NORGE

(19) [NO]

STYRET FOR DET INDUSTRIELLE RETTSVERN

[B] (12) UTLEGNINGSSKRIFT (11) Nr. 164505

(51) Int. Cl.[5] G 01 N 27/02, C 12 M 1/34

(83)

(21) Patentsøknad nr. 854844

(22) Inngivelsesdag 02.12.85

(24) Løpedag 03.04.85

(62) Avdelt/utskilt fra søknad nr.

(86) Internasjonal søknad nr. PCT/GB85/00150

(86) Internasjonal inngivelsesdag 03.04.85

(85) Videreføringsdag 02.12.85

(41) Alment tilgjengelig fra 02.12.85

(44) Utlegningsdag 02.07.90

(71)(73) Søker/Patenthaver PUBLIC HEALTH LABORATORY SERVICE BOARD, 61 Colindale Avenue, London NW9 5EQ, England, GB.

(72) Oppfinner BARRY CHARLES BLAKE-COLEMAN, Newton Toney, Nr Salisbury, Wiltshire, DAVID JOHN CLARKE, Salisbury, Wiltshire, England, GB.

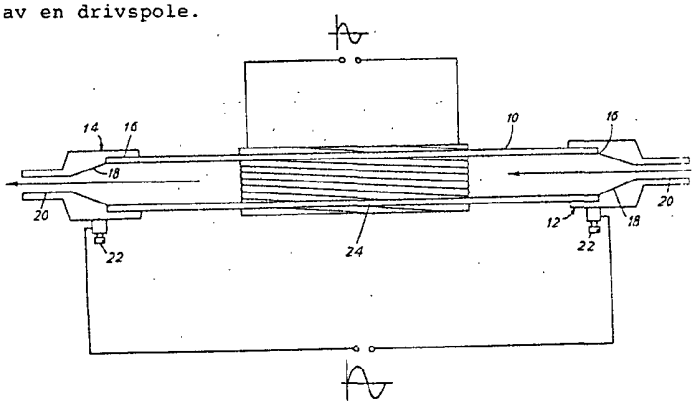
(74) Fullmektig Tandbergs Patentkontor A-S, Oslo.

(30) Prioritet begjært 03.04.84, GB, nr. 8408529.

(54) Oppfinnelsens benevnelse FREMGANGSMÅTE OG APPARAT FOR UNDERSØKELSE AV TILSTANDEN FOR BIOLOGISKE PARTIKLER.

(57) Sammendrag

Fremgangsmåte for undersøkelse av tilstanden for biologiske partikler, særlig mengden av levedyktige celler i en bakteriepopulasjon, omfattende påtrykk av en spenning og måling av den spenning som induseres ved magnetisk induksjon i en detektorspole. Den påtrykte spenning er en vekselspenning med variabel frekvens og påtrykkes fortrinnsvis mediet ved hjelp av en drivspole.



(56) Anførte publikasjoner Ingen.

Oppfinnelsen vedrører en fremgangsmåte og et apparat for undersøkelse av tilstanden for biologiske partikler, såsom bakterier, i et medium. I et eksempel angår oppfinnelsen undersøkelse av en bakteriekulturs levedyktige fraksjon.

Tidligere har det blitt utført arbeider i forbindelse med å undersøke den elektriske impedans i medier eller oppløsninger med visse bakteriekulturer. Man har funnet ut at impedansen hovedsakelig består av resistive og kapasitive komponenter, idet den målte ledningsevne og relative dielektrisitetskonstant ikke er konstante, men avhengig av påtrykt frekvens. I en grafisk sammenheng mellom relativ dielektrisitetskonstant og påtrykt frekvens er det mulig å identifisere de såkalte alfa- og betautbredelsene som det har vært anerkjent å forbinde med de relative fordelinger av de forskjellige membransjikt i bakteriene. Hvert membransjikt virker ifølge denne hypotese som et motstands-/kapasitetsnettverk med den relative fordeling av de ulike sjikt som en varierende funksjon av påtrykt frekvens. Alfa-utbredelsen har vært knyttet til de ytre membransjikt og beta-utbredelsen til de indre sjikt.

Den klassiske anvendelse av impedansmålinger ved bakteriekulturer omfatter manuell målebroteknikk. Slik teknikk er tidkrevende og forlanger en meget omhyggelig observasjon av balanseringen og kalibreringen av utstyret. Fremgangsmåtene er normalt ikke anvendelige ved bioreaktorer i kommersiell skala hvor anvendt tid og kontinuerlig overvåking er nøkkelfaktorer.

Et antall kommersielt tilgjengelige impedansanalysatorer har blitt foreslått for anvendelse ved undersøkelse av den dielektriske utbredelse i slike oppløsninger. Vanskeligheten ligger her i at disse analysatorer er bygget og innrettet for måling av nettverk med ukjent, men konstant motstand, kapasitans og induktans. Det er således behov for ytterligere omhyggelig analyse før resultatene fra en slik kommersielt tilgjengelig impedansanalysator kan gi brukbar informasjon i denne sammenheng, siden både ledningsevnen og den relative dielektrisitetskonstant for mediet varierer med den påtrykte frekvens.

Denne oppfinnelse angår en fremgangsmåte og et apparat for undersøkelse av konsentrasjonen av biolgiske partikler, slik at man på en forbedret måte blir i stand til å skille mellom eksempelvis levedyktige og ikke levedyktige bakterier.

Ifølge dette omfatter den foreliggende oppfinnelse i ett aspekt en fremgangsmåte for undersøkelse av tilstanden for biologiske partikler i et medium, kjennetegnet ved påtrykk av en vekselspenning med variabel frekvens over en del av mediet, måling av en indusert spenning ved hjelp av en detektorspole anordnet i nærheten av mediet, og analysering av sammenhengen mellom påtrykt frekvens og den frekvensavhengige admittans for mediet med dets partikkelinnhold.

En annen del av oppfinnelsen vedrører et apparat for undersøkelse av tilstanden for biologiske partikler i et medium, og denne del er kjennetegnet ved de trekk som fremgår av den karakteriserende del av det etterfølgende krav 6. Ytterligere trekk ved oppfinnelsen fremgår av de øvrige krav.

Det er hensiktsmessig at det kammer som benyttes danner en del av et rør eller ledning som mediet kan flyte gjennom uten avbrudd,og fortrinnsvis er røret eller rørledningen sylindrisk. Apparatets drivspole er gjerne solenoidformet og plassert slik at lengdeaksen går vinkelrett på rørets eller rørledningens lengdeakse.

Fortrinnsvis er generatororganene for spenningspåtrykk innrettet slik at amplituden av den genererte vekselspenning endres som funksjon av frekvensen, hvorved det opprettholdes en konstant strøm i drivspolen selv om vekselspenningens frekvens varieres.

Ved å studere variasjonen over frekvens av impedansen (eller admittansen) for én og samme biologiske oppløsning ved ulike tidspunkter, er det mulig ved sammenlikning å finne en forskyvning i fordelingen av alfa- og beta-utbredelsen og som har sammenheng med endringen i mengden av levedyktige bakterier. I det eksempel som vedrører bakterier må man skjelne mellom levedyktige bakterier og "spøkelser" som omfatter sprukne cellevegger fra hvilke cytoplasmaet er tapt. Man antar at disse "spøkelser" bidrar til alfa-utbredelsen som har vært satt i forbindelse med de ytre cellesjikt, men uten bidrag til beta-utbredelsen. En relativ økning i fordelingen

av alfa-utbredelse kan således tolkes som en reduksjon i antallet levedyktige celler.

I en særlig utførelse av oppfinnelsens apparat forsterkes den spenning som induseres - ved at en vekselstrøm flyter gjennom en del av mediet - og tilbakekobles til generatororganene for å stimulere resonans, hvoretter bestemmelse av denne resonansfrekvens finner sted.

Oppfinnelsen vil nå bli beskrevet ved hjelp av et eksempel og med henvisning til de ledsagende tegninger der fig. 1 skjematisk viser et prøverør for det medium som skal undersøkes, fig. 2 viser et blokkdiagram av apparatet ifølge oppfinnelsen og som omfatter prøverøret vist på fig. 1, fig. 3a), b) og c) er typiske frekvensdiagrammer, fig. 4 viser et blokkdiagram av et alternativt apparat ifølge denne oppfinnelse, fig. 5 er et skjematisk delsnitt av et apparat ifølge en annen utførelse av oppfinnelsen, fig. 6 viser en variant av et prøverør ifølge oppfinnelsen, fig. 7a, b) og c) er typiske frekvensdiagrammer, og fig. 8 er et skjema av en apparatutførelse hvor en frekvensteller inngår.

Med henvisning til fig. 1 vises et prøverør ifølge oppfinnelsen, omfattende et glassrør 10 a pyreks- eller silisiumglass og med elektroder 12 og 14 festet i hver ende. Elektrodene er identiske og omfatter en kapseldel 16 som omslutter glassrørets ende, idet denne kapseldels indre overflate er utformet med en hals for å sikre en glatt samlet flate. Elektroden har en indre konisk flate 18 som åpner mot en åpning 20 og tjener som inntaks- og utløpsåpning for dyrkningsvæsken. En elektrodekontakt 22 med konvensjonell fasong er anordnet på hver elektrode. Mellom elektrodene bærer røret 10 på sin ytre overflate en stramt viklet solenoidformet spole 24. Denne spole 24 er viklet på en passende spoleform (ikke vist) med spolens lengdeakse i rett vinkel på rørets lengdeakse.

Man vil forstå at med et ledende medium i glassrøret vil en vekselspenning påtrykt elektrodene 12 og 14 forårsake en strømgjennomgang i mediet, hvilket i sin tur skaper et svingende magnetisk felt som induserer en spenning over spolen siden dennes vindinger omslutter feltet.

Med henvisning til fig. 2 vil i det følgende et system bli beskrevet hvor informasjon fremskaffes fra denne induserte spenning og dens variasjon med frekvensen.

Prøverøret som er vist på fig. 1 er forbundet med en mediumbeholder 30, en peristaltisk pumpe 32 og et vannbad 34 slik at det fremskaffes en jevn strøm av dyrkningsvæske gjennom prøverøret og ved en konstant temperatur. I en alternativ utførelse kan dyrkningsvæsken avgrenes i en sammenhengende strøm fra et kammer eller tilførselsrør i en bioreaktor og passere gjennom temperaturbadet til prøverøret. En signalgenerator 36 er forbundet med elektrodene 12 og 14 for å påtrykke en sinusspenning med fast amplitude og med en valgt frekvens på disse elektroder. En mikroprosessor 38 er forbundet med signalgeneratoren 36 for å bringe generatorens frekvens til et sveip over frekvensområdet. Mikroprosessoren 38 muliggjør forvalg av signalamplitude, antall valgte prøvefrekvenser, forsinkelsen mellom prøvene, antallet repeterte prøver ved hvilken som helst av frekvensene og det aktuelle frekvensområdet.

Vekselspenningen som induseres i spolen 24 føres til en forsterker 40 med høy forsterkning ved lave frekvenser. Forsterkerens frekvensrespons er valgt for å kompensere for den frekvensvariasjon som oppstår for den induserte spenning ved lave frekvenser ifølge Faraday's lov. Ved høyere frekvenser vil den induserte spenning være tilstrekkelig høy slik at det ikke er behov for noen forsterkning. Utgangen fra forsterkeren 40 føres til en analog/digital omformer 42 og deretter til mikroprosessoren 38.

Ved et egnet prøveforløp vil mikroprosessoren beregne en sammenheng mellom indusert spenning og frekvens og som omfatter eksempelvis 300 måleverdier av et valgt frekvensbånd. Et eksempel på en slik sammenheng for en E koli-bakterieoppløsning er vist på fig. 3a). En kvalitativ sammenlikning avslører at det har vært en forskyvning i de relative fordelinger av alfa- og beta-utbredelsene, noe som igjen indikerer en endring i den relative mengde av levedyktige bakterier. For å muliggjøre en kvantitativ analyse, kan en sammenheng eller frekvensrespons beregnes for et medium fra hvilket bakteriene har blitt fraskilt. Dette kan oppnås ved f.eks. å benytte det apparat som er vist på fig. 4 hvor strømmen av dyrkningsvæske kan føres enten direkte til prøverøret eller gjennom et filter 50 innrettet for å fraskille bakterier eller andre biologiske partikler. Den numeriske sammenheng som fremkommer for et medium uten bakterier lagres i mikroprosessoren og benyttes som en basis for analysen av etterfølgende sammenhenger. Et eksempel på en frekvensrespons for et medium alene er vist på fig. 3b).

Resultatet ved subtraksjon av kurven fra fig. 3b) (kun medium) fra kurven på fig. 3a) (medium + E koli) er vist på kurve I på fig. 3c). Den del som ligger mellom maksimumet ved ca. 100 Hz og minimumet ved ca. 350 Hz kan tolkes som alfa-utbredelsen og med spenningsforskjellen mellom disse to punkter som en indikasjon på alfa-utbredelsens styrke. Som nevnt ovenfor er alfa-utbredelsen knyttet til de ytre cellemembraner. Kurve II tilsvarer en oppløsning hvor en del av bakteriene er døde. Man kan se kvalitativt at styrken av alfa-utbredelse har øket. For en kvantitativ analyse må de relative fordelinger mellom alfa- og beta-utbredelsen undersøkes, idet beta-utbredelsen finnes ved høyere frekvenser - typisk 50 MHz.

Ved å betrakte fig. 5 vil man se en ytterligere utførelse av denne oppfinnelse. En resirkulerings-kanal for næringsmedium er tilveiebrakt ved de parallelle grener 110a,

110b, en beholder 112, et temperaturkontrollert bad 114 og en peristaltisk pumpe 116. Parallellgrenen 110b har på sin ytre overflate en spole 118 med vindingsakse vinkelrett på kanalen og parallell med papirets plan. Med styring fra en mikroprosessor 120 påtrykker en signalgenerator 122 en vekselspenning over spolen 118 ved en valgt og variabel frekvens. Forbindelsen mellom signalgeneratoren og spolen omfatter en seriekoblet presisjonsmotstand 124 fra hvilken det er ført et uttak for å muliggjøre en strømstyring i signalgeneratoren.

Det er viktig at det er anordnet en konstant strømgjennomgang i spolen 118 uansett frekvens og derfor omfatter signalgeneratoren 122 en komparator som gir et feilsignal dersom den følte strøm (representert ved spenningen over presisjonsmotstanden 124) avviker fra en forhåndsgitt strømverdi. Dersom denne følte strøm faller under den ønskede verdi økes amplituden av den spenning som påtrykkes fra signalgeneratoren. For å oppnå denne betingelse med konstant strøm over et anvendbart frekvensomfang, omfatter signalgeneratoren en kraftforsterker.

Det svingende magnetiske felt som dannes av spolen 118 induserer en spenning i mediet og en strøm langsetter kanalen. Denne strøm vil ha en tendens til å gå rundt de parallelle grener 110a og 110b. For å føle denne strøm befinner det seg en detektorspole 126 på yttersiden av grenen 110a. Denne spole er tilsvarende spolen 118, men har vindingsaksen vinkelrett på papirets plan. Spenningen som induseres i detektorspolen 126 forsterkes så, likerettes og føres til en datalogger 128. Mikroprosessoren 120 forbindes videre på tradisjonell måte med en skriver 130, en plotter 132, en dataskjerm 134 og et tastatur 136.

Under drift vil mikroprosessoren få frekvensen av den påtrykte spenning til drivspolen 118 til å sveipe gjennom det ønskede frekvensbånd. Som beskrevet oppnås at strømmen i drivspolen er tilnærmelsesvis konstant. Spenningen i detektorspolen 126 måles ved prøvetaking over hele frekvenssveipet. I et eksempel ble en oppløsning av E koli med volum 14,5% i et næringsmedium ført gjennom de parallelle grener 110a, 110b. Frekvensen av den påtrykte spenning ble sveipet fra 500 Hz til 500 kHz. En sammenheng mellom spenningen over

detektorspolen og påtrykt frekvens ble opptatt og vises på fig. 7a. Frekvenssveipet ble gjentatt med et medium fra hvilket bakteriene var fjernet ved filtrering, og en sammenheng for mediumet alene er vist på fig. 7b. På denne figur representerer den punktstrekete linje en kalibreringslinje som ble oppnådd med en ohmsk væske i strømningskanalen. Ved å trekke kurvene på fig. 7a og 7b fra hverandre, fremkommer kurven på fig. 7c og denne omfatter den ønskede informasjon vedrørende bakteriekulturen alene. På denne figur er alfa-utbredelsen klart synlig. Med gjentatte målinger over livssyklusen for en bakteriekultur, vil man kunne måle endringer i fordelingen for bakterienes alfa-utbredelse som beskrevet ovenfor.

I en annen utførelse er et prøverør egnet for bruk ved svært høye frekvenser vist på fig. 6, og her er glassrøret på fig. 1 erstattet av et fleksibelt teflonrør 152 viklet rundt en ikke ledende spoleform 154. Den spole 156 som røret 152 danner er åpent viklet om spoleformen 154. På en annen måte benyttes således dette modifiserte prøverør analogt den måte som den beskrevet i forbindelse med fig. 1.

I nok en alternativ utførelse ifølge oppfinnelsen er prøverøret innbefattet i en lukket svingekrets på en slik måte at rørets innhold er med på å bestemme resonansfrekvensen for dette system. Dette oppnås ved å benytte feltsammenhengen mellom det ledende innhold i prøverøret og tilførselsspolen i en positiv tilbakekoblingsvei mellom inngangen og utgangen på en forsterker med stor forsterkning. Frekvensresponsen for forsterkeren kan være bredbåndet eller selektiv, avhengig av anvendelsen, i begge tilfeller er apparatet utformet for å ha et amplitudeavhengig forsterkningssystem som muliggjør at dyrkningsvæske kan analyseres, hvor den reaktive komponent er den parameter som hovedsakelig endres eller hvor det målte område for ledningsevne er under det som skal til for å forårsake oscillasjon.

Med henvisning til fig. 8 er detektorspolen forbundet med den høyimpedansede inngang på en forsterker 160, og drivspolen eller elektrodene, avhengig av hva det er behov for, fødes fra forsterkerens lavimpedansede utgang.

I praksis vil den ene ende av hver spole eller den ene av elektrodene være forbundet med jord. En utgang er tatt fra et mellomtrinn i forsterkeren for en frekvensteller 162 med stor oppløsning for måling av resonanssvingningens periodetid eller frekvens.

Man har funnet at svingefrekvensen endres med populasjonen av levedyktige bakterier i mediumet. En reduksjon av antallet levedyktige bakterier kjennetegnes ved en reduksjon av frekvensen. Man antar at dette fenomen kan forklares ved at det frigjøres tilleggs-elektrolytt i mediumet ved lysis i celleveggene. En reduksjon i antallet levedyktige celler medfører således en reduksjon av den dielektriske komponent, men en økning i den elektrolytiske ledningsevne. Tidskonstanten økes således og resonansfrekvensen avtar.

Man skal merke seg at oppfinnelsen har blitt beskrevet kun ved hjelp av eksempler, og et antall modifikasjoner vil være mulig uten at det fravikes fra oppfinnelsens ramme. Således har beskrivelsen henvist til forsøk hvor dyrkningsvæsken har passert i en jevn strøm gjennom prøverørene, men apparater ifølge oppfinnelsen kan likeledes funksjonere med et stillestående volum av medium i et prøverør eller også med elektroder nedsenket i et prøvemedium som ved en sonde.

Fra analysen har man funnet at det med en spesiell bakterie - E koli - gis nyttig informasjon vedrørende bakterienes levedyktighet ved undersøkelse av styrken for alfa-utbredelsen. Under andre betingelser og med andre mikroorganismer vil andre analysemetoder være et alternativ.

Oppfinnelsen i dennes ulike varianter finner særlig anvendelse ved bestemmelse av den del av bakterier i en populasjon som er levedyktig, men mange andre anvendelser innenfor analyse av konsentrasjonen av biologiske partikler i et medium i oppløsning, i en kolloid løsning eller en tykkere velling, kan tenkes. I deler av de beskrevne fremgangsmåter er det benyttet apparater ifølge oppfinnelsen for å bestemme impedansen av mediet fra hvilket det biologiske materiale har blitt fraskilt for å fremskaffe referanseverdier. Denne anvendelse kan utvides til tilfeller hvor impedansen (eller ledningsevnen) for mediet er den viktigste parameter som skal undersøkes.

Patentkrav

1. Fremgangsmåte for undersøkelse av tilstanden for biologiske partikler i et medium, KARAKTERISERT VED:

påtrykk av en vekselspenning med variabel frekvens over en del av mediet,

måling av en indusert spenning ved hjelp av en detektorspole (126) anordnet i nærheten av mediet, og

analysering av sammenhengen mellom påtrykt frekvens og den frekvensavhengige admittans for mediet med dets partikkelinnhold.

2. Fremgangsmåte ifølge krav 1, KARAKTERISERT VED:

separering av biologiske partikler fra et medium, påtrykk av vekselspenningen med variabel frekvens og måling av den induserte spenning, analysering av sammenhengen mellom påtrykt frekvens og frekvensavhengig admittans for mediet alene, og

sammenlikning mellom admittansenes frekvensavhengighet, henholdsvis for mediet med partikler og mediet alene.

3. Fremgangsmåte ifølge krav 1 eller 2, KARAKTERISERT VED at vekselspenningen påtrykkes elektroder (12, 14) anordnet et stykke fra hverandre.

4. Fremgangsmåte ifølge krav 1 eller 2, KARAKTERISERT VED at vekselspenningen påtrykkes ved hjelp av en drivspole (24, 118).

5. Fremgangsmåte ifølge krav 4, KARAKTERISERT VED at drivspolen (24, 118) påtrykkes en vekselspenning hvis amplitude endres med frekvensen slik at det opprettholdes en konstant strømstyrke i drivspolen, også når frekvensen varieres.

6. Apparat for undersøkelse av tilstanden for biologiske partikler i et medium, KARAKTERISERT VED et kammer (10, 110) som ved apparatets bruk er fylt med mediet, drivorganer (12, 14, 118) for påtrykk av en spenning over kammerets medium, generatororganer (36, 122) for generering av en vekselspenning med valgt frekvens for drivorganene, en detektorinnretning (24, 126) anordnet slik at det i eller over innretningen induseres en spenning som gir indikasjon på det magnetiske felt som oppstår som følge av en elektrisk strøm gjennom mediet, og prosessororganer (38, 120) for beregning av sammenhengen mellom spen-

ningen i eller over detektorinnretningen (24, 126) og frekvensen av den spenning som påtrykkes drivorganene (12, 14, 118).

7. Apparat ifølge krav 6, KARAKTERISERT VED at prosessororganene (38, 120) omfatter lagringsorganer for å lagre sammenhengene, dvs. måleresultatene som funksjon av frekvensen.

8. Apparat ifølge krav 6 eller 7, KARAKTERISERT VED at kammeret (10, 110) er en del av et rør eller en rørledning som mediet kan strømme kontinuerlig gjennom.

9. Apparat ifølge krav 8, KARAKTERISERT VED at røret eller rørledningen er sylindrisk og at detektororganene omfatter en solenoidformet spole (24) hvis lengdeakse ligger eller står normalt på rørets eller rørledningens lengdeakse.

10. Apparat ifølge krav 8 eller 9, KARAKTERISERT VED at drivorganene omfatter elektroder (12, 14) ved kammerets respektive ender, og at elektrodene har åpninger som mediet kan strømme gjennom.

11. Apparat ifølge ett av kravene 7 - 9, KARAKTERISERT VED at drivorganene omfatter en spole (118) for påtrykk av en spenning over mediet.

12. Apparat ifølge krav 11, KARAKTERISERT VED at spolen (118) er en solenoidspole, at detektorinnretningen omfatter en solenoidspole (126), og at solenoidspolenes lengdeakse står vinkelrett på hverandre.

13. Apparat ifølge krav 11 eller 12, KARAKTERISERT VED at generatororganene (122) er innrettet for å variere vekselspenningens amplitude på en slik måte at det opprettholdes en konstant elektrisk strøm i drivspolen (118), også når den påtrykte vekselspennings frekvens varieres.

14. Apparat ifølge krav 13, KARAKTERISERT VED at generatororganene (122) omfatter strømføleorganer (124) for registrering av strømmen i drivspolen (118), referansestrømorganer som kan innstilles på forhånd, og komparatororganer som gir et feilsignal når den registrerte strøm avviker fra den forhåndsinnstilte referansestrøm.

164505

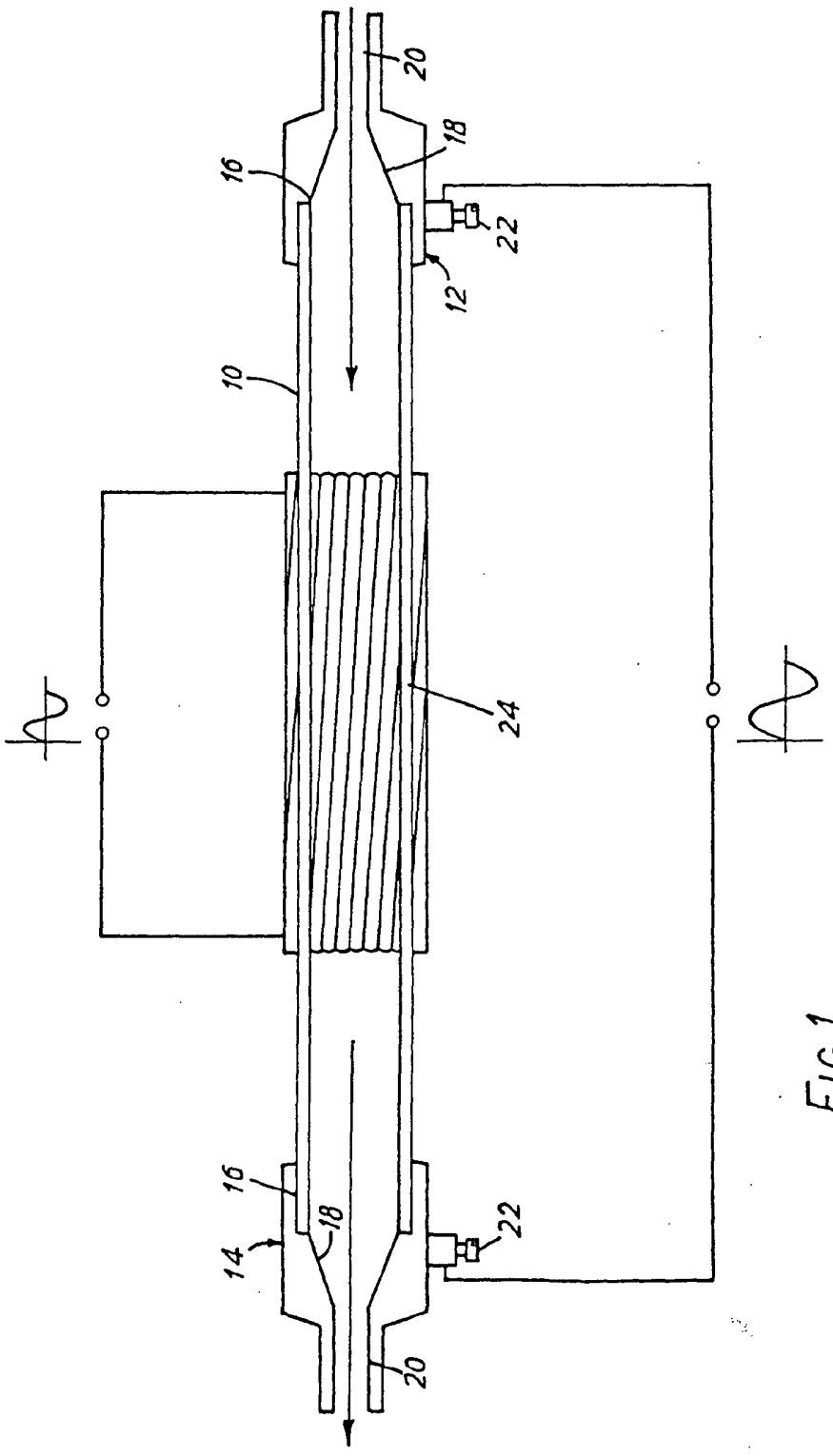


FIG.1

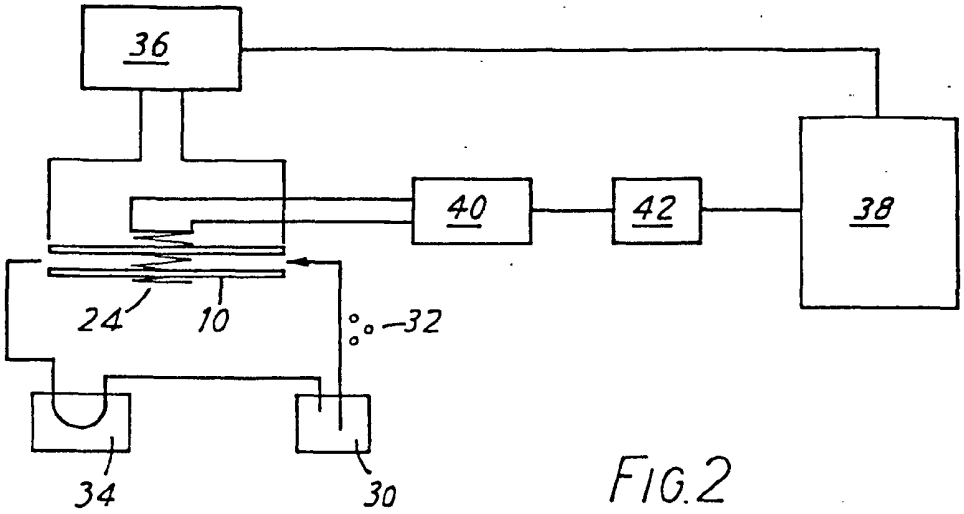


FIG.2

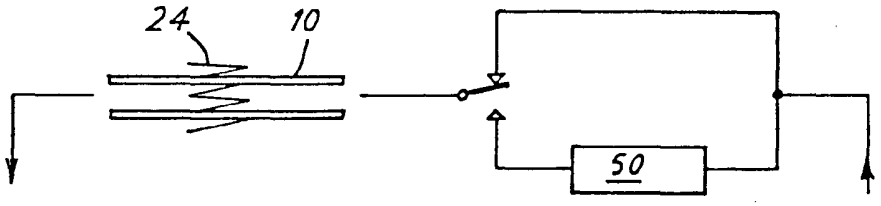


FIG.4

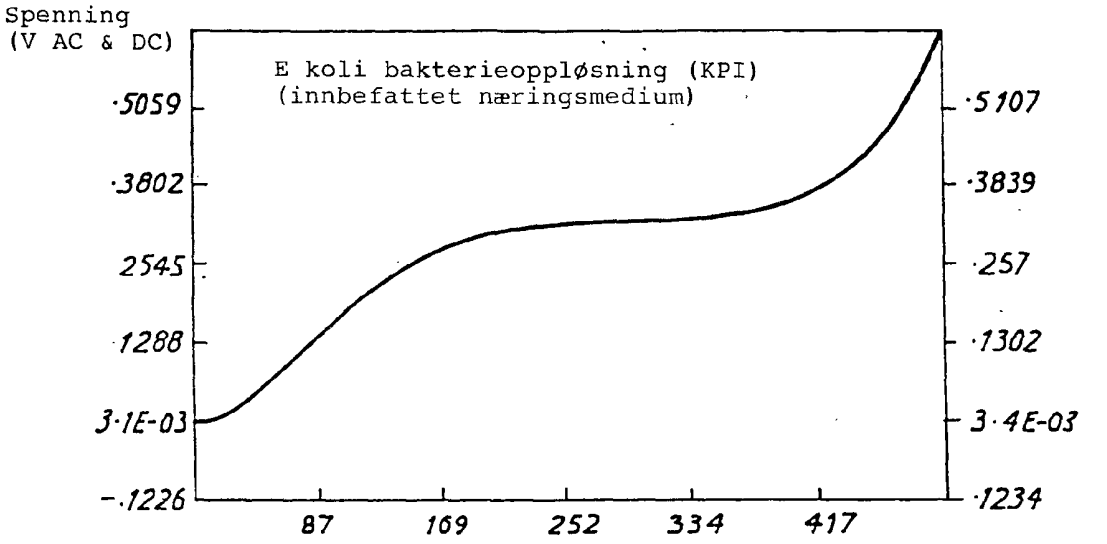

Spenning
(V AC & DC)
E koli bakterieoppløsning (KPI)
(innbefattet næringsmedium)
·5059
·3802
2545
·1288
3·1E-03
-·1226
·5107
·3839
·257
·1302
3·4E-03
·1234
87
169
252
334
417
Påtrykt frekvens (kHz)
KPI 10 mM, 5-500 kHz, 10 Y sign. (SCAN 14)

FIG. 3a)

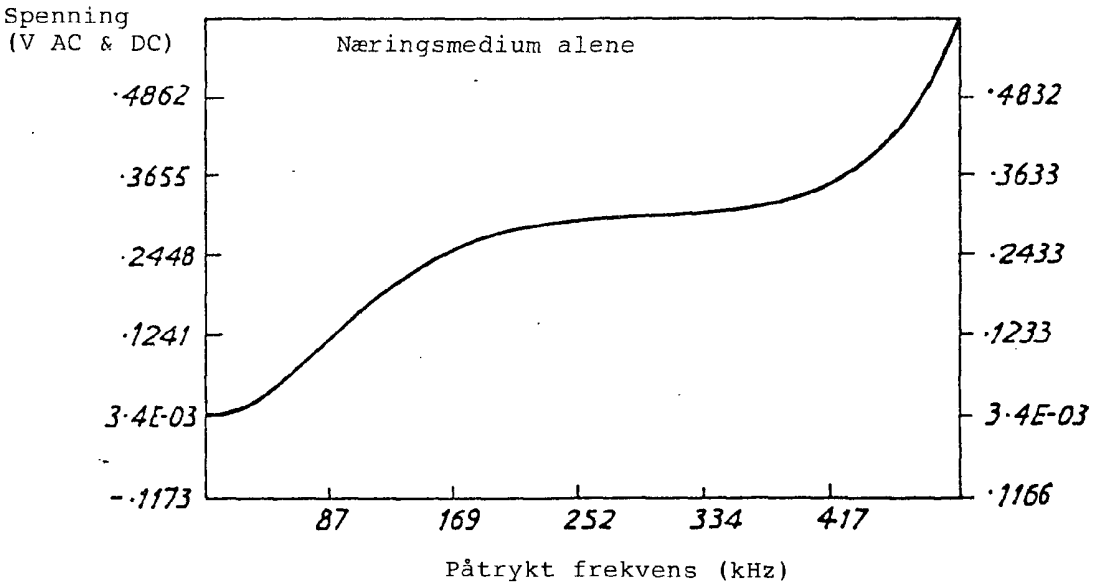

Spenning
(V AC & DC)
Næringsmedium alene
·4862
·3655
·2448
·1241
3·4E-03
-·1173
·4832
·3633
·2433
·1233
3·4E-03
·1166
87
169
252
334
417
Påtrykt frekvens (kHz)

FIG. 3b)

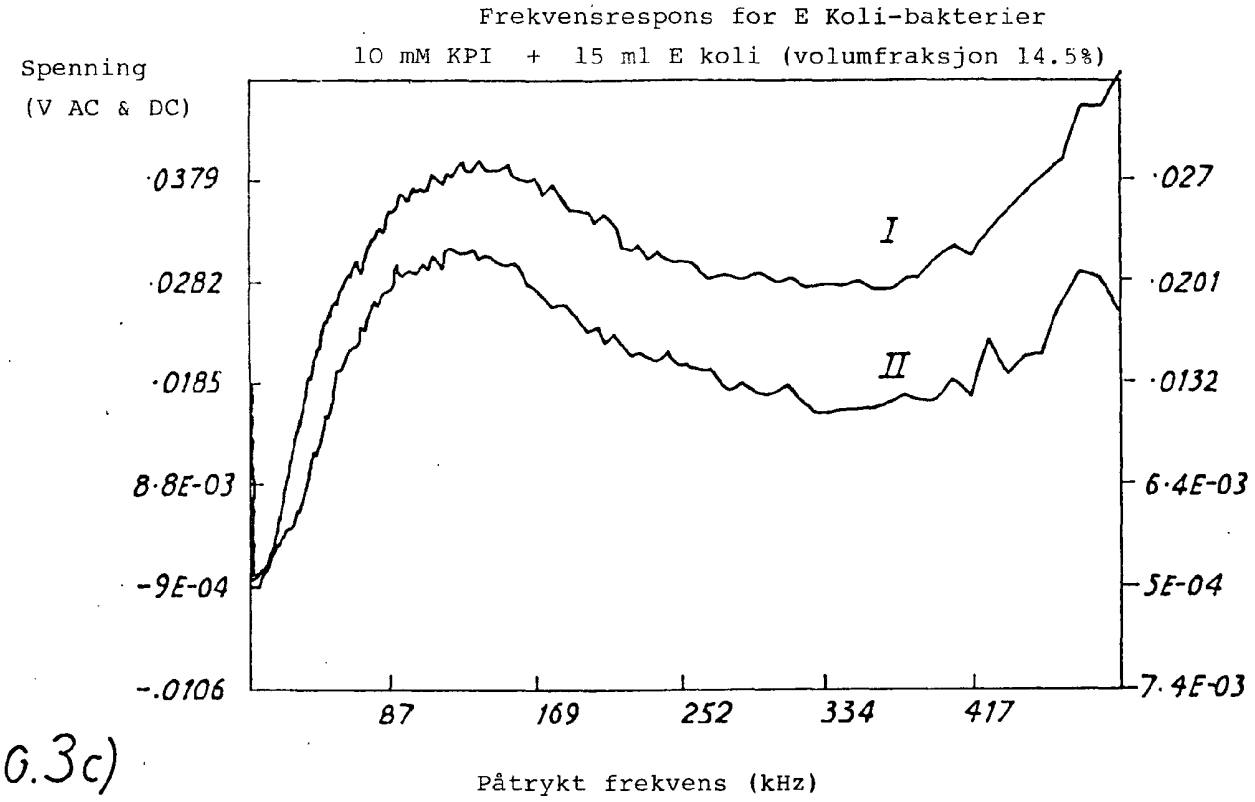


FIG.3c)

164505

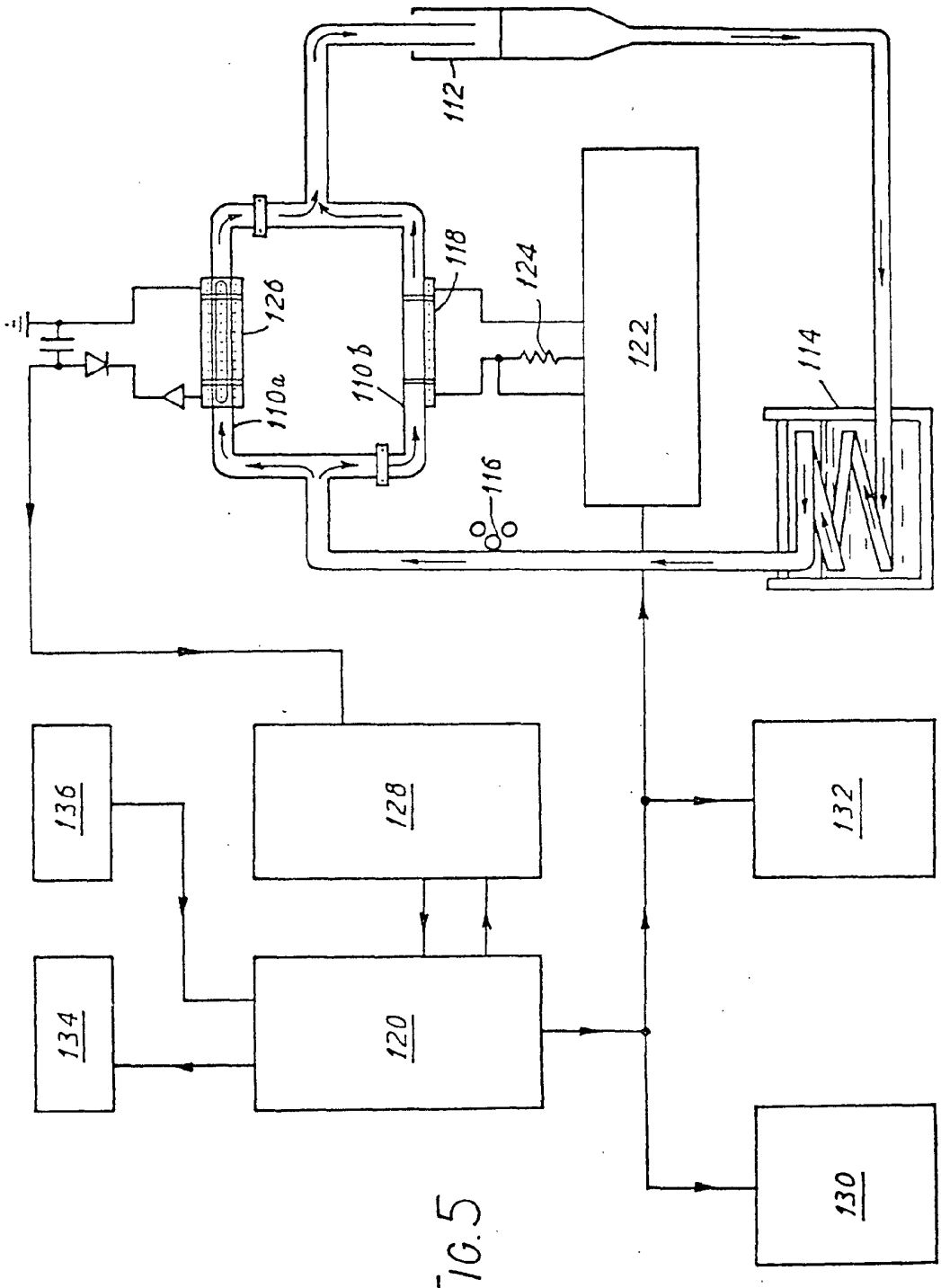


FIG. 5

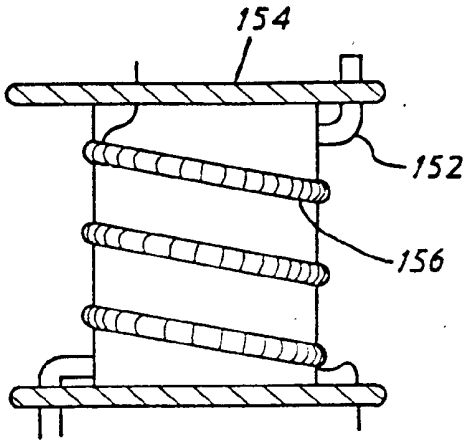


FIG.6

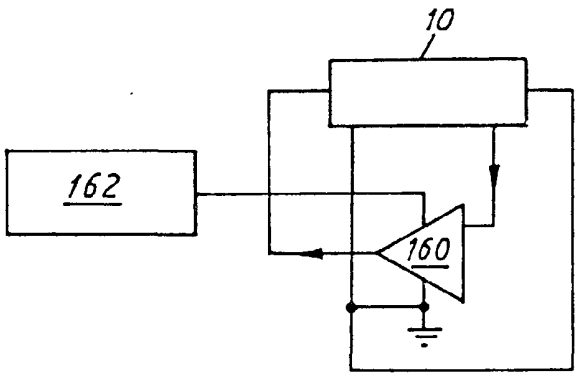


FIG.8

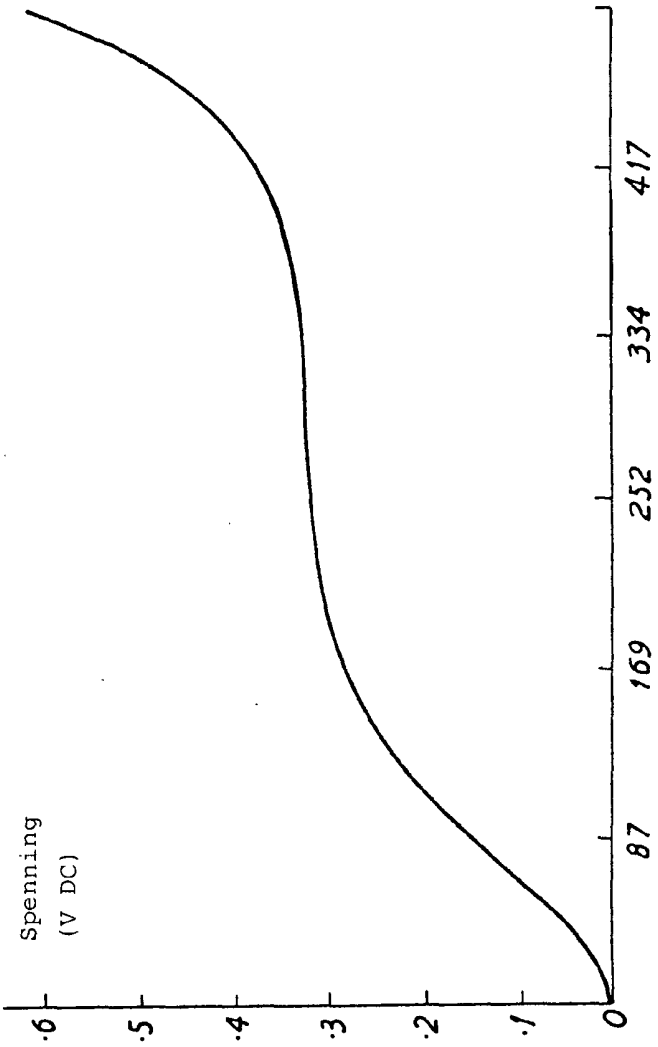

Spenning
(V DC)
.6
.5
.4
.3
.2
.1
0
87
169
252
334
417
Påtrykt frekvens (kHz)

FIG. 7a)

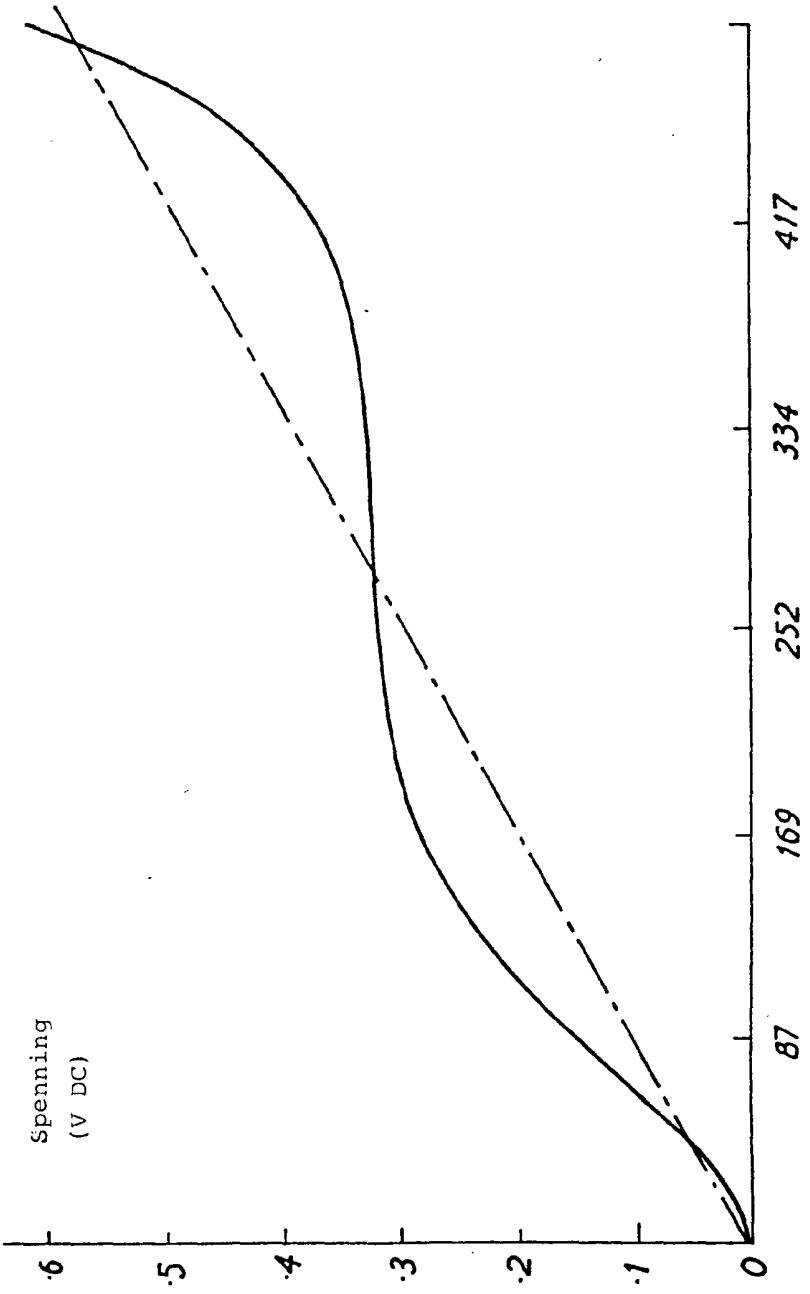

Spenning
(V DC)
.6
.5
.4
.3
.2
.1
0
87
169
252
334
417
Påtrykt frekvens (kHz)

FIG. 7b)

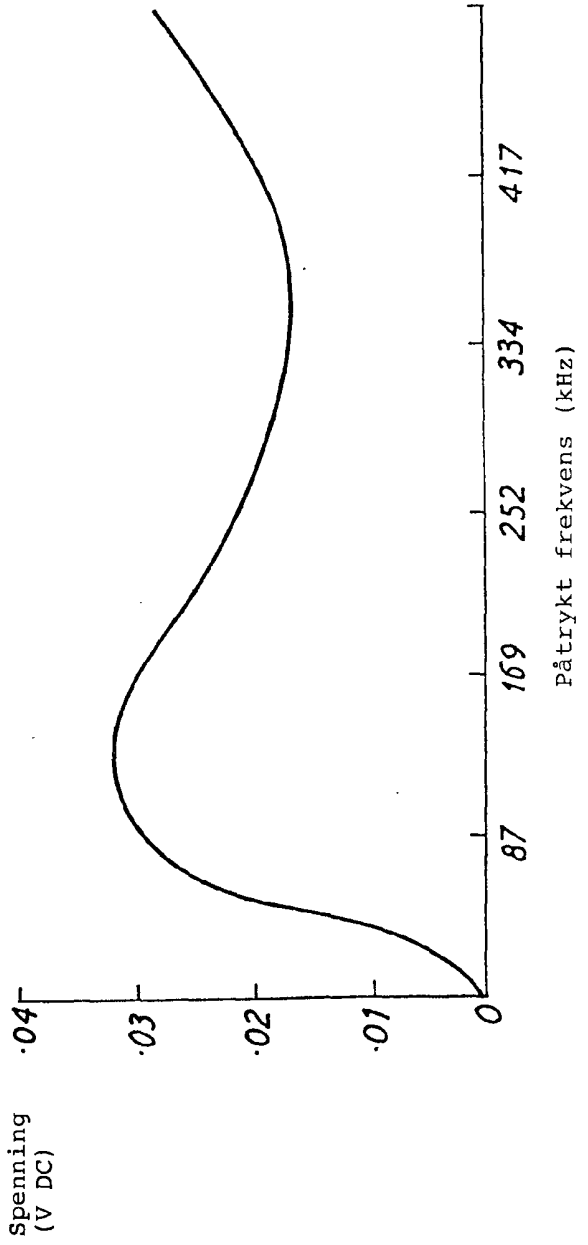

Spenning
(V DC)
.04
.03
.02
.01
0
87
169
252
334
417
Påtrykt frekvens (kHz)

FIG.7c)