



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 10 2004 008 762 B4 2006.10.12**

(12)

Patentschrift

(21) Aktenzeichen: **10 2004 008 762.8**
 (22) Anmeldetag: **23.02.2004**
 (43) Offenlegungstag: **08.09.2005**
 (45) Veröffentlichungstag
 der Patenterteilung: **12.10.2006**

(51) Int Cl.º: **G01N 15/14 (2006.01)**
G01N 21/65 (2006.01)
G01N 21/47 (2006.01)
G01J 3/44 (2006.01)

Innerhalb von drei Monaten nach Veröffentlichung der Patenterteilung kann nach § 59 Patentgesetz gegen das Patent Einspruch erhoben werden. Der Einspruch ist schriftlich zu erklären und zu begründen. Innerhalb der Einspruchsfrist ist eine Einspruchsgebühr in Höhe von 200 Euro zu entrichten (§ 6 Patentkostengesetz in Verbindung mit der Anlage zu § 2 Abs. 2 Patentkostengesetz).

(73) Patentinhaber:

Erwin Kayser-Threde GmbH, 81379 München, DE;
Friedrich-Schiller-Universität Jena, 07743 Jena,
DE; rap.ID Particle Systems GmbH, 12459 Berlin,
DE; Fraunhofer-Gesellschaft zur Förderung der
angewandten Forschung e.V., 80686 München, DE

DE; Schmauz, Günther, 70569 Stuttgart, DE;
Lankers, Markus, 10551 Berlin, DE; Burkhardt,
Hans, Prof. Dr., 79104 Freiburg, DE; Ronneberger,
Olaf, Dipl.-Phys., 79102 Freiburg, DE; Peschke,
Klaus-Dieter, 79100 Freiburg, DE

(74) Vertreter:

PRÜFER & PARTNER GbR, 81479 München

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
 gezogene Druckschriften:

DE 197 17 749 A1
US 57 01 012 A
EP 06 85 731 A1
WO 1997/0 28 439 A1
WO 1996/0 18 205 A1
WO 2003/0 60 444 A1
WO 2002/0 97 409 A1
WO 1998/048243 A1 = DE 197 16 264 A1;

(72) Erfinder:

Popp, Jürgen, Prof. Dr., 07751 Jena, DE; Rösch,
Petra, Dr., 97218 Gerbrunn, DE; Petry, Renate, Dr.,
97072 Würzburg, DE; Hofer, Stefan, Dr., 81545
München, DE; Schüle, Andreas, 70569 Stuttgart,

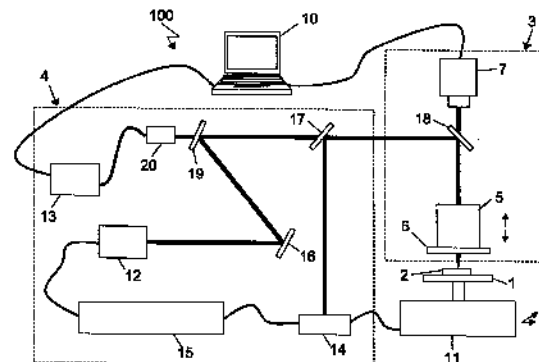
(54) Bezeichnung: **Verfahren und Vorrichtung zur Detektion und zum Identifizieren von Biopartikeln**

(57) Hauptanspruch: Verfahren zum Identifizieren von Biopartikeln mit den Schritten:

Lokalisierung einzelner Partikel auf einem Substrat (2) durch Abbilden wenigstens eines Bereichs des Substrats durch Bestrahlung mittels Licht von einer ersten Lichtquelle und Messung des von den Partikeln reflektierten Lichts in einer Vorrichtung (100);

Bestrahlung eines lokalisierten Partikels mit einem von der ersten Lichtquelle verschiedenen Laser und Erzeugen eines Raman-Spektrums in der Vorrichtung (100);

Identifizieren des Partikels durch Vergleich des erzeugten Raman-Spektrums mit für eine Mehrzahl von verschiedenen Partikeln abgelegten Raman-Spektren.



Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Detektion und zum Identifizieren von Biopartikeln.

[0002] In verschiedenen Branchen, wie z.B. der pharmazeutischen oder der Lebensmittelindustrie, finden Produktionen und Forschung unter Reinraumbedingungen statt, wobei hohe Reinheitsanforderungen einzuhalten sind. Es besteht daher Bedarf an Information über die aktuell vorhandene Partikelbelastung im gesamten Produktionsbereich, um das Kontaminationspotential durch Mikroorganismen zu kontrollieren bzw. die Einhaltung der Reinheitsanforderungen quantitativ zu verifizieren.

Stand der Technik

[0003] Bislang erfolgt die Überwachung der Biopartikelkontamination von Produktionsbereichen meist anhand von konventionellen molekularbiologischen Methoden. Bei den konventionellen Methoden wird die Probe auf verschiedene Nährmedien aufgebracht, da verschiedene Mikroorganismen unterschiedlichen Nährmedien benötigen, diese bebrütet, die Mikroorganismen gezählt und anhand ihrer Morphologie sowie dem Wachstum unter variablen Umgebungsbedingungen identifiziert. Frühestens nach einem Zeitraum von ca. 2 bis 5 Tagen lassen sich aus den Labor-Ergebnissen Rückschlüsse auf die Art und Häufigkeit vorhandener Kontaminationen von einem weiter zurückliegenden Zeitpunkt ziehen. Im allgemeinen ist auch keine Einzelmethode, sondern nur die Kombination mehrerer Methoden in der Lage, die Mikroorganismen eindeutig zu identifizieren.

[0004] Bei einem weiteren Verfahren werden einzelne Zellen mit Vitalfarbstoffen gekennzeichnet und die angefärbten Zellen mit Hilfe eines Laserscanners detektiert. Problematisch erweist sich hier, dass die Vitalität der Zellen nach der Anfärbung nicht mehr gegeben ist und der Anfärbeprozess manuell durchgeführt werden muss. Ein automatisiertes Umgebungsmonitoring ist so nicht möglich.

[0005] Bei einem weiteren bekannten Verfahren wird eine Fluoreszenzanregung von Partikeln genutzt, die angesaugt und durch einen speziellen Triggermechanismus im Flug angeregt werden. Das Verfahren beinhaltet keinerlei Probenvorbereitung und liefert unmittelbar Ergebnisse. Problematisch erweist sich hier der Verlust der untersuchten Partikel. Erkannte biotische Partikel können keiner weiterführenden Identifizierung zugeführt werden.

[0006] Die DE 197 17 749 offenbart ein Verfahren zur Größenbestimmung und Online-Differenzierung von luftgetragenen biotischen und abiotischen Kontaminationen mit Hilfe von optischen Partikelzählern in

Kombination mit einer Veränderungseinheit. Eine genotypische Unterscheidung der Mikroorganismen kann mit diesem Verfahren nicht erzielt werden.

[0007] Die WO 98/48243 offenbart ein Verfahren zur Detektion von Partikeln auf technischen Oberflächen über Streiflicht, wobei eine Unterscheidung bzw. Identifizierung der Biopartikel nicht gegeben ist.

[0008] Die US 5,701,012, WO 96/18205 und WO 97/28439 offenbaren Fluoreszenzverfahren bei denen nach UV-Licht-Anregung von Stoffwechselprodukten in biologischen Zellen das emittierte Fluoreszenzlicht detektiert wird. Ein Echtzeit-Verfahren zur Bestimmung der Partikelgrößen kombiniert mit der Detektion von biologisch aktiven, vitalen Kontaminanten wird in der US 5,701,012 beschrieben. Die Partikelgröße wird hierbei durch die unterschiedlichen Flugzeiten der Partikel aufgrund ihrer Masse ermittelt (Aerodynamic Particle Sizing – APS). Anschließend werden die Zellinhaltsstoffe wie NADH und Riboflavin per UV-Licht angeregt und das Fluoreszenzlicht detektiert. Eine genotypische Bestimmung der biologischen Materialien ist mit diesem Verfahren nicht möglich.

[0009] Es ist ferner bekannt, mit schwingungsspektroskopischen Methoden die chemische Zusammensetzung einer Biokontamination zu identifizieren. Das untersuchte Probenvolumen liegt im Bereich von $1\mu\text{m}^3$, d. h. für die Identifizierung müssen Mikrokolonien gezüchtet werden. Die Untersuchung von einzelnen Mikroorganismen mit konfokaler Raman-Spektroskopie auf Calciumfluoridsubstraten wurde berichtet. SERS bzw. SERRS wurde zur Spektroskopie von Einzelzellen sowie zur Identifizierung von DNA-Fragmenten eingesetzt.

[0010] In der WO 03/060444 wird ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Identifizierung von pathogenen Mikroorganismen auf einer Oberfläche beschrieben, das unter anderem Raman-Spektroskopie zur Identifizierung der Mikroorganismen einsetzt. Mit diesem Verfahren wird ein integriertes Spektrum über einen Oberflächenbereich erzeugt und daraus die vorkommenden pathogenen Mikroorganismen bestimmt. Es ist jedoch mit diesem Verfahren nicht möglich, die Anzahl der Mikroorganismen zu bestimmen und gezielt einen einzelnen Mikroorganismus aus der vorhandenen Mehrzahl zu identifizieren.

[0011] Aus der WO 02/097409 ist ein Verfahren zur automatisierten Erkennung, spektroskopischen Analyse und Identifizierung von Partikeln bekannt.

[0012] Die EP 0 685 731 A1 offenbart ein Verfahren, bei dem auf einem Silizium-Wafer befindliche Partikel zunächst mit einem Partikelzähler grob lokalisiert werden. Anschließend erfolgt ein Transfer der Probe zu einem Analysator, um Partikel weiter zu untersuchen.

chen

duktverderb entstehen, minimieren.

Aufgabenstellung

Ausführungsbeispiel

[0013] Es ist Aufgabe der Erfindung, ein Verfahren und eine Vorrichtung bereitzustellen mit dem bzw. mit der zeitnahe Identifizierung von Biokontaminationen auf einfache schnelle und zuverlässige Weise möglich ist.

[0014] Die Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren nach Patentanspruch 1 bzw. durch eine Vorrichtung nach Patentanspruch 12. Weiterbildungen der Erfindung sind in den Unteransprüchen angegeben.

[0015] Die Erfindung weist den Vorteil auf, daß einzelne aus einer Mehrzahl zu untersuchender Biopartikel, wie z.B. einzelne Bakterien, in einem Zeitraum von wenigen Minuten detektierbar und identifizierbar sind. Eine Unterscheidung zwischen biotischen und abiotischen Partikeln ist möglich. Bei der Analyse können selektiv die interessierenden Partikel betrachtet werden, wodurch sich die Gesamtanalysezeit deutlich reduzieren läßt.

[0016] Der Einsatz von höchstsensitiver Raman-Spektroskopie (Raman, Resonanz-Raman, UV-Resonanz-Raman) erlaubt den spezifischen Nachweis geringster Stoffmengen. Es ist keine Probenvorbereitung und kein Züchten erforderlich. Ferner werden die Biopartikel bei der Detektion und der Identifizierung nicht zerstört. Die Identifizierung der einzelnen Mikroorganismen erfolgt an Hand charakteristischer Markermoleküle wie z. B. DNA bzw. Proteinen. Durch die gezielte Analyse einzelner Partikel ist es möglich, die Spektroskopieparameter optimal an die Streucharakteristiken individueller Organismen anzupassen, wodurch die Analysezeit optimiert wird. Das Verfahren ist daher nahezu unabhängig von Wachstumsphasen bzw. Umwelteinflüssen. Der Zeitgewinn gegenüber konventionellen Methoden ist somit außerordentlich hoch. Im Vergleich zu konventionellen mikrobiologischen Methoden erfolgt die Identifizierung etwa 1000 mal schneller. So werden konventionell z.B. etwa 3000 Minuten benötigt, während etwa 3 Minuten mit dem erfindungsgemäßen Verfahren benötigt werden.

[0017] Falls eine weiterführende Untersuchung erforderlich ist, können einzelne Partikel abgenommen werden und entsprechend weiterverarbeitet werden, z.B. mit SERS oder SERRS oder durch klassische mikrobiologische Verfahren.

[0018] Die Erfindung eignet sich für den automatisierten Betrieb in Produktionsbereichen wie z.B. der pharmazeutischen Produktion, der Lebensmittelherstellung, der Wasserversorgung und -aufbereitung. Durch die zeitnahe Analyse lassen sich die Kosten und Risiken, die durch Produktionsausfälle oder Pro-

[0019] Weitere Merkmale und Zweckmäßigkeiten der Erfindung ergeben sich aus der Beschreibung von Ausführungsbeispielen anhand der Figuren. Von den Figuren zeigen:

[0020] **Fig. 1** eine schematische Darstellung der erfindungsgemäßen Vorrichtung;

[0021] **Fig. 2** eine schematische Darstellung der Beleuchtungseinrichtung der Vorrichtung nach **Fig. 1**;

[0022] **Fig. 3a)** bis 3c) Abbildungen des Substrats mit Partikeln;

[0023] **Fig. 4** Raman-Spektren einzelner Bakterien, die mit der erfindungsgemäßen Vorrichtung aufgenommen wurden;

[0024] **Fig. 5** die durchschnittliche Erkennungsrate von Bulk-Spektren eines dicken Bakterienausstrichs auf der Trägeroberfläche zum Vergleich mit dem erfindungsgemäßen Verfahren;

[0025] **Fig. 6** die durchschnittliche Erkennungsrate von Spektren einzelner Bakterien gemäß dem Identifizierungsschritt des erfindungsgemäßen Verfahrens.

[0026] **Fig. 7a)** SERS-Spektren von zerstörten E. coli in ansteigender (b-e) Konzentration der Zellsuspensionen im Silberkolloid;

[0027] **Fig. 7b)** SERS-Spektren von fünf verschiedenen Spezies; und

[0028] **Fig. 8** UV-Raman-Spektren einer Auswahl an Mikroorganismen, die mit der erfindungsgemäßen Vorrichtung gemessen wurden.

[0029] Wie aus **Fig. 1** ersichtlich ist, weist die Vorrichtung **100** in einer Ausführungsform einen Träger **1** mit einem darauf aufgebracht Substrat **2** auf. Das Substrat **2** ist vorzugsweise als eine Filtermembran z.B. aus polymerem Material oder aus Metall ausgebildet, auf die die zu untersuchenden Partikel aufgebracht worden sind, z.B. durch Abscheidung aus der Luft. Die Partikel umfassen in der Regel biotische und abiotische Partikel. Ferner umfaßt die Vorrichtung **100** eine Detektionseinheit **3** zum Bestimmen der Position und der Formfaktoren von einzelnen Biopartikeln auf dem Substrat **2** und zur Differenzierung zwischen biotischen und abiotischen Partikeln. Es ist außerdem eine Identifizierungseinrichtung **4** vorgesehen zum Identifizieren des Partikels, bei biotischen Partikeln der Spezies bzw. des Stamms. Die Detektionseinheit **3** beinhaltet eine optische Einheit **5** mit

Vergrößerungsfunktion, eine Beleuchtungseinheit 6 und eine Bildaufnahmeeinrichtung 7.

[0030] Wie aus **Fig. 2** ersichtlich ist, ist die Beleuchtungseinheit 6, bestehend aus einer Lichtquelle 6a, Linsen 6b, Anregungsfiltern 6c und Lichtleitern 6d derart ausgebildet, daß die Lichtleiter 6d ringförmig oberhalb des Substrats 2 angeordnet sind und ein streifender Lichteinfall des Beleuchtungslichts 8 unter einem vorgegebenen Einstrahlwinkel α auf die Oberfläche erfolgt. Der Einstrahlwinkel α ist der Winkel zwischen der Haupteinstrahlrichtung und dem Träger 1. Er liegt bevorzugt zwischen etwa 20° bis etwa 30°. Als Lichtquelle 6a wird z.B. eine UV-Lichtquelle mit hoher Lichtausbeute im UVA-Bereich eingesetzt.

[0031] Zur Erzeugung von wellenlängenspezifischem UV-Licht sind vor die UV-Lichtquelle 6a wahlweise schaltbare Anregungsfilter 6c vorgesehen.

[0032] Das von den Partikeln auf dem Substrat 2 gestreute oder durch Fluoreszenzanregung über das Beleuchtungslicht 8 emittierte Licht 9 wird über die optische Einheit 5 der Bildaufnahmeeinrichtung 7 zugeleitet. Die optische Einheit 5 beinhaltet eine Zwischenlinse 5a und ein mehrfachvergrößerndes Objektiv 5b. Zur Selektion von Fluoreszenzlicht, das von den Partikeln ausgesandt wird, sind wahlweise in den Strahlengang schaltbare Fluoreszenzfilter 5c vorgesehen.

[0033] Die Bildaufnahmeeinrichtung 7 ist vorzugsweise als hochauflösende CCD-Kamera, mit einer Auflösung von z.B. 2k × 2k Pixeln, ausgebildet und erzeugt ein vergrößertes Bild des Substrats.

[0034] Zur Ausgabe und Weiterverarbeitung des Bildes ist eine Datenverarbeitungseinrichtung 10 mit Bildschirm vorgesehen. Auf der Datenverarbeitungseinrichtung 10 ist ein Auswerteprogramm zur Bestimmung der Koordinaten, sowie zur Bestimmung der Abmessungen der detektierten Partikel auf dem Substrat 2 installiert.

[0035] Die optische Einheit 5 die Detektionseinheit 3 und der Träger 1 sind relativ zueinander über eine Positioniereinheit 11 positionierbar, z.B. in x-, y- und z-Richtung verfahrbar. Bevorzugt wird der Träger 1 in x-y-Richtung verfahren und die optische Einheit 5 in z-Richtung bewegt.

[0036] Die Identifizierungseinrichtung 4 umfaßt einen Laser 12, ein Spektrometer 13, einen Autofokusdetektor 14, eine elektronische Steuer- und Versorgungseinheit 15 für den Laser und den Autofokusdetektor, Spiegel 16, 17, 18 und eine mit dem Spektrometer gekoppelte Notch-Filtereinheit 19 sowie Faserkopplungen 20 zwischen der Notch-Filtereinheit 19 und dem Spektrometer 13. Der Laser 12 ist bevor-

zugt ein im UV-Bereich emittierender Laser, aber auch frequenzverdoppelte NdYAG mit einer Wellenlänge von 532 nm sind verwendbar. Andere Lasertypen sind je nach Anwendung einsetzbar. Der Laserstrahl wird über die Spiegel 16, 17, 18 in die optische Einheit 5 eingekoppelt und über diese auf das Substrat 2 fokussiert. Mithilfe der Positioniereinheit 11 ist die optische Einheit 5 so relativ zu dem Substrat 2 positionierbar, daß der Laserstrahl auf jede vorgegebene Stelle auf dem Substrat 2 fokussierbar ist.

[0037] Der mit der Steuereinheit 15 und der Positioniereinheit 11 verbundene Autofokusdetektor 14 erhält über die dichroitischen Spiegel 17, 18 einen Teil des vom Partikel auf dem Substrat reflektierten Laserlichts. Die von dem Autofokusdetektor 14 gemessene Intensität hängt vom Grad der Fokussierung des Lasers auf das Partikel ab. Durch systematische vertikale Verschiebung der Detektionseinheit 3 und durch Messung der jeweils erzielten Signalstärke läßt sich die optimale Fokusposition einstellen.

[0038] Das von den Partikeln auf dem Substrat 2 aufgrund der Einstrahlung mit dem Laserstrahl erzeugte Raman-Streulicht wird über den dichroitischen Spiegel 19 aus dem zur Bildaufnahmeeinrichtung 7 führenden Strahlengang ausgekoppelt und über die Notch-Filtereinheit 19 dem Spektrometer 13 zugeführt, mit dem ein Raman-Spektrum gemessen und an die Datenverarbeitungseinrichtung 10 weitergegeben wird.

[0039] In der Datenverarbeitungseinrichtung 10 ist ferner ein Programm vorgesehen, das jedem detektierten Partikel ein gemessenes Raman-Spektrum zuordnet und diese Information abspeichert und/oder weiterverarbeitet. Es ist ferner in dieser Datenverarbeitungseinrichtung oder einer davon getrennten Datenverarbeitungseinrichtung eine Datenbank abgelegt, die bekannte Raman-Spektren für eine Vielzahl von Partikeln und Substanzen enthält.

[0040] Das erfindungsgemäße Verfahren und der Betrieb der Vorrichtung ist wie folgt.

Erster Schritt: Lokalisierung der Partikel

[0041] In einem ersten Schritt werden die auf dem Substrat 2 befindlichen Partikel über die Detektion des elastisch gestreuten Lichts lokalisiert. **Fig. 3c)** zeigt dabei ein von der Bildaufnahmeeinrichtung 7 in Form der CCD-Kamera aufgenommenes Bild der Partikel auf dem Substrat, in diesem Fall einer Edelmetalloberfläche, das mit der erfindungsgemäßen Streiflichtbeleuchtung erzeugt wurde. Im Vergleich dazu zeigen **Fig. 3a)** und **Fig. 3b)** Bilder, die mit den herkömmlichen Verfahren, wie Auflicht und Dunkel-feldbeleuchtung erzeugt wurden. Mittels der Streiflichtbeleuchtung lassen sich die Partikel als helle Punkte deutlich von der Oberfläche unterscheiden.

Die Oberfläche reflektiert aufgrund der flachen Beleuchtung kaum. So entsteht ein maximaler Kontrast zwischen Oberfläche und Partikel, was die Lokalisierung aller Partikel erlaubt.

[0042] Über die Datenverarbeitungseinrichtung **10** werden die Koordinaten und falls erforderlich die Abmessungen der detektierten Partikel bestimmt. Eine Bestimmung der Anzahl der Partikel ist ebenso möglich.

Zweiter Schritt: Differenzierung in biotische und abiotische Partikel

[0043] In einem zweiten Schritt wird eine Differenzierung der Partikel in biotische und abiotische Partikel über Detektierung des Fluoreszenzlichts vorgenommen. Für die Erfassung der biotischen Partikel wird z.B. die Fluoreszenz universeller Zellinhaltsstoffe verwendet. Dazu werden vor die UV-Lichtquelle geschaltete Anregungsfilter **6c** in Form von Bandpassfiltern verwendet, mit denen die entsprechenden Anregungswellenlängen herausgefiltert werden. Das Fluoreszenzlicht wird dann durch Vorschaltung eines geeigneten Fluoreszenzfilters **5c** in der optischen Einheit **5** herausgefiltert.

[0044] Die Differenzierung in abiotische und biotische Partikel wird in einem Ausführungsbeispiel anhand der Fluoreszenzmessung von in den Zellen biotischer Partikel universell vorkommender Inhaltstoffe NAD(P)H und Riboflavin vorgenommen. Das Coenzym NAD(P)H hat sein Absorptionsmaximum bei ca. 334 nm, die Fluoreszenzwellenlänge liegt bei ca. 470 nm, was im elektromagnetischen Spektrum im sichtbaren blauen Bereich liegt. Riboflavin welches auch ein Coenzym der Zelle ist, wird bei ihrem Absorptionsmaximum bei ca. 365 nm zu einer Fluoreszenz bei ca. 515 nm angeregt. Die Detektionseinheit **3** ermöglicht somit die Erfassung und Differenzierung beider spezifischen Fluoreszenzen der Coenzyme und die anschließende Differenzierung zwischen biotischen und abiotischen Partikeln.

Dritter Schritt: Raman-Spektroskopie einzelner ausgewählter Partikel

[0045] In diesem Schritt wird der Laserstrahl auf ein einzelnes gewünschtes Partikel fokussiert. Die Positionierung des Strahlfokus erfolgt dabei über die Positionierungseinrichtung **11** anhand der zuvor bestimmten Koordinaten und gegebenenfalls den Abmessungen des Partikels. Über den Autofokusdetektor **14** wird eine genaue Fokussierung vorgenommen.

[0046] Dann wird das Partikel über eine vorbestimmte Zeit mit dem Laserstrahl bestrahlt

[0047] Das Raman-Streulicht wird über die optische

Einheit **5** und die Spiegel **17**, **18** und das Filter **19** dem Spektrometer zugeführt und ein Raman-Spektrum für das einzelne Partikel aufgezeichnet, was dann in der Datenverarbeitungseinrichtung **10** abgelegt und/oder weiterverarbeitet wird.

[0048] Anschließend wird für jedes gewünschte Partikel auf dem Substrat ein Raman-Spektrum wie zuvor beschrieben aufgenommen.

[0049] In einem konkreten Beispiel wurden einzelne Mikroorganismen mit einer Anregungswellenlänge von 532 nm gemessen. Wenn ein Spektrum eines Markerpigments detektiert wurde, z.B. Carotinoid, überdeckt das entsprechende Resonanzspektrum das partikelspezifische Raman-Spektrum. Das Pigment kann aber durch die eingestrahlte Energie bei dieser Messung zerstört werden. Durch erneutes Messen der Zelle mit zerstörtem Pigment kann dann das partikelspezifische Spektrum aufgenommen werden. Bei großen Zellen wurden mehrere Messungen entlang der Hauptachse vorgenommen, da es sich hierbei hauptsächlich um eukaryotische Mikroorganismen (Hefen, Pilze) mit Kompartimentierungen der Zelle handelt.

[0050] **Fig. 4** zeigt die gemessenen Raman-Spektren einzelner Bakterien verschiedener Stämme. Die Integrationszeit, d.h. die Belichtungszeit mit der Laser betrug 60s.

Schritt 4: Identifizierung

[0051] Das erhaltene Spektrum wird mittels chemometrischer Verfahren mit bekannten in einer Datenbank abgelegten Spektren verglichen und somit eine Identifizierung des Partikels vorgenommen. Die Identifizierung von biotischen Partikeln erfolgt dabei anhand charakteristischer Markermoleküle, wie z.B. DNA bzw. Proteinen.

[0052] **Fig. 5** zeigt die durchschnittliche Erkennungsrate von Bulk-Spektren von Bakterien, die durch Messung eines Bakterienausstrichs auf der Trägeroberfläche erzeugt sind.

Abwandlungen

[0053] Abwandlungen der grundlegenden Schritte der Erfindung und der zugehörigen Vorrichtung sind möglich.

[0054] In einer Abwandlung erfolgt die Lokalisierung der Partikel auf dem Substrat unter Verwendung von sichtbarem Licht anstelle von UV-Licht. In einer weiteren Abwandlung wird die zur Lokalisierung und Differenzierung eingestrahlte Lichtleistung, insbesondere bei der Verwendung von UV-Licht, so gewählt, daß die Vitalität der biotischen Partikel erhalten bleibt.

[0055] In einer weiteren Anwendung ist der Träger 1 gekühlt, um eine Zerstörung der Partikel aufgrund von Erwärmung durch die eingestrahelte Leistung zu verhindern.

[0056] Bei großen Substraten erfolgt die Lokalisierung bereichsweise. Anschließend werden die Bilder der Bereiche zu einem Gesamtbild zusammengesetzt. Somit lassen sich große Flächen untersuchen.

[0057] In einer weiteren Abwandlung wird der Differenzierungsschritt weggelassen. Der Aufwand bei der Auswertung ist dann größer, weil Raman-Spektren von abiotischen Partikeln mitaufgenommen werden und die Differenzierung zu biotischen Partikeln über die Differenzierung der Raman-Spektren erfolgen muß.

[0058] In einer weiteren Abwandlung wird eine oberflächenverstärkte Raman-Spektroskopie (Surface Enhanced Raman Spectroscopy SERS) oder eine oberflächenverstärkte Resonanz-Raman-Spektroskopie (Surface Enhanced Resonance Raman Spectroscopy SERRS) durchgeführt. Dabei wird ein einzelner Mikroorganismus vom Substrat entfernt, z.B. mithilfe eines Mikromanipulators und einer Mikropumpe, und dieser anschließend zerstört, z.B. durch Schockgefrieren oder Ultraschall. Anschließend wird ein Edelmetallkolloid, vorzugsweise Gold oder Silber, zugegeben und der zerstörte Mikroorganismus im Kolloid mit einer geeigneten Anregungswellenlänge, z.B. 532, 633, 785 oder 830nm bestrahlt und das Raman-Spektrum aufgenommen.

[0059] **Fig. 7a)** zeigt SERS-Spektren von zerstörten E. coli in ansteigender (b-e) Konzentration der Zellsuspensionen im Silberkolloid bei einer Integrationszeit von 120s. a zeigt das reine Kolloid. **Fig. 7b)** zeigt SERS-Spektren von fünf verschiedenen Spezies.

[0060] Die Aufnahme eines SERS-Spektrums bzw. eines SERRS-Spektrums erfolgt zusätzlich insbesondere dann, wenn die Aufnahme eines Raman-Spektrums auf dem Substrat in der Vorrichtung kein eindeutiges Spektrum liefert und eine weitere Identifizierung erforderlich ist.

[0061] Es ist auch möglich einzelne Partikel nach der Lokalisierung und Identifizierung in der erfindungsgemäßen Vorrichtung zu entnehmen und für eine weitergehende Untersuchung anzuzüchten.

[0062] In einer weiteren Abwandlung wird eine UV-Raman-Spektroskopie durchgeführt. Die Anregungswellenlängen sind in diesem Fall 264, 257, 244, 238 und 229nm. Der Träger 1 ist bevorzugt tiefgekühlt auf eine Temperatur kleiner als -100°C . Der Abstand des Mikroskopobjektivs der optischen Einheit 5 vom Substrat 2 ist größer als bei der normalen Raman-Spektroskopie. Das Abkühlen bei der UV-Ra-

man-Spektroskopie hat den Vorteil, daß thermische Schäden am biotischen Partikel verhindert oder reduziert werden. Das Partikel kann nach der Messung für eine Züchtung verwendet werden.

[0063] **Fig. 8** zeigt die UV-Raman-Spektren einer Auswahl an gemessenen Mikroorganismen. Die Anregungswellenlänge beträgt beispielhaft 244 nm, die Laserleistung auf dem Substrat ca. 5-8 mW.

[0064] In einer weiteren Abwandlung wird ein Bruchteil des Raman-Signals auf eine hochempfindliche Photodiode ausgekoppelt und das entsprechende Meßsignal als Referenz für die Einstellung der optimalen Meßzeit verwendet.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Identifizieren von Biopartikeln mit den Schritten:

Lokalisierung einzelner Partikel auf einem Substrat (2) durch Abbilden wenigstens eines Bereichs des Substrats durch Bestrahlung mittels Licht von einer ersten Lichtquelle und Messung des von den Partikeln reflektierten Lichts in einer Vorrichtung (100); Bestrahlung eines lokalisierten Partikels mit einem von der ersten Lichtquelle verschiedenen Laser und Erzeugen eines Raman-Spektrums in der Vorrichtung (100); Identifizieren des Partikels durch Vergleich des erzeugten Raman-Spektrums mit für eine Mehrzahl von verschiedenen Partikeln abgelegten Raman-Spektren.

2. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß eine Differenzierung durch Messung der Fluoreszenzanregung von universell in biotischen Partikeln vorkommenden Stoffen, bevorzugt von NAD(P)H und/oder Riboflavin, erfolgt.

3. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 11 mit einem Substrat (2); einer Detektionseinheit (3) mit einer ersten Lichtquelle zum Lokalisieren von einzelnen Partikeln auf dem Substrat; und einer Identifizierungseinrichtung (4) mit einem Laser zum Identifizieren eines einzelnen Partikels über Raman-Spektroskopie.

4. Verfahren nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch einen Schritt des Differenzierens zwischen biotischen und abiotischen Partikeln über Messung des Fluoreszenzlichts der Partikel bei dem oder nach dem Schritt des Lokalisierens.

5. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß zum Lokalisieren und/oder Differenzieren UV-Licht verwendet wird.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Bestrahlung beim Schritt des Lokalisierens mit Streiflicht erfolgt.

eine ringförmig über dem Substrat vorgesehene Strahlungsquelle (6d) umfaßt.

Es folgen 8 Blatt Zeichnungen

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Differenzierung durch Messung der Fluoreszenzanregung von universell in biotischen Partikel vorkommenden Stoffen, bevorzugt von NAD (P) H und/oder Riboflavin, erfolgt.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, gekennzeichnet durch einen Schritt des Bestimmens der Formparameter des einzelnen lokalisierten Partikels.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, gekennzeichnet durch einen Schritt des Bestimmens der Gesamtzahl der lokalisierten Partikel.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß der Schritt des Bestrahleins einen Schritt des Fokussierens des Laserstrahls auf die Position des einzelnen ausgewählten Partikels umfaßt.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß ein Raman-Spektrum, ein UV-Raman-Spektrum oder ein SERS- oder ein SERRS-Raman-Spektrum aufgenommen wird.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Bestrahlungsdauer mit dem Laser auf der Grundlage eines Signals gewählt wird, das durch Auskoppeln eines Bruchteils des Raman-Signals und Messen der Stärke des ausgekoppelten Signals bestimmt wird.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Strahlungsleistung bei dem Schritt des Lokalisierens und/oder bei dem Schritt des Bestrahleins mit dem Laser so gewählt wird, daß die Vitalität der Zellen erhalten bleibt.

14. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 11 mit einem Substrat (2); einer Detektionseinheit (3) zum Lokalisieren von einzelnen Partikeln auf dem Substrat; und einer Identifizierungseinrichtung (4) zum Identifizieren eines einzelnen Partikels über Raman-Spektroskopie.

15. Vorrichtung nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Detektionseinheit (3) eine UV-Beleuchtungseinrichtung (6) umfaßt mit der das Substrat (2) unter Streiflichteinfall beleuchtet wird.

16. Vorrichtung nach Anspruch 13 dadurch gekennzeichnet, daß die Beleuchtungseinrichtung (6)

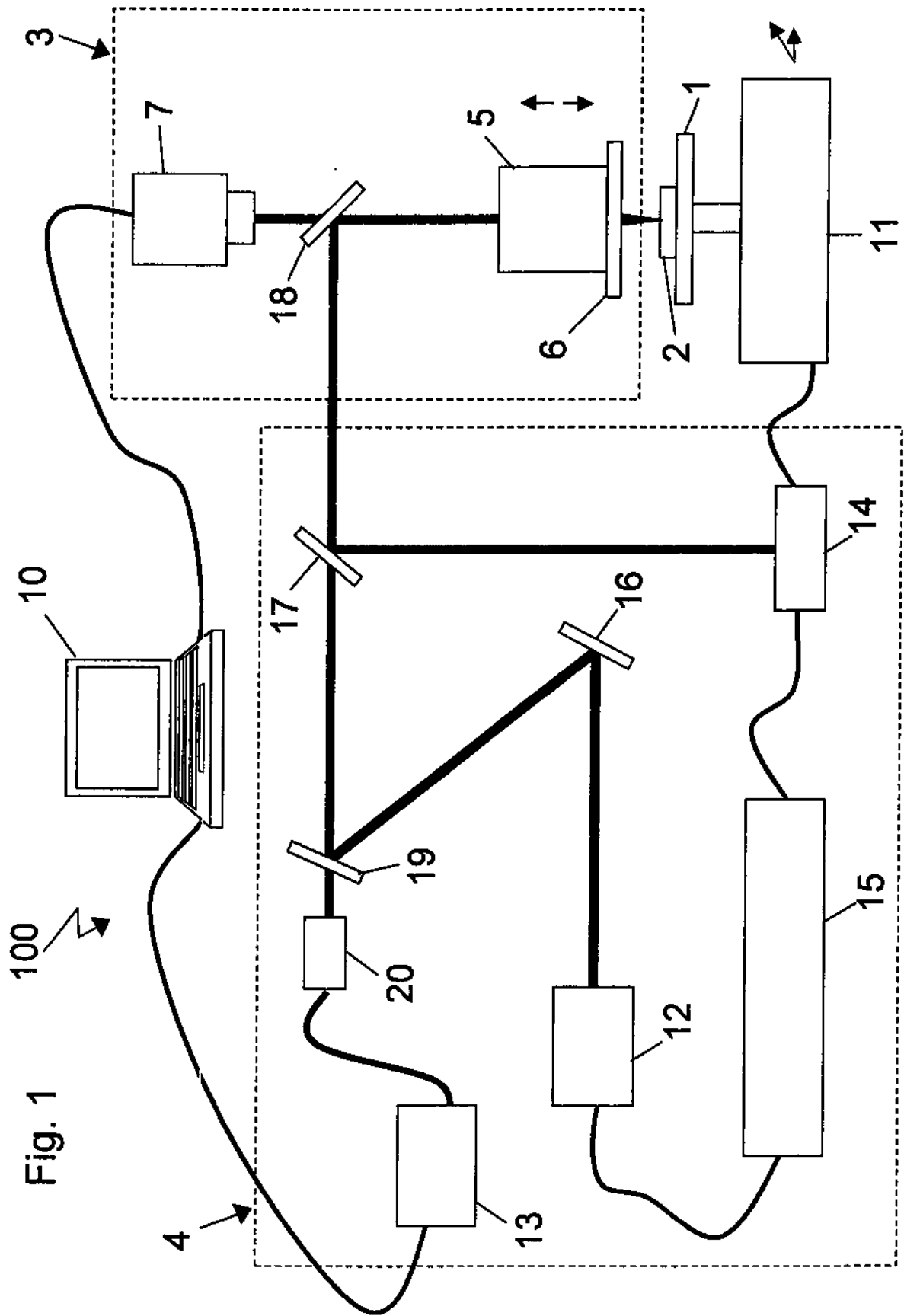


Fig. 1

FIG. 2

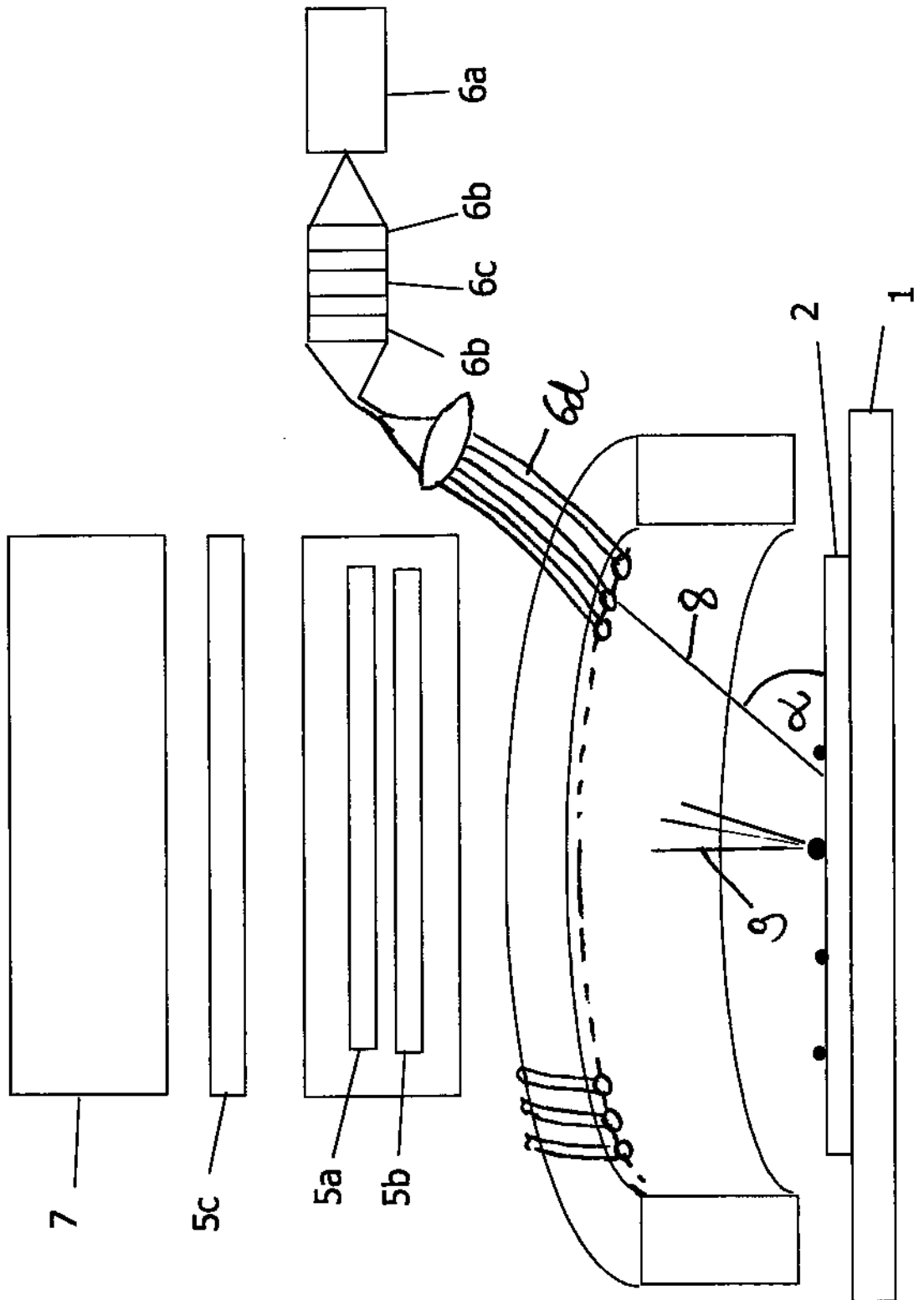


Fig. 3c Streiflicht



Fig. 3b Dunkelfeld

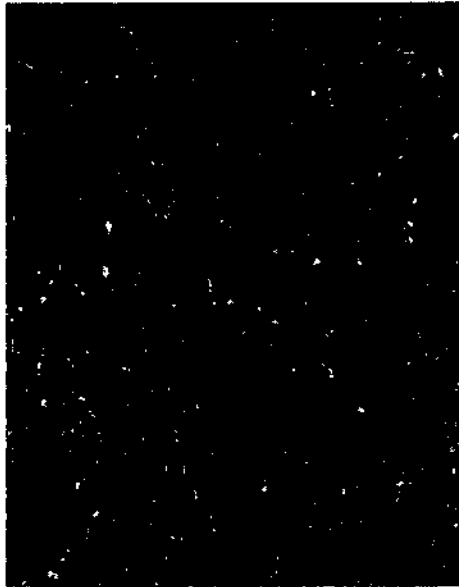


Fig. 3a Auflicht



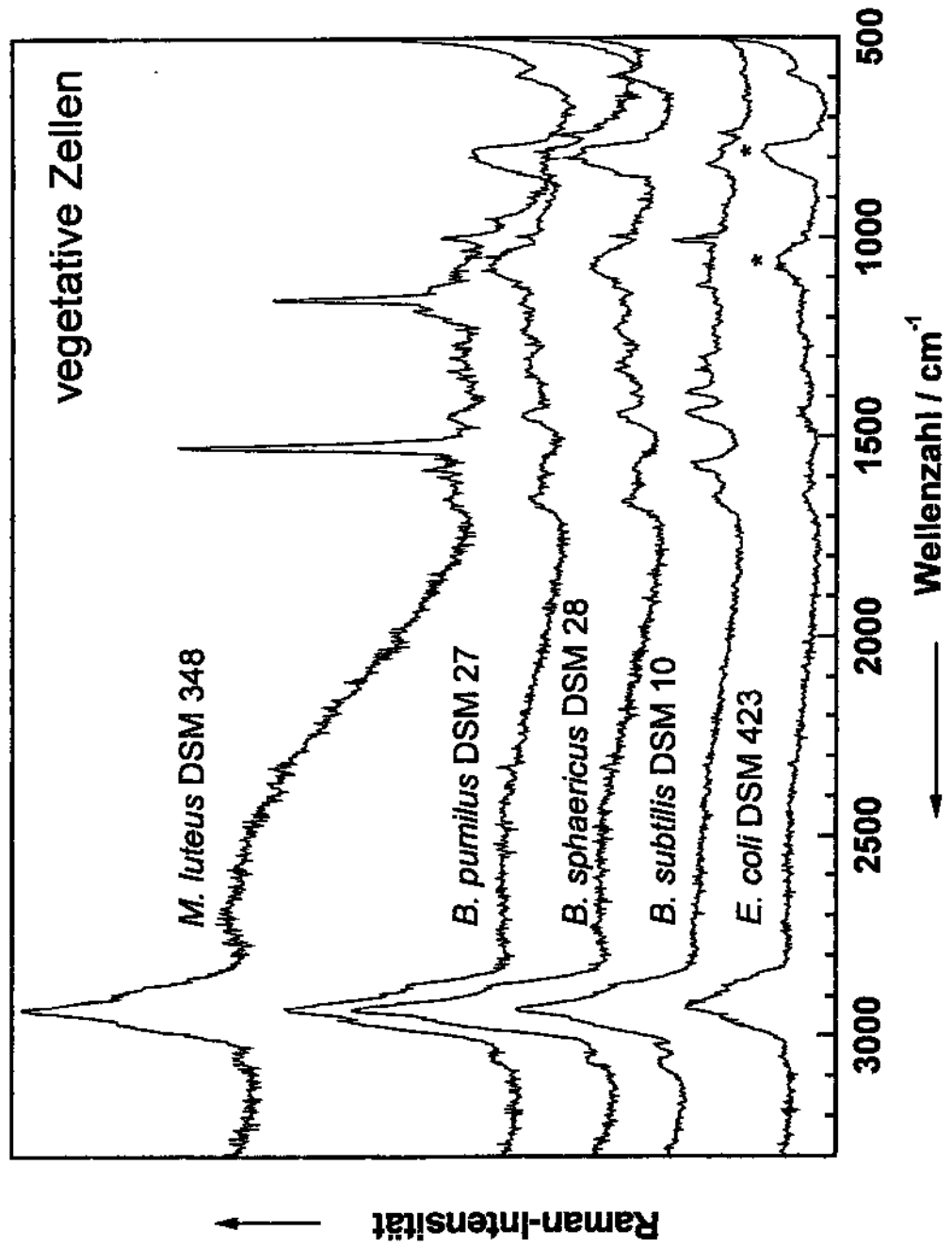


FIG. 4

FIG: 5

Name	Anzahl Spektren	Falsch- Klassifizierung		Erkennungsrate		Falsch- Klassifizierung		Erkennungsrate	
		Stamm	Art	Stamm (%)	Art (%)	Stamm	Art	Stamm (%)	Art (%)
<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> DSM 10	16	0	0	100	100	0	0	100	100
<i>B. subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> DSM 347	10	0	0	100	100	0	0	100	100
<i>M. luteus</i> DSM 20030	20	0	0	100	100	0	0	100	100
<i>M. luteus</i> DSM 348	12	0	0	100	100	0	0	100	100
<i>B. pumilus</i> DSM 27	12	0	0	100	100	0	0	100	100
<i>B. pumilus</i> DSM 361	12	0	0	100	100	0	0	100	100
<i>B. sphaericus</i> DSM 28	14	0	0	100	100	0	0	100	100
<i>B. sphaericus</i> DSM 396	16	1	1	84	84	0	0	100	100
<i>E. coli</i> DSM 423	12	0	0	100	100	0	0	100	100
Durchschnittliche Erkennungsrate				98,2	98,2			100	100

FIG. 6

Name	Anzahl Spektren	Falsch- Klassifizierung		Erkennungsrate		Falsch- Klassifizierung		Erkennungsrate	
		Stamm	Art	Stamm (%)	Art (%)	Stamm	Art	Stamm (%)	Art (%)
<i>B. subtilis</i> subsp. subtilis DSM 10	307	3	3	99	99,0	3	3	99,0	99,0
<i>B. subtilis</i> subsp. spizizenii DSM 347	21	1	1	95,2	95,2	1	1	95,2	95,2
<i>M. luteus</i> DSM 20030	24	1	1	95,8	95,8	1	1	95,8	95,8
<i>M. luteus</i> DSM 348	623	5	5	99,2	99,2	5	5	99,2	99,2
<i>B. pumilus</i> DSM 27	35	8	8	77,2	82,9	6	6	82,9	82,9
<i>B. pumilus</i> DSM 361	20	6	6	70,0	80,0	4	4	80,0	80,0
<i>B. sphaericus</i> DSM 28	53	8	8	84,9	86,8	7	7	86,8	86,8
<i>B. sphaericus</i> DSM 396	20	3	3	85,0	85,0	3	3	85,0	85,0
<i>E. coli</i> DSM 423	31	8	8	74,2	74,2	8	8	74,2	74,2
Durchschnittliche Erkennungsrate:				86,7	88,6			88,6	88,6

FIG. 7a)

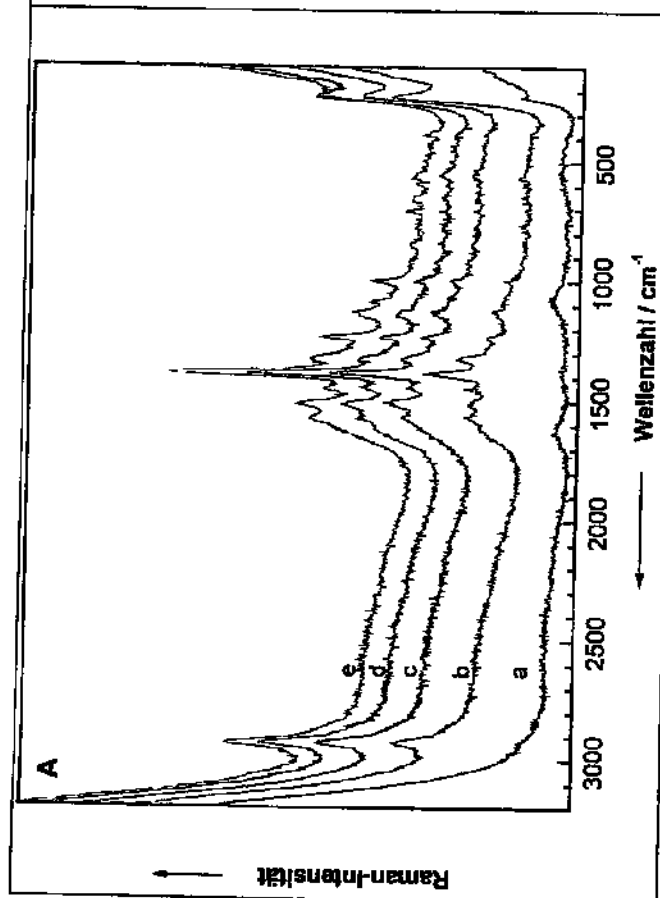
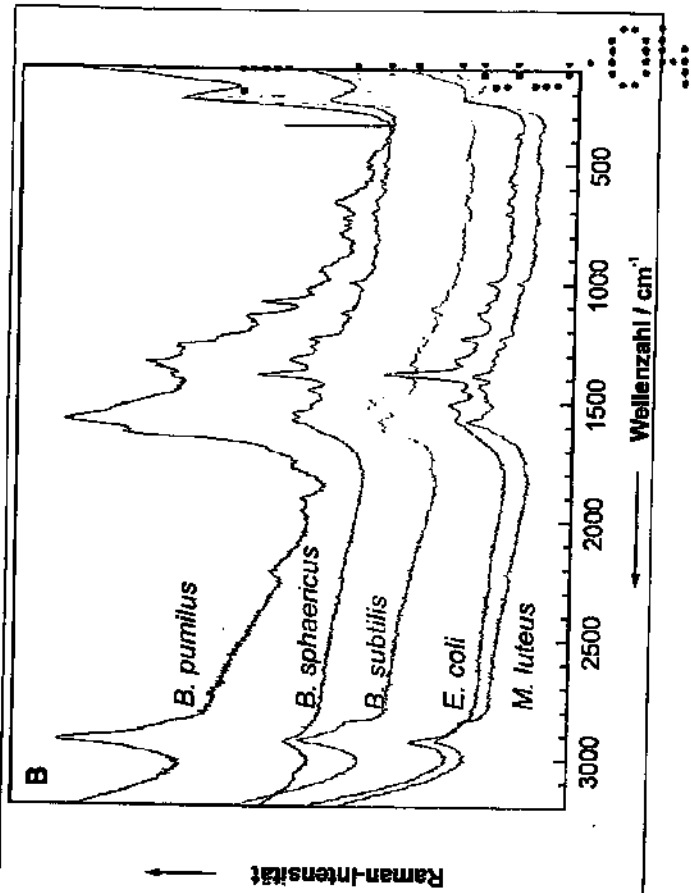


FIG. 7b)



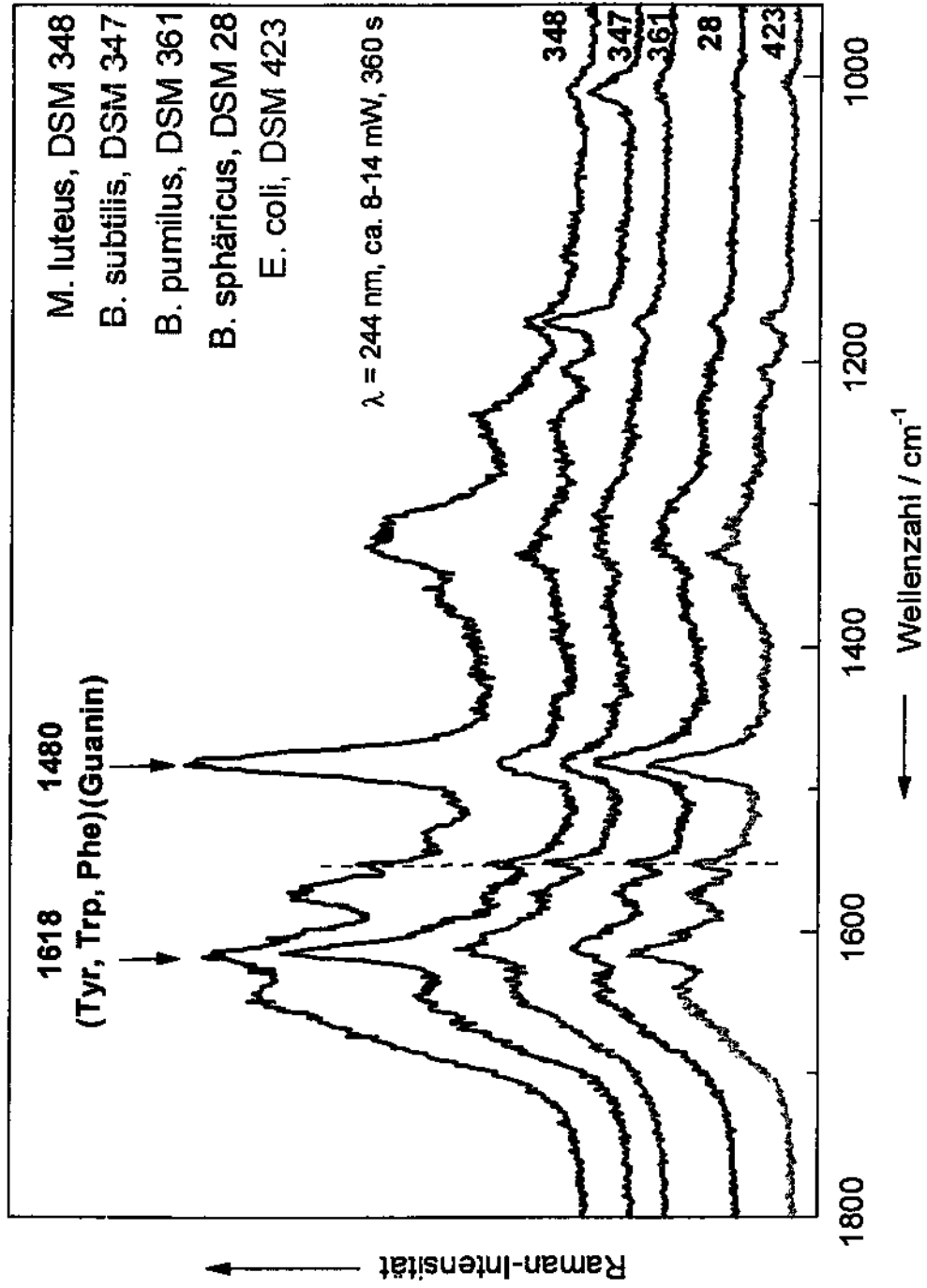


FIG. 8