

## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101403724 B

(45) 授权公告日 2011. 12. 21

(21) 申请号 200810143066. 0

US 4789804 A, 1988. 12. 06,

(22) 申请日 2008. 10. 08

CN 101235397 A, 2008. 08. 06,

(73) 专利权人 湖南大学

WO 2005043150 A1, 2005. 05. 12,

地址 410082 湖南省长沙市岳麓区岳麓山麓  
山南路 2 号

CN 1260486 A, 2000. 07. 19,

(72) 发明人 何凤姣

陈颖等. 压电体声波阻抗生物传感器技术在  
血培养中的应用评价. 《微生物学杂志》. 2006, 第  
26 卷 (第 5 期), 23-25.(74) 专利代理机构 长沙市融智专利事务所  
43114

审查员 李明瑞

代理人 颜勇

(51) Int. Cl.

G01N 27/416 (2006. 01)

C12Q 1/02 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1325028 A, 2001. 12. 05,

WO 0102858 A1, 2001. 01. 11,

CN 1584579 A, 2005. 02. 23,

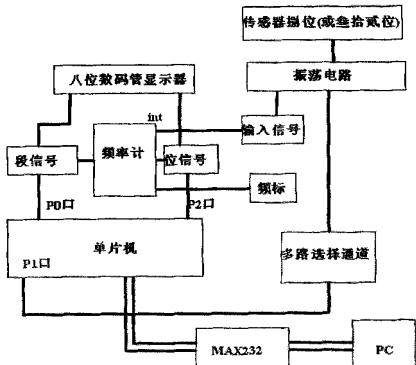
权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 5 页

(54) 发明名称

用于血样中微生物快速检测的仪器、试剂及  
制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种基于压电传感器原理对血样中微生物进行快速检测的仪器与试剂。本测试仪的特点是具有灵敏度高、易于实现数字化、响应谱广、检测快速、操作简单、成本低廉等，其充分利用串联式压电传感器对溶液电导的响应，并和微生物的新陈代谢特征相结合，拓宽了压电传感器在临床血液检测方面的应用，为疾病诊断应用提供了可靠依据。与之配套的试剂的特征在于，由牛肉浸膏、酵母浸膏、YC-1 溶液和 YC-2 溶液配置而成，各组分的比例为：牛肉浸膏 0.2 ~ 10g/L，酵母浸膏 0.2 ~ 10g/L，YC-1 溶液 20 ~ 60g/L，YC-2 溶液 10 ~ 40g/L。本发明还公开了该试剂的制备方法。



1. 一种用于血样中微生物快速检测的测试仪,其特征在于,包括检测池、传感器和检测电路;所述的检测池中包括了一对传感电极及用于血样中微生物快速检测的试剂,该试剂由牛肉浸膏、酵母浸膏、YC-1溶液和YC-2溶液配置而成,各组分的比例为:牛肉浸膏0.2~10g/L,酵母浸膏0.2~10g/L,YC-1溶液20~60g/L,YC-2溶液10~40g/L;待检测的血样加入到所述的检测池中的试剂中;传感器的输出信号端接检测电路的输入端,检测电路输出可以表征血样中微生物浓度的频率信号,所述频率信号为数字信号,所述的传感器为压电传感器。

2. 根据权利要求1所述的用于血样中微生物快速检测的测试仪,其特征在于,所述的检测电路包括振荡电路、频率计、单片机和上位机,所述的振荡电路的输入端接传感器的信号输出端,所述的振荡电路的输出端接频率计的输入端,频率计的输出端接单片机的IO端口,所述单片机和上位机通信连接。

3. 一种用于血样中微生物快速检测的试剂,其特征在于,由牛肉浸膏、酵母浸膏、YC-1溶液和YC-2溶液配置而成,各组分的比例为:牛肉浸膏0.2~10g/L,酵母浸膏0.2~10g/L,YC-1溶液20~60g/L,YC-2溶液10~40g/L。

4. 根据权利要求3所述的用于血样中微生物快速检测的试剂,其特征在于,所述各组分优选比例为:牛肉浸膏2g/L;酵母浸膏1g/L;YC-1溶液40g/L;YC-2溶液16g/L。

5. 根据权利要求3所述的用于血样中微生物快速检测的试剂的制备方法,其特征在于,将牛肉浸膏、酵母浸膏、YC-1溶液和YC-2溶液按“牛肉浸膏0.2~10g/L,酵母浸膏0.2~10g/L,YC-1溶液20~60g/L,YC-2溶液10~40g/L”的比例称量,溶解,定容后形成培养基,通过过滤去除培养基中杂质,将过滤后的培养基的pH值调到7.2~7.4,再放入灭菌器中灭菌;再按10~40g/L的比例加入YC-2溶液,再密封、保存备用,即得到所述的用于血样中微生物快速检测的试剂。

6. 根据权利要求5所述的用于血样中微生物快速检测的试剂的制备方法,其特征在于,所述的牛肉浸膏、酵母浸膏、YC-1溶液和YC-2溶液的比例优选为:牛肉浸膏2g/L;酵母浸膏1g/L;YC-1溶液40g/L;YC-2溶液16g/L。

## 用于血样中微生物快速检测的仪器、试剂及制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于化学试剂、检测及计算机应用领域,涉及一种用于血样中微生物快速检测的仪器、试剂及制备方法。

### 背景技术

[0002] 我国临床抗生素的滥用已相当严重。中华医院感染管理委员会的调查结果显示,我国抗生素的使用率在三级医院达到了 70%,二级医院达到了 80%,一级医院达到了 90%。与此同时,世界卫生组织的统计报告为 30%,美国的统计结果只有 20%,临床抗生素的不合理使用,不仅增加了患者的经济负担,造成医疗资源的巨大浪费;更严重的是导致了临床的许多不良反应和耐药性细菌的不断增长。

[0003] 加强病原学的检测,提供及时、准确的病原学检验报告,根据病原学药物敏感实验结果来选择抗生素是临床合理使用抗生素最重要的途径。目前国外已有 Bactec9000 系列、BacT/Alert3D 系统、ESP 系列等全自动培养系统。国内外对于全自动血培养系统的临床应用与评价结果显示,其血培养及无菌体液培养的阳性率较传统手工方法均有明显提高,检测时间明显缩短。经 BacT/Alert 培养的阳性检出时间为  $13.3 \pm 9.2$  小时,在 12 小时内出现阳性的比率达 56.5%,而采用传统的培养方法阳性检出的时间为  $43.4 \pm 34.2$  小时,在 12 小时内阳性比率仅为 13.0%。ESP 系统的阳性率为 17.3%,其中 67.6% 的细菌在 24 小时内检出,92.6% 的细菌在 48 小时内检出。快速血培养系统的应用对于临床病原菌感染的早期诊断、抗生素的合理运用、延缓病原菌的耐药性都起到了十分重要的作用。

[0004] 无论哪类培养系统,都还存在一些缺陷与不足。Bactec9000 系列的检测原理是检测细菌在新陈代谢过程中产生的 CO<sub>2</sub>,或利用 CO<sub>2</sub> 激活培养瓶底的荧光物质,通过检测荧光强度的变化来判断有无细菌生长。BacT/Alert3D 系统,利用产生 CO<sub>2</sub> 使培养瓶内 pH 值降低,瓶底颜色发生改变,通过颜色感应器检测颜色变化来判断有无细菌生长。ESP 系列 [5],利用产生 CO<sub>2</sub> 使培养瓶内的压力发生改变,通过检测瓶内压力的变化来判断有无细菌生长。各类血培养系统均利用细菌在新陈代谢过程中分解糖原产生 CO<sub>2</sub> 这一原理。对力弱的细菌如苛养菌、真菌等容易引起假阴性 [6];而对各种引起培养瓶内 CO<sub>2</sub> 浓度升高的一些非细菌性因素(如白血病患者血液中的白细胞过度生长、严重感染引起的全血白细胞升高,培养温度不稳定等)常引起假阳性 [7]。另外,全自动微生物培养系统仪器与试剂都非常昂贵,这些都严重的制约了全自动培养系统的推广与应用。

### 发明内容

[0005] 本发明所要解决的技术问题是,提供一种用于血样中微生物快速检测的仪器、试剂、及制备方法,用于对临床血样中微生物的准确、快速检测。

[0006] 本发明为解决上述技术问题所采用的技术方案是:

[0007] 一种用于血样中微生物快速检测的测试仪,其特征在于,包括检测池、传感器和检测电路;所述的检测池中放入用于血样中微生物快速检测的试剂,该试剂由牛肉浸膏、酵母

浸膏、YC-1 溶液和 YC-2 溶液配置而成,各组分的比例为 : 牛肉浸膏 0.2 ~ 10g/L, 酵母浸膏 0.2 ~ 10g/L, YC-1 溶液 20 ~ 60g/L, YC-2 溶液 10 ~ 40g/L; 待检测的血样加入到所述的检测池中的试剂中 ; 所述传感器置入该试剂中, 传感器的输出信号端接检测电路的输入端, 检测电路输出可以表征血样中微生物浓度的频率信号, 所述频率信号为数字信号。

[0008] 所述的检测电路包括振荡电路、频率计、单片机和上位机, 所述的振荡电路的输入端接传感器的信号输出端, 所述的振荡电路的输出端接频率计的输入端, 频率计的输出端接单片机的 IO 端口, 所述单片机和上位机通信连接。

[0009] 一种用于与上述微生物快速检测仪配套的试剂, 其特征在于, 由牛肉浸膏、酵母浸膏、YC-1 溶液和 YC-2 溶液配置而成, 各组分的比例为 : 牛肉浸膏 0.2 ~ 10g/L, 酵母浸膏 0.2 ~ 10g/L, YC-1 溶液 20 ~ 60g/L, YC-2 溶液 10 ~ 40g/L。

[0010] 所述各组分优选比例为 : 牛肉浸膏 2g/L ; 酵母浸膏 1g/L ; YC-1 溶液 40g/L ; YC-2 溶液 16g/L。

[0011] 一种用于与上述微生物快速检测仪配套的试剂的制备方法, 其特征在于, 将牛肉浸膏、酵母浸膏和 YC-1 溶液按 “ 牛肉浸膏 0.2 ~ 10g/L, 酵母浸膏 0.2 ~ 10g/L, YC-1 溶液 20 ~ 60g/L, YC-2 溶液 10 ~ 40g/L ” 的比例称量, 溶解, 定容后形成培养基, 通过过滤去除培养基中杂质, 将过滤后的培养基的 pH 值调到 7.2 ~ 7.4, 再放入灭菌器下灭菌 ; 再按 10 ~ 40g/L 的比例加入 YC-2 溶液, 再密封、保存备用, 即得到所述的用于血样中微生物快速检测的试剂。

[0012] 所述的牛肉浸膏、酵母浸膏、YC-1 溶液和 YC-2 溶液的比例优选为 : 牛肉浸膏 2g/L ; 酵母浸膏 1g/L ; YC-1 溶液 40g/L ; YC-2 溶液 16g/L。

[0013] 本发明一种用于血样中微生物快速检测的测试仪、试剂及其制备方法。其检测原理是 : 压电全自动血培养仪 ( 即测试仪 ) 对培养液中的电特性变化有灵敏频移响应, 能在线检测血液中微生物的生长情况。具体关系如下所示 :

$$[0014] \Delta F = \frac{\pi F_0^2 C_q (4\pi^2 F_0^2 C_s^2 Y + 4\pi F_0 C_s G_0 - Y G_0^2)}{[4\pi^2 F_0^2 C_s (C_0 + C_s) - 2\pi F_0 C_0 Y G_0 + G_0^2]^2} \Delta G$$

[0015] 式中  $G_0$  为溶液背景电导,  $C_q$ 、 $C_0$  和  $C_s$  分别为 PQC 的动态电容、静态电容和溶液电容。  $\Delta G$  为培养液的电导变化。  $F_0$  为石英晶体的振荡基频, 为常数。  $y$  是振荡器的相移参数, 取决于振荡器的类型及工作条件, 各条件固定时, 为常数。

[0016] 细菌在培养过程中, 能将一些大分子物质转化成无机小分子物质如  $\text{CO}_2$ 、 $\text{NH}_3$ 、 $\text{H}_2\text{O}$  等等, 使培养液电特性发生变化, 引起全自动血培养仪响应频率的改变, 从而实现血液中细菌的检测。

[0017] 其检测方法是 : 向带有传感电极和无菌试剂检测池中依次加入 1 ~ 5mL 临床血液, ( 此时试剂的量大约 80mL ) 再将检测池插入温度设定为 37℃ 的压电生物传感仪中培养, 启动检测。仪器每隔 13 分钟记录一个频率值, 所有的频率曲线自动保存于计算机中, 检测完毕, 仪器将自动给出检验结果。

[0018] 所发明的全自动血培养仪检测速度快、性能可靠、操作方便, 其配套检测池及试剂, 检测菌谱广, 安全性能高, 使用方便。

[0019] 本发明的有益效果有 :

[0020] 本发明的特点是具有灵敏度高、易于实现数字化、响应谱广、快速检测、操作简单、

成本低廉等优点,其充分利用串联式压电传感器对溶液电导的响应,并和微生物的新陈代谢特征相结合,拓宽了压电传感器在临床血液检测方面的应用,使信息的提取更加准确容易,检测更加快速方便,从而为疾病诊断应用提供了可靠依据。

## 附图说明

- [0021] 图 1 是本发明实施例 1 的测试仪的总体框图;
- [0022] 图 2 是本发明实施例 1 的测试仪的振荡电路原理图;
- [0023] 图 3 是本发明实施例 1 的测试仪的振荡电路的基本振荡电路原理图;
- [0024] 图 4 是频率和品质因子关系图;((a) 未引入 RLC 回路, (b) 引入 RLC 回路)
- [0025] 图 5 是本发明实施例 1 的测试仪的振荡电路的一级放大电路原理图;
- [0026] 图 6 是本发明实施例 1 的测试仪的振荡电路的二级放大电路原理图;
- [0027] 图 7 是本发明实施例 1 的测试仪的振荡电路的三级放大电路原理图;
- [0028] 图 8 是本发明实施例 1 的测试仪的实测曲线 (a) 检测呈阳性曲线 (b) 检测呈阴性曲线。

## 具体实施方式

- [0029] 下面结合附图和具体实施方式对本发明作进一步说明。
- [0030] 实施例 1:
  - [0031] (1) 测试仪的硬件
    - [0032] 图 1 给出了多个样品同时检测的压电全自动血培养仪(即测试仪)的检测方框图。检测池的振荡频率信号由振荡电路取出,再输入频率计,由频率计将信号分为段信号和位信号,分别送到八位数码显示器和单片机,单片机再将信号经 232 数据接口送到 pc 机显示出来。为了实现多个样品的适时采集,由 pc 机发指令,通过 232 数据接口送到单片机,单片机发指令给多通道选择开关,采集指定检测池的信号,即可同时实现多通道样品的同时检测。八位数码显示器直接显示出频率信号,而 PC 机能给出频移 - 时间曲线及测试结果。
    - [0033] 在电路部分,具有创新性的是振荡电路设计与制造。现详细说明如下。
    - [0034] ①振荡电路的基本原理:
      - [0035] 振荡电路的基本原理如图 2 所示;包括基本振荡电路和三级放大电路。图中 AGC 是自动增益控制。
      - [0036] 基本振荡电路(如图 3 所示):
        - [0037] 基本振荡电路中,在外接电源处增加了一个 RLC 回路,这样即可降低 Q 值,在外环境稍有变化时,电路仍然起振,又可以减少外电路其他信号的影响。即在响应外环境变化的同时,能稳定振荡。未引入和引入 RLC 回路时,所测得的频率与品质因子的关系如图 4(a)、(b) 所示:
        - [0038] 在图 4(a) 中,品质因子 Q 在 9MHz 处最大,频率稍偏离 9MHz,则品质因子 Q 急剧下降,如 A 点,这样电路回不起振。在图 4(b) 中,频率稍低于 9MHz,品质因子 Q 变化不是很大,电路仍能稳定振荡。
      - [0039] 一级放大电路(图如 5):
      - [0040] 在一到三级放大电路中均增加了 LC 抗干扰回路,保证整个电路能长期稳定工作。

- [0041] 二级放大电路（如图 6）：
- [0042] 二级放大电路中，增加了自动增益控制，防止信号波形改变。
- [0043] 级放大电路（图 7）：
- [0044] 三级放大电路是为了增加电路带负载能力而设置的。采频部分就是频率计数器。
- [0045] (2) 仪器的软件
- [0046] 在 Microsoft Windows2000 操作系统中开发了本产品配套软件，软件由 Delphi 程序编译而成，设计灵活，使用简便，可视化程度高，功能齐全，可在 Windows2000 及以上系统中运行。湖南高新生物仪器有限公司开发的艾丽特全自动血培养系统 Version1.0 软件已通过湖南省医疗器械与药用包装材料（容器）检测所验证通过，性能稳定，符合使用要求。
- [0047] 据仪器的需要，软件的开发包括了以下部分：操作界面的设计、测定曲线的显示、临床阴阳结果的自动判定、软件工作原理。
- [0048] ①操作界面的设计
- [0049] 操作软件包括：采样周期、串口选择、文件存放路径等选择，同时包括了检测位的运行，判别阴阳的指示灯提示。工具栏有运行、查看响应曲线、系统设置、病人资料、化验单和帮助等几个选项，可以对整个检测过程进行控制。完善的设计，使检测过程系统化，操作更简便。
- [0050] ②测定曲线的显示
- [0051] 响应曲线中，横坐标为检测时间 t（秒 / 时 / 日），纵坐标为  $\Delta F$ (Hz)： $\Delta F = F_i - F_0$ ( $F_i$  是任一时刻的频率值)
- [0052] ③临床阴阳结果的自动判定
- [0053] 根据临床响应曲线的变化，软件自动进行后台分析判断检测样品的阴阳性。
- [0054] ④软件工作原理
- [0055] i. 系统软件组成：
- [0056] 本血培养仪是一种医疗监控管理软件。按照该软件的功能，可以划分为以下几个部分：数据采集模块，通过串口控制医疗设备并采取实验数据；数据分析模块，对采集的数据根据某种变化规律判断实验结果，包括阳性与阴性；图形分析模块，将采集的数据生成曲线图，便于实验人员分析结果；其它控制模块，包括实验结果入库，病人档案管理等。
- [0057] ii. 系统软件的通讯协议：
- [0058] PC 机与仪器之间通过串口进行通讯，其通讯协议采用主从模式，即 PC 机为主机，仪器为从机，只有 PC 机向串口发送命令后，仪器才将实验频率传送给 PC 机，从协议看，分为：
- [0059] PC 机发往仪器：仪器共有实验标本 32 支，当 PC 机需要采取某一支的实验数据时，只需要发送这支标本的序号给串口，如 PC 机需要采取第 6 支标本的数据，只需要向串口发送 6 即可；
- [0060] 仪器发往 PC 机：当仪器接收到采取指令时，将会传送对应标本的实验数据给 PC 机，如第 6 支实验数据为 9012340，仪器将会向串口输出 9012340 数据。
- [0061] 所用检测池及试剂：检测池材料为聚碳酸酯，检测池下端有一对电极，检测池内装有试剂。该检测池和试剂与仪器配套使用。
- [0062] 试剂的组成：

[0063] 牛肉浸膏 0.2 ~ 10g/L

[0064] 酵母浸膏 0.2 ~ 10g/L

[0065] YC-1 20 ~ 60g/L( 范围 )

[0066] YC-2 10 ~ 40g/L( 范围 )

[0067] 配制方法 :首先,将牛肉浸膏、酵母浸膏、YC-1,按比例称量,溶解,定容后形成培养基,通过过滤去除培养基中杂质。(注 :配制培养基的水必须为去除杂质后的去离子水,因为普通水中的离子会使培养基的电导产生变化。)。将过滤后培养基 pH 值调到 7.2 ~ 7.4( 调 ph 值就是直接加如碱或酸,为常用的技术手段 ),放入灭菌器 121 ℃下高压灭菌 20min ;以无菌操作按比例加入 YC-2,再分装、密封、保存备用。YC-1 和 YC-2 具体是 (长沙英才公司生产的溶液,在市场上有商品出售,产品名称即为 YC-1 和 YC-2)。

[0068] 在自身进行模拟实验的同时,还在 2 个医院做了大量的临床实验,具体实验情况见下表 :

[0069]

实验名称 实验结果	模拟实验	医院 A	医院 B
实验总数	3625 例	260 例	420 例
阳性结果	2943 例	32 例	50 例
阴性结果	682 例	228 例	370 例
实际阴性率	18.9%	87.7%	88.1%
实际阳性率	81.1%	12.3%	11.9%
阳性检出率	99.9%	100%	100%
假阳性	8 例	0	0
假阳性率	0.3%	0	0
假阴性	4 例	0	0
假阴性率	0.1%	0	0

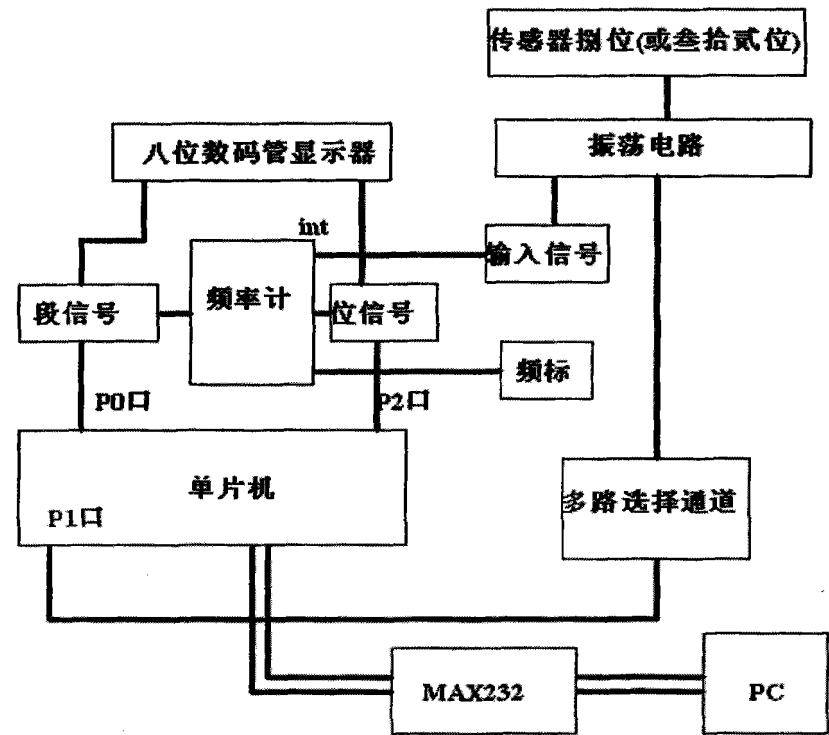


图 1

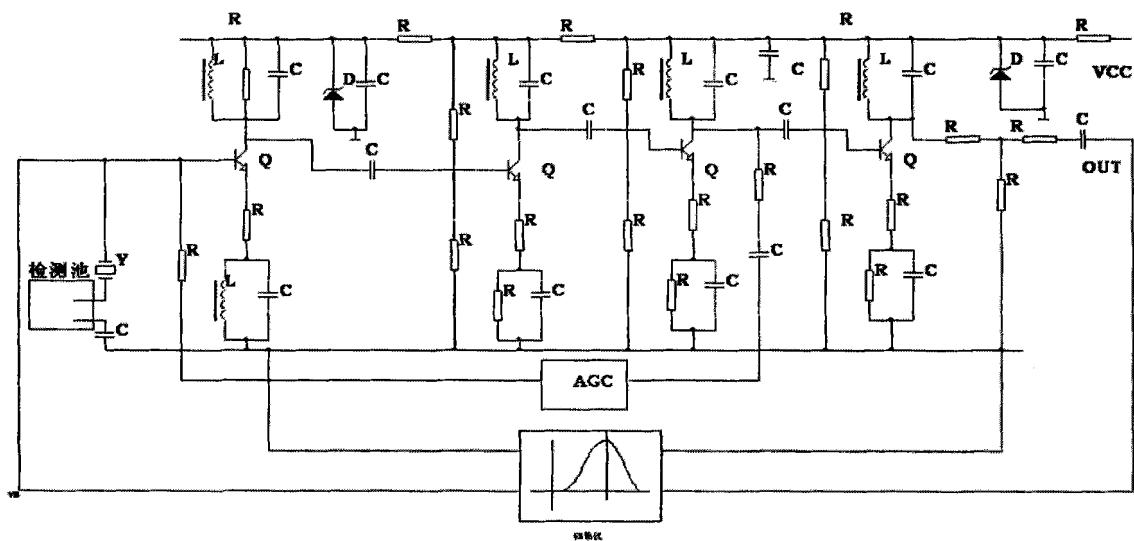


图 2

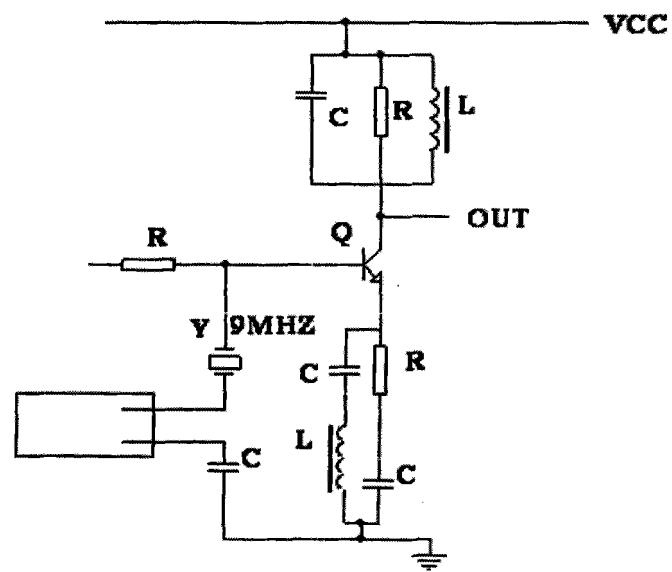


图 3

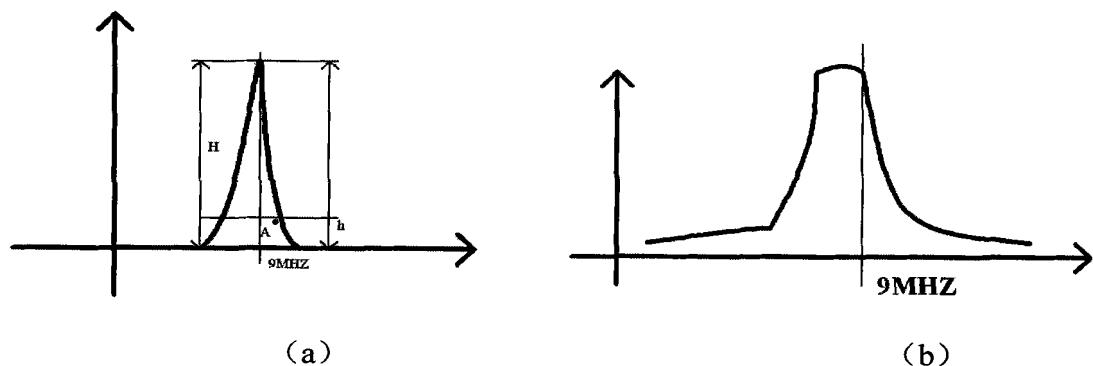


图 4

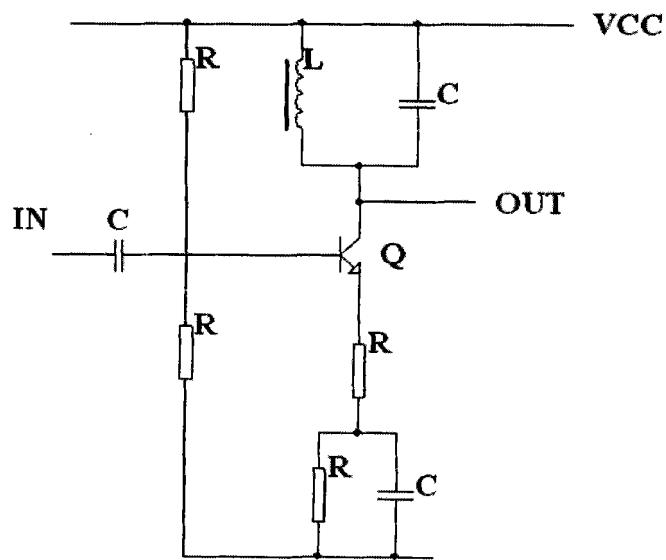


图 5

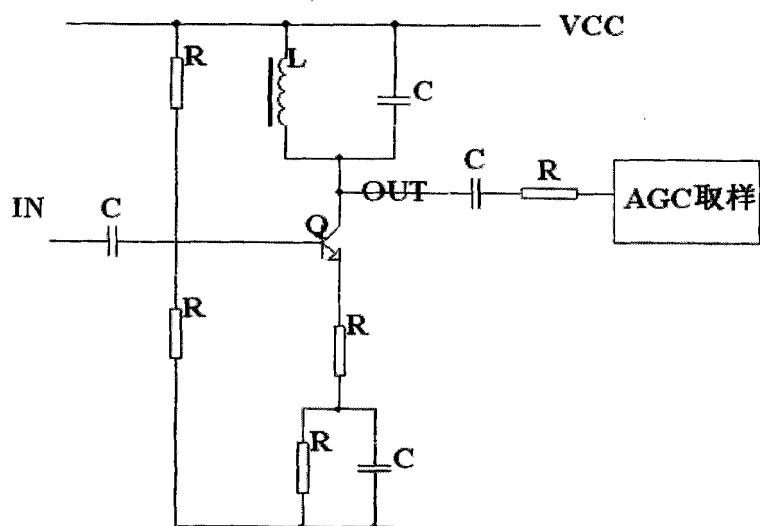


图 6

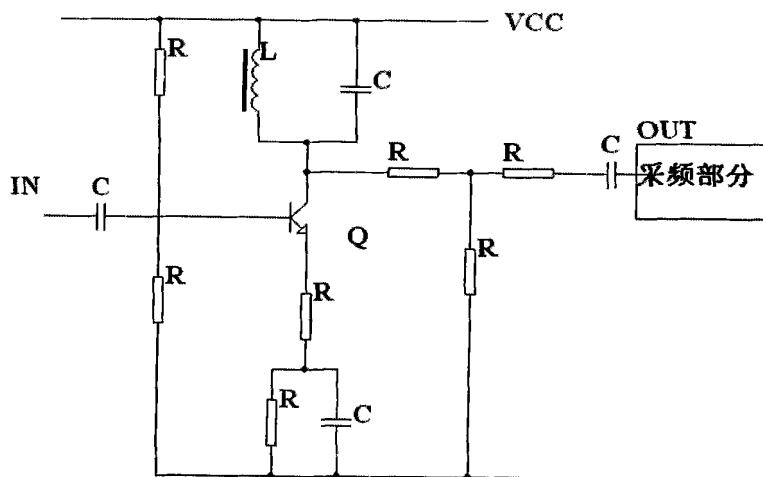


图 7

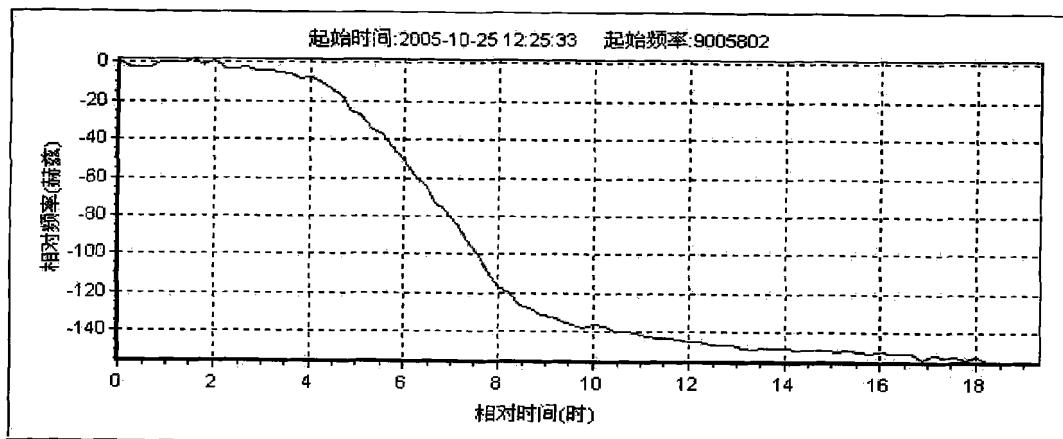


图 8(a)

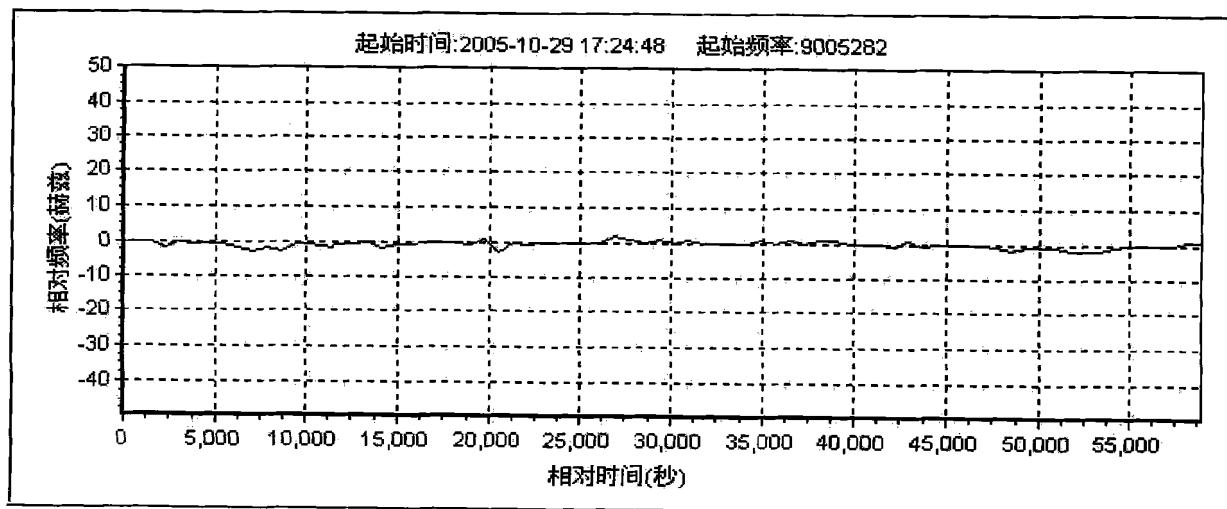


图 8(b)