



FI000094646B

(B) (11) KUULUTUSJULKAISU
UTLAGGNINGSSKRIFT

94646

C (45) Patentti myönnetty
Patent meddelat 10 10 1995

(51) Kv.1k.6 - Int.cl.6

C 12M 1/34, C 12Q 1/04, G 01N 27/26

SUOMI-FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(21) Patenttihakemus - Patentansökning	913579
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	26.07.91
(24) Alkupäivä - Löpdag	27.11.90
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	26.07.91
(44) Nähtäväksipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	30.06.95
(86) Kv. hakemus - Int. ansökan	PCT/GB90/01836
(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet	
27.11.89 GB 8926781 P	

(71) Hakija - Sökande

1. British Technology Group Limited, 101 Newington Causeway, London SE1 6BU, United Kingdom, (GB)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Betts, Walter Bernard, 20 Moorfield Drive, Wilberfoss, York YO4 5PZ, United Kingdom, (GB)
2. Hawkes, Jeremy John, 24 Grange Street, Fishergate, York YO1 4BH, United Kingdom, (GB)

(74) Asiamies - Ombud: Oy Borenus & Co Ab

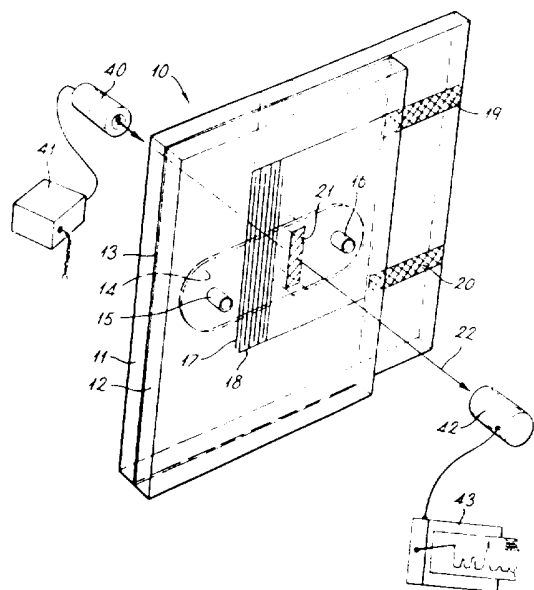
(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Mikro-organismien ja muiden hiukkasten dielektrforeettinen määrittäminen
Dielektrforetisk bestämning av mikroorganismer och andra partiklar

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Fluidisuspensiossa olevien mikro-organismien tai muiden elollisten tai elottomien, dielektrisesti polarisoituvien hiukkasten dielektrforeettiset kerääntymisnopeudet määritetään saattamalla suspensio virtaamaan elektrodien (17, 18) ohi, joihin on johdettu energiaa siten, että ne tuottavat suspensioon epäyhtenäisen vaihtosähkökentän, energian johtaminen elektrodien lopetetaan ennalta määrätyn ajanjakson jälkeen suspensiosta kerääntyneiden hiukkasten vapauttamiseksi, minkä jälkeen elektrodien suhteen alavirrassa mitataan näiden vapautuneiden hiukkasten tuottama pulssi, joka on mitta hiukkasten kerääntymisnopeudesta sinä aikana, kun elektrodien joihin johdettiin energiaa. Toistetut mittaukset erilaisilla kenttääjauksilla tekevät mahdolliseksi kerääntymisnopeusspektrin määrittämisen sekä tarkastelun kohteena olevien hiukkasten luonnehtimisen tai tunnistamisen tunnettujen hiukkasten tunnettuihin spektreihin vertaamalla.



Dielektroforetiska uppsamlingshastigheter för mikroorganismer eller andra levande eller icke-levande dielektriskt polariserbara partiklar i suspension i ett fluidum bestäms genom att bringa suspensionen att strömma förbi elektroder (17, 18) som matats med energi för att producera ett icke-enhetligt växlande elektriskt fält i suspensionen, avsluta matningen av energi till elektroderna efter en på förhand bestämd tid för att frigöra de partiklar som samlats upp ur suspensionen, och mäta, på en plats nedströms om elektroderna pulsen av frigjorda partiklar som ett mått på partiklarnas uppsamlingshastighet under energimatningen till elektroderna. Genom att upprepa mätningen vid olika frekvenser i fältet kan man fastslå ett uppsamlingshastighetsspektrum och karakterisera eller identifiera de undersökta partiklarna genom en jämförelse med kända spektra för kända partiklar.

Mikro-organismien ja muiden hiukkasten dielektroforeettinen määrittäminen

Dielektroforetisk bestämning av mikroorganismer och andra partiklar

Oheinen keksintö kohdistuu menetelmään ja laitteeseen mikro-organismien ja muiden hiukkasten määrittämiseksi tai tunnistamiseksi käyttäen hyväksi dielektroforeesi-ilmiötä.

Hyvin tunnettua on se, että dielektrisesti polarisoituviin hiukkasiin, jotka ovat suspendoituneina väliaineeseen epäyhenteisessä sähkökentässä, kohdistuu silloinkin, kun hiukkasilla ei ole nettovarausta, "dielektroforeettinen" voima, joka pyrkii siirtämään niitä (sen mukaan, onko niiden polarisoituvuus suurempi vai pienempi kuin väliaineen polarisoituvuus) suuntaan, jossa sähkökentän voimakkuus suurenee tai pienenee. Voima F , joka kohdistuu hiukkaseen, jonka tilavuus on v ja tehollinen polaroituvuus on p , saadaan yhtälöstä

$$F = pv (E \cdot \nabla) E$$

missä E on sähkökentän voimakkuus hiukkasen sijaintikohdassa ja ∇ on del-vektorioperaattori. Vaihtokentässä, jossa kentän voimakkuus jokaisessa pisteessä värähtelee, mutta jossa kenttäkuvio pysyy paikoillaan, hiukkaseen kohdistuva dielektroforeettinen voima on yksisuuntainen, vaikka sen suuruus vaihtelee jaksollisesti, ja tuloksena oleva hiukkasen liike on myös yksisuuntainen siten, että hiukkanen siirtyy, mikäli sen polaroituvuus on suurempi kuin sitä ympäröivän väliaineen polaroituvuus, suuntaan, jossa kentän voimakkuus suurenee, ja tavallisesti jompaa kumpaa elektrodijärjestelmän elektrodia kohden, joiden väliin kenttä on tuotettu. Vaihtokentän käyttöön liittyy se etu, ettei siitä kohdistu hiukkaseen hiukkasen mahdollisesta nettosähkövarauksesta johtuvaa nettovoimaa, sillä tällainen mahdollinen voima vaihtelee itsekin ja sen keskiarvo yhden jakson aikana on nolla.

Alalla on ehdotettu dielektroforeettisen vaikutuksen hyväksikäyttöä biologisten solujen keräämiseksi tällaisia soluja sisältävästä, vedessä tai muussa nesteessä olevasta suspensiosta siten, että suspensio laitetaan astiaan, jossa on tähän suspensioon upotettu elektrodijärjestelmä, minkä jälkeen elektrodien välille aiheutetaan jännite (tavallisesti vaihtojännite) siten, että suspensiossa olevat solut (jotka liikkuvat aina siihen suuntaan, jossa niiden oman välittömän sijaintikohdan kenttävoimakkuus kasvaa) saadaan siirtymään jompaa kumpaa elektrodia kohden ja kerääntymään näille elektrodeille tai niiden välittömään läheisyyteen. Kuten julkaisussa J. A. R. Price, J. P. H. Burt ja R. Pething, Biochimica et Biophysica Acta, 964 (1988), sivut 221-230, on kuvattu, solujen kerääntymisnopeutta on seurattu ja se on mitattu fotometrisesti johtamalla valoa elektrodien välitilan läpi ja mittaamalla valonsäteen voimakkuus läpikulun jälkeen; läpikulkeutuneen valon voimakkuuden pieneneminen, joka aiheutuu valon suuremmasta absorptiosta tai sironnasta solujen kerääntymisen seurauksena, on mitta sekä kerääntyneiden solujen kokonaismäärästä sekä solujen kerääntymisnopeudesta ajan funktiona. Tavallisesti tämä kerääntymisnopeus on suurimmillaan alussa, minkä jälkeen se pienenee johtuen sekä suspensiossa jäljelläolevien solujen pientyneestä pitoisuudesta että suojaus- tai kyllästymisvaikutuksesta, jonka elektrodeille jo kerääntyneet solut saavat aikaan.

Kuten edellä mainitussa julkaisussa on esitetty, on todettu, että solujen kerääntymisnopeus riippuu myös aiheutetun sähkökentän taajuudesta, eli elektrodeille aiheutetun jännitteen taajuudesta. Minkä tahansa solutyypin (tai muiden hiukkastyypin) tapauksessa kerääntymisnopeusspektri, eli käyrä, jossa solujen kerääntymisnopeus riippuu aiheutetun sähkökentän taajuudesta, voidaan määrittää esimerkiksi kentän taajuusalueella 100 Hz - 10 MHz; ja on todettu, että erilaisilla soluilla on merkittävästi erilaiset kerääntymisnopeusspektrit.

Niinpä voitaisiin toivoa, että tämän seikan, että erilaisilla soluilla on erilainen kerääntymisnopeusspektri, avulla mikro-organismien fluidisuspensioiden tuntemattomat suspendoituneet aineosat kyettäisiin tunnistamaan määrittämällä koko suspensiolle seka- tai kokonaiskerääntymisnopeusspektri, minkä jälkeen analysoitaisiin tätä spektriä mahdollisten erillisten aineosien tunnettujen spektrien suhteen ja suhteita, joissa tällaisia erillisiä spektrejä voitaisiin yhdistää additiivisesti siten, että saataisiin kokeellisesti määritettyä spektriä vastaava sekaspektri.

Kuitenkin tunnettujen laitteiden, joiden avulla tällainen sekaspektri voitaisiin määrittää, tapauksessa tällaisen spektrin määrittämiseen tarvittava aika ja vaivannäkö olisivat epätarkoituksenmukaisen suuria, koska kerääntymisnopeuden jokaisen, jollakin taajuudella toteutetun määrittelyn jälkeen tutkittavaa suspensionäytettä sisältävä astia olisi huuhdottava ja täytettävä uudella näytteellä, tai vähintäänkin olemassaoleva näyte olisi palautettava alkuperäiseen, ennen määrittystä vallinneeseen tilaansa esimerkiksi voimakkaasti sekoittamalla, mikä on vaikeasti kuviteltavissa, koska näyte on olennaisesti liikkumatonta. Lisäksi kerääntymisnopeuden seuraaminen sellaisen valonsäteen, joka kulkee vain elektrodien välitilan läpi, avulla on epätydyttävä ratkaisu, koska siitä ei saada lainkaan suoraa tietoa niistä kerääntyneistä hiukkasista, jotka ovat "piilossa" elektrodien takana.

Oheisen keksinnön tavoitteena on saada aikaan parannettu laite dielektroforeettisten kerääntymisnopeuksien ja kerääntymisnopeusspektrien määrittämiseksi suspensiossa olevien, dielektrisesti polarisoituvien hiukkasten tapauksessa, sekä tätä laitetta hyväksikäyttävä parannettu menetelmä tällaisten kerääntymisnopeuksien ja kerääntymisnopeusspektrien määrittämiseksi, ja tällä tavalla näiden suspensiossa olevien hiukkasten luonnehtimiseksi tai tunnistamiseksi tunnetun tyyppisten hiukkasten tunnettujen kerääntymisnopeusspektrien perusteella. Hiukkassista, joihin oheista keksintöä voidaan soveltaa, voidaan mainita

erilaiset elolliset hiukkaset kuten mikro-organismit ja solut kuten verisolut, soluja pienemmät hiukkaset kuten virukset ja plasmidit, sekä elottomat hiukkaset kuten lateksihelmet, jotka voivat olla tai eivät ole pinnoittuneita elollisella materiaalla. Seuraavassa kuvauksessa yksinkertainen, lyhyiden vuoksi tehty viittaus hiukkasiin on tarkoitus ymmärtää tässä laajassa merkityksessään.

Keksinnön erään piirteen mukaisesti aikaan saadaan laite fluidisuspensiossa olevien hiukkasten dielektroforeettisten keräätymisnopeuksien määrittämiseksi, joka laite käsittää kammion suspensiofluidia varten, elektrodijärjestelmän, jonka tehtävänä on vaikuttaa tässä kammiossa olevaan fluidiin, välineen vaihtojännitteen aikaansaamiseksi tämän elektrodirakenteen elektrodien välille siten, että tähän fluidiin saadaan aikaan kolmiulotteisesti epäyhtenäinen vaihtosähkökenttä, joka saa aikaan mainittuun fluidiin suspendoituneiden, sähköisesti polarisoituvien hiukkasten dielektroforeettisen kerääntymisen näiden elektrodien viereen, sekä välineen hiukkaspitoisuuden mittaamiseksi kammion jostakin kohdasta, tämän kammion käsittäessä sisäänmenon ja ulostulon, jotka sijaitsevat siten, että kammion läpi, sisäänmenosta ulostuloon virtaava fluidi virtaa elektrodirakenteen ohi ja sitten mainitun kohdan läpi, sekä välineen, joka on järjestetty tuottamaan tällainen fluidivirtaus kammion läpi.

Väline, joka on järjestetty tuottamaan fluidivirtaus kammion läpi, voi olla fluidia kierrättävä väline, joka kierrättää fluidia kammion ulostulosta takaisin sen sisäänmenoon.

Väline mikro-organismien tai muiden hiukkasten pitoisuuden mittaamiseksi on edullisesti edellä kuvatun kaltainen väline, joka käsittää valonlähteen, josta saadaan kammion läpi kulkeva valonsäde (mutta joka sijaitsee elektrodirakenteesta alavirtaan eikä sen kohdalla), sekä valoa ilmaisevan välineen, joka reagoi kammion läpi kulkeneen valonsäteen voimakkuuteen ja täten valonsäteen suurentuneeseen tai pienentyneeseen absorp-

tioon tai sirontaan, mikä osoittaa fluidiin, jonka läpi valonsäde on kulkenut, suspendoituneiden mikro-organismien tai muiden hiukkasten pitoisuuden suurenemisen tai pienenemisen.

Keksinnön erään toisen piirteen mukaisesti aikaan saadaan menetelmä fluidisuspensiossa olevien, dielektrisesti polarisoituvien hiukkasten dielektroforeettisten kerääntymisnopeuksien määrittämiseksi, jossa menetelmässä: suspensiofluidi saatetaan virtaamaan elektrodirakenteen ohi, elektrodirakenteeseen syötetään ennaltamäärätyn ajanjakson ajaksi vaihtojännitettä, jolla on ennaltamäärätty taajuus, jolloin virtaavaan fluidiin saadaan aikaan kolmiulotteisesti epäyhtenäinen vaihtosähkökenttä, joka saa aikaan mainittuun fluidiin suspendoituneiden, dielektrisesti polarisoituvien hiukkasten dielektroforeettisen kerääntymisen elektrodirakenteen viereen, minkä jälkeen elektrodirakenteesta poistetaan jännite, jolloin sen viereen kerääntyneet hiukkaset vapautuvat, ja elektrodirakenteen suhteen alavirrassa olevasta kohdasta mitataan suurentuneen hiukkaspitoisuuden aiheuttama pulssi, joka syntyy, kun vapautuneet hiukkaset kulkeutuvat tämän kohdan läpi virtaavan fluidin mukana.

Keksinnön mukainen menetelmä toteutetaan edullisesti käyttäen edellä kuvattua, keksinnön mukaista laitetta.

∴

On selvää, että sen jälkeen, kun kerääntyneet hiukkaset ovat vapautuneet elektrodirakenteesta, mittauskohdan läpi kulkeutuvan, suurentuneen hiukkaspitoisuuden aiheuttama pulssi hajoaa sitten nopeasti suspensiofluidiin sen virtauksen aikana; ja että tämä menetelmä voidaan toistaa jopa pienelläkin näytteellä, jota on kierrätettävä, käyttäen aiheutetun vaihtojännitteen erilaisia taajuuksia elektrodirakenteen peräkkäisten jännitteensyöttöajanjaksojen aikana, jotta saataisiin tutkittavan suspension kerääntymisnopeusspektrin koko alueiden tai kriittisten alueiden määrittämiseen tarvittavat tiedot. Täten saatuja tietoja voidaan sitten verrata vastaaviin tunnettuihin tietoihin, jotka liittyvät erityisten mikro-organismien tai

muiden hiukkasten kerääntymisnopeusspektreihin, näiden hiukkasten suhteellisten ja/tai absoluuttisten pitoisuuksien selvittämiseksi, jotka pitoisuudet ovat välttämättömiä tutkittavassa suspensiossa tuottaakseen saadut kerääntymisnopeustiedot.

Keksintö on ymmärrettävissä täydellisemmin seuraavasta yksityiskohtaisemmasta kuvauksesta, jossa viitataan liitteenä oleviin piirustuksiin, joissa:

kuvio 1 on kaavamainen perspektiiviesitys elektrodijärjestelmän käsittävästä kammiorakenteesta, jota voidaan käyttää oikeiden keksinnön mukaisesti;

kuvio 2 on kaavamainen esitys keksinnön mukaisesta laitteesta, johon kuuluu kuvion 1 mukainen kammiorakenne;

kuvio 3 esittää sitä tapaa, jolla kuvion 2 mukaisesta laitteesta saadun valonsäteen absorptio vaihtelee ajan funktiona mikro-organismin tai muun hiukkasen kerääntymisjakson aikana ja sen jälkeen laitteen ollessa toiminnassa; ja

kuvio 4 esittää neljän erilaisen mikro-organismin kerääntymisnopeusspektriä, jotka aikaisemmat tutkijat ovat määrittäneet ja jotka on löydettävissä tekniikan nykytasoa esittävistä julkaisuista.

Kuvion 1 esittämä kammiorakenne, jota on merkitty yleisesti viitenumerolla 10, käsittää takalevyn 11 sekä etulevyn 12, jotka molemmat on tehty lasista ja ovat läpinäkyviä, ja joiden väliin on sijoitettu väliarkki 13. Väliarkin 13 keskiosa on poistettu siten, että levyjen 11 ja 12 väliin syntyy ohut kammio 14 (väliarkin 13 paksuinen, joka paksuus voi olla noin 0,05 mm, mutta joka voi vaihdella laajalla alueella, riippuen tavattavien suspendoituneiden hiukkasten koosta), ja levy 12 on varustettu sisäänmenolla 15 ja ulostulolla 16, joka avautuu kammioon 14. Kammion 14 korkeus voi olla noin 10 mm ja sen

pituus voi olla noin 40 mm. Takalevyn 11 päällä on elektrodirakenne, joka koostuu metallikerroksesta, esimerkiksi alumiinikerroksesta, levitettynä takalevyn päälle esimerkiksi 1 mikronin paksuiseksi kerrokseksi, joka on sitten syövytetty siten, että on saatu pari lomittain sijaitsevia elektrodeja 17 ja 18, jotka ovat yhtenäisiä liitintaulujen 19 ja 20 kanssa, vastavasti. Kumpikin elektrodi voi muodostua kahdeksasta yhdensuuntaisesta sormesta, joiden kunkin leveys on 0,06 mm, ja jotka ovat 0,06 mm:n etäisyydellä toisen elektrodin kustakin seuraavasta sormesta. Kunkin sormen pituuden keskiosa on paljaana kammion 14 sisätilan kohdalla ollakseen lähellä kammiossa olevaa fluidia, vaikka läsnä voikin olla eristävää materiaalia oleva suojakalvo fluidin ja elektrodien välisen todellisen kosketuksen estämiseksi. Elektrodit ovat muodoltaan sellaisia, että ne tuottavat kolmiulotteisesti erittäin epäyhtenäisen sähkökentän välittömään läheisyyteensä, kun niiden välille aiheutetaan jännite. Elektrodit 17 ja 18 ovat lähempänä sisäänmenoa 15 kuin ulostuloa 16 siten, että elektrodien ja ulostulon 16 väliin jää kammioista 14 alue 21, jonka läpi voidaan johtaa numerolla 22 merkitty valonsäde (jonka aallonpituus on esimerkiksi 450 tai 660 nm, tai jolla on jokin muu aallonpituus, joka sopii paremmin kyseisen materiaalin tapauksessa), jota elektrodit 17 ja 18 eivät tällöin häiritse.

Kuvion 1 mukainen kammiorakenne 10 liitetään kuviossa 2 esitettyyn, keksinnön mukaiseen laitteeseen. Se käsittää säiliön 23 tunnistettavia hiukkasia, esimerkiksi mikro-organismeja sisältävää nestesuspensiota 24 varten. Kammiorakenteen 10 sisäänmenoon 15 liitetty putki 25 on uponneena säiliössä 23 olevaan nestesuspensioon 24, ja kammiorakenteen ulostulo 16 on liitetty putkella 26 pumppuun 27, joka voi olla peristalttipumppu, joka imee suspensiofluidia kammion 14 läpi ja palauttaa sen säiliöön 23 palautusputkea 28 pitkin, esimerkiksi nopeudella 0,1-1,0 ml/min. Ilmalinjasta 29 peräisin oleva ilma kuplii säiliössä olevan suspension 24 läpi, ja tämän ilman tehtävänä on sekä suspension sekoittaminen että sen ilmastaminen. Säiliössä 23 on myös pH-anturi 30 suspension pH-arvon seuraamiseksi

siten, että se voidaan säilyttää toivotulla vakiotasolla, sillä ollaan todettu, että mikro-organismien kerääntymisnopeus dielektroforeesin seurauksena elektrodeilla 17 ja 18 riippuu suspension pH-arvosta. Koko laite pidetään edullisesti toivotussa vakiolämpötilassa, koska myös lämpötilan muutokset pyrkivät vaikuttamaan kerääntymisnopeuksiin.

Laitteessa on myös signaaligeneraattori 31, joka tuottaa vaihtojännitettä, jolla on valittu taajuus ja amplitudi, ja joka voidaan siirtää kytkimen 32 avulla oskilloskooppiin 33, jonka tehtävänä on seurata sitä, sekä kammiorakenteen 10 elektrodeihin 17 ja 18. Elektrodeihin syötetyn jännitteen amplitudi on tarkoituksenmukaisesti valittu alueelta 5-30 voltia, taajuuden vaihdellessa alueella 10 Hz - 10 MHz tai enemmän. Laitteeseen kuuluu myös valonlähde, edullisesti LED-valonlähde 40, johon syötetään tehoa tehonlähteestä 41 kuvion 1 mukaisesti, ja joka sijaitsee siten, että kammion 14 läpi saadaan kulkemaan valonsäde 22, sekä kuviossa 1 numerolla 42 esitetty fotometri, joka mittaa säteen 22 intensiteetin sen jälkeen, kun säde on kulkenut kammion 14 läpi, ja josta saadaan syöttösuure piirturiin 43.

Kun tätä laitetta käytetään, jolloin pumppu 27 imee jatkuvasti suspensiosta 24 virran kammion 14 läpi ja kierrättää sen takaisin säiliöön 23, kytkin 32 suljetaan esimerkiksi 5 sekunniksi jännitteen syöttämiseksi signaaligeneraattorista 31, ennalta määrättyllä amplitudilla ja valitulla taajuudella, elektrodeihin 17 ja 18, jolloin elektrodien vieressä olevaan suspensioon syntyy kolmiulotteisesti epäyhtenäinen vaihtosähkökenttä, jonka seurauksena suspensiossa olevat mikro-organismit liikkuvat dielektroforeettisesti ja kerääntyvät elektrodeille tai niiden läheisyyteen. Kun kytkin 32 avataan, kerääntyneet mikro-organismit vapautuvat ja kulkeutuvat suspensionesteen jatkuvan virran mukana alavirtaan ja kulkevat valonsäteen 22 läpi suspensiossa olevien mikro-organismien suurentuneesta pitoisuudesta johtuvana paikallisena pulssina.

Kuviosta 3 nähdään fotometrillä saadun ja piirturin 43 esittämän ulostulosignaalin lopullinen muoto, tämän ulostulosignaalin esittäessä valonsäteen 22 mitattua intensiteettiä I ajan t funktiona. Kun elektrodien 17 ja 18 välillä ei ole jännitettä, niin pysyvä mitattu säteen intensiteetti I_1 on pienempi kuin arvo I_0 , joka edustaa säteen intensiteettiä ennen säteen kulua kammiorakenteen 10 läpi. Ero $I_0 - I_1$ on intensiteettihäviö säteen kulkiessa kammiorakenteen 10 läpi, tämän häviön johtuessa suureksi osaksi kammion 14 läpi virtaavaan nesteeseen suspendoituneiden mikro-organismien aiheuttamasta valon absorptiosta ja/tai siroamisesta. Kun elektrodeihin 17 ja 18 aiheutetaan vaihtojännite ajanhetkellä t_1 , mitattu valon intensiteetti kasvaa jyrkästi arvoon I_2 mikro-organismien alkaessa kerääntyä elektrodeille tai niiden läheisyyteen, jolloin niiden pitoisuus valonsäteen 22 läpi kulkevassa fluidin alavirrassa pienenee nopeasti. Aikavälillä hetkeen t_2 saakka, jolloin elektrodeihin syötetty jännite kytketään pois päältä, kerääntymisnopeus elektrodeilla alkaa pienentyä ja valonsäteen mitattu intensiteetti alkaa heiketä, koska mikro-organismien pitoisuus elektrodien suhteen alavirrassa alkaa kasvaa vastavalla tavalla. Jännitteen poistaminen ajanhetjellä t_2 aiheuttaa kerääntyneiden mikro-organismien nopean vapautumisen elektrodeilta, minkä jälkeen nämä mikro-organismit kulkeutuvat alavirtaa kohden virtaavassa suspensiossa läsnäolevien mikro-organismien kasvaneesta pitoisuudesta johtuvana suurena paikallisena pulssina, joka aiheuttaa säteen intensiteetin terävän pienenemisen pieneen arvoon I_3 tämän pulssin kulkiessa säteen läpi. Hieman myöhemmin ajanhetkellä t_3 pulssi on ohittanut säteen ja mitattu säteen intensiteetti on palautunut pysyvään arvoonsa I_1 . Intensiteettieron $I_1 - I_3$ edustama absorption kasvu on huomattavasti (jopa 100-kertaisesti) herkempi tapa mitata aikavälillä $t_1 - t_2$ kerääntyneen (kerääntyneiden) mikro-organismi(e)n määrää ja täten alkuperäistä kerääntymisnopeutta kuin suhteellisen pieni intensiteetin kasvu kerääntymisnopeuden suorana seurauksena arvosta I_1 arvoon I_2 .

Kun suspensiossa olevien hiukkasten suurentuneesta pitoisuudesta johtuva pulssi on kulkenut valonsäteen 22 läpi, se hajoaa nopeasti, kun suspensiota pumpataan takaisin säiliöön 23, jossa sitä sekoitetaan lisäksi ilmalinjaa 29 pitkin saatavalla ilmalla. Taajuudeltaan erilaisten vaihtojännitteiden peräkkäinen syöttäminen elektrodeille 17 ja 18 edullisesti automaattisesti tietokoneen 44 säätelyn alaisuudessa, kuviossa 2 kaavamaisesti esitetyllä tavalla, voidaan toteuttaa nopeana sarjana tutkittavan fluidin kerääntymisnopeusspektrin määrittämiseksi tällä tavalla tietokoneeseen talletetuista tiedoista. Täten aikaa, joka tarvitaan kerääntymispektrin saamiseksi taajuusalueella 10 Hz - 1 MHz, voidaan lyhentää yli vuorokaudesta, joka kuluu tähän saakka tunnetuissa menetelmissä, 5 minuuttiin tai sen alle. Täten saatujen, spektrin määrittävien tietojen vertaaminen tunnettujen, valituilla erillisillä mikro-organismeilla tai muilla asiaan mahdollisesti liittyvillä hiukkasilla saatujen spektrien vastaaviin tietoihin tarkastelun kohteena olevan näytteen hiukkassisällön analysoimiseksi, voidaan myös toteuttaa nopeasti käyttäen sopivaa tietokoneohjelmaa siten, että näytteiden analyysit voidaan toteuttaa nopeasti keksinnön mukaista laitetta ja menetelmää käyttäen.

Kuviossa 4 on esitetty neljän mikro-organismin kerääntymisnopeusspektrit, jotka tunnetaan aikaisempien julkaisujen perusteella, jossa kuviossa 4 käyrät 34, 35, 36 ja 37 esittävät vastaavasti mikro-organismien Staphylococcus aureus, Pseudomonas fluorescens, E. coli ja B. cereus kerääntymisnopeusspektrejä. Sen sijaan, että tällaisia aikaisempia tuloksia käytettäisiin varauksetta viitespektrinä, saattaa olla edullista muodostaa keksinnön mukaista erityistä laitetta varten tällaisten viitespektrien kirjasto tällä laitteella sen vakiintuneissa toimintaolosuhteissa, joita käytetään myös sen myöhemmän käytön aikana. Yleisesti, laitteessa tarvitaan kuitenkin vain vähäistä rutiininomaista kalibrointia, ja tästä huolimatta sillä saavutetaan selvästi parantunut herkkyys, suurempi selektiivisyys mikrobeille ja muuntotyypisille hiukkasille sekä

huomattavasti parantunut nopeus ja toiminnan yksinkertaisuus verrattuna tähän saakka käytettyihin laitteisiin.

Kuten edellä on mainittu, elektrodit 17 ja 18 voivat olla alumiinia ja ne on voitu muodostaa kerrostamalla tästä metallista lasilevyllä 11 kerros, jota sitten on syövytetty tarvittavan elektrodikuvion aikaansaamiseksi. Alumiinin sijasta voidaan käyttää platinasta tai kullatusta kromista tehtyjä elektrodeja, jotka on valmistettu joko syövytystekniikalla tai "poisto"-tekniikalla, jossa substraatin päälle muodostetaan kuvionaamio käyttäen sopivaa materiaalia kuten valonsuojamateriaalia ennen metallikerroksen kerrostamista, minkä jälkeen kerrostetusta materiaalista poistetaan epätoivotut alueet poistamalla kuvionaamio siten, että metallia jää vain kohtiin, jossa se kerrostui suoraan substraatin päälle.

Patenttivaatimukset

1. Laite fluidisuspensiossa olevien hiukkasten dielektroforeettisten kerääntymisnopeuksien määrittämiseksi, t u n n e t t u siitä, että se käsittää kammion (14) suspensiofluidia varten, elektrodijärjestelmän (17,18), jonka tehtävänä on vaikuttaa tässä kammiossa olevaan fluidiin, välineen (31) vaihtojännitteen aikaansaamiseksi tämän elektrodirakenteen elektrodien välille, jolloin tähän fluidiin saadaan aikaan kolmiulotteisesti epäyhtenäinen vaihtosähkökenttä, joka saa aikaan mainittuun fluidiin suspendoituneiden, sähköisesti polarisoituvien hiukkasten dielektroforeettisen kerääntymisen näiden elektrodien (17,18) viereen, sekä välineen (42) hiukkaspitoisuuden mittaamiseksi kammion (14) jostakin kohdasta (21), tämän kammion (14) käsittäessä sisäänmenon (15) ja ulostulon (16), jotka sijaitsevat siten, että kammion (14) läpi, sisäänmenosta (15) ulostuloon (16) virtaava fluidi virtaa elektrodirakenteen (17,18) ohi ja sitten mainitun hiukkaspitoisuuden mittauskohdan (21) läpi, sekä välineen (27), jonka tehtävänä on tuottaa tällainen fluidivirtaus kammion (14) läpi.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen laite, t u n n e t t u siitä, että väline, jonka tehtävänä on tuottaa fluidivirtaus kammion (14) läpi, on fluidia kierrättävä väline (27), joka kierrättää fluidia kammion (14) ulostulosta (16) takaisin sen sisäänmenoon (15).

3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen laite, t u n n e t t u siitä, että väline hiukkasten pitoisuuden mittaamiseksi käsittää valonlähteen (40), josta saadaan mainitussa kohdassa (21) kammion (14) läpi kulkeva valonsäde (22), joka kohta sijaitsee alavirran puolella elektrodirakenteen (17,18) suhteen, sekä valoa ilmaisevan välineen (42), joka reagoi kammion (14) läpi kulkeneen valonsäteen (22) voimakkuuteen ja täten valonsäteen suurentuneeseen tai pienentyneeseen absorptioon tai sirontaan, mikä osoittaa fluidiin, jonka läpi valonsäde (22) on kulkenut mainitussa kohdassa (21), suspendoituneiden hiukkasten pitoisuuden suurenemisen tai pienenenemisen.

4. Menetelmä fluidisuspensiossa olevien, dielektrisesti polarisoituvien hiukkasten dielektroforeettisten kerääntymisnopeuksien määrittämiseksi, t u n n e t t u siitä, että suspensiofluidi saatetaan virtaamaan elektrodirakenteen (17,18) ohi, elektrodirakenteeseen syötetään ennaltamäärätyn ajanjakson ajaksi vaihtojännitettä, jolla on ennaltamäärätty taajuus, jolloin virtaavaan fluidiin saadaan aikaan kolmiulotteisesti epäyhtenäinen vaihtosähkökenttä, joka saa aikaan mainittuun fluidiin suspendoituneiden, dielektrisesti polarisoituvien hiukkasten dielektroforeettisen kerääntymisen elektrodirakenteen viereen, minkä jälkeen jännitteen syöttö elektrodirakenteeseen lopetetaan, jolloin sen viereen kerääntyneet hiukkaset vapautuvat, ja elektrodirakenteen (17,18) suhteen alavirrassa olevasta kohdasta (21) mitataan suurentuneen hiukkaspitoisuuden aiheuttama pulssi, joka syntyy, kun vapautuneet hiukkaset kulkeutuvat tämän kohdan läpi virtaavan fluidin mukana.

5. Menetelmä fluidisuspensiossa olevien hiukkasten dielektroforeettisen kerääntymisnopeusspektrin määrittämiseksi, t u n n e t t u siitä, että tässä menetelmässä patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä toistetaan käyttäen syötetyn vaihtojännitteen erilaisia taajuuksia elektrodirakenteen peräkkäisillä jännitteensyöttöaikaväleillä, suspension koko kerääntymisnopeusspektrin tai sen kriittisten osien määrittämiseen tarvittavien tietojen saamiseksi.

6. Menetelmä fluidisuspension sisältämien, dielektrisesti polarisoituvien hiukkasten tunnistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että niille määritetään dielektroforeettisen kerääntymisnopeusspektrin tiedot patenttivaatimuksen 5 mukaisella menetelmällä, ja sitten täten saatuja tietoja verrataan vastaaviin tunnettuihin, erityisten tunnistettujen hiukkasten kerääntymisnopeusspektreistä saatuihin tietoihin, näiden tunnistettujen hiukkasten suhteellisten ja/tai absoluuttisten pitoisuuksien selvittämiseksi, jotka pitoisuudet ovat välttämättömiä tutkittavassa suspensiossa tuottaakseen saadut kerääntymisnopeustiedot.

7. Jonkin patenttivaatimuksen 4, 5 tai 6 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että se toteutetaan jonkin patenttivaatimuksen 1-3 mukaisella laitteella.

Patentkrav

1. Anordning för att bestämma dielektroforetiska uppsamlingshastigheter för partiklar i suspension i ett fluidum, k ä n n e t e c k n a d av att den omfattar en kammare (14) för suspensionsfluidumet, ett elektrodsystem (17,18) anordnat för att påverka ett fluidum i kammaren, medel (31) för att anbringa en växelspanning mellan elektroderna i elektrodstrukturen och därmed åstadkomma i detta fluidum ett i rummet ojämnt växlande elektriskt fält varmed åstadkoms dielektroforetisk uppsamling av elektriskt polariserbara partiklar suspenderade i fluidumet bredvid dessa elektroder (17,18), samt medel (42) för mätning av partikelkoncentrationen i en position (21) inom kammaren (14), varvid kammaren (14) är försedd med inlopp (15) och utlopp (16) så anordnade att fluidum som strömmar genom kammaren (14) från inloppet (15) till utloppet (16) strömmar förbi elektrodstrukturen (17,18) och sedan genom nämnda position (21) för mätning av partikelkoncentrationen, samt medel (27) arrangerade för att producera dylik fluidumströmning genom kammaren (14).

2. Anordning enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a d av att medlen som är arrangerade för att producera fluidumströmning genom kammaren (14) är fluidumcirculationsmedel (27) arrangerade för att cirkulera fluidum från utloppet (16) tillbaka till inloppet (15) i kammaren (14).

3. Anordning enligt patentkrav 1 eller 2, k ä n n e t e c k n a d av att medlen för att mäta partikelkoncentrationen omfattar en ljuskälla (40) arrangerad för att rikta en stråle av ljus (22) genom kammaren (14) vid nämnda position (21) nedströms om elektrodstrukturen (17,18), samt ljusdetektormedel (42) som är känsliga för intensiteten i ljusstrålen (22) efter transmission genom kammaren (14) och därmed för den ökade eller minskade absorptionen eller spridningen av ljusstrålen vilket indikerar en ökning eller minskning av koncentrationen

av partiklar suspenderade i det fluidum som genomstrålats av ljusstrålen (22) vid nämnda position (21).

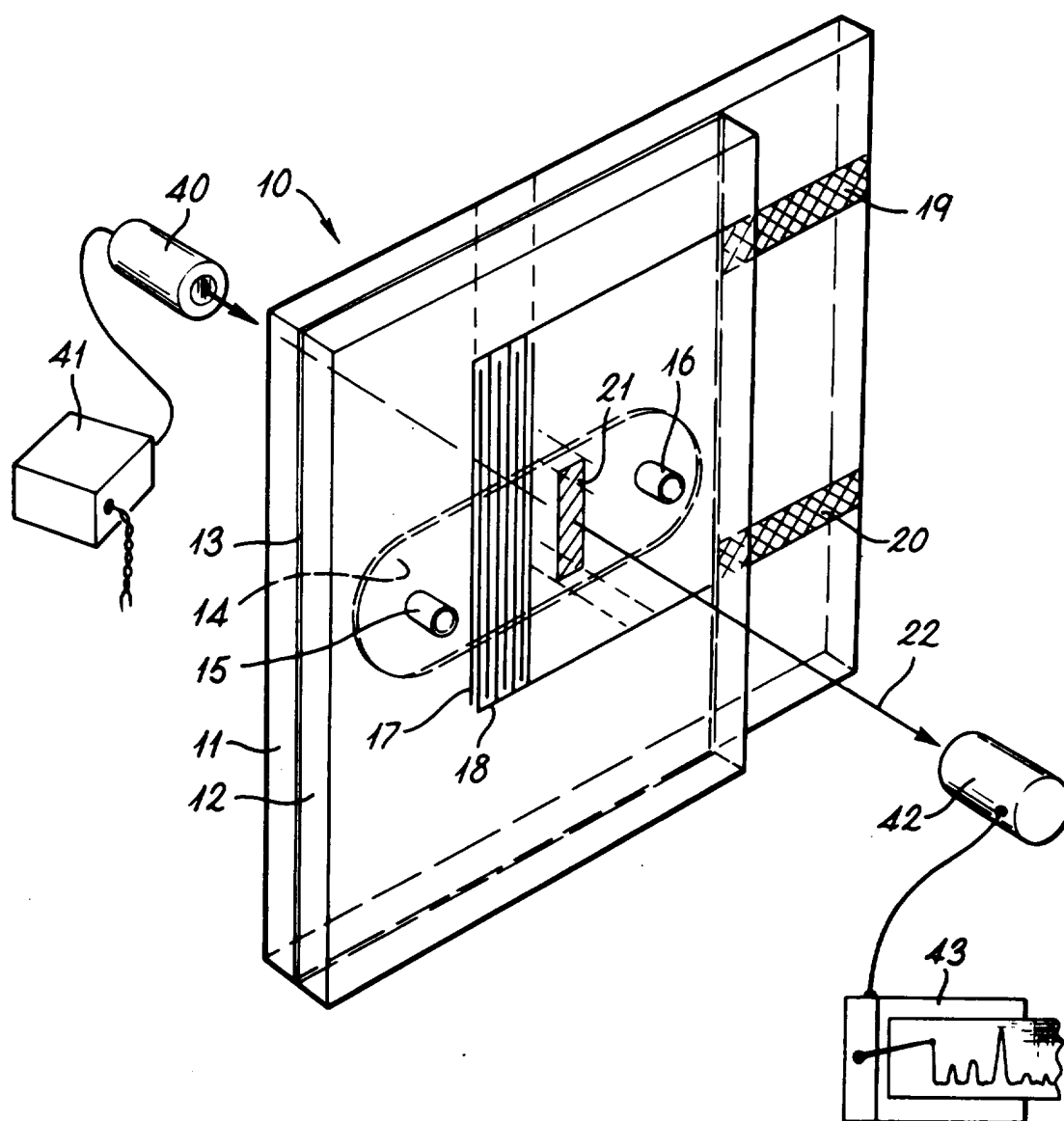
4. Förfarande för att bestämma de dielektroforetiska uppsamlingshastigheterna för dielektriskt polariserbara partiklar i en fluidumsuspension, k ä n n e t e c k n a t av att suspensionsfluidumet bringas att strömma förbi en elektrodstruktur (17,18), elektrodstrukturen matas under ett på förhand bestämt tidsintervall med en växelspanning med en på förhand vald frekvens, varmed åstadkoms i det strömmande fluidumet ett i rummen ojämnt växlande elektriskt fält och induceras dielektroforetisk uppsamling, bredvid elektrodstrukturen, av dielektriskt polariserbara partiklar suspenderade i fluidumet, varefter energimatningen till elektrodstrukturen avslutas vilket frigör partiklarna som uppsamlats bredvid densamma, och pulsen för den ökade partikelkoncentrationen mäts i en position (21) nedströms om elektrodstrukturen (17,18), vilken ökning sker då de frigjorda partiklarna bärs genom nämnda position av det strömmande fluidumet.

5. Förfarande för att bestämma ett dielektroforetiskt uppsamlingshastighetsspektrum för partiklar i en fluidumsuspension, k ä n n e t e c k n a t av att man utför förfarande enligt patentkravet 4 upprepade gånger användande olika frekvenser för den matade växelspanningen under på varandra följande spänningsmatningsintervall i elektrodstrukturen, varvid produceras data som behövs för att bestämma antingen hela uppsamlingspektret för suspensionen eller kritiska områden därav.

6. Förfarande för att identifiera dielektriskt polariserbara partiklar i en fluidumsuspension, k ä n n e t e c k n a t av att man bestämmer data för dielektroforetiska uppsamlingshastighetsspektra för suspensionen medelst förfarandet enligt patentkravet 5 och korrelerar de så erhållna data med motsvarande kända data som hänför sig till specifika identifierade partiklars uppsamlingshastighetsspektra för att därmed bestämma de relativa och/eller absoluta koncentrationerna för

dessa identifierade partiklar som bör vara närvarande i den undersökta suspensionen för att ge de erhållna uppsamlingshastighetsdata.

7. Förfarande enligt något av patentkraven 4, 5 eller 6, k ä n n e t e c k n a t av att det utförs medelst en anordning enligt något av patentkraven 1 till 3.

*Fig. 1*

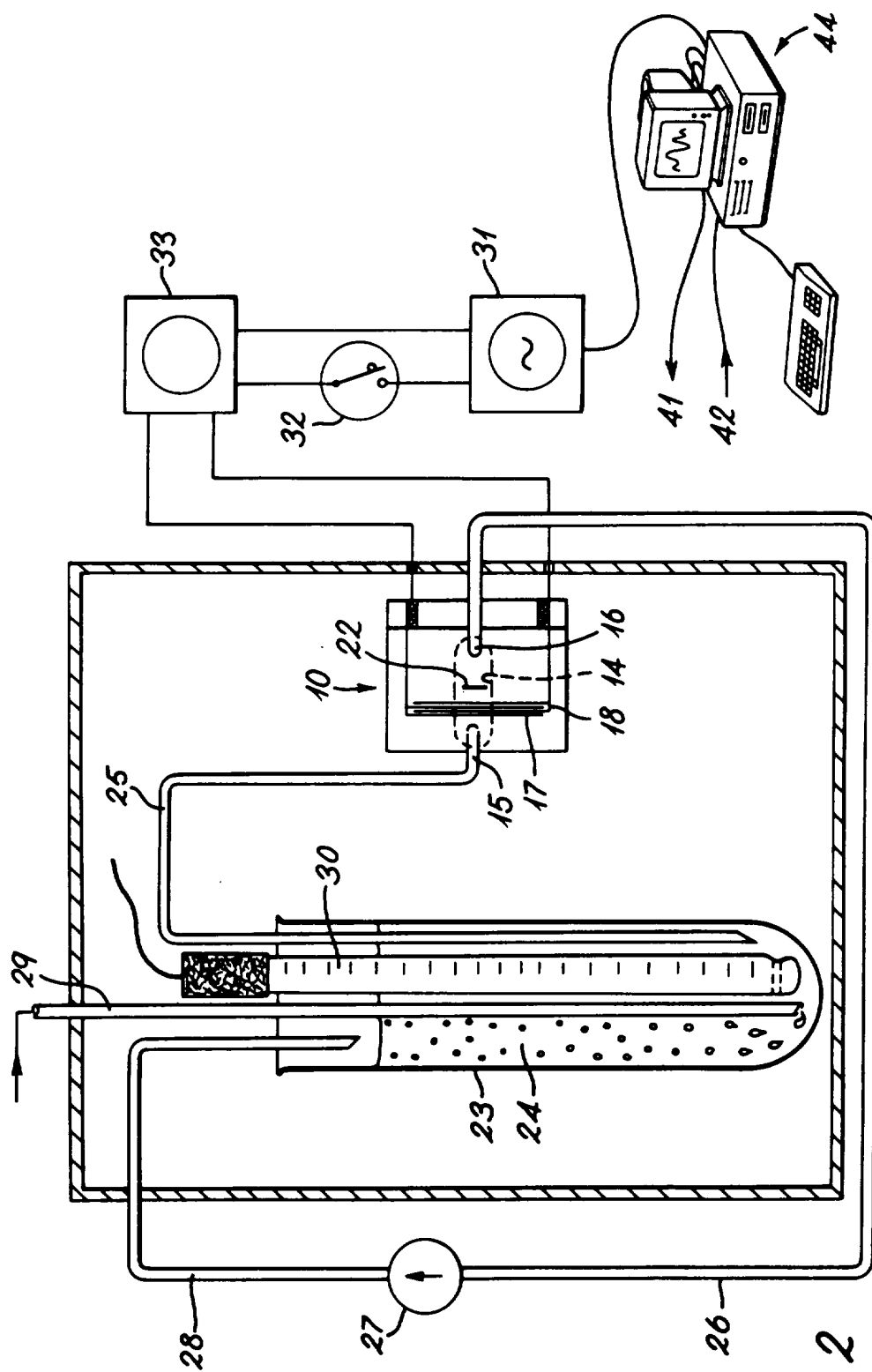


Fig. 2

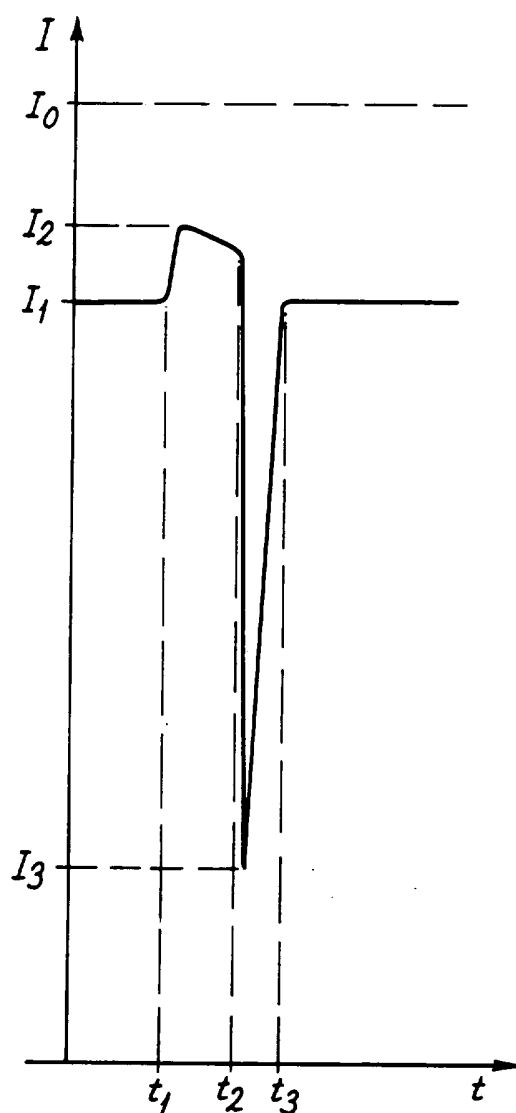


Fig. 3

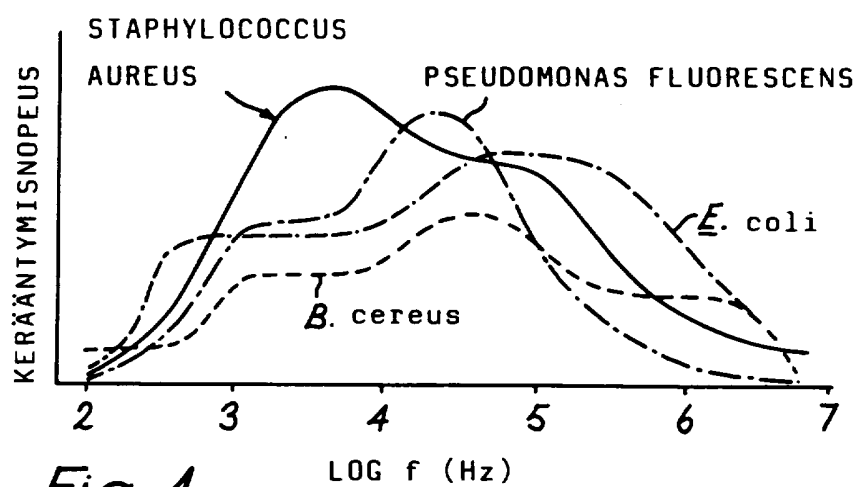


Fig. 4