNN MN, PORTNOY A, RITTENHOUSE SF, PAYNE DJ. Challenges of antibacterial discovery revisited[J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2010, 1213(1): 5-19.
- [9] LEE WB, FU CY, CHANG WH, YOU HL, WANG CH, LEE MS, LEE GB. A microfluidic device for antimicrobial susceptibility testing based on a broth dilution method[J]. Biosensors & Bioelectronics, 2017, 87: 669-678.
- [10] RELLER LB, WEINSTEIN M, JORGENSEN JH, FERRARO MJ. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices[J]. Clinical Infectious Diseases, 2009, 49(11): 1749-1755.
- [11] DALGAARD P, ROSS T, KAMPERMAN L, NEUMEYER K, McMEEKIN TA. Estimation of bacterial growth rates from turbidimetric and viable count data[J]. International Journal of Food Microbiology, 1994, 23(3/4): 391-404.
- [12] WIEGAND I, HILPERT K, HANCOCK REW. Agar and broth dilution methods to determine the minimal

- inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances[J]. *Nature Protocols*, 2008, 3: 163-175.
- [13] SU M, SATOLA SW, READ TD. Genome-based prediction of bacterial antibiotic resistance[J]. *Journal of clinical microbiology*, 2019, 57(3). DOI: 10.1128/jcm.01405-18.
- [14] STROMMINGER B, KETTLITZ C, WERNER G, WITTE W. Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus*[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003, 41(9): 4089-4094.
- [15] 孙志刚, 刘静, 王奕凯, 任晓敏, 司晓慧, 吕若一, 张倩, 董虹, 孙英健, 刘晓晔. 微生物检测技术在动物细菌性疫病诊断中的研究进展[J/OL]. *微生物学杂志*, 2023-11-22. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1186.Q.20231121.1123.002.html>.  
SUN ZG, LIU J, WANG YK, REN XM, SI XH, LYU RY, ZHANG Q, DONG H, SUN YJ, LIU XY. Advances in microbial detection techniques in animal bacterial disease diagnosis[J/OL]. *Journal of Microbiology*, 2023-11-22. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1186.Q.20231121.1123.002.html> (in Chinese).
- [16] ELOWITZ MB, LEVINE AJ, SIGGIA ED, SWAIN PS. Stochastic gene expression in a single cell[J]. *Science*, 2002, 297(5584): 1183-1186.
- [17] HUMPHRIES R, BOBENCHIK AM, HINDLER JA, SCHUETZ AN. Overview of changes to the clinical and laboratory standards institute Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, M100, 31st edition[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2021, 59(12): e0021321.
- [18] 程禹, 罗敏玉, 陈代杰. 耐甲氧西林金葡菌到万古霉素高度耐药金葡菌的发展及其感染的药物治疗[J]. *世界临床药物*, 2011, 32(8): 482-487.  
CHENG Y, LUO MY, CHEN DJ. Development and pharmacotherapy of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin resistant *Staphylococcus aureus*[J]. *World Clinical Drugs*, 2011, 32(8): 482-487 (in Chinese).
- [19] JIA CY, WU FG. Antibacterial chemodynamic therapy: materials and strategies[J]. *BME Frontiers*, 2023, 4: 0021.
- [20] TONG SYC, DAVIS JS, EICHENBERGER E, HOLLAND TL, JR FOWLER VG. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2015, 28(3): 603-661.
- [21] LI B, MA CL, YU X, SUN Y, LI MM, YE JZ, ZHANG YP, WU Q, ZHOU TL. Investigation of mechanisms and molecular epidemiology of linezolid nonsusceptible *Enterococcus faecalis* isolated from a teaching hospital in China[J]. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 2016, 49(4): 595-599.
- [22] 李佳珣, 叶雨寒, 胡心怡, 张秋香, 赵建新. 抑制铜绿假单胞菌和金黄色葡萄球菌生物膜形成的乳杆菌筛选及机制初探[J]. *微生物学杂志*, 2023, 43(6): 89-96.  
LI JX, YE YH, HU XY, ZHANG QX, ZHAO JX. Screening of biofilm forming *Lactobacillus* inhibiting *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* and initial probe of its mechanism[J]. *Journal of Microbiology*, 2023, 43(6): 89-96 (in Chinese).
- [23] BUSH K. Beta-lactam antibiotics: penicillins[J]. *Antibiotic and chemotherapy*, 2010: 200-225.
- [24] CALVORI C, FRONTALI L, LEONI L, TECCE G. Effect of rifamycin on protein synthesis[J]. *Nature*, 1965, 207: 417-418.
- [25] DRLICA K, ZHAO X. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1997, 61(3): 377-392.
- [26] SRIVASTAVA S, van RIJN SP, WESSELS AM, ALFFENAAR JW C, GUMBO T. Susceptibility testing of antibiotics that degrade faster than the doubling time of slow-growing mycobacteria: ertapenem sterilizing effect versus *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2016, 60(5): 3193-3195.
- [27] EDMONDSON DG, DeLAY BD, KOWIS LE, NORRIS SJ. Parameters affecting continuous *in vitro* culture of *Treponema pallidum* strains[J]. *mBio*, 2021, 12(1): e03536-20.