

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6795495号
(P6795495)

(45) 発行日 令和2年12月2日(2020.12.2)

(24) 登録日 令和2年11月16日(2020.11.16)

(51) Int. Cl. F I
C 1 2 Q 1/02 (2006.01) C 1 2 Q 1/02
G O 1 N 27/02 (2006.01) G O 1 N 27/02 D

請求項の数 13 (全 19 頁)

(21) 出願番号	特願2017-518797 (P2017-518797)	(73) 特許権者	595117091
(86) (22) 出願日	平成27年10月14日 (2015.10.14)		ベクトン・ディキンソン・アンド・カンパニー
(65) 公表番号	特表2017-532033 (P2017-532033A)		BECTON, DICKINSON AND COMPANY
(43) 公表日	平成29年11月2日 (2017.11.2)		アメリカ合衆国 ニュー・ジャージー 07417-1880 フランクリン・レイクス
(86) 国際出願番号	PCT/US2015/055501		ベクトン・ドライブ 1
(87) 国際公開番号	W02016/064635		1 BECTON DRIVE, FRANKLIN LAKES, NEW JERSEY 07417-1880, UNITED STATES OF AMERICA
(87) 国際公開日	平成28年4月28日 (2016.4.28)		
審査請求日	平成30年10月15日 (2018.10.15)	(74) 代理人	100099623
(31) 優先権主張番号	62/063, 602		弁理士 奥山 尚一
(32) 優先日	平成26年10月14日 (2014.10.14)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 微生物を検出するリアクタンス及びキャパシタンス検知プラットフォーム

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

微生物増殖を検出するインピーダンスベースの方法であって、
 少なくとも2つの電極が配置された容器を準備するステップと、
 微生物増殖についてモニタリングされるサンプルを前記容器に導入するステップであって、前記電極は前記サンプル内に浸漬される、ステップと、
前記電極に対して電氣的に接続され、総インピーダンスの虚数のリアクタンス成分を検出する信号処理電子回路を準備するステップと、
虚数のリアクタンスを求めるために前記信号処理電子回路の周波数感度をチューニングするステップと、
 前記サンプルの総インピーダンスを測定して、前記サンプルの総イオン組成を経時的に求めるステップと、
 前記測定から、前記総インピーダンスの虚数のリアクタンス成分を経時的に求めるステップと、
前記総インピーダンスの虚数のリアクタンス成分について少なくとも1つのゼロクロス周波数を求めるステップと、
 前記虚数のリアクタンスを経時的に求めることから、微生物の増殖が起こっているか否かを判断するステップと、
 を含む、方法。

【請求項 2】

前記チューニングすることは、ロックイン増幅器検出器の容量性入力段と並列の1つ又は複数の抵抗器の抵抗を調整することによるものである、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記チューニングすることは、ブリッジ抵抗器 - キャパシタチューニング回路によるものである、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

前記総インピーダンスは、40kHz～80kHzの高周波数において測定される、請求項1に記載の方法。

【請求項5】

前記総インピーダンスは、1kHz～10kHzの低周波数において測定される、請求項1に記載の方法。

【請求項6】

微生物の増殖に対する感度を有するシステムであって、
生体サンプルを収容するように適合された容器に接続された信号処理電子回路と、
前記容器内に進入し、前記生体サンプルと接触する2つ以上の電極と、
を備え、

前記信号処理電子回路は、前記サンプルの総インピーダンスを測定し、前記総インピーダンスの虚数のリアクタンス成分を経時的に検出し、前記総インピーダンスの虚数のリアクタンス成分の変化を経時的に求め、求められた前記虚数のリアクタンス成分の変化に基づいて、微生物の増殖が起こっているか否かを判断するように構成されている、システム

【請求項7】

チューニング素子を更に備える、請求項6に記載のシステム。

【請求項8】

前記チューニング素子は、ロックイン増幅器の容量段と並列の1つ又は複数の可変抵抗器である、請求項7に記載のシステム。

【請求項9】

前記チューニング素子は、ブリッジ抵抗器 - キャパシタチューニング回路である、請求項7に記載のシステム。

【請求項10】

前記電子回路は、高周波数モードの動作と低周波数モードの動作との間で切り替え可能であり、高周波数は、40kHz～80kHzの範囲にあり、低周波数は、1kHz～10kHzの範囲にある、請求項6に記載のシステム。

【請求項11】

チューニング素子を更に備える、請求項10に記載のシステム。

【請求項12】

前記チューニング素子は、ブリッジ抵抗器 - キャパシタチューニング回路である、請求項11に記載のシステム。

【請求項13】

前記ブリッジ抵抗器と直列のスイッチを更に備え、前記システムは、前記スイッチが開いているときは低周波数モードで動作し、前記スイッチが閉じているときは高周波数モードで動作する、請求項12に記載のシステム。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願の相互参照)

本出願は、2014年10月14日に出願された米国仮出願第62/063,602号の出願日の利益を主張する。この米国仮出願の開示内容は、参照することにより本明細書の一部をなすものとする。

【0002】

10

20

30

40

50

本発明は、臨床サンプル内の微生物検出の分野に関する。本発明は、特に、生体サンプル内のバクテリアの有無のより高速な検出を達成することに関する。

【背景技術】

【0003】

複製する微生物（バクテリア、真菌、ウイルス）を検出する能力は、多くの臨床微生物学の用途において基本となる必要条件である。この点に関して、生物の増殖を検出する幾つかの直接的及び／又は間接的な方法が開発されている。

【0004】

例えば、間接的な検出方法は、生物の増殖／複製に対する副生成物、分子、化合物、又は化学反応体の影響を推定することができる。すなわち、副生成物、分子、化合物、又は化学反応体が、生物の増殖／複製の結果として、集積的かつ累積的に増加するのか、減少するのか、又は変化するのか、である。例えば、増殖する微生物個体群の変化する代謝要求は、蛍光発光の変化又はエラストマセンサの比色変化を通じて観測することができる。そのような検出メカニズムはよく知られているが、検出閾値を越えるのは、生物の濃度がボトル当たりほぼ 10^9 コロニー形成単位（CFU）に達したときである。この結果、多くの臨床的に関連のある血流病原体について、通常の見出時間（TTD）は、8時間～24時間の範囲となる。幾つかの場合には、幾つかの生物は、検出に72時間よりも多くの時間を要する場合がある。

【0005】

加えて、溶液内で生存可能な微生物を検出する電気検出システムが開発されている。一般に、これらのプラットフォームは、微生物増殖の間接的な指標としてインピーダンス測定値を利用する。1つのそのようなシステムは、2013年2月14日に出願された「Impedance-Based Bacterial Detection System」という発明の名称の国際公開第2013/123189号に記載されている。この国際出願は、本出願の譲受人に譲渡されており、参照することにより本明細書の一部をなすものとする。

【0006】

微生物増殖が起こると、荷電生成物（例えば、イオン、リン酸塩、硫酸塩、硝酸塩）の排泄若しくは摂取又は荷電代謝中間体（例えば、乳酸）の産生を通じて、サンプルの全体のイオン構成が変化する。微生物増殖は、培地の全体的な導電率（又は抵抗率）に影響を与える。この導電（又は抵抗）の変化は、溶液の全体的な電気インピーダンスの経時的な変化によって現われる。インピーダンスは、複数の電極を溶液内に浸漬して、電圧（例えば、AC又はDC）応答及び／又は電流応答を測定することによって測定される。これらのシステムは、通常、理論的枠組みを生じるインピーダンスデータに当てはめるデータモデリングを用いて、微生物の増殖に関する情報を抽出する。

【0007】

例えば、幾つかのよく知られているシステムは、特殊化された培養液で満たされた10 mL反応セルを用いる。この反応セルは、産業微生物学サンプルを接種され、最大で24時間培養される。固定周波数（10 kHz）入力波形がこの管内に供給され、インピーダンスがモニタリングされる。培地のイオン組成が、微生物増殖に反応して経時的に変化するにつれて、培地伝導の小さな変化が累積し始める。導電率が増加して、指定された閾値を越えると、微生物増殖の陽性を示すサンプル試験表示が返される。しかしながら、これらのタイプのシステムは、それらの用途の範囲が産業微生物学用途に主に限定されているというように、主な技術的限界を有する。

【0008】

この点に関して、電気検出システムは、微生物増殖の副生成物の形成及び蓄積に起因した増殖培地内の伝導又は抵抗の変化に依拠しているという点で、技術的限界を有するという難点がある。その結果、高イオン強度培地の場合、微生物複製によって生成されるいずれの信号も、非常に高い濃度の微生物が存在するまで本質的にかき消されてしまう。加えて、微生物の増殖及び検出のための非常に複雑な培地（例えば、血液）をモニタリングする多くの用途は、標準的なインピーダンスベースの検出技法を用いることができない。

10

20

30

40

50

【0009】

インピーダンス検出システムに関する上記問題に対して提案された1つの解決策は、総インピーダンスのサブセットを用いて、微生物の増殖を示す測定に対する感度を高めることを提案している。Sengupta他「A micro-scale multi-frequency reactance measurement technique to detect bacterial growth at low bio-particle concentrations」Lab Chip, Vol. 6, pp. 682-692 (2006) (以下、「Sengupta」という)では、100 μ L容量のマイクロ流体チャンバが、バクテリアの存在を示す応答についてモニタリングされるチャンバとして用いられている。Senguptaは、非常に小さな電極が双方の端部に位置決めされている、サンプルを収容する長く(c mスケール)非常に薄い(250ミクロン未満(250マイクロメートル未満))チャンネル状チャンバを設けることによって、単純な誘電導電率測定と比べて検知応答を改善することができることを報告している。非常に高い周波数(100kHz~100MHz)を用いることによって、液体サンプルのキャパシタンス寄与度が測定されている。Senguptaによれば、液体サンプル内のキャパシタンスは、チャンバに配置されたサンプル内のバクテリアの存在及び/又は増殖によって引き起こされる変化に敏感である。

10

【0010】

しかしながら、Senguptaは、誘電導電率測定を用いたサンプル内のバクテリアの存在の分析にマイクロ流体環境を用いる方法の使用には、温度変動が最重要課題であったことを述べている。加えて、Senguptaは、解析時点ごとに新たなサンプルを取得して測定する。すなわち、Senguptaは、後続の測定を行う前に、新たなマイクロ流体チャンバを満たす(又はマイクロ流体チャンバ内の液体サンプルを新鮮なサンプルに取り替える)必要がある。この手法は、以前にサンプリングされた各部分は廃棄されることから、1時間当たりほぼ100 μ L~200 μ Lのサンプルの消費を必要とするので非建設的である。経時的なサンプル消費の容量は、特に、増殖又は代謝の速度が遅い微生物を有するサンプルの場合に深刻な課題を提示する可能性がある。加えて、サンプルを経時的に取得することは、固有のバイオハザード廃棄物処理及び無菌処理の問題も有する。

20

【0011】

Senguptaに記載されている技法のもう1つの不利点は、マイクロリットルの体積スケールで実験を行う必要があるということである。これによって、この技法が、適切な準備ステップ又はサブサンプリングステップなしに臨床的に関連のあるサンプルを検知することが妨げられる。さらに、この技法は、溶液の「キャパシタンス」の回路モデルに計算的に合わせるために、広い周波数レンジ(数百kHz~数千kHz)からの生のスペクトルデータを利用する。したがって、これらのデータの解析の周辺には数学的な複雑さがあり、これによって、消耗品ごとに或る程度まで事後処理時間がかかる場合がある。

30

【0012】

最後に、Senguptaは、説明したインピーダンス技法が高イオンの培地(例えば、血液)と本来的に適合しないことを克服していない。代わりに、Senguptaは、検出チャンバの全体的な容積を削減することによってイオンの総数を制限することでこの問題を回避している。したがって、僅かであっても容積が大きくなると、その結果、感度が大きく失われる。

40

【0013】

したがって、誘電測定を用いて液体内の微生物の有無を検出することには、改良の必要性がある。

【発明の概要】

【0014】

本出願は、総インピーダンスのサブ成分、すなわち虚数(リアクタンス)成分を用いて、培地の全イオン組成を求めるインピーダンスベースの方法及びシステムを記載している。この点に関して、リアクタンスサブ成分は、微生物の増殖に起因した培地のイオン成分の変化(間接的検出)と、微生物の荷電細胞マスの変化(直接的検出)との双方に対してはるかに高い感度を有する。これによって、微生物の広く多様なスペクトルに対処する幅

50

広い検出手法が提供される。

【0015】

本出願は、マイクロリットルからミリリットルの範囲にわたる流体容量内のリアクタンス検出を可能にするチューニング方法も記載している。この点に関して、1つの実施の形態では、ロックイン増幅器検出器の容量性入力段と並列の抵抗器の物理値をチューニングすることによって、システムの周波数感度を1kHz～数百kHzに変化させることができる。この結果、イオン組成の変化(1kHz～20kHzの動作周波数の場合)と、微生物バイオマスの変化(20kHzよりもはるかに高い動作周波数の場合)とに対する感度が向上する。

【0016】

代替の実施態様によれば、本出願は、ブリッジ抵抗器 - キャパシタチューニング回路を用いてターゲットサンプルの周波数感度をチューニングする方法を記載している。ブリッジ抵抗器 - キャパシタチューニング回路の値をチューニングすることによって、検出は、高周波数スペクトル(20kHzよりもはるかに高い)におけるイオン組成の変化及び荷電生物マスの変化の双方に対して高感度になる。したがって、ブリッジ抵抗器 - キャパシタチューニング回路は、より高速の検出時間(TTD)をもたらす。

【0017】

さらに、試験消耗品内の周波数応答をチューニングすることによって、比較的大きな容量(例えば10mL超)のサンプル内の微生物増殖の検出が可能になる。これにより、従来技術の絶え間のないサブサンプリングの必要性がなくなる。追加の利益は、生のリアクタンスデータを利用することによって実現される。なぜならば、各サンプルの後に、複雑な数学的計算がもはや必要とされない場合があるからである。より狭い周波数レンジの利用に結び付いた計算複雑度の低減により、より高速な走査時間(数秒～数分に対する数ミリ秒～数秒)が可能になる。

【0018】

本出願は、微生物の増殖に対する向上した感度を有するシステムも記載している。このシステムは、試験細胞内に十分に進入するとともに流体内容物と接触している2つ以上の電極を通じて試験細胞(すなわち、消耗品)に接続された信号処理電子回路を備える。この電子回路は、総インピーダンスの成分、具体的には「異相(out-of-phase:位相のずれた)」又は虚数のリアクタンス成分を検出するように構成されている。この成分は、周波数に依存して生物の増殖に対して高感度の応答を有する。インピーダンスのリアクタンス成分は、当業者によく知られており、本明細書では詳細に説明されない。この点に関して、システムは、このパラメータの変化についてサンプルをモニタリングすることに基づいて、液体マトリックス内の荷電分子の組成及び微生物の数の双方の変化を検出することができる。この結果、検出時間(TTD)が5%～70%短縮される。

【0019】

本出願に記載されたシステム及び方法によって実現される別の利点は、複数の消耗品の形状、容量、及びマトリックス(又は培地)フォーマット内の生物を検出することができるということである。この点に関して、電極は、液体サンプルの連続体内に十分に浸漬されるべきである。電極間の距離は、消耗品のニーズに適合するように調整又はチューニングすることができる。さらに、電圧入力も、消耗品内の内容物の適切な検出を可能にするように調整することができる。

【0020】

この点に関して、本システムは、微生物の細胞壁が高電荷を有する性質と、液体マトリックスのイオン組成の微生物のそれぞれの変化とによって、通常ならば「汚れた」サンプルとみなされるものに存在する微生物を検知することが可能である。すなわち、本システムは、血液汚染物質と、通常ならば光学的検出ストラテジーを妨害するサンプルの他の構成物質とを有する抗菌薬感受性試験の状況において増殖をモニタリングすることができる。

【図面の簡単な説明】

10

20

30

40

50

【 0 0 2 1 】

【図 1】液体サンプルの誘電キャパシタンスを測定して液体サンプル内の微生物の有無を判断する装置の一例を示す図である。

【図 2】液体サンプルの誘電キャパシタンスを測定して液体サンプル内の微生物の有無を判断し、それにより、信号発生器の測定周波数がゼロクロス周波数に自動的にチューニング及び維持される装置の別の実施態様を示す図である。

【図 3】液体サンプルのリアクタンスを測定して液体サンプル内の微生物の有無を判断する装置の一例を示す図である。

【図 4 A】液体サンプルのリアクタンスを測定する装置のブロック図である。

【図 4 B】液体サンプルのリアクタンスを測定する装置のブロック図である。

【図 5】種々の周波数における E . コリ (E. Coli : エシェリキアコリ、大腸菌) の検出までの時間を示す線グラフである。

【図 6】本明細書において説明する実施形態によって実現される短縮された検出時間を示す図表である。

【図 7】より高い周波数を用いると検出時間を改善することができるという実験結果を示す図である。

【図 8】高周波数における A . ルオフィイ (A. lwoffii : アシネトバクテールオフィイ) の検出までの時間を示す線グラフである。

【図 9】高周波数における M . ルテウス (M. luteus : ミクロコッカスルテウス、ルテウス菌) の検出までの時間を示す線グラフである。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 2 2 】

本明細書において説明する例によれば、微生物増殖の有無は、インピーダンスサブ成分測定を用いて判断される。電極構成及び周波数は、本明細書において説明するように、微生物増殖の有無を判断するために、試験環境のイオン電荷の小さな変化であっても検出可能であることを確実にするよう構成することができる。

【 0 0 2 3 】

インピーダンスは、電圧が印加されたときに回路が電流に対して示す電氣的対立の大きさ (measurement) である。交流 (AC、 $f > 0$) 回路において動作しているとき、インピーダンスは、抵抗及びリアクタンスからなる。これとは対照的に、直流 (DC、 $f = 0$) 回路では、インピーダンスは抵抗のみからなる。したがって、インピーダンスは、以下のように表すことができる。

$$Z = Z_o + j Z_r (f)$$

ここで、 Z = インピーダンスであり、 Z_o = 抵抗であり、 $j = (-1)$ であり、 Z_r = リアクタンスであり、 f = 周波数である。このように、インピーダンスは、抵抗及びリアクタンスの 2 つのサブ成分で構成される物質の電氣的特性である。

【 0 0 2 4 】

抵抗は、電流の電気導体 (例えば、金属線、塩水溶液等) の通電に対する対立である。抵抗は、スカラー値であり、周波数に依存しない。したがって、抵抗は、所与のサンプル内に含まれる静的な (非展開型 (non-evolving)) 荷電種 (すなわち、イオン、プロトン、アミノ酸、ペプチド、小分子等) の総数と反比例関係を有する。荷電種の増加は抵抗の低下をもたらす一方、逆に、減少は抵抗の上昇をもたらす。微生物複製 (一般に微生物増殖と呼ばれる) 中、荷電粒子の総数は、生物に依存して変化し続ける。例えば、新たな細胞が分裂すると、イオンが培地から取り出され、娘細胞に組み込まれる。したがって、細胞分裂の結果、荷電種の数は減少する。同時に、生物は、培地内の栄養素を代謝し、荷電生成物を産生し、その結果、荷電種の数が増加する。

【 0 0 2 5 】

他方、リアクタンスは、回路素子のインダクタンス又はキャパシタンスに起因した電流又は電圧の変化に対するその素子の対立である。リアクタンスは、電気抵抗に類似しているが、動作周波数の影響を受けやすいという点で異なる。したがって、リアクタンスは、

所与のサンプル内に含まれる容量性成分の総数と反比例関係を有する。この点に関して、生体サンプル内のキャパシタンスは、2つの方法で明らかにされる。第1に、荷電種（通常は、分子、非微生物細胞等）が、検知電圧（又は電位）の印加に起因して電極界面の部位に蓄積する。これは、電圧（例えば、正又は負）が電極に印加されると、その表面電極上の電荷を中和しようとして、異極性の荷電分子が電極に引き付けられるからである。反対電荷を有する別の分子層がそれらの分子上に形成され、「被覆効果（coating effect）」を生み出し、その結果、電極界面における正味電荷はほぼ存在しない。この被覆効果の結果、絶縁体のような中性電荷を有する電気二層キャパシタ又は二層キャパシタ（例えば、電気二重層キャパシタ）が得られる。したがって、この絶縁体のような被覆は、界面キャパシタンスと呼ばれる容量効果（すなわち、導電性培地及び電極金属が各側面に位置する絶縁体）をもたらす。

10

【0026】

界面キャパシタンス（ C_i ）は、システムが低周波数（15kHz未満）で動作しているときに最大となる。微生物増殖の検出に関して、微生物細胞の質量及びそれに関連した代謝産物の増加に起因して培地のイオン組成が変化すると、界面キャパシタンスは変化する。したがって、界面キャパシタンスは、微生物の増殖の間接的な指標である。

【0027】

リアクタンスに寄与する他方の生物学的なものは、細胞のキャパシタンスである。この点に関して、ヒト細胞及び非ヒト細胞は、荷電した外側細胞膜と、これに続く絶縁膜コアと、最後に高イオンの内側細胞成分（例えば、イオン）とを有する。これは、上記で論述した界面キャパシタンスに類似しており、細胞キャパシタンス又は膜キャパシタンス（ C_m ）と呼ぶことにする。

20

【0028】

インピーダンスとは対照的に、導電率は、代謝バクテリア性副生成物（例えば、 CO_2 等のガス）の有無に関する大きさである。この点に関して、上記で論述した容量性成分（及びそれらの成分の経時的な変化）は、サンプル容器内の微生物（例えば、バクテリア）の有無をより直接的に反映する。

【0029】

本明細書において説明する方法及びシステムは、外部周波数チューニング回路を用いて、電気リアクタンスの変化によって明らかにされる界面キャパシタンス（ C_i ）及び/又は細胞キャパシタンス（ C_m ）を検出する。この結果、生物バイオマスの増加と、微生物に関連した代謝活動によって誘発されるサンプル環境の変化との双方に対する検出感度が高くなる。外部周波数チューニング回路は、マイクロリットルからミリリットルを越える容量に及び複数の培地容量に適合している。さらに、外部周波数チューニング回路は、用いられているサンプルの周期的なサブサンプリング及びリフレッシュを必要とすることなく連続モニタリングを可能にする。

30

【0030】

図1は、成分の容量性インピーダンスの測定に基づいて微生物増殖を検出する装置を示す詳細な説明図である。出力段210及び入力段235を有するロックイン増幅器（ロックインアンプ）が示されている。出力段210は、誘電インピーダンス測定チャンバ220（図示せず）の一方の電極211に正弦波RF信号を供給するのに用いることができる内部信号発生器を備える。上記チャンバの第2の電極212は、上記ロックイン増幅器の信号入力段235と接続されている。ロックイン増幅器が図に示され、本明細書の例において説明されているが、当業者であれば、LCRメータ又はネットワークアナライザ等の他の測定装置をロックイン増幅器の代わりに用いることができることを認識するであろう。

40

【0031】

この実施態様によれば、上記チャンバ220（図示せず）内のサンプル液体は、2つの電極と直接接触し、破線のボックス225に示す回路図によって記述することができる。この点に関して、 C_i は、金属電極と液体との間の界面キャパシタンスを表し、 R_i は、

50

金属電極と液体との間の界面抵抗を表し、 R_b は、液体のバルク抵抗であり、 R_m は、微生物の膜抵抗であり、 C_m は、膜キャパシタンスである。

【0032】

ロックイン増幅器の出力段210における内部信号発生器は、50 の通常の内部抵抗を有し、ロックイン増幅器の入力段235は、15 pFの通常のキャパシタンス(C_p)及び10 M の通常の入力抵抗(R_p)を有するものと仮定する。

【0033】

図1に示す微生物増殖を検出する装置は、ソースマッチング(信号源整合)抵抗器 R_s 215及び測定負荷抵抗器 R_v 216を備える。図1によれば、ソースマッチング抵抗器215及び測定負荷抵抗器216は、測定信号の異相成分の周波数スペクトルが、(i) C_m の値に依存しかつ(i) 好都合に低い周波数に設定される、ゼロクロス特徴部を示すように、所与の誘電測定チャンバ及び液体について選択することができる。幾つかの実施形態では、その周波数は、約100 kHz以下の値に設定される。これによって、標準的なロックイン増幅器の使用が可能になる。例えば、 $R_s = 500$ 及び $R_v = 500$ であるとき、液体サンプル培地が従来の血液培養基(blood culture growth media)である場合に約30 kHz~約100 kHzの範囲内のゼロクロス周波数が生成される。そのような血液培養基の1つの例は、メリーランド州スパークスにあるBecton Dickinson Diagnostics社から提供されているStandard Aerobic/F培地である。

【0034】

図1によれば、ロックイン増幅器の出力段210に関する異相信号振幅は、異相インピーダンス値に反比例する。換言すれば、異相インピーダンス値(例えば、リアクタンス値)は、測定された異相信号振幅のゼロクロス周波数においてその最大値にある。インピーダンス測定チャンバの寸法を変更すること(それによって、サンプルの容量、サンプルの高さ/幅比又はそれらの双方を変更すること)、又は増殖培地を別の液体サンプルと取り替えることは、 R_s 及び R_m の選択された値を変化させる可能性があることに留意すべきである。図示するように、ロックイン増幅器の入力段235は基準電位を提供する。この基準は、図示するように浮遊接地である。当業者であれば、入力段によって基準電位を提供する多くの異なる方法が存在し、図1における基準は限定ではなく単なる例示にすぎないことを理解するであろう。

【0035】

図2は、液体サンプルの誘電キャパシタンス及びリアクタンスを測定して、測定周波数の自動チューニングを用いて試験環境のイオン電荷の変化を求める装置の代替の実施態様を示している。この点に関して、位相敏感信号検出器330の異相信号出力332は、電子積分器340の入力335に接続されている。積分器340の出力345は、図1に示す装置と同様の信号発生器として動作する電圧制御発振器310の周波数制御入力305に接続されている。ここでも、 C_i は、金属電極と液体との間の界面キャパシタンスを表し、 R_i は、金属電極と液体との間の界面抵抗を表し、 R_b は、液体のバルク抵抗であり、 C_m は、バルクキャパシタンスである。加えて、参照することにより本明細書の一部をなすものとされる国際公開第2013/123189号に論述されているようなバルクキャパシタンス(C_b)を用いて微生物増殖を検出することができる。

【0036】

この実施形態では、正弦波電気信号が、電圧制御発振器(「VCO」)310によって生成され、サンプルと接触した電極311に電氣的に結合されている。同じくサンプルと接触している第2の電極312は、位相敏感信号検出器330に電氣的に接続されている。上述したように、位相敏感信号検出器の異相出力信号は、積分器340に結合されている。積分器340の出力は、VCO310の周波数制御入力に結合されているので、VCO310の周波数は、位相敏感信号検出器によって測定される異相信号振幅が0になるまで調整される。経時的に、0の異相信号振幅におけるチューニング周波数の増加は、サンプル内の微生物の増殖を示す。

【0037】

10

20

30

40

50

動作中、積分器340の出力電圧は、電圧制御発振器の周波数に影響を与える。例えば、開始周波数が60kHz未満である場合、異相信号振幅は正である。これによって、積分器出力345において出力電圧は正となり、その結果、電圧制御発振器310の周波数は増加する。この周波数の増加は、ゼロクロス周波数に達する（その場合、異相信号振幅は0である）まで継続する。この時点で、異相振幅は0になり、積分はそれ以上行われない。したがって、電圧制御発振器の周波数はゼロクロス周波数のままとされ、このゼロクロス周波数は、この例によれば、60.723kHzである。初期周波数が過度に高い場合、その過度に高い周波数から実際のゼロクロス周波数への接近が自動的に行われる。バクテリアの存在は、ゼロクロス周波数を経時的に記録し、微生物増殖に起因し得る周波数の増加を検出することによって検出することができる。

10

【0038】

図2に示す装置の利点は、ゼロクロス周波数を極めて高い精度で求めることができるということである。「ゼロ信号」が位相敏感信号検出器の出力において生成されることに起因して、信号発生器の振幅又は位相敏感信号検出器の内部利得におけるいずれのドリフトも、自動的にチューニングされるゼロクロス周波数に影響を与えない。これは、システム出力情報を表す。

【0039】

図3を参照すると、ブリッジ抵抗器(R_p) - キャパシタチューニング回路405を用いてインピーダンスを測定するシステム400の一実施態様が示されている。図3のシステムは、内部信号発生器を有するロックイン増幅器の出力段410と、可変直列チューニング可能素子415（すなわち、可変ポテンショメータ）と、液体サンプルを含む消耗品420と、ブリッジ抵抗器 - キャパシタチューニング回路（例えば、直列に配線された第2の可変ポテンショメータ405及びスイッチ425）と、ロックイン増幅器の入力段435とを備える。図示した実施形態では、スイッチが開いているとき、システムは低周波数で動作し、スイッチが閉じているとき、システムは高周波数で動作する。

20

【0040】

上記で説明したように、内部信号発生器を有するロックイン増幅器は、50の通常の内部抵抗を有する。加えて、ロックイン増幅器の入力段435は、15pFの通常のキャパシタンス(C_{is})及び10Mの通常の入力抵抗(R_{is})を有する。この点に関して、ロックイン増幅器は、液体サンプルに印加される電圧及び周波数を生成することができる。さらに、当業者であれば、本明細書において説明する例の範囲から逸脱することなく、LCRメータ又はネットワークアナライザ等の測定装置を用いることができることを認識するであろう。

30

【0041】

可変ブリッジチューニング可能素子(R_s)（例えば、可変ポテンショメータ）405は、上記で論述したソースマッチング抵抗器のように機能する。したがって、可変ブリッジチューニング可能素子(R_s)405は、測定信号の異相成分の周波数スペクトルが、(i) C_m の値に依存しかつ(i) i)100kHz未満の好都合に低い周波数に位置決めされた、ゼロクロス特徴部を示すように、所与の消耗品420（すなわち、測定チャンバ）及びサンプル液体の抵抗(0 ~ 10000)にチューニングすることができる。これによって、標準的なロックイン増幅器の使用が可能になる。

40

【0042】

消耗品420は、大部分が設計上の選択の問題である。説明されているこの実施形態では、消耗品は、約10mm~約40mm離間した側部に2つの開口部を有するプラスチックボトル又は同様のプラスチック消耗品（図示せず）である。金属化電極（例えば、金の電気メッキを施された真鍮製円柱部分）が各開口部に配置され、エポキシ樹脂（例えば、接着剤）が外側のプラスチック/金属界面の周囲に配置されて電極を所定の箇所に固定している。エポキシ樹脂は、外側表面のみに見られ、サンプルを収容するボトルの内側エリアに進入していないことに留意することが重要である。すなわち、エポキシ樹脂は、サンプルに接触していない。

50

【0043】

当業者であれば、消耗品が、様々な幾何形状と、当該消耗品の内外へのサンプルの無菌移送用のアダプタポートとを有することができることを認識するであろう。この点に関して、患者検体タイプ、試験されるサンプルの容量等に基づいて異なる消耗品を用いることができる。

【0044】

金属化電極411、412は、非腐食性金属（例えば、プラチナ、金、銀）を有するコンフォーマル被覆（すなわち、サブnm厚～ミクロン厚）が付着された任意の標準的な（すなわち、低コストの）金属（例えば、銅、真鍮、鋼等）から作製することができる。この非腐食性金属のコンフォーマル被覆は、高塩増殖/培地マトリックス（例えば、血液、尿、唾液）に適合するために必要である。コンフォーマル被覆技法の例には、電気メッキプロセス、スパッタリングプロセス、及び蒸着プロセスが含まれる。そのようなプロセスは、当業者によく知られており、本明細書では詳細に説明されない。当業者であれば、従来のコンフォーマル被覆技法の中から選択して、本明細書において説明した電極を形成するであろう。

10

【0045】

電極構成は、実質上、消耗品（すなわち、試験デバイス）において用いられる任意のサイズ、幾何形状、及び材料に適合することができる。電極（2つ以上）は、当該電極を収容するように適切にサイズ決めされた特徴部が設けられた任意の消耗品フォーマットに構成することができる。代替の実施形態では、消耗品は、電極の周囲に消耗品をブロー成形することによって形成することができる。他の例では、電極は、消耗品の蓋を通して当該消耗品内に延在することができる。この設計は、消耗品の材料内に電極を直接成形又は接着することを要しない。上記で説明した実施形態では、電極は、消耗品の外側の世界と内側の内容物（すなわち、液体）との間に導電パスを形成するように構成することができる。

20

【0046】

消耗品の例には、従来の小瓶（vial：バイアル）、管構成、マイクロ流体カートリッジ等が含まれる。適した消耗品は、当業者によく知られており、本明細書では詳細に説明されない。

【0047】

電極に適した金属の例には、銀、金、亜鉛、鉄、ニッケル、アルミニウム等が含まれるが、これらに限定されるものではない。さらに、異なる金属被覆を電極に用いることができる。加えて、電極間隔、トレースワイヤ構成、及び電極寸法は、大部分が設計上の選択の問題である。電極設計は、培地、消耗品、サンプル等の様々な因子に依存する。当業者であれば、本明細書において説明した例に基づいて、様々な構成を用いることができることを認識するであろう。

30

【0048】

動作中、電極が消耗品の内部に位置決めされている実施形態では、電極間に導電パスが存在するように、電極をサンプル液体内に浸漬させなければならない。換言すれば、一方の電極を覆う液体の同じ本体が、他方の電極も覆わなければならない。さらに、ボトル内の非生物体（例えば、エポキシ樹脂、樹脂）の存在が、電極間の導電性パスを妨害し、その結果、データを非常に変わりやすく信頼できないものにし得る程度に電極を覆ってはならない。

40

【0049】

システムは、消耗品（図3に概略的に示す）がシステム400内に電子的に統合されるように当該消耗品を収容するよう構成されている。幾つかの実施形態によれば、非対称の特徴部を消耗品内に形成して、ユーザが1つの所定の向きでしか機器内に消耗品を挿入することができないようにすることができる。これによって、消耗品「モジュール」とシステム内の他の構成要素との間の適切な相互接続が確実にされる。

【0050】

50

図4A及び図4Bを参照すると、複数の消耗品においてインピーダンスを測定するシステム400の様々な実施態様が示されている。図4A及び図4Bのシステムは、ロックイン増幅器の出力段410と、マルチプレクサ440と、可変直列抵抗器415と、第1の電極411及び第2の電極412を有する消耗品420と、攪拌器450と、ラック470と、可変ブリッジ抵抗器405と、第2のマルチプレクサ460と、ロックイン増幅器の入力段435と、コンピュータ500とを備える。図4Aでは、スイッチ425は、可変ブリッジ抵抗器405と直列になっている。スイッチ425とブリッジ抵抗器405との間のそのような関係は、図3にも示されている。図4Bは、スイッチ425が可変ブリッジ抵抗器405と並列になっている代替の構成である。

【0051】

この実施形態によれば、消耗品420は、ラックベースのモジュール式プラットフォーム470に格納することができる。各ラック470は、20個までの消耗品をアドレス指定することができるマルチプレクサ素子を備えることができる。したがって、信号取得を担当する専用のデジタル信号処理(DSP)ロックイン増幅器モジュールが、ラックごとに少なくとも1つ存在することができる。したがって、本発明は、消耗品及びスイッチのアレイであって、当該アレイ内の各消耗品の信号取得を可能にするアレイを想定している。

【0052】

マルチプレクサ回路部440及び460は、コンピュータ(例えば、500)、単一の検出基板又は検出機器が、複数の消耗品、又は単一の消耗品のサブ構成要素を走査することを可能にすることができる。1つの消耗品が複数のチャンバを有し、これらの複数のチャンバのそれぞれにサンプルがある実施形態では、マルチプレクサは、検出機器/回路と単一の消耗品又は或る消耗品の単一のサブ構成要素との接続(1+入力及び1+出力)を「切り替える」ように動作する。マルチプレクサ回路部によって、比較的少数のハードウェア構成要素が複数の消耗品をモニタリングすることが可能になる。マルチプレクサ回路部は、多重化の程度及び消耗品構成に応じて、複数の動作変形形態を有することができる。

【0053】

動作中、消耗品の測定は順次行うことができる。すなわち、アレイ内の各消耗品を一時に1つ走査することができる。消耗品当たりの走査時間は、数十秒程度とすることができる。したがって、各ラック(完全に満たされている場合)を走査するには、概ね2分~3分を要する。コンピューティングデバイス500は、10分~15分ごとに走査動作を繰り返すことができる。アレイが走査されていないとき、攪拌器450を用いて消耗品を攪拌して、液体を十分に混合するとともに液体に空気を含ませることができる。攪拌は、垂直変位、オービタル振動、又は消耗品内での攪拌子の使用を通じて行うことができる。攪拌メカニズム(必要に応じて)は、サンプルの混合を最大にする水平振動メカニズムを含む様々な構成を有することができる。当業者であれば、本明細書において説明した例と異なる攪拌器の例を用いることができることを認識するであろう。したがって、これらの異なる攪拌器の例は、より詳細には論述されない。

【0054】

可変ブリッジ抵抗器405(例えば、ブリッジ抵抗器-キャパシタチューニング回路)は、消耗品420を検出機器(すなわち、ロックイン増幅器の入力段435)に物理的に接続する外部チューニング回路とすることができる。可変ブリッジ抵抗器405は、周波数感度の「オンザフライの周波数チューニング及び校正」を可能にする一連の並列可変抵抗器(デジタルポテンショメータ)を含むことができる。この点に関して、消耗品からの信号の周波数は、約1kHz~約200MHzにチューニングすることができる。チューニングパラメータ(すなわち、選択された周波数レンジ及びピーク間電圧)は、消耗品の総容量、電極のメタライゼーション(例えば、Au、Ag、又はPt)、含まれる液体のタイプ等によって決定することができる。低周波数及び高周波数の双方に消耗品信号をチューニングすることによって、システムは、低周波数では代謝副生成物を、より高い周波

10

20

30

40

50

数では生物バイオマスを独立して検出することができる。

【 0 0 5 5 】

幾つかの実施態様によれば、スイッチ 4 2 5 は、図 4 A に示すように、一連の可変ブリッジ抵抗器 4 0 5 と直列に配線することができる。代替の例では、スイッチ 4 2 5 は、図 4 B に示すように、可変ブリッジ抵抗器 4 0 5 と並列に配線することができる。スイッチが開いているとき、システムは、低周波数（すなわち、1 k H z ~ 2 0 k H z ）で動作することができる。上で述べたように、これによって、消耗品の構成の変化の検出が可能になる。スイッチが閉じているとき、システムは、フィードバックを信号発生器に提供することによって、より高い周波数（すなわち、2 0 k H z よりもはるかに高い）で動作することができる。前述したように、より高い周波数で動作することによって、システムは、液体のイオン組成及び生物マス自体の双方の変化に対して高感度になる。周波数をチューニングして高周波数及び低周波数の双方で試験する能力を有することによって、システムは、より少ない容量のサンプルを用いてより高速の検出時間（T T D）をもたらすことができる。

10

【 0 0 5 6 】

ロックイン増幅器の入力段 4 3 5 は、極めて雑音の多い環境内から既知の周波数を有する信号を抽出することができる特殊化された装置である。さらに、ロックイン増幅器は、信号を、特に対象となる主要なサブ成分に分解することができる。例えば、総インピーダンスの成分、具体的には、「異相」リアクタンス成分は、以下の式に従って用いることができる。

20

$$Z = \text{抵抗} + j * \text{リアクタンス}$$

$$\text{総インピーダンス} | Z | = \left(\text{抵抗}^2 + \text{リアクタンス}^2 \right)$$

別の例では、容量成分（すなわち、界面キャパシタンス及び細胞キャパシタンス）は、総リアクタンスサブ成分に寄与する。したがって、信号のサブ成分を用いることによって、1）数日間（例えば、5日プロトコル）の指定された間隔（例えば、約10分）での各消耗品又は消耗品のサブ構成要素の連続モニタリングを可能にすることができ、2）荷電分子の組成の変化と、サンプルの生体細胞又は生体成分の数の変化とを検出することができる。

【 0 0 5 7 】

この点に関して、信号がロックイン増幅器の入力段 4 3 5 に入力されると、データ解析を実行することができる。幾つかの実施形態によれば、このデータ解析は、微生物増殖を判断する2つのステップで実行される。第1に、生のスペクトルデータ（すなわち、検出されたリアクタンス信号対周波数）が、単一のデータ点に達する各時点において解析される（例えば、傾き、曲線下面積、x切片、y切片等）。第2に、消耗品又は消耗品のサブ構成要素ごとに複数のデータ点が取得された後、既知の対照値からの統計的に有意な偏差がどの点において生物の存在を示しているのかを判断する一般化されたアルゴリズムが適用される。微生物増殖に対する感度の向上によって、本明細書において説明する例は、微生物増殖のより高速の検出時間を提供する。

30

【 0 0 5 8 】

代替の実施形態では、生の「リアクタンス」データからの単一の抽出データ値を用いて、微生物増殖の有無を判断することができる。この点に関して、抽出データは、数学関数を用いて、切片又は曲線下面積を求めることができる。これらの数学関数の結果は、閾値と比較することができる。よって、閾値を越えた累積的な変化を用いて、生物含有消耗品を区別することができる。したがって、測定信号の異相成分の周波数スペクトルは、(i) C m の値に依存しかつ (i i) 好都合に低い周波数に設定された、ゼロクロス特徴部を示す。幾つかの実施形態では、その周波数は、約 1 0 0 k H z 以下の値に設定される。これによって、本明細書において説明したロックイン増幅器、L C R メータ、及び / 又はネットワークアナライザ等の標準的な測定装置の使用が可能になる。

40

【 0 0 5 9 】

上記で説明した実施形態は、標準的な光学的方法と比較して、検出時間（T T D）を 5

50

% ~ 70% 改善する。以下で説明するように、データは、低周波数チューニングの下で検査するとき、複数の生物の検出を、従来の光学的方法と比較してより高速のTTDで行うことができることを示している。さらに、データは、高周波数チューニングを用いると、検出感度を更に高めることができ、それにより、より一層高速のTTDがもたらされることを示している。

【0060】

この点に関して、図5に示すように、10mLのBACTEC標準好気性培地(standard aerobic medium)と、3mLの袋入り血液(bagged blood)と、17CFU(コロニー形成単位)のE.コリ生体(A25922)と、消耗品の内部に延在するとともに培地/サンプル混合物内に浸漬された金メッキ金属電極(真鍮本体)とを収容した、より小さなポリカーボネート管を用いて実験を行った。消耗品内の電極をロックイン増幅器の他の構成要素と相互接続した。機器のブリッジ抵抗器のセットアップを187オームに設定し、その結果、40kHz~80kHzの帯域におけるスペクトル感度を得た。

10

【0061】

並列に走査した対照(生物なし)管と比較すると、図6に示すように、TTDは、ほとんどの生物及び培地について大幅に改善した。これは、約 10^4 CFU~ 10^5 CFUの生物感度を示すことができ、これは、ほぼ 10^9 CFUで生物を検出する現在の光学的測定システムよりも少なくとも2桁~4桁高感度である。これらの結果は、図5に関して以下でより詳細に論述するように、70%の検出時間の短縮を表している。これらのレベルにおける検出は、報告されたことがなく、完全に予想外であった。例示として、E.コリについての経時的な周波数変化が、(対照に対して)示されている。低周波数では、TTDはほぼ10時間であった。これは、最大で5%~10%高速化されている。高周波数では、TTDは、ほぼ4時間に改善され、これは、ほぼ70%高速化されている。

20

【0062】

図6を再び参照する。図5にその結果が示されている上記で説明した実験を、図6に報告された様々なサンプルについて繰り返した。例えば、3mLの袋入り血液及び17CFUのS.アウレウス(S. aureus:スタフィロコッカスアウレウス、黄色ブドウ球菌)(A25923)を用いて、増殖を7時間~8時間で検出した。ほぼ12時間~14時間でコロニー増殖を検出する標準的な光学的検出技法とは対照的に、これは、42%の検出時間の短縮を示した。

30

【0063】

図6は、7mLの袋入り血液及び17CFUのE.コリ生体(A25922)と、7mLの袋入り血液及び17CFUのS.アウレウス(A25923)と、7mLの袋入り血液及び17CFUのH.インフルエンザ(H. influenzae:ヘモフィルスインフルエンザ、インフルエンザ菌)(A19418)と、7mLの袋入り血液及び17CFUのH.フェカリス(H. faecalis)(A29212)と、7mLの袋入り血液及び17CFUのC.グラブラータ(C. glabrata:カンジダグラブラータ)(A66032)とを用いて実験を行った結果を示している。

【0064】

それに応じて、7mLの溶菌(mycolytic)培地において、ほぼ8.5時間~9時間でE.コリ増殖を検出した。これは、溶菌培地におけるE.コリの増殖を検出する標準的な光学的検出技法(10時間~11時間)と比較してTTDが改善している。溶菌培地におけるS.アウレウスの増殖については、約10時間で検出した。これは、標準的な光学的検出技法よりも23%の改善を示した。溶菌培地におけるH.インフルエンザのコロニー増殖は、ほぼ16時間で検出した。これは、標準的な光学的検出技法を用いたH.インフルエンザのTTD(16時間)よりも16%の改善を示した。溶菌培地におけるH.フェカリスのコロニーについては、TTDが11時間であり、標準的な光学的検出技法を用いた11時間~12時間のTTDよりも8%の改善を示した。溶菌培地におけるC.グラブラータのコロニーのTTDについては、ほぼ17時間で検出した。これは、標準的な光学的検出技法を用いたC.グラブラータのTTD(20時間~42時間)の45%の改善を

40

50

示した。標準的な光学的技法を上回る標準的な好気性培地におけるこのサンプルのTTDの改善は、図5及び図6にも報告されている。

【0065】

図7は、上記で説明した、より小さな容量について達成された検出時間の改善が、それよりも大きな容量のサンプル/培地についても達成されることを示している。具体的には、40mLの標準的なBACTEC培地及び10mLの血液をBACTECボトル内で組み合わせた。50CFU~60CFUのE.コリをサンプルに点在させた。本明細書において説明した装置及び方法を用いると、低周波数では、TTDは10.5時間~11時間であった。これは、最大で5%高速化されている。高周波数では、TTDは、9.5時間~10時間に改善された。これは、14%高速化されている。

10

【0066】

図5は、種々の周波数におけるE.コリの検出時間を示している。全ての消耗品を同じ方法で準備し、生物の有無及び外部回路の電気パラメータのみが異なっていた。この点に関して、4つの16mLの消耗品を用いて実験を行った。各消耗品を、10mLの標準的な好気性培地及び3mLの血液を用いて準備した。これらの消耗品のうちの2つには、17コロニー形成単位のE.コリも加えた(低周波数モード用に1つ及び高周波数モード用に1つ)。消耗品の電極は、30mmの金の電極であった。実験中、500mVのピーク間電圧を消耗品に印加し、120回転毎分の速度の振動を介して消耗品を撈拌した。

【0067】

低周波数モード(例えば、1kHz~10kHz)では、培地及び血液を有する消耗品には、印加信号の偏差はなかった。これと比較して、E.コリが加えられた消耗品については、図5の信号偏差点510に示すように、低周波数モードで約10時間の箇所において、周波数の偏差が検出された。これは、標準的な光学的検出技法よりも5%~10%の検出時間の改善を示している。E.コリのこれまでの(historic)BACTECのTTDはほぼ11時間である。

20

【0068】

高周波数モード(例えば、40kHz~80kHz)では、可変ブリッジ抵抗器(例えば、図4A及び図4Bにおける405)を500にチューニングした。それに応じて、E.コリを有する消耗品には、図5の信号偏差点520に示すように、約4時間のマークの箇所に、印加信号からの偏差が検出された。これは、標準的な光学的検出技法よりも70%の検出時間の改善を示している。前出のE.コリの実験と同様に、この時間枠内のこれらのレベルにおける検出は報告されたことがなく、完全に予想外であった。本発明者は、特定の理論に縛られたくはないが、信号偏差点520におけるこの早期の検出の特徴は、主として細胞キャパシタンス、又は微生物細胞の膜電位に伴う電荷に起因し得ると考えられる。細胞が複製し続け、代謝副生成物を産生し続けるにつれて、図5の信号偏差点525に示すように、培地のイオン濃度は、第2の特徴が生じる転換点に達する。双方のシグネチャは、増殖する生物の予備的確認の可能性を有する固有の特徴セットを示している。このように、本出願は、高周波数検出及び低周波数検出の双方を用いることによって検出感度を高め、より短い検出時間を得ることを記載している。

30

【0069】

図8は、時間の関数としての変化レートを測定することによる高周波数モードにおけるA.ルオフィイの検出時間を示している。可変ブリッジ抵抗器(例えば、図4A及び図4Bにおける405)を200にチューニングした。周波数帯域は50kHz~60kHzであった。2つの1mLの消耗品(例えば、対照、及びサンプルを有するもの)を、0.9mLの標準的な好気性培地及び0mLの血液を用いて準備した。この実験によれば、これらの消耗品のうちの一方に28コロニー形成単位のA.ルオフィイを加えた。消耗品は、2つの15mmの電極を有していた。実験中、250mVのピーク間電圧を消耗品に印加し、100回転毎分の速度の振動を介して消耗品を撈拌した。高周波数を印加すると、図8の信号偏差点810において示すように、規定周波数(normal frequency)のレート変化は、約11時間の箇所で検出された。これは、従来の光学的検出システムにおける

40

50

50%の短縮を示している。A.ルオフィイのこれまでのBACTECのTTDはほぼ20時間である。

【0070】

図9は、高周波数モードにおいてM.ルテウスを検出した実験結果を表している。可変ブリッジ抵抗器(例えば、図4A及び図4Bにおける405)を200にチューニングした。周波数帯域は60kHz~70kHzであった。2つの1mLの消耗品(例えば、対照、及びサンプルを有するもの)を、0.9mLの標準的な好気性培地及び0mLの血液を用いて準備した。これらの消耗品のうちの一方には、21コロニー形成単位のM.ルテウスを加えた。消耗品は、2つの15mmの電極を有していた。実験中、250mVのピーク間電圧を消耗品に印加し、100回転毎分の速度の振動を介して消耗品を撹拌した。図9の信号偏差点910に示すように、規定周波数のレート変化は、約28時間~約30時間の箇所で検出された。これは、従来の光学的検出システムよりも30%の短縮である。M.ルテウスのこれまでのBACTECのTTDはほぼ42時間である。

10

【0071】

上記で説明した検出時間は、報告されたことがなく、完全に予想外であった。このように、本出願は、高周波数及び低周波数の双方を用いることによって検出感度を高めて、微生物増殖のより短い検出時間を得ることを記載している。

【0072】

本明細書では、特定の実施形態を参照して本発明を説明してきたが、これらの実施形態は、本発明の原理及び用途の単なる例示にすぎないことが理解されるべきである。したがって、添付の特許請求の範囲によって規定される本発明の趣旨及び範囲から逸脱することなく、これらの例示の実施形態に対して非常に多くの変更を行うことができ、また、他の構成を考案することができることが理解されるべきである。

20

【図1】

【図2】

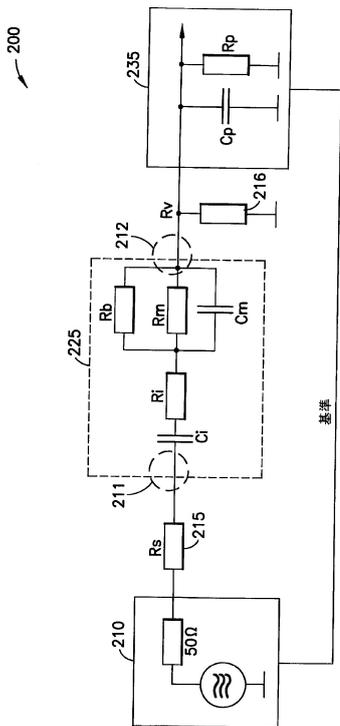


FIG.1

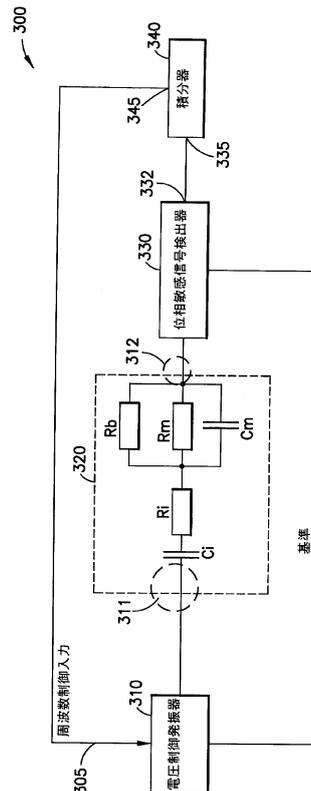


FIG.2

【図6】

培地 (mL)	血液 (mL)	生物	推定 TTD (時間)	これまでの BACTEC TTD (時間)	% 高感化
標準的な好気性 (11)	袋入り (3)	A25922-E. コリ	9	10-11	14%
標準的な好気性 (11)	袋入り (3)	A25923-S. アウレウス	7-8	12-14	42%
培養 ML1D (7)	袋入り (7)	A25922-E. コリ	8.5-9	10-11	14%
培養 ML1D (7)	袋入り (7)	A25923-S. アウレウス	10	12-14	23%
培養 ML1D (7)	袋入り (7)	A19418-H. インフルエンザ	16	17-21	16%
培養 ML1D (7)	袋入り (7)	A29212-E. フェカリス	11	11-12	8%
培養 ML1D (7)	袋入り (7)	A66032-C. クラファラータ	17	20-42	45%

FIG.6

【図7】

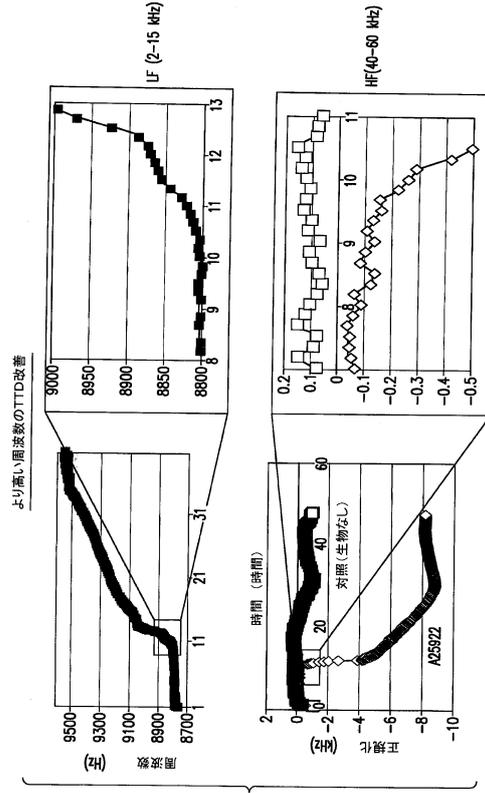


FIG.7

【図8】

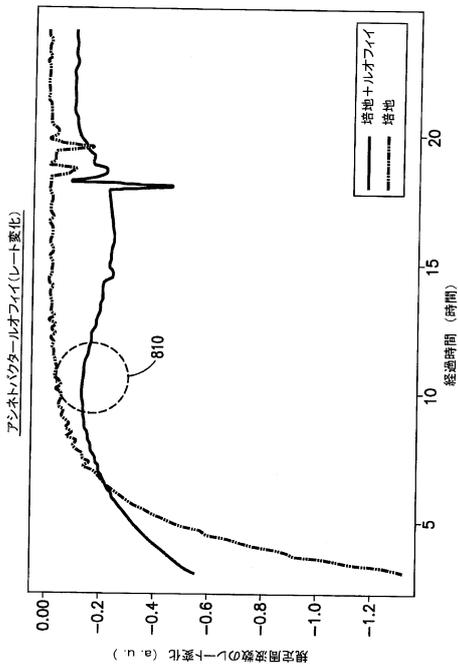


FIG.8

【図9】

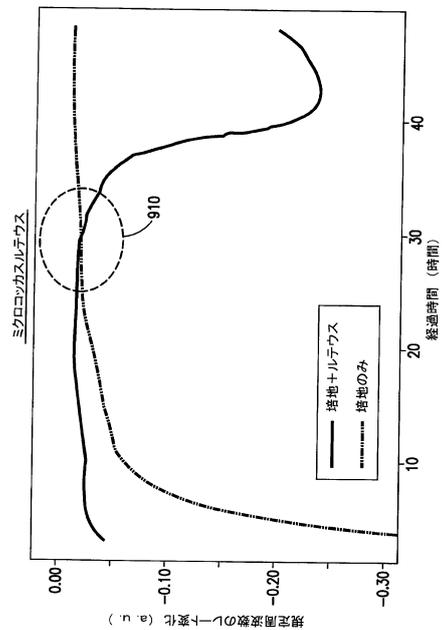


FIG.9

フロントページの続き

- (74)代理人 100096769
弁理士 有原 幸一
- (74)代理人 100107319
弁理士 松島 鉄男
- (74)代理人 100125380
弁理士 中村 綾子
- (74)代理人 100142996
弁理士 森本 聡二
- (74)代理人 100166268
弁理士 田中 祐
- (74)代理人 100170379
弁理士 徳本 浩一
- (74)代理人 100180231
弁理士 水島 亜希子
- (72)発明者 ビーティ, パトリック・ショーン
アメリカ合衆国ペンシルヴァニア州 1 7 3 1 3 , ダラスタウン, プライマイア・ロード 1 2 5
- (72)発明者 ブラッシュ, マイケル・エイ
アメリカ合衆国メリーランド州 2 0 8 8 2 , ゲイザーズバーク, サニーエイカーズ・ロード 2 0
9 3 1
- (72)発明者 ホスマネ, スニール
アメリカ合衆国ニュージャージー州 0 7 4 1 7 , フランクリン・レイクス, スターリング・ドライ
ヴ 5 0 3
- (72)発明者 ポーリー, デイヴィッド
アメリカ合衆国メリーランド州 2 1 0 3 0 , クッキーズヴィル, フランダース・リッジ・コート
1 5
- (72)発明者 ロサレス, ジュリー・エル
アメリカ合衆国メリーランド州 2 1 1 3 3 , ランドールスタウン, キャロル・アヴェニュー 3 4
1 2
- (72)発明者 スミス, ケリー・リン
アメリカ合衆国ペンシルヴァニア州 1 7 4 0 3 - 1 9 2 9 , ヨーク, ヒル・ストリート 3

審査官 小田 浩代

- (56)参考文献 国際公開第 2 0 1 3 / 1 2 3 1 8 9 (WO , A 1)
欧州特許出願公開第 0 1 1 6 2 4 4 9 (EP , A 1)
小林雅明 ほか, 交流インピーダンス法を用いた細胞増殖能のリアルタイム測定, 第 4 8 回自動
制御連合講演会, 2 0 0 6 年 1 月 1 日, C 2 - 1 6 , pp. 513-516
RAMIREZ, N. et al. , Electrochemical impedance spectroscopy: An effective tool for rapi
d microbiologic diagnosis, Biotecnologia Aplicada , 2 0 0 8 年, Vol. 26 , pp. 72-78
VARSHNEY, M. et al. , Double interdigitated array microelectrode-based impedance biosen
sor for detection of viable Escherichia coli O157:H7 in growth medium, Talanta , 2 0 0
8 年, Vol. 74 , pp. 518-525
KIM, YH. et al. , An impedimetric biosensor for real-time monitoring of bacterial growt
h in a microbial fermentor, Sensors and Actuators. B. Chemical , 2 0 0 9 年, Vol. 138
, pp. 270-277
WISSENWASSER, J. et al. , Multifrequency impedance measurement technique for wireless c
haracterization of microbiological cell cultures, Rev. Sci. Instrum. , 2 0 1 1 年, Vol.
82:115110 , pp. 1-7

GROSSI, M. et al., Total Bacterial Count in Soft-Frozen Dairy Products by Impedance Biosensor System, IEEE SENSORS JOURNAL, 2009年, Vol. 9, pp. 1270-1276

CIUREANU, M. et al., Electrical impedance studies on a culture of a newly discovered strain of Streptomyces, Enzyme and Microbial Technology, 1997年, Vol. 21, pp. 441-449

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q 1/00 - 3/00

C12M 1/00 - 3/10

G01N 27/00 - 27/92

JSTPlus / JMEDPlus / JST7580 (JDreamIII)

PubMed