



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104380090 B

(45)授权公告日 2018.03.30

(21)申请号 201380019672.0

(22)申请日 2013.02.14

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 104380090 A

(43)申请公布日 2015.02.25

(30)优先权数据  
61/599,100 2012.02.15 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日  
2014.10.13

(86)PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2013/026138 2013.02.14

(87)PCT国际申请的公布数据  
W02013/123189 EN 2013.08.22

(73)专利权人 BD公司  
地址 美国新泽西州富兰克林湖

(72)发明人 克劳斯.W.伯恩特

(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 赵蓉民 陆惠中

(51)Int.Cl.  
G01N 27/02(2006.01)  
G01N 27/06(2006.01)  
C12M 1/34(2006.01)  
C12Q 1/00(2006.01)

(56)对比文件  
US 2011/0081676 A1,2011.04.07,  
US 2011/0086352 A1,2011.04.14,  
US 6096272 A,2000.08.01,  
WO 2004010103 A3,2004.04.01,  
US 2007090927 A1,2007.04.26,  
CN 1584579 A,2005.02.23,

审查员 何孟珂

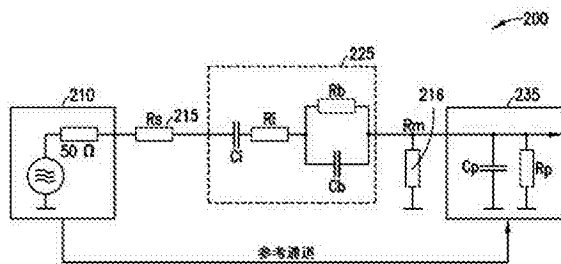
权利要求书3页 说明书8页 附图14页

(54)发明名称

电阻抗法细菌检测系统

(57)摘要

本发明公开了一种可以检测液体样品中是否存在微生物的仪器和方法。一个配有电极的器皿用来容纳待测的一定量的液体样本。并设置第二个电极，两个电极均与样本直接接触。一个随时间变化的信号加载到一个电极上，另一个电极则与相敏信号检测器相连。相敏信号检测器可以测定异相信号振幅为零时的频率。零点交叉频率作为基线，其变化时可以指示微生物的生长情况。



1. 一种电阻抗法细菌检测方法,包括如下步骤:

提供至少一个装有可能含有微生物的液体样本的器皿,其设置于第一和第二电极之间;

提供随时间变化的电信号到与所述液体样本接触的第一电极,其中所述第二电极与相敏信号检测器电气连接;及

选择所述电信号的频率以便所述检测器检测的异相信号振幅在所选择的频率下为零;

监测一段时间内的异相信号振幅,如果振幅在某段时间内增加,则说明液体样本中有微生物在生长。

2. 如权利要求1所述的电阻抗法细菌检测方法,其中,所述至少一个器皿是器皿阵列,其至少多个装有可能含有微生物液体样本,其中所述第一和第二电极设置于所述器皿阵列上,该方法进一步包括:

提供产生到所述器皿阵列中的多个器皿的第一电极的随时间变化的电信号,和接收由多个器皿传输的所述随时间变化的电信号;和

传输所述信号至相敏信号检测器。

3. 如权利要求1所述的电阻抗法细菌检测方法,其中所述液体样本的体积为40毫升。

4. 如权利要求1所述的电阻抗法细菌检测方法,其中所述液体样本中应含有微生物生长所需要的培养基。

5. 如权利要求4所述的电阻抗法细菌检测方法,其中所述液体样本是10毫升的血液并且与30毫升的生长培养基组合。

6. 如权利要求2所述的电阻抗法细菌检测方法,其中所述器皿阵列拥有相同的顶部空间。

7. 如权利要求1所述的电阻抗法细菌检测方法,其中所述第二电极整合入器皿底部,并且所述第一电极延伸入器皿中与所述液体样本接触。

8. 一种电阻抗法细菌检测方法,包括如下步骤:

提供一个样本容器,具有至少一个器皿,所述器皿包括可能含有微生物的液体样本,并设置于第一和第二电极之间;

提供一个随时间变化的电信号予第一电极,其中第二电极与相敏信号检测器电气连接;及

通过此检测器检测异相信号振幅随时间的变化;

通过调节电信号的频率,确定当异相信号振幅为零时的频率,这样上述检测器检测的异相信号振幅也为零;

按照确定的时间间隔,重复确定步骤;

所述电信号的所述频率在一段时间内的增加即表示微生物在样本室中繁殖。

9. 如权利要求8所述的电阻抗法细菌检测方法,其中所述样本容器具有器皿阵列,在所述器皿阵列的多数可能含有细菌的液体样本室中,其中所述第一和第二电极设置于所述器皿阵列上;

该方法进一步包含:

提供一个随时间变化的电信号予连接阵列式的多数样本室的每一个中的第一电极,接收由多数样本室传输的随时间变化的电信号至相敏信号检测器。

10. 如权利要求8所述的电阻抗法细菌检测方法,其中液体样本的体积为40毫升。

11. 如权利要求8所述的电阻抗法细菌检测方法,其中液体样本中应含有微生物生长所需要的培养基。

12. 如权利要求11所述的电阻抗法细菌检测方法,其中液体样本应包含10毫升的血液与30毫升的生长培养基。

13. 如权利要求9所述的电阻抗法细菌检测方法,其中所述器皿阵列拥有相同的顶部空间。

14. 如权利要求9所述的电阻抗法细菌检测方法,其中所述第二电极整合入器皿底部,第一电极的每一个延伸入各个器皿中与所述液体样本接触。

15. 一种电阻抗法细菌检测方法,包括如下步骤:

提供一个样本容器,具有至少一个器皿,所述器皿包含可能含有微生物的液体样本,该样本容器应放置于两个电极之间,并与两个电极直接接触;

通过压控振荡器,提供一个随时间变化的电信号予第一电极,第二电极与相敏信号检测器电气连接;

提供所述检测器的集成异相输出信号至压控振荡器的频率控制信号输入中,借此振荡器被调谐为一个异相检测信号为0的频率,其中所述频率在某段时间的增加即表示微生物在液体样本中繁殖。

16. 如权利要求15所述的电阻抗法细菌检测方法,其中所述样本容器具有器皿阵列,其中在所述器皿阵列的多数可能含有细菌的样本室中,其中所述第一和第二电极设置于所述器皿阵列上;该方法进一步包含:

提供一个随时间变化的电信号予连接阵列式的多数样本室中的第一电极,接收由多数样本室传输的随时间变化的电信号至相敏信号检测器。

17. 如权利要求15所述的电阻抗法细菌检测方法,其中液体样本的体积为40毫升。

18. 如权利要求15所述的电阻抗法细菌检测方法,其中液体样本中应含有微生物生长所需要的培养基。

19. 如权利要求18所述的电阻抗法细菌检测方法,其中液体样本应包含10毫升的血液与30毫升的生长培养基。

20. 如权利要求16所述的电阻抗法细菌检测方法,其中所述器皿阵列拥有相同的顶部空间。

21. 如权利要求15所述的电阻抗法细菌检测方法,其中所述第二电极整合入器皿底部,所述第一电极延伸入器皿中与液体样本接触。

22. 一种电阻抗法细菌检测装置,包括:

一个样本容器,包括至少一个器皿,所述器皿适于包含液体样本,所述液体样本可能含有微生物,并设置于第一和第二电极之间;

一个向第一电极提供随时间变化的电信号的信号源,该信号通过液体样本传输至第二电极;

一个连接于器皿第二电极的相敏信号检测器;

信号检测器的输出,表明液体样本电容量的变化。

23. 如权利要求22所述的电阻抗法细菌检测装置,其中所述样本容器包括器皿阵列,在

所述器皿阵列室的多数可能含有细菌的样本室中,至少有一个样本室设置于电阻抗细菌检测方法装置的第一与第二电极之间,进一步包括:

信号分离器,用于向所述器皿阵列多数样本室的第一电极提供随时间变化的电信号,及

多路转接器,用于接收多数样本室传输的随时间变化的电信号,并传递信号至相敏信号检测器。

24.如权利要求22所述的电阻抗法细菌检测装置,其中相敏信号检测器是一个带有内部信号发生器的锁相放大器,用于测量通过液体样本传输的信号的同相分量,上述内部信号发生器是提供随时间变化的电信号至第一电极的信号源,该装置进一步包括一个检测器,其可检测产生的内部信号的频率变化,以使同相信号振幅达到零值。

25.如权利要求22所述的电阻抗法细菌检测装置,其中所述信号源是压控振荡器;该装置进一步包括:

耦合到相敏信号检测器的输出的积分电路,积分电路的输出耦合到压控振荡器的输入,其中振荡器适合用来调节频率,使同相信号振幅为零,信号检测器的输出表示调节频率的变化。

26.如权利要求23所述的电阻抗法细菌检测装置,其中所述器皿阵列拥有相同的顶部空间。

27.如权利要求22所述的电阻抗法细菌检测装置,其中所述第二电极整合入器皿底部,所述第一电极延伸入器皿中与样本接触。

## 电阻抗法细菌检测系统

[0001] 相关申请对照参考

[0002] 本申请要求2012年2月15日提交的第61/599,100号美国临时专利申请提交日的优先权,这里将其公开内容引为参考文献。

[0003] 发明背景

[0004] 该发明涉及临床样本中的微生物检测领域,尤其涉及对生物样本中是否含有细菌实施快速检测。

[0005] 检测生物样本中是否含有微生物,如细菌,对于人体健康很有必要。一般此类检测需要培养出足够的微生物时,才能进行检测。样本中微生物生长需要多种培养基,只有当待测样本中有足够数量微生物时,才能保证微生物被检测到。

[0006] 例如,通常在含30毫升供细菌繁殖的生长培养基的培养瓶中,加入约10ml的全血进行接种,用来检测临床血液样本是否染菌。培养瓶中的样本在35°C下自动进行培养,通过检测样本中细胞代谢和生长产生的副产物来测定样本中是否含有细菌。在一个实施例中,细菌代谢产物(如CO<sub>2</sub>)可通过培养瓶中放置的化学传感器进行检测。

[0007] 在总体积为80ml的培养瓶中,含有一个生长的细菌菌落时,通常需要微生物数量升至 $5 \times 10^9$ CFU(菌落形成单位)才能检测得到。很显然,10ml的血液样本中要达到如此高的数值,需要从1个或者2个微生物发生细菌倍增以产生细菌群落。一个实现快速细菌检出的方法是,将10ml样本溶液与所需生长培养基混合(通常30ml的生长培养基与10ml的血液样本混合),然后分离成放于密闭的样本室中的大量小体积副样本。这种方法在Berndt的美国5770440号和5891739号专利中已有记述,这里将其引为参考文献。被本专利引用为文献的Monthony等人的美国5716798号专利中,阐述了一些小体积样本室(每孔体积为250 $\mu$ l的96孔板)彼此不紧连,但是有一个顶部连接空间。Monthony等人考虑使用比色法,荧光法,放射性测定,浊度法和红外分析法检测样本孔中是否染菌。Monthony等人报告称,采用较小样本体积可以缩短细菌检测时间(TTD)。

[0008] 虽然将10ml血液原样与30ml生长培养基混合后分离,在实现快速细菌检测方面取得了成功。但是设计一个实际的多室样本容器用于检测1个或以上样本室中是否存在微生物则是一个难题。例如,如果仅在一个或两个小样本室中检测到细菌生长,则需要对这些样本室进行判定和样本提取,以便从这些样本室中移出染菌样本溶液。检测结果阳性的样本溶液的可以用于下游分析,如ID(如飞行时间质谱)和药物敏感试验(AST)。从样本组中分散的一些小样本室的分散室中准确移除样本又是一个难题。

[0009] 对于检测微生物生长而使用小体积样本室的方法存在的另一个难题是,如何选择合适的检测器。单个样本室的光询问需要测定准确,以保证测量结果与适合的样本室紧密相关。要避免样本孔之间的信号交叉串扰。每个孔配置独立的化学传感器,则使得成本高而难以实施。

[0010] 介电阻抗测试被认为是化学传感器应用的替代方法。然而,介电阻抗测试方法商业应用的障碍在于,阻抗对温度改变敏感。保持血液培养瓶温度超过 $\pm 0.05^\circ\text{C}$ 对于获得理想的临床细菌检测环境仍不切实际。

[0011] Sengupta, S等人认为参考文献LabChip, 第6卷, 682-692页 (2006年) 中的“微尺度多频率电抗测定技术可以用于检测样本中低浓度生物颗粒中细菌的生长情况”, 在这里引为参考文献。100 $\mu$ l容积的微流体样本室可以用于检测对细菌存在的响应。Sengupta等人称, 相对于简单电介导电性测量而言, 当使用长而极细的通道状含有液体样本的, 并且两端配有极小电极的样本室时, 可以提高检测响应。Sengupta等人称通过使用高达100MHz的频率时, 可以检测液体样本的电容量, 这对于由于细菌存在和/或生长引起的样本电容变化更加敏感。

[0012] Sengupta等人进一步表示“使用倍频微通道阻抗方法可以快速检测食品样本中的细菌增殖情况”Sens&Instrumen. FoodQual., 第四卷, 108-118页 (2010年) 和Puttaswamy, S等人称, “新颖的电学测定方法可以用于血液培养基中的活性细菌的检测。”J. Chin. MicroBio., 49卷第6期, 2286-2289页 (2011年)。这里都加以引用为参考文献。对于使用Sengupta, S等人的介电电导率法方法检测样本中的细菌方法, 温度波动是最大的难题。

[0013] Sengupta的方法应用的另一个限制是1小时后需要重新填充微流体室 (或更换微流体室中的样本为新鲜的样本) 使下一步测量用到新的样本。这种方法10小时内消耗约1ml液体样本, 这是由于以前每次采集的样本成分均被丢弃。为了获得更好的信噪比, 可能需要多次取样; 对于生长缓慢的微生物, 随时间消耗的样本量会是一个严峻的难题。

[0014] 因此, 应用介电测试方法检测液体样本中是否存在细菌, 需要加以改善, 这样会有良好的商用价值。

[0015] 发明的简要说明

[0016] 这里展示的是宏观可见的液体样本的微生物检测仪器和方法, 对于血液培养基检测, 最先考虑使用的样本体积, 通常为40ml (10ml血液和30ml生长培养基)。这种仪器和方法, 便于测量电容性电抗分量, 不受环境影响, 可使用相对简单, 低成本一次性的样本室, 样本测量室可用于介电测量独立样本成分, 在基线检测时便于与其他样本室进行比较, 同时可以提高样本微生物检测的快速检测能力。

[0017] 本发明的实施方案之一是电阻抗法细菌检测方法。这种方法需要一个装有可能含有微生物的液体样本的器皿。器皿配有电极, 以使样本设置于电极之间。液体样本至少与两个电极中的一个有直接接触。器皿本身可能含有一个或多个样本室, 每个样本室配有电极, 以使室中的任何样本都设置于两个电极之间。器皿和多室板 (例如, 微量滴定板) 是本领域所熟知的方法, 本文不再赘述。

[0018] 随时间变化的电信号施加于与液体样本接触的第一电极上。第二个电极则与相敏信号检测器进行电气连接。选择随时间变化的电信号频率, 以使检测器在所选的频率上测得的异相信号振幅为0。相敏信号检测器随时监控异相信号振幅。如果检测到信号振幅增大, 就提示液体样本中有微生物生长。

[0019] 另一种实施方案采用电阻抗法细菌检测方法, 随时间变化的电信号施加于与液体样本接触的第一电极上。第二个电极则与相敏信号检测器进行电气连接。相敏信号检测器随时监控异相信号振幅。这种方法中, 异相信号振幅为零时的频率经上述电信号调谐进行测定, 由此上述检测器测量的异相信号振幅为零。该步骤经预先设置的时间间隔进行重复测定。如果检测到所在频率上的信号振幅增大, 就提示液体样本中有微生物生长。

[0020] 另一种实施方案中,由压控振荡器发出的随时间变化的电信号施加于第一电极上。第二个电极则与相敏信号检测器进行电气连接。该实施方案中,检测器的整合异相输出信号充当压控振荡器的频率控制输入信号,而经该振荡器检测的异相信号振幅调谐为零。随时间检测的调谐信号频率增加,就提示液体样本中有微生物生长。

[0021] 本发明的另一个实施方案是借助以电阻抗法为基础的细菌检测仪器。该仪器配有可以容纳上述单个器皿或多孔板的容器。单个器皿或者多孔板上的一个或多个样本孔中的液体样本疑似含有微生物。无论是单个器皿或者多孔板上的样本孔都装有两个电极,以便样本放置于两者之间,并可以与第一和第二个电极接触。

[0022] 该仪器有一个信号源,它可以向第一个电极发送随时间变化的电信号,也可以向第二个电极发送在液体样本中传递的信号。该仪器含有与器皿中第二电极相连的相敏信号检测器。信号检测器可以显示液体样本电容量的变化。

[0023] 在该实施方案中,如果该容器是一个多孔板,至少多数板上的孔装有可能含有微生物的液体样本。该实施方案中,信号分离器向多孔板孔中的第一电极发出随时间变化的电信号。同时,仪器上含有一个多路器,用于接收经多孔板的孔传递的随时间变化的电信号。多路器将信号传输至相敏信号检测器。

[0024] 该仪器的另一个实施方案中,相敏信号检测器是一个锁相放大器,该放大器有一个可以测量在液体中传递的异相信号分量的内部信号发生器。该内部信号发生器充当向第一个电极发送随时间变化的电信号的信号源。该仪器可检测产生的内部信号的频率变化(该变化即表示微生物生长),以使异相信号振幅达到零值。

[0025] 另一个实施方案中,向第一电极传输的随时间变化的电信号由一个压控振荡器产生。该实施方案中配有与相敏信号检测器的输出信号相耦合的整合器。整合器的输出信号与压控振荡器的输出信号相耦合。振荡器可以调节为可使检测器测定的异相信号振幅为零时的频率。信号检测器的输出信号可以显示调谐频率的变化。调谐信号频率的变化即表示微生物的生长。

[0026] 在一个实施方案中,10ml的全血样本与30ml的BDBACTEC™生长培养基混合后,分配至96孔板中,每孔的总体积为0.42ml。选取10ml的样本量,因为这是行业普遍接受的标准样本体积,如果病人的血液中含有微生物,10ml体积的样本中就能保证检测出微生物。有经验的人会了解,本发明不受样本体积或者培养基的限制,只需确保样本容量足以帮助检测出样本中是否有微生物。

[0027] 每个含有样本的样本室(孔或者微孔,这些术语可以互换)通过射频介质阻抗测量,可以检测出是否存在细菌。电极结构通常设计成一个可以充当样本室底的下电极和一个放置于测量阵列并可以延伸至样本室顶部部分的上电极。测量的频率、电极的直径、两个电极之间的距离都进行了最优化,以便液体样本电容的任何变化都可以引起检测的异相信号分量的变化。异相信号分量是指与在特定频率下测定的信号有不同相位的信号。

[0028] 虽然电导率分量与细菌代谢产物有关,例如代谢气体,但是电容分量会显示是否存在细菌。细菌检查出来后,所有的样本室都有联合顶部空间,根据该现象可以设计一个非常简单且低成本的一次性阳性样本室。

[0029] 根据此处描述的方法和仪器,可以快速检测出是否存在细菌,原因如下:1)使用小体积样本室;2)与阵列室中相邻样本室比较;3)电容检测机制比电导检测机制更敏感。

## 附图说明

- [0030] 图1到图18用于说明本发明的具体实施方案。
- [0031] 图1是本发明的一个实施方案中的一次性样本阵列底部图解。
- [0032] 图2是具有连接盖的图1中样本室阵列底部图解。
- [0033] 图3是本发明的一个实施方案采用的充满40ml样本溶液的样本阵列的一次性底部图解。
- [0034] 图4是装满且组装好的一次性样本阵列图解。
- [0035] 图5是根据本发明的一个实施方案设计的测量阵列中样本室的阻抗测定电路的原理图。
- [0036] 图6是在一次性阵列中每个样本室测定原理的图解。
- [0037] 图7显示了两个点,分别代表异相信号分量的理论计算值和样本电容两个循环测频值。
- [0038] 图8显示了与图7相同的两个点,但是用线性Y轴比例,循环频率范围在 $10^5$ - $10^6$ 1/s,该频率下可以观察到零点交叉现象。
- [0039] 图9显示使用小体积样本室、加强传感器分辨率可以缩短检测时间。与阵列中的临近样本室比较,测量样本的电容阻抗分量都可以提高传感器分辨率。
- [0040] 图10是基于液体样本介电电容率测定来检测样本中是否存在微生物的仪器相关实施方案的图解。
- [0041] 图11是本文所述的96孔板和标准96孔测试板的面积比较图。
- [0042] 图12是异相信号与频率的关系图。
- [0043] 图13A和13B代表可以阐明频率和异相信号之间关系的实际数据(这里称作信号虚化部分)。
- [0044] 图14A-C是装有相同样本体积和成分的不同样本孔测定的谱图,该谱图是由采用图10中所述实验参数,用斯坦福研究系统SR850100-kHzDSP锁相放大器测定。
- [0045] 图15是基于一些含有大肠杆菌培养基的样本孔的测定图谱考察的时间-频率关系图解,以及采用装有相同液体样本的大容量BACTEC™培养瓶和BectonDickinsonDiagnostics, Sparks, MD的BACTEC™血液培养基进行平行测定所得生长曲线示意图。
- [0046] 图16是随着浸有大肠杆菌的BACTEC™培养基的电容量增大,异相信号分量朝正值变化所需的时间示意图。右侧曲线为采用装有相同液体样本的大容量BACTEC™培养瓶和BectonDickinsonDiagnostics, Sparks, MD的BACTEC™血液培养基进行平行测定所得生长曲线示意图。
- [0047] 图17显示了将测定的异相信号图例放大,可以检测到微生物的早期生长情况。
- [0048] 图18是基于液体样本介电电容率测定来检测样本中是否存在微生物的仪器的另一个实施方案的图解,它的信号发生器测量频率可以被自动调谐,并可以保持在零点交叉频率。
- [0049] 详细描述。
- [0050] 本发明的实施例都是关于检测血液样本中是否存在细菌。除特别说明外,所用的生物样本均由10ml全血样本与30mBD的BACTEC™生长培养基混合而成。样本与培养基混合后



加入到0.42ml/孔的96孔板中。尽管许多实施例都是这样描述,有经验的人会明白所用的方法和仪器可以用于测试不同类型的样本(组织样本,唾液样本,尿液样本等)和不同类型的生长培养基。虽然就血液/培养基混合样本的体积而言,以上所述样本孔体积和样本阵列都是非常有利的,但是经验丰富的人可以针对特定的环境来选择样本室容量和阵列大小。

[0051] 应用射频介电阻抗测定法可以检测样本中是否存在细菌。电极的配置结构和频率都按照本文所述的方法进行设置,以保证液体样本电容的任何变化都可以引起检测的异相信号分量变化。

[0052] 虽然电导率分量与细菌代谢产物有关,例如不同的代谢气体(如CO<sub>2</sub>),但是电容分量可以更直接地反映出样本中是否存在细菌。若检测到细菌(不是细菌代谢的副产物)存在,阵列中的所有样本孔可以共享共同或联合的顶部空间。这就使样本阵列免受设计限制(如在气密模式下,样本孔或者样本室彼此分离),反过来,根据该现象可以设计一个非常简单,低成本的一次性样本室,它可以方便地接触其他细菌检测呈阳性的样本孔。

[0053] 参见图表,图1是阵列100的侧视图。样本室120的底部110装有与140电连接的电极130。120中的样本孔体积为0.5ml,高26mm,直径5mm。外壳150由塑料制成,可以节约组装成本。

[0054] 图2是图1中的样本阵列120的底部110配有连接盖170后的示意图。连接盖170底层金属层160可以充当每个样本室的上电极。上电极可以延伸至每个样本孔,如此,上、下电极之间的距离可达21.5mm。在该实施方案中,正如下面所述,21.5mm的距离对于检测因样本中存在细菌而导致的阻抗变化是有利的。

[0055] 图3是图1所示的阵列中的样本室充满液体样本180的示意图。尽管是侧视图,96孔板阵列100(12X8)可以容纳40ml的液体样本(0.5ml/孔)。

[0056] 图4是图1所示的阵列中的样本室充满液体样本180的示意图。用于检测细菌存在与否的有效可弃体积等于电极间的空间大小,在展示的实施实施方案中仅为0.417ml。样本阵列的有效顶部空间为15.3ml。由于存在联合顶部空间,气/液比率高于或者等于高达36孔阳性样本室的BACTECTM比例。这就意味着对于含细菌达36CFU/10ml的全血样本来说,存在一个最佳的生长条件。对于细菌含量大于36CFU/10ml全血来说,生长条件会比最优条件偏低,但是这样的情况很少出现。我们需要记住的是10ml血液样本是患者血液中可检测出1-2个微生物的推荐体积。

[0057] 图5是根据本发明设计的阵列100中样本孔120中阻抗测定电路200的原理示意图。该实施方案中,信号源210连接到上电极120,并且矢量电压计220可以检测样本180的阻抗和参考电压230的阻抗变化。配置多路信号分离器240和多路器250可以保证信号实施,逐个对样本孔进行读数。

[0058] 图6是在一次性阵列中每个样本室测定原理的图解。使用8通道多路信号分离器接收上电极的信号,所有的96孔板上的孔都可以独立的进行测试,而12通道的多路信号器可以获取下电极的信号。

[0059] 图7显示的两个点分别代表了异相信号分量的理论计算值和样本电容两个循环测频值( $\omega = 2\pi f$ )。实线260代表一个因样本中细菌含量而使本身电容达0.66pF的样本孔。虚线代表可以产生两倍实线260所代表的样本孔电容量的样本孔。需要注意的是,尽管细菌所致电容不同,但在较低频率时,这两种样本孔的异相信号没有差异。而在高频率时,不同细

菌浓度下可以观察到不同的异相信号。

[0060] 图8有两种与图7一样的点,但是用线性Y轴比例,循环频率范围在 $10^5-10^6$ 1/s时,该频率下可以观察到零点交叉现象。在本体-混悬液中因为细菌数量的增长可以引起电容的变化,细菌增殖可以引起初始零点交叉频率升高。根据本文所述的实施方案,可以测定初始的零点交叉频率,并可以将检测到的频率调谐至该初始零点交叉频率,还可以检测随时间异相信号振幅的变化。混悬液中细菌数量增多可以引起相信号振幅增大。换言之,监控随时间异相信号振幅的变化情况,可以检测样本中细菌的存在与增长情况。

[0061] 图9显示使用小体积样本室、加强传感器分辨率可以缩短检测时间。与阵列中的临近样本室比较,测量样本的电容阻抗分量都可以提高传感器分辨率。图9说明对于高灵敏度传感器,样本体积减小可以缩短检测时间。降低标准BACTEC™样本瓶的体积( $8 \times 10^4 \mu\text{l}$ )到该实施方案中所设的样本孔体积( $500 \mu\text{l}$ )可以显著降低检测时间。

[0062] 根据本文描述的方法和仪器,可以快速检测出是否存在细菌,原因如下:1)使用小体积样本室(如0.5ml或者更少);2)实时与阵列室中相邻样本室比较;3)从检测机制上讲,电容检测比电导检测机制更敏感。

[0063] 正如上文所述,本发明的仪器和方法适用于很多样本和生长培养基。测试环境也可以加以调整适应取样环境,以便为不同的体积(包括培养基)的样本提供有利数目的样本孔。培养基是弱导电性,使得电容变化更易测得,因此对基于电容阻抗法检测细菌是有利的。在现有技术下,与微流体样本室相比,宏观的样本室阵列更易于用来检测样本的电容量变化,只需一次加样,可以容纳并检测10ml全血样本。另外,细菌可以在宏观的样本室中生长,而如果没有足够的顶部空间,在密闭的微流体环境中,细菌增殖缓慢或者不生长。

[0064] 此外,由于存在联合顶部空间,开放式的样本板提供了充足的氧气,从而为有氧微生物整个生长过程提供了良好的条件。因为不需要检测细菌的气体性代谢物,所以无需密封样本室。因为可以实时比较与相邻样本孔的阻抗测定结果,可以提高感应器灵敏度分辨率。本发明的先进之处在于不需要化学传感器。开放式样本板不仅便宜而且是一次性的,同样适用于机器自动化,例如放置和吸取血液样本,将阳性样本室中的样本转移至其他样本孔中,或者同一仪器上的另一个有相似设计的一次性样本板中,以供下游的ID/AST序列测定。

[0065] 图10是本发明实施方案所用仪器的详细图解。一个共同的含有内部信号发生器210的锁相放大器可以输出正弦射频信号至介电电抗测试室220。上述样本室的第二个电极与上述内部锁相放大器通过信号输入信号235相连。

[0066] 熟悉该技术领域的人会知道,在上述样本室内与两个电极直接接触的样本液体,可以用图10中的虚线框225表示的电信号网络进行传递。在此, $C_i$ 表示金属电极与液体样本接触界面的电容量, $R_i$ 代表金属电极与液体样本接触界面的电阻。 $R_b$ 表示液体的电阻, $C_b$ 表示液体的电容量。

[0067] 假设锁相放大器内部信号发生器210内电阻为 $50 \Omega$ ,输入级235电容量通常为 $15 \text{pF}$ ,输入电阻为 $10 \text{M} \Omega$ 。

[0068] 根据本发明,如图10所示,可以选择信号源-电阻器 $R_s$ (215),载荷测试电阻器 $R_m$ (216),如此,对于给定介电测量室和液体来说,测量信号的异相信号分量频率图谱可以展示零点交叉图谱特征:1)取决于 $C_b$ 值;2)置于低频区( $< 100 \text{kHz}$ ),可以使用标准锁相放大

器;3)在附图中所得数据是用斯坦福研发系统SR850100-kHzDSP锁相放大器测定。据研究发现,对于血液生长培养基,例如BectonDickinsonDiagnostics, Sparks, MD的BACTEC™血液培养基,当 $R_s=500\ \Omega$ ,  $R_m=500\ \Omega$ 时,可以产生在30-100KHz范围内的零点交叉频率。如图10中所描述的仪器,用锁相放大器235测定的异相信号振幅与异相信号阻抗成反比。换言之,当用本文所述的锁相放大器测定方式测定时,异相信号振幅频率位于零点交叉频率时,异相信号阻抗最大。需要理解的是,图10所展示的仪器只是其中一个示例。有专业经验的人可以明白图10中所展示的仪器和方法应该用合适的信号发生器,以及适合的矢量电压器,这样可以简化方法和仪器(如图5所示)。

[0069] 需要注意的是,阻抗测定室的尺寸变化,或者用其他样本替代生长培养基时,都会导致 $R_s$ 和 $R_m$ 的最佳值发生变化。

[0070] 图11是本文所述的96孔板410和标准96孔测试板400的面积比较图。与标准96孔板相比,所用的96孔板面积大大减少。

[0071] 正如图10为背景进行的讨论中,所述方法影响了电容量与异相分量测定信号频率之间的关系。为了更好地比较频谱计算值和测量值的差异,图12显示了图7的计算值谱图,但是用的是线性标度。另外,对于低循环频率,不同电容量的样本频谱是一致的。

[0072] 图13A和13B中的点表示的是用无菌的BectonDickinsonBACTEC™标准有氧/F生长基质测定的实际数据。从图13A中可以看出,测定的图谱与图12中计算的图谱看起来非常相似。在这种情况下,在60KHz可以观察到零点交叉特征。图13B所示的点与图8对比更容易理解。因为在实际样本中没有细菌,所以只观察到1个零点交叉频率。14A-14C的镜像图显示,对于所有测定的样本孔中可以检测的有零点交叉特征的相似频谱。需要注意的是,尽管每个孔加入相同体积的生长介质,每个孔测定的零点交叉频率仍不相同。然而,这并不构成问题,因为自动检测仪器可以检测每一个孔的零点交叉频率,而检测细菌存在与否是在每个孔检测频率基础上测定的。

[0073] 正如前文所述,样本中生长的细菌浓度可以影响样本的电容(其他因素都一样)。

[0074] 图15阐释的是,对于给定的样本,细菌浓度变化可以改变异相信号振幅为零时的频率。因此,了解该技术领域的人会想到通过检测这种异相信号零点交叉频率的特征来检测细菌的生长。高频率区的频率变化是由于细菌生长导致浓度变化,频率向高频率转变。图15左侧的点,显示的是培育3.5小时后,频率向高场移动。3.5小时后可以检测的细菌个数增加。图15右侧的点,显示了用BACTEC™仪器,使用含有相同液体样本的BACTEC™标准培养瓶,测得的细菌的生长曲线。在此情况下,9.33小时过后,可以检测是否存在细菌。

[0075] 相对图15所示的方法,即每10分钟测定一次零点交叉频率可能发生的变化,可以选择测定初始零点交叉频率,在固定的频率下操作仪器,监控异相信号振幅随时间变化的曲线。若未发生飘移,且未出现细菌增殖,则振幅将保持在零。随着电容的增加,细菌生长会引起异相信号振幅向正值方向变化。

[0076] 在实际的实验设置中,信号振幅随时间发生变动。对于BACTEC™标准有氧/F生长培养基,可以发现振幅向负值变化。这个现象可以在图16中显示出来,当频率固定在初始零点交叉频率时,测定异相信号振幅随时间的变化。可以看到,经培养后信号振幅向负值变化,3小时后又急剧向正值转变。这表明3小时后,检测到了一个生长的细菌菌落。图16右侧的BACTEC™生长曲线可作为对比,9.25小时后检测到细菌生长。

[0077] 图16左侧的生长曲线显示了急剧的增加。图17是图16中生长曲线的全部数据集。当BACTEC™仪器上的培养瓶开始检测出细菌后,这个曲线在约9小时后开始急剧增加。虽然申请人不希望受限于某些理论,但是申请人认为这个现象表明只有当培养瓶中的化学物质强烈变化时,化学感应器才能响应。相比较而言,电容阻抗细菌检测法更加灵敏。图17右侧的生长曲线说明,即使Y轴缩放比例不一样,而X轴不缩放,只有一条曲线在两小时内显示出细菌增长情况。因此,在被化学感应器检测出来前,细菌早已开始生长。

[0078] 图18是如图10所示依靠液体样本介电阻抗测定检测样本有无细菌的另一个实施方案,该实施方案的信号发生器测量频率可以被自动调谐,并可以保持在零点交叉频率。相敏信号检测器的异相输出信号与电子整合器的输入信号连接。整合器的输出信号与压控振荡器的频控输入信号相连接,压控振荡器可以作为仪器内部的信号发生器(图10,210A)。Ci表示金属电极与液体样本接触界面的电容量,Ri代表金属电极与液体样本接触界面的电阻。Rb表示液体的电阻,Cb表示液体的电容量。

[0079] 在这种实施方案中,由压控振荡器产生的正弦电信号与样本接触的电极460电耦合。与样本直接接触的第二个电极与相敏信号检测器相连。相敏信号检测器的异相输出信号与整合器连接。整合器的输出信号与压控振荡器的频控输入信号相连接。当相敏信号检测器测定的异相信号振幅为零时,压控振荡器的频率就会被调谐。随着时间变化,被调谐的频率增加即表明样本中有微生物生长。

[0080] 在实际操作中,整合器的输出电压可以影响压控振荡器的频率。图13A和13B可以解释这一现象。在该实施例,如果初始频率低于60kHz,异相信号振幅为正值。整合器的输出电压就为正值,继而会使压控振荡器的频率增加。频率会一直增加,直到到达零点交叉频率。这时,异相振幅为零,不再进一步整合,使得压控振荡器的频率处于零点交叉频率,也就是60.723kHz。如果初始频率过高,会自动达到实际的零点交叉频率。通过测定零点交叉频率随时间的变化,可以检测出细菌是否存在或者有无增加。

[0081] 从图18中我们可以看出这套装置可准确测定零点交叉频率。由于“零点信号”是由相敏信号检测器输出,因此信号发生器振幅以及相敏信号检测器内部增加的变动,将不会影响自动调谐零点交叉频率,这是一种系统输出信息。

[0082] 虽然参照具体实施方案对本发明进行了描述,需要了解的是这些实施方案仅仅是说明本发明的原理和应用。因此,需要了解对实施方案的各种修改和其他装置的设计和发明不应该脱离本发明(如随附权利要求书中所定义)的宗旨和范围。

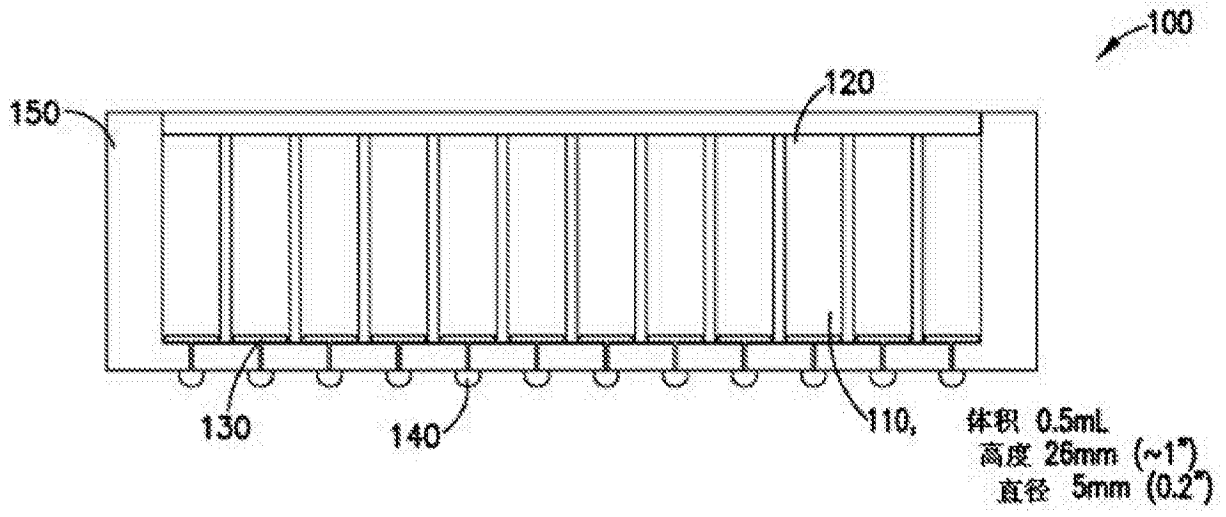


图1

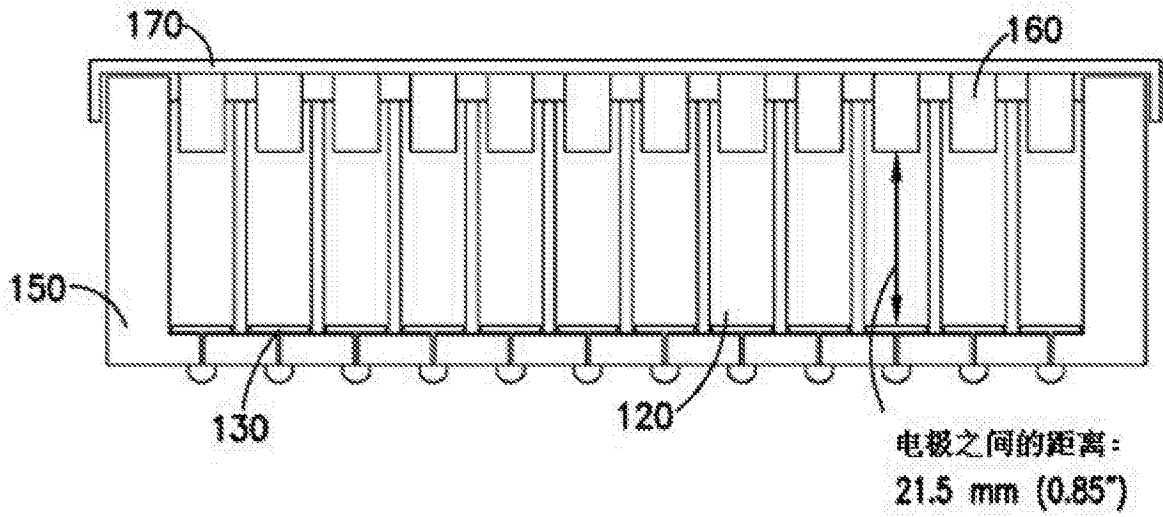


图2

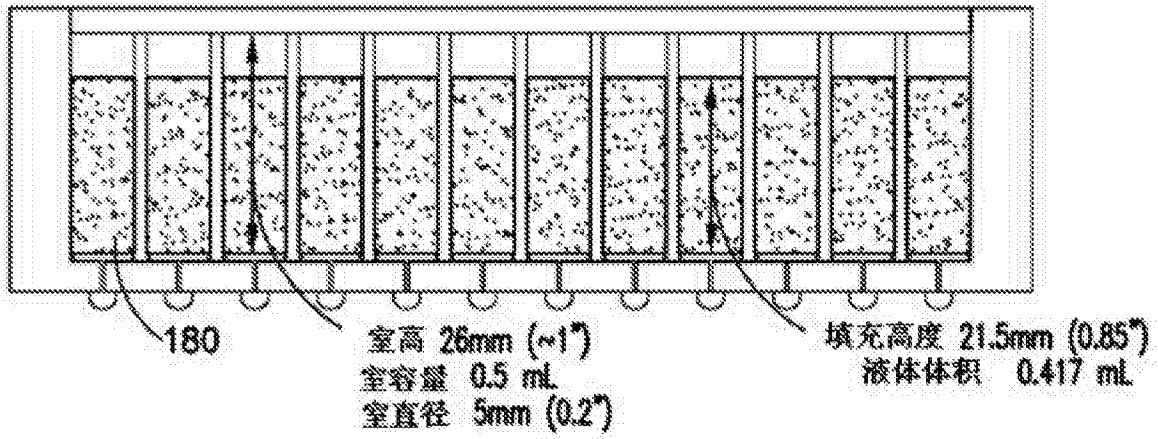


图3

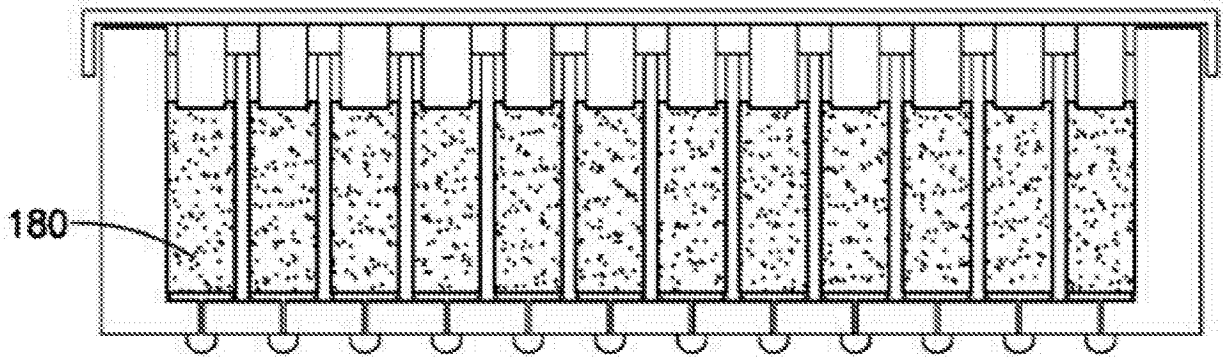


图4

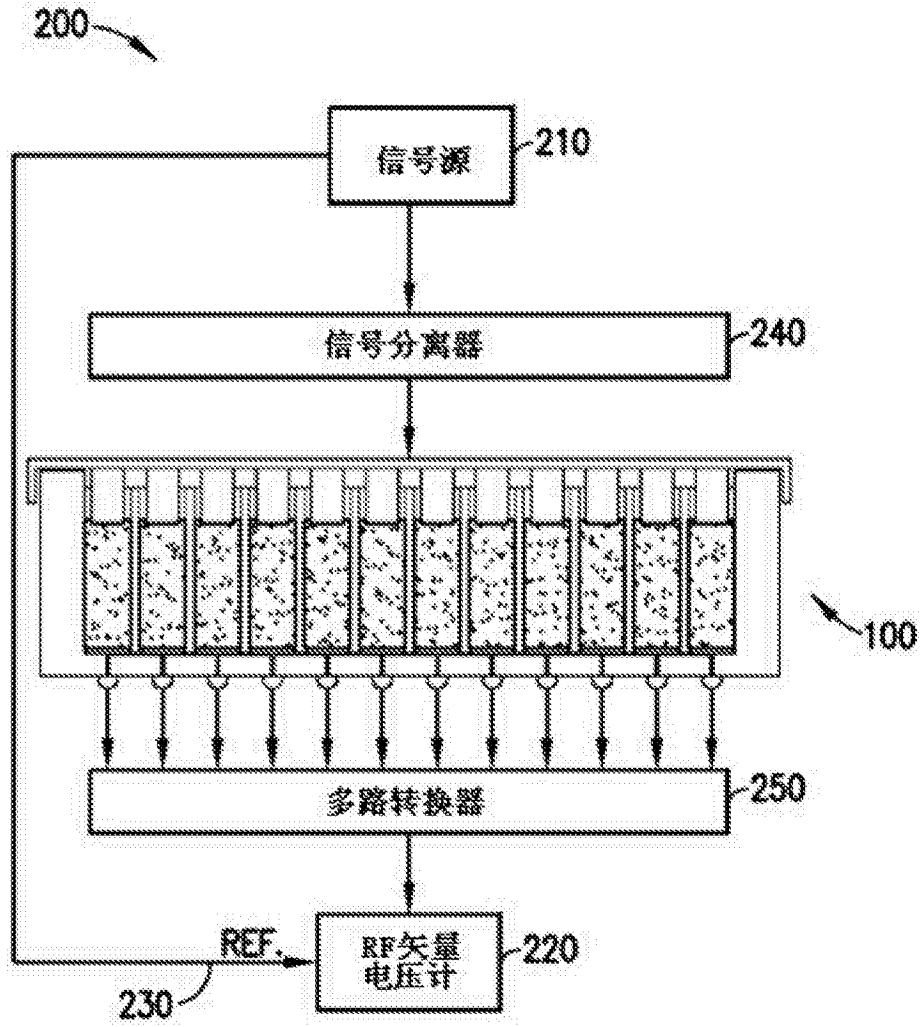


图5

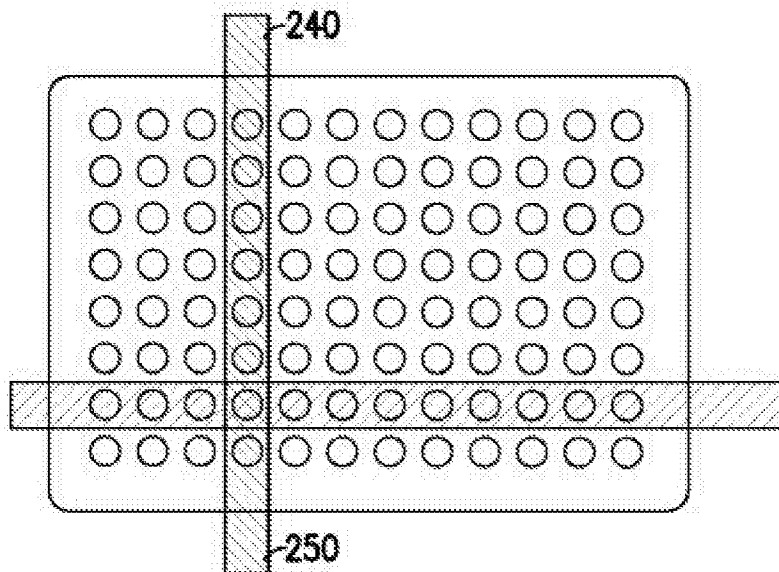


图6

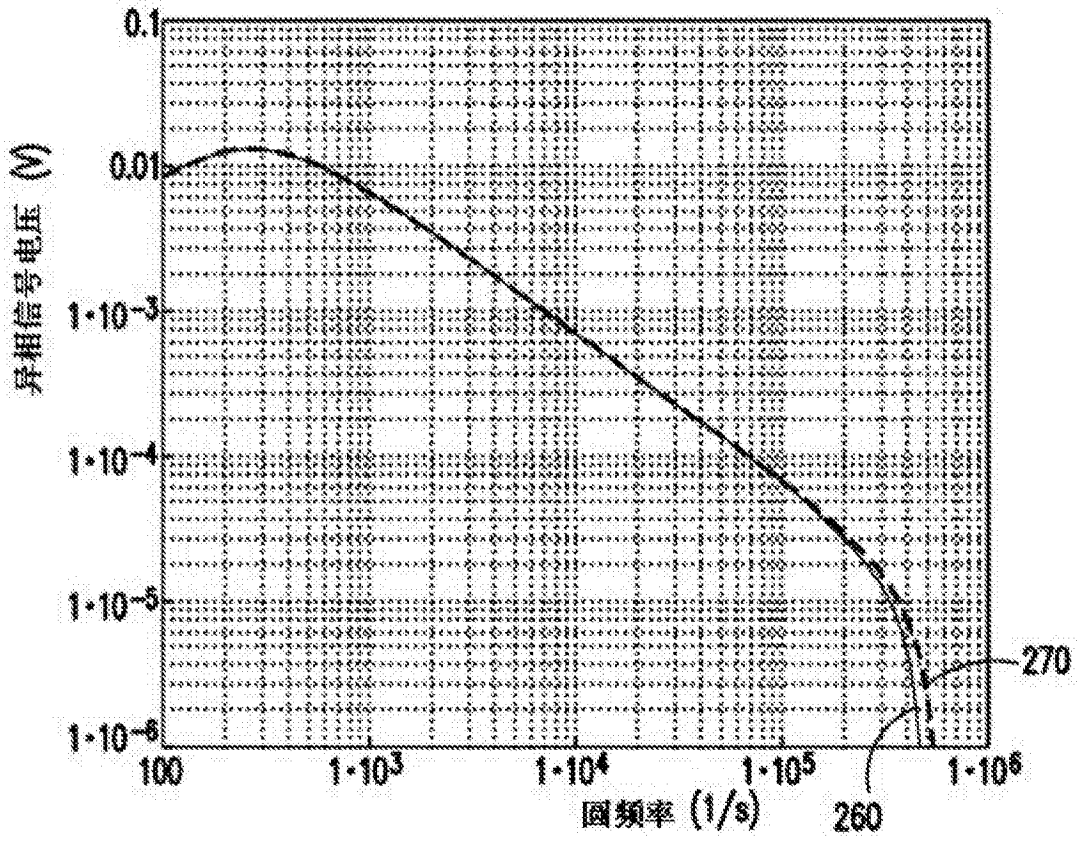


图7

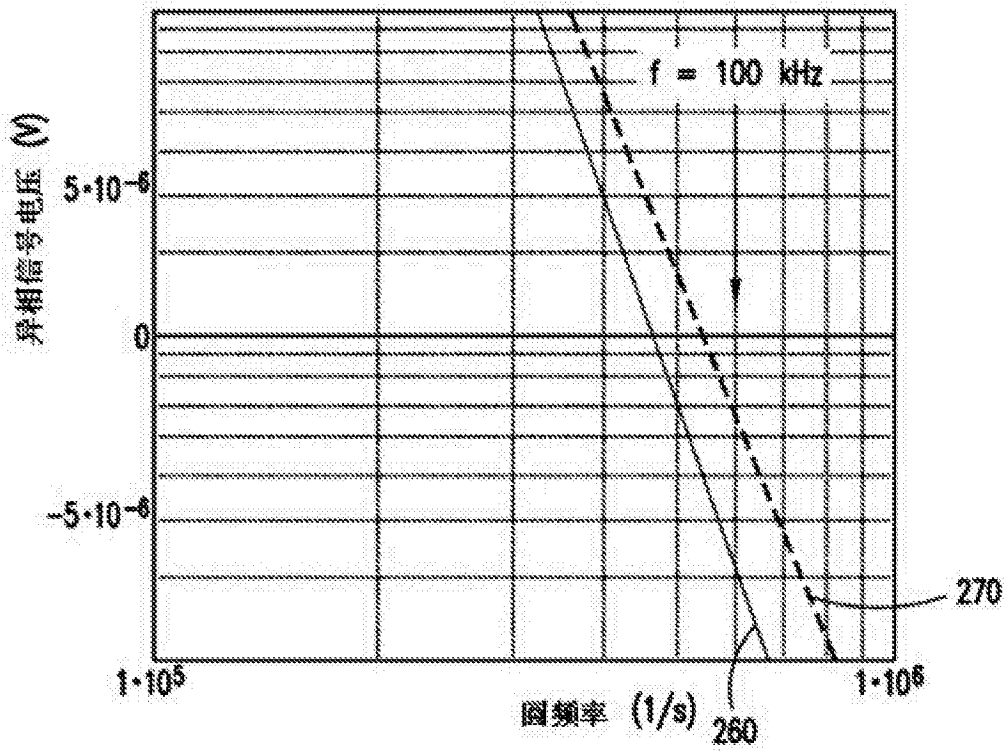


图8



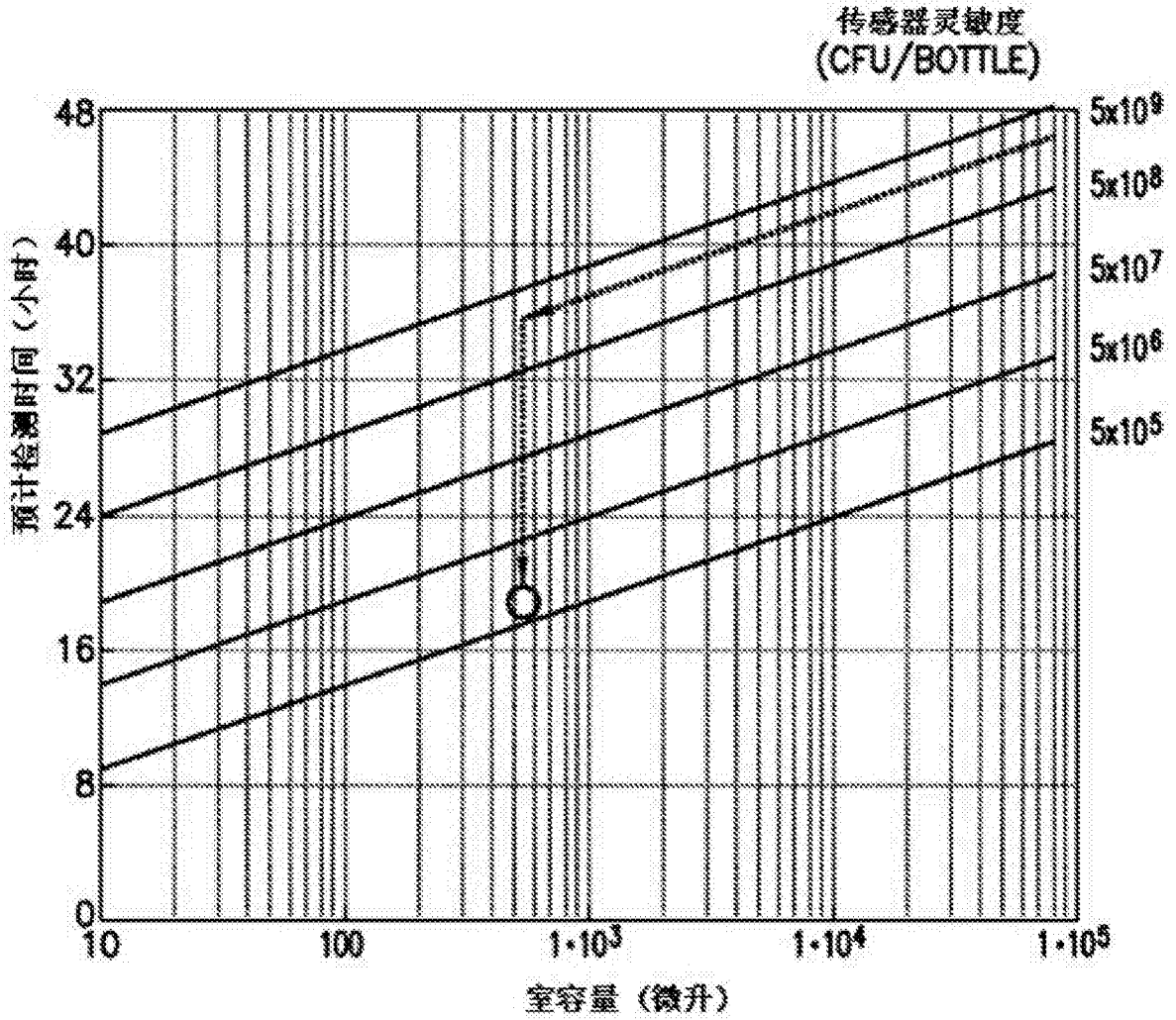


图9

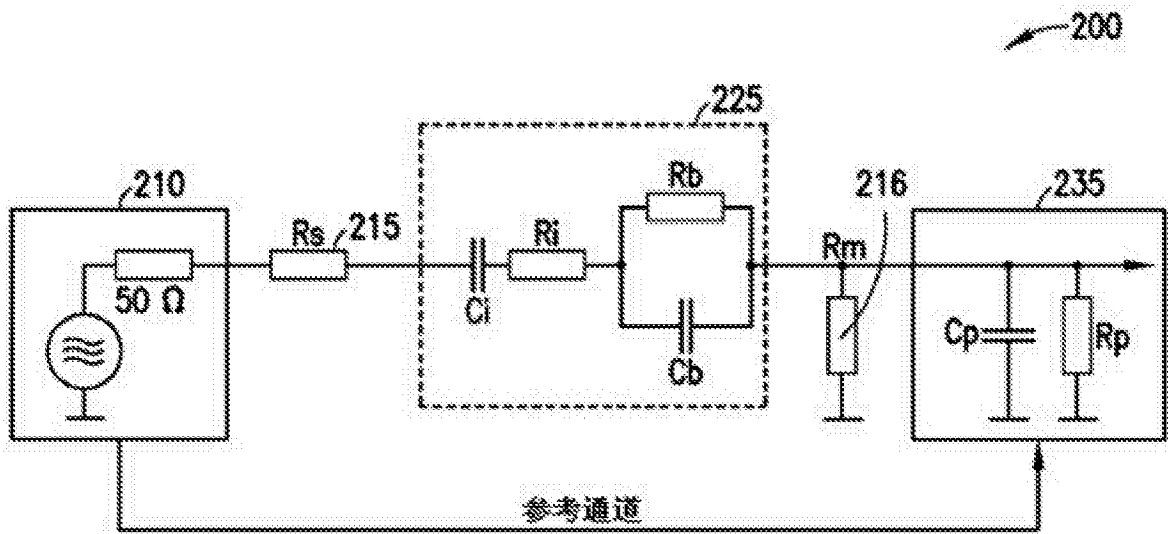


图10

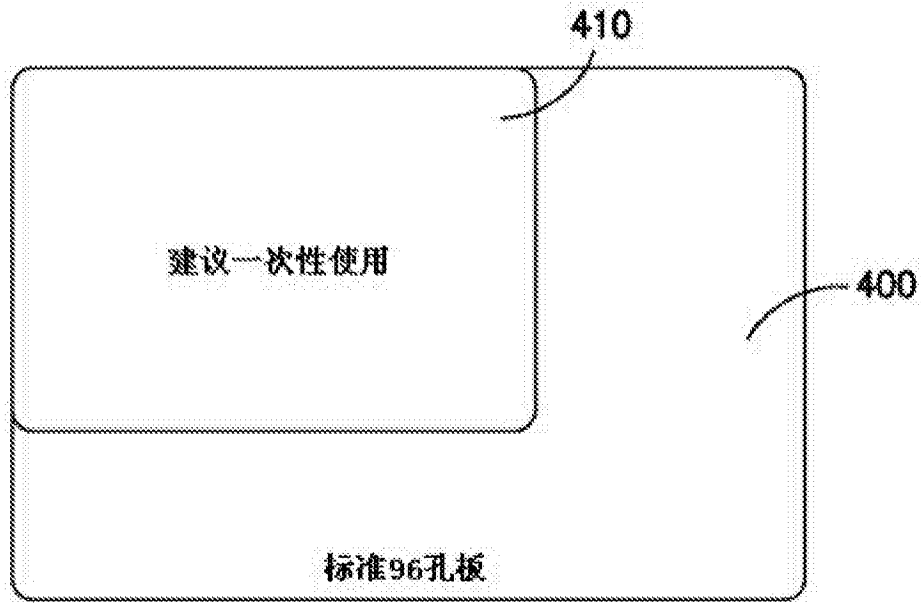


图11

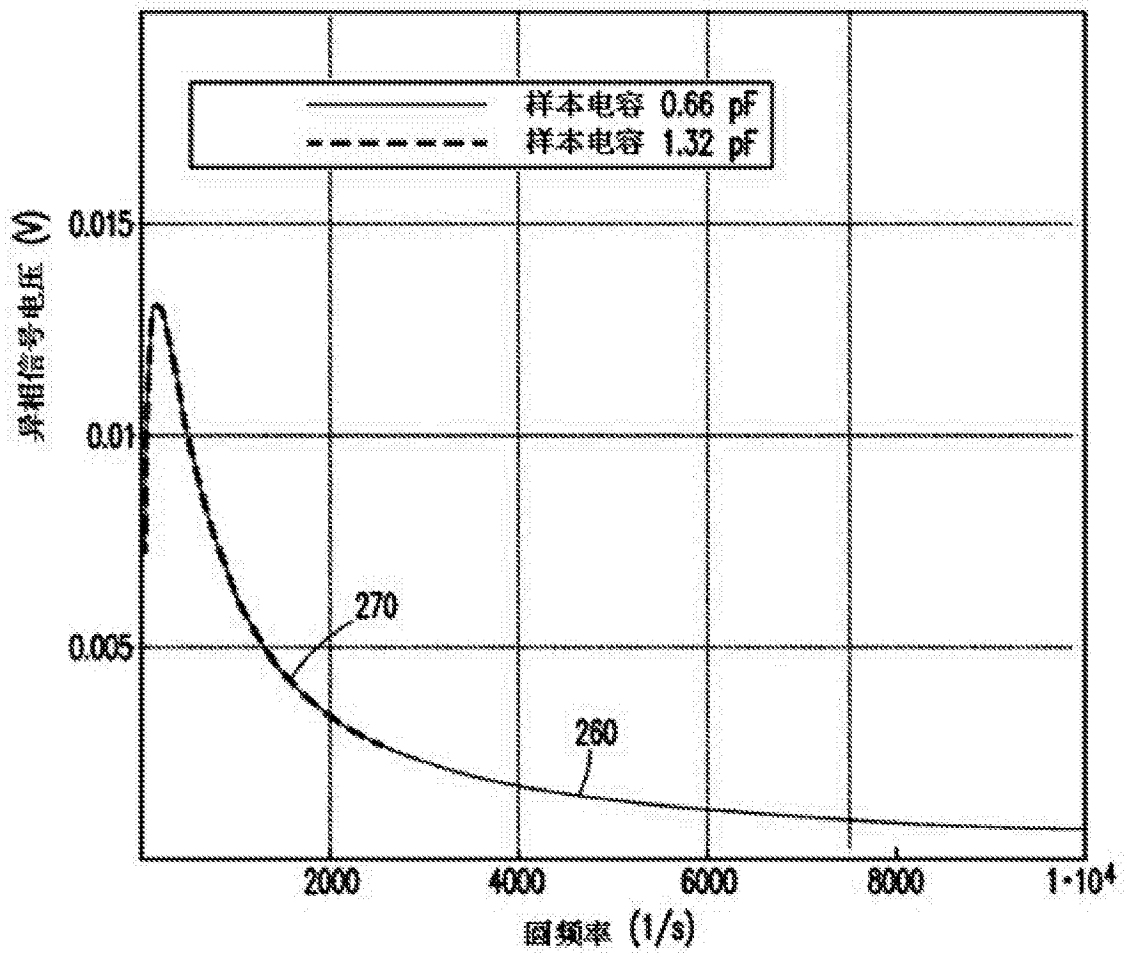


图12

手动步进式记录异相分量频谱  
输出信号虚部与频率  
BACTEC™ 标准有氧培养基

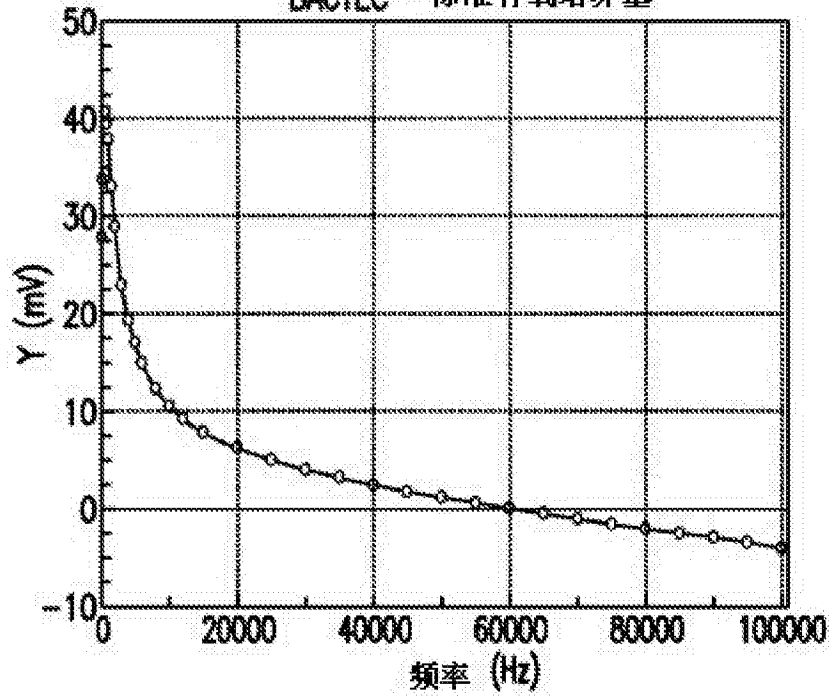


图13A

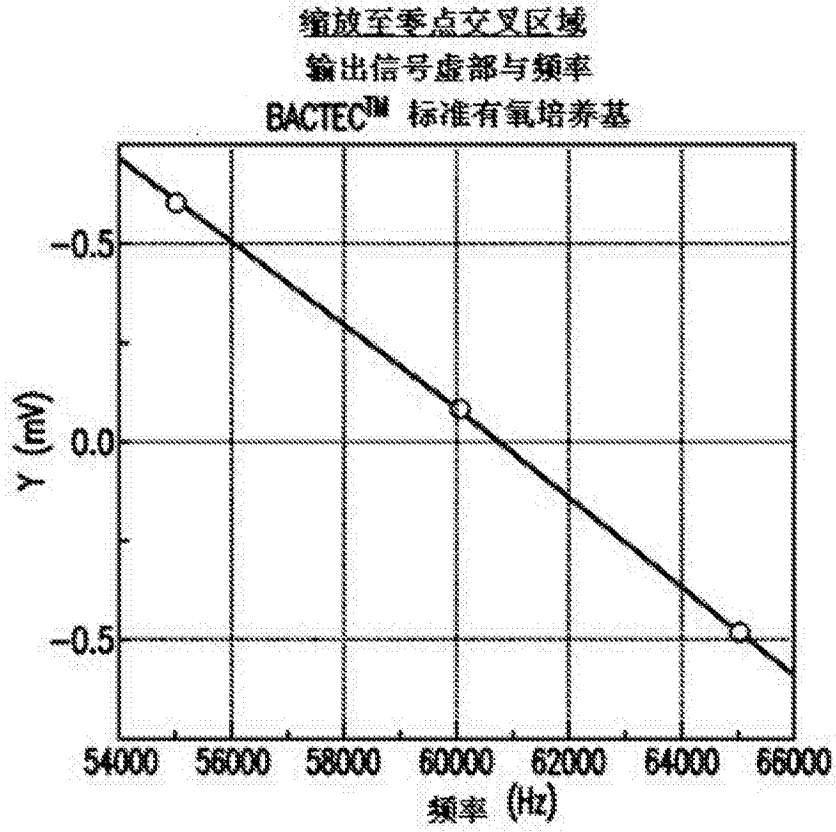


图13B

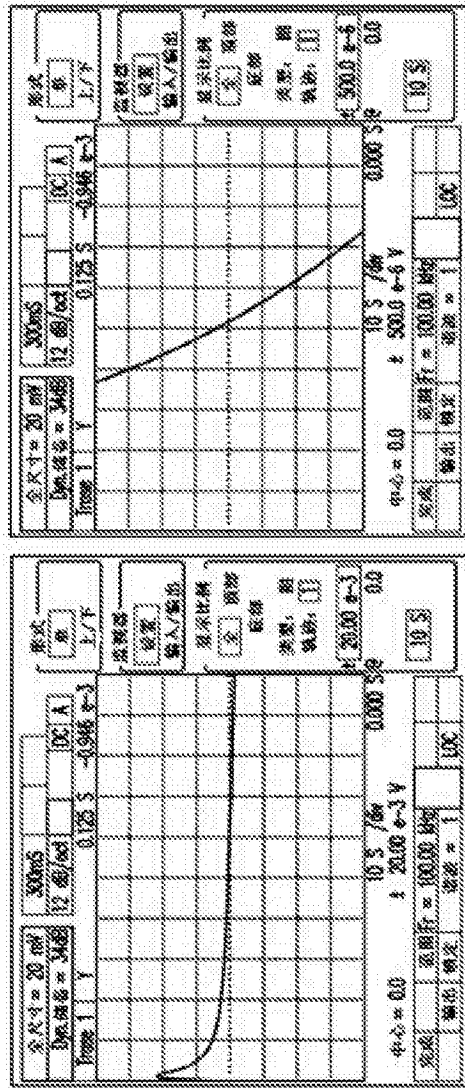


图14A

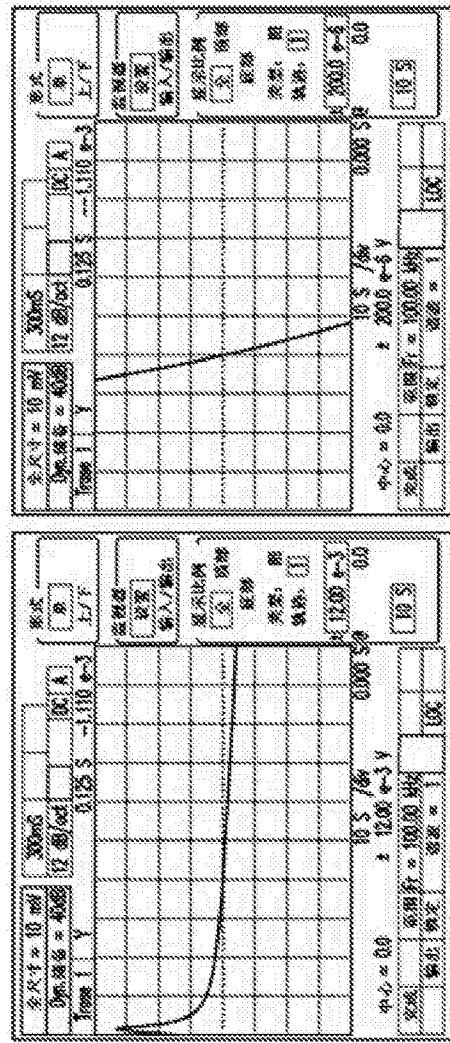


图14B

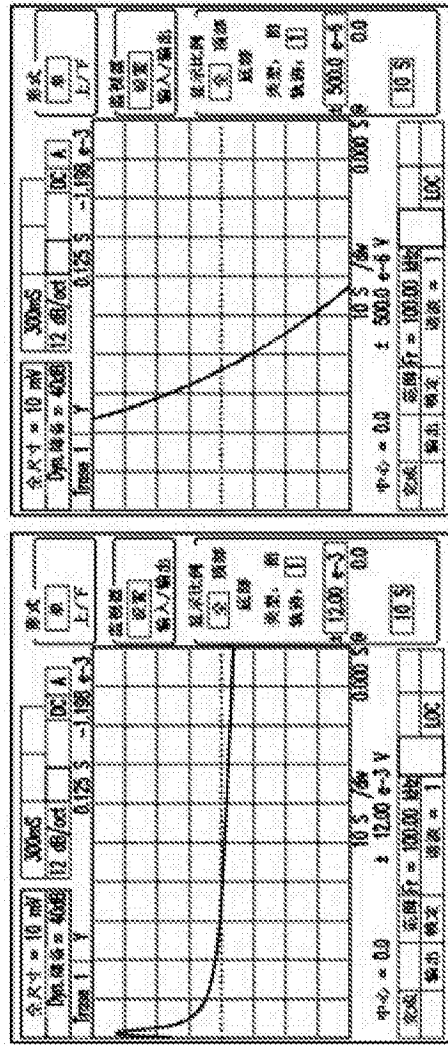


图14C

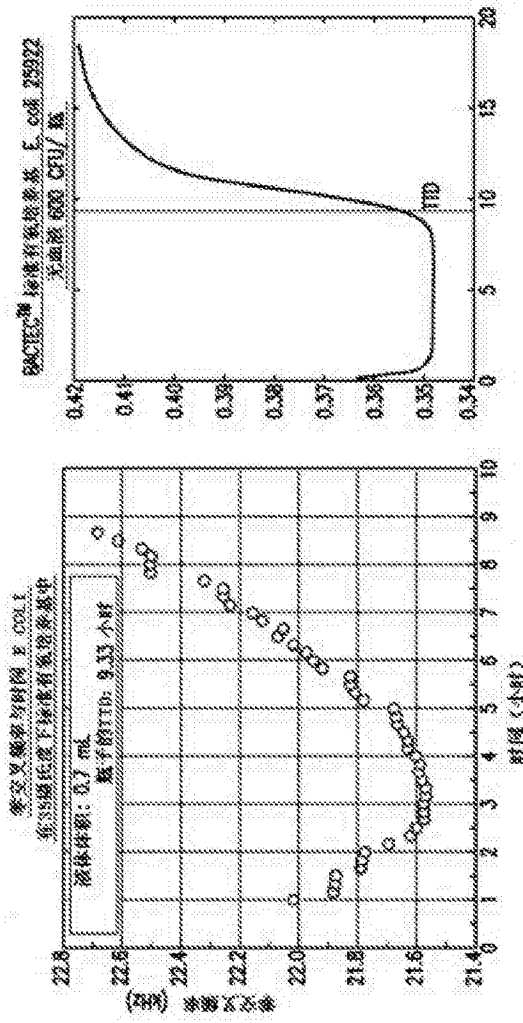


图15



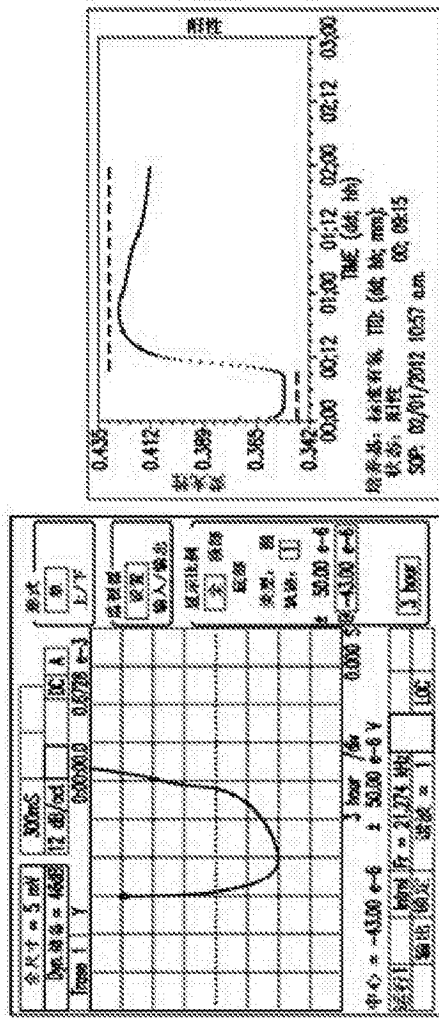


图16

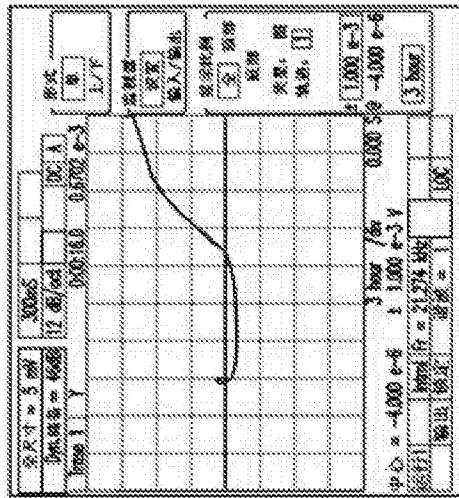
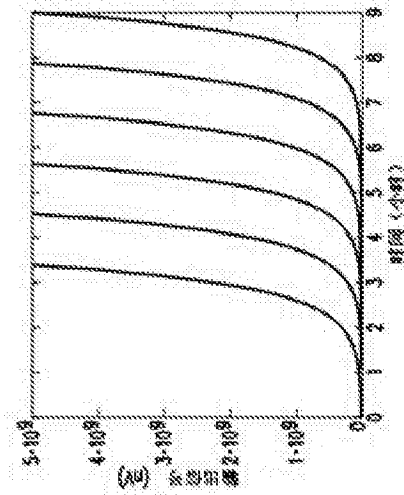


图17

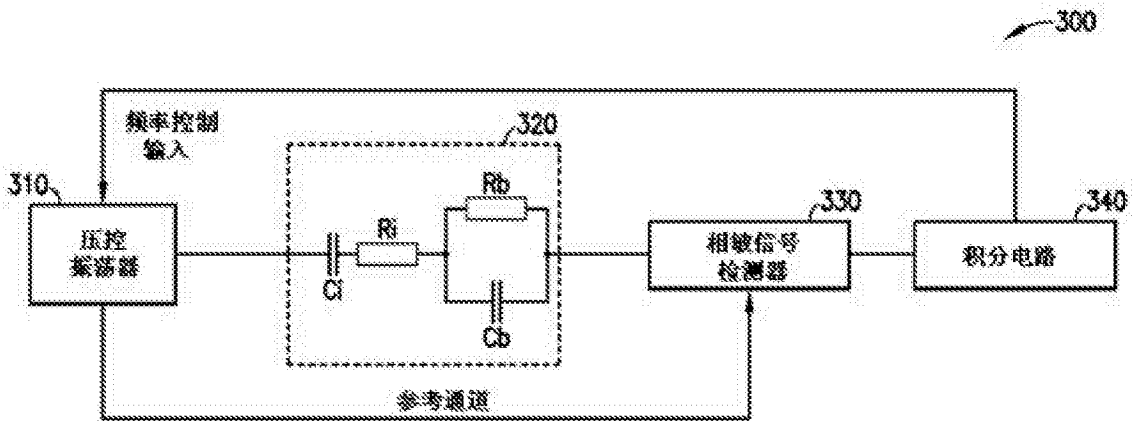


图18