(19) Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 10 2017 009 804 A1** 2019.04.25

(12) # Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: **10 2017 009 804.2**
(22) Anmeldetag: **20.10.2017**
(43) Offenlegungstag: **25.04.2019**

(51) Int Cl.: ***G01N 21/64*** (2006.01)
G01N 1/28 (2006.01)
G02B 21/00 (2006.01)
G03B 13/34 (2006.01)
G06K 9/00 (2006.01)
C12Q 1/02 (2006.01)

(71) Anmelder:
vermicon AG, 80992 München, DE

(74) Vertreter:
Patentanwälte Henkel, Breuer & Partner mbB, 80333 München, DE

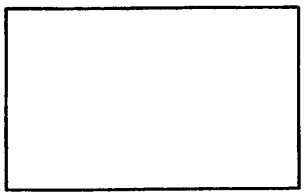
(72) Erfinder:
Snaidr, Jiri, Dr., 80992 München, DE; Beimfohr, Claudia, Dr., 80992 München, DE; Bonsen, Axel, 80992 München, DE; Mühlhahn, Peter, Dr., 80992 München, DE

(56) Ermittelter Stand der Technik:
siehe Folgeseiten

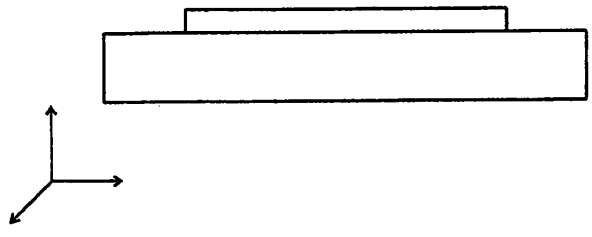
Prüfungsantrag gemäß § 44 PatG ist gestellt.

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen.

(54) Bezeichnung: **Verfahren zur Bewertung von mikroskopischen Proben und Vorrichtung zur Ausführung dieses Verfahrens**



(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bewertung von mikroskopischen Proben und eine Vorrichtung zur Ausführung dieses Verfahrens. Das erfindungsgemäße Verfahren umfasst die Schritte: Bereitstellen einer Trägers 1 mit mikroskopischen Proben 7; Anordnen des Trägers 1 auf einem Mikroskoptisch 9; Abbilden unter Vergrößerung eines Ausschnitts 3 des Trägers 1 mittels einer Digitalkamera 5 und einer vergrößernden Optik 11; wobei der gleiche Ausschnitt 3 mehrfach abgebildet wird, wobei während des Abbildens von aufeinanderfolgenden Abbildungen eine Fokusebene der Abbildungen verschoben wird; Erstellen einer kombinierten Abbildung aus den mehreren aufeinanderfolgenden Abbildungen; und Auswerten der kombinierten Abbildung zur Bewertung der mikroskopischen Proben.



(56) Ermittelter Stand der Technik:

DE	**102 20 824**	**B4**
DE	**103 59 780**	**B4**
DE	**199 44 516**	**B4**
DE	**10 2004 047 928**	**B4**
DE	**10 2016 116 620**	**B3**
DE	**101 49 357**	**A1**
DE	**102 37 470**	**A1**
DE	**102 41 290**	**A1**
DE	**195 02 472**	**A1**
DE	**10 2007 045 897**	**A1**
DE	**10 2013 006 994**	**A1**
DE	**10 2015 107 367**	**A1**
DE	**10 2015 115 615**	**A1**
DE	**10 2016 116 311**	**A1**
DE	**10 2016 125 255**	**A1**
DE	**20 2017 003 181**	**U1**
US	**7 646 482**	**B2**
US	**6 055 097**	**A**
US	**5 745 239**	**A**
EP	**1 929 939**	**B1**
EP	**1 258 766**	**A2**
WO	**00/ 25 113**	**A1**
WO	**2008/ 125 605**	**A2**
WO	**2017/ 013 054**	**A1**

Beschreibung

[0001] Die Anmeldung betrifft ein Verfahren zur Bewertung von mikroskopischen Proben und eine Vorrichtung zur Ausführung dieses Verfahrens.

[0002] Zur Quantifizierung von Bakterien in einem größeren Flüssigkeitsvolumen, beispielsweise 100ml oder mehr, werden bei mikrobiologischen Untersuchungen die zu untersuchende Flüssigkeit filtriert. Üblicherweise werden hierzu Filter mit einer Seitenlänge oder Durchmesser von ca. 2,5cm verwendet. Anschließend werden die Mikroorganismen in bekannter Weise durch Kultivieren der Filter auf Agarplatten und nachfolgender optischer Bestimmung von Mikrokolonien analysiert.

[0003] Als moderne Methoden zur Bestimmung von Mikroorganismen, vorzugsweise Bakterien, auf Filtern hat sich mittlerweile eine spezifische Färbemethode, die sogenannte Fluoreszenz in Situ Hybridisierung (Fish) etabliert. Hierbei werden die Zellen auf einem Träger/Filter durch fluoreszenzmarkierte Nukleinsäure-Sondenmoleküle unter einem Mikroskop sichtbar gemacht. Dieses Verfahren ist in: Amman et. all Microbial. Rev. 59 (1995), Seiten 143 - 169 beschrieben.

[0004] In anderen Ausführungsformen können spezifische Färbemethoden auf das Filter selbst angewendet werden, und die fluoreszenzmarkierten Mikroorganismen können mittels Fluoreszenzmikroskops gezählt werden.

[0005] Da das Filter in der Fläche wesentlich größer als das Gesichtsfeld des Mikroskops ist, müssen zur vollständigen Quantifizierung der Mikroorganismen auf dem Filter eine Vielzahl von Gesichtsfeldern bzw. Ausschnitten ausgezählt werden. Je nach Vergrößerung, Größe des Ausschnitts und Größe des Filters können einige 10.000 Ausschnitte vorliegen, die einzeln ausgewertet werden müssten.

[0006] Bei einer hohen Konzentration der Mikroorganismen hat sich daher eingebürgert, nur eine statistisch repräsentative Anzahl von 10 - 100 Ausschnitten zu zählen, und das Ergebnis entsprechend auf die gesamte Fläche hochzurechnen. Diese Vorgehensweise ist allerdings ungenau und mit großen Fehlern behaftet. Auch ist das händische Auszählen der Mikroorganismen in einem Ausschnitt oft schwierig.

[0007] Um dieses Problem zu lösen, ist es bekannt, das Filter mithilfe von automatischen Mikroskopen, die über einen motorbetriebenen XYZ-Tisch verfügen, abzufahren und von jedem Ausschnitt über eine Digitalkamera eine Abbildung zu machen, das heißt ein digitales Bild aufzunehmen. Dieses Bild kann dann mit einer Mustererkennung bzw. Objekterkennung in bekannter Weise analysiert werden.

[0008] Aktuelle Ausgestaltungen dieser automatischen Mikroskope benötigen für die Auswertung eines Trägers/Filters der oben genannten Art immer noch mehr als zwölf Stunden.

[0009] Ein Problem bei diesem Verfahren besteht darin, dass das Filter nicht vollständig eben ist. Das heißt, für jede Aufnahme muss zunächst die Fokusebene eingestellt werden, sodass eine scharfe Abbildung erhalten wird.

[0010] Dieser Fokussierungsvorgang auf eine Zielebene, in der die zu erkennenden Mikroorganismen scharf abgebildet sind, wird beim Stand der Technik dadurch gelöst, dass über ein Hilfssystem, beispielsweise ein separat eingespeister Lasterstrahl, die Oberfläche des Filters detektiert wird, und anschließend der Z-Motor des Mikroskoptisches so verfahren wird, dass die Filteroberfläche im Fokus liegt. Aufgrund der fehlenden Planarität des Filters, die vorangehend angesprochen wurde, ist dieser Fokussiervorgang für jeden Ausschnitt zu wiederholen. Dieser Fokussiervorgang ist im Vergleich zu der eigentlichen Aufnahme der digitalen Abbildung sowie zu dem Verfahren des Tisches in XY-Richtung der zeitintensivste Schritt des gesamten Vorgangs.

[0011] Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein neues Verfahren zur Bewertung von mikroskopischen Proben und eine entsprechende Vorrichtung bereitzustellen, die zuverlässig und schnell die Anzahl der zu untersuchenden mikroskopischen Proben auf einem Träger bestimmen kann.

[0012] Gelöst wird diese Aufgabe durch ein Verfahren gemäß Anspruch 1 und eine Vorrichtung nach Anspruch 10. Die abhängigen Ansprüche beziehen sich auf weitere vorteilhafte Ausgestaltungen der Erfindung.

[0013] Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren zur Bewertung von mikroskopischen Proben wird zunächst ein Träger mit darauf ausgebildeten mikroskopischen Proben bereitgestellt. Dieser Träger wird auf einem Mikro-

skoptisch angeordnet. Mit Hilfe einer Digitalkamera und einer vergrößernden Optik wird ein Ausschnitt des Trägers abgebildet.

[0014] Das erfindungsgemäße Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, dass der gleiche Ausschnitt mehrfach abgelichtet wird, wobei während des Abbildens von aufeinanderfolgenden Abbildungen eine Fokusebene der Abbildungen verschoben wird.

[0015] Aus den so gewonnenen mehreren aufeinanderfolgenden Abbildungen wird eine kombinierte Abbildung erstellt. Diese kombinierte Abbildung wird zur Bewertung der mikroskopischen Proben ausgewertet.

[0016] Da erfindungsgemäß kein Fokussierschritt für die einzelnen Abbildungen nötig ist, ist das Verfahren nur durch die Belichtungszeit der einzelnen Aufnahmen bestimmt, und somit wesentlich schneller als das bekannte Verfahren.

[0017] In einer bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens wird die kombinierte Abbildung dadurch erhalten, dass für jedes Pixel der kombinierten Abbildung der maximale Wert der positionsmäßig korrespondierenden Pixel der mehreren aufeinanderfolgenden Abbildungen bestimmt wird.

[0018] Es wird davon ausgegangen, dass ein Pixel einer Abbildung den maximalen Wert dann einnimmt, wenn diese Abbildung die Fokusebene in der Ebene des abzubildenden Objekts, also der mikroskopischen Probe, hat. In den Bereichen des Ausschnitts, in denen keine mikroskopische Probe vorhanden sind, in denen also keine Fluoreszenz stattfindet, wird zwar ebenfalls der Maximalwert der Pixel herangezogen, dieser ist jedoch nur durch das Rauschen bestimmt, und wird sich deutlich von einem positiven Befund unterscheiden.

[0019] Bei einer weiteren Ausgestaltung der Erfindung wird die kombinierte Abbildung mittels automatischer Mustererkennung, insbesondere beruhend auf einem Histogram of Oriented Gradients (HOG) in Kombination mit einem Lernalgorithmus mittels Support Vector Machine (SVM) ausgewertet.

[0020] HOG in Verbindung mit SVM ist eine bekannte Technik zur Mustererkennung, die beispielsweise für Gesichtserkennung oder die Erkennung von Handschriften verwendet wird. Beispiele derartiger Mustererkennung sind etwa in Hamayun A. Khan, „MCS HOG Features and SVM Based Handwritten Digit Recognition Systems“, Journal of Intelligent Learning Systems and Applications, 2017, 9, Seiten 21-33 oder in Chandrasheka, T.R. et. all. „Face Recognition Based on Histogram of Oriented Gradients, Local Binary Pattern and SVM/HMM Classifiers“, International Journal of Engineering Sciences and Research Technology, August 2014, Seiten 344-352, beschrieben.

[0021] Die erfindungsgemäß gewonnene kombinierte Abbildung ist für das menschliche Auge nicht scharf. Jedoch ermöglicht die oben beschriebene Mustererkennung, wenn entsprechende Parametersätze in einer speziell dafür vorbereiteten Datenbank hinterlegt werden, eine zuverlässige und schnelle Erkennung von Mikroorganismen auf dem Träger/Filter.

[0022] Gemäß einem weiteren Aspekt der Erfindung werden verschiedene Ausschnitte des Trägers sequenziell in das Gesichtsfeld der Digitalkamera und der Optik gebracht, wobei für jeden Ausschnitt mehrere Abbildungen mit verschiedenen Fokusebenen erstellt werden, für jeden Ausschnitt eine kombinierter Abbildung erstellt und ausgewertet wird, und wobei anhand der Auswertung aller Ausschnitte die mikroskopischen Proben auf dem Träger insgesamt bewertet werden.

[0023] Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren kann der XYZ-Tisch des Mikroskops automatisch von einem Ausschnitt zum nächsten verfahren werden, bis das gesamte Filter/der gesamte Träger abgetastet ist. Auf diese Art ist eine schnelle und vollständige Auswertung des Filters/Trägers möglich.

[0024] Erfindungsgemäß ist der Träger ein Filter, der zur Filtrierung einer mit Mikroorganismen kontaminierten Flüssigkeit verwendet und eingefärbt wurde. Anstelle eines Filters kann auch die Oberfläche einer mit Agar oder einem anderen Kulturmedium gefüllte Schale abgetastet werden.

[0025] Weiter ist es bevorzugt, dass im Mittel zwischen je zwei aufeinanderfolgenden Abbildungen der Abstand zwischen dem Träger und der Digitalkamera um 1 - 10µm, besonders bevorzugt um 2µm verändert wird, um dadurch die Fokusebene zu verändern.

[0026] Die Auswahl des Abstands ist in Abhängigkeit der Größe der untersuchten Mikroorganismen oder Mikrokolonien so zu wählen, dass eine hinreichend große Wahrscheinlichkeit besteht, jeden Mikroorganismus tatsächlich in einer der Abbildungen eines Stapels von aufeinanderfolgenden Abbildungen mindestens einmal im Fokus zu haben. Darüber hinaus soll der Abstand auch hinreichend klein sein, um selbst bei einer Mehrzahl von Aufnahmen keine signifikante Änderung des Ausschnitts aufgrund der Vergrößerung oder Verkleinerung des Abstands zwischen Träger und Digitalkamera zu haben. Das heißt, bei den üblichen digitalen Abbildungen, bei der die Pixel in Zeilen und Spalten angeordnet sind, entspricht ein in einer bestimmten Zeile und einer bestimmten Spalte angeordnetes Pixel einer ersten Abbildung annähernd demselben Ort auf dem Filter wie bei jeder anderen Abbildung des gleichen Ausschnitts auch bei verändertem Abstand zwischen Träger und Kamera.

[0027] Auf diese Art ist es einfach möglich, die Fokusebene in kleinen Schritten zu ändern, wobei nur der Mikroskoptisch in Z-Richtung bewegt werden muss.

[0028] Es ist dabei nicht erforderlich, dass der Abstand während der Belichtungszeit einer Abbildung konstant bleibt.

[0029] Alternativ dazu ist es natürlich auch möglich, die Optik zu verstellen, so dass sich die Fokusebene ändert, oder die Digitalkamera zu verschieben, und den Träger ortsfest zu halten.

[0030] Gemäß einem weiteren vorteilhaften Verfahren der Erfindung ist es vorgesehen, zunächst eine Ausgangsfokusebene zu bestimmen, wobei verteilt über das Filter mehrere Fokuswerte für scharfe Abbildungen einzelner Ausschnitte ermittelt werden, und wobei eine Ausgangsfokusebene für die aufeinanderfolgenden Abbildungen der übrigen Ausschnitte beruhend auf dem Mittelwert der mehreren Fokuswerte, dem Ausmaß der Veränderung der Fokusebene zwischen aufeinanderfolgenden Abbildungen und der Anzahl der aufeinanderfolgenden Aufnahmen für eine kombinierte Aufnahme berechnet wird.

[0031] Wenn beispielsweise 16 Abbildungen eines Ausschnitts mit einem Abstand der Fokusebene von 2µm gemacht werden sollen, so ist es sinnvoll, die erste Fokusebene um 8µm versetzt hinter den durch die Mittelwertsbildung der Fokuswerte ermittelte Ebene zu setzen, und anschließend in 2µm Schritten den Abstand zwischen der Digitalkamera und dem Träger zu vergrößern. In diesem Fall, werden Abbildungen mit Fokusebenen in einem Bereich von plus minus 8µm um den oben ermittelten Mittelwert zu erhalten.

[0032] Weiter ist es vorteilhaft, das für jeden Ausschnitt zwischen 5 und 50, vorzugsweise zwischen 10 und 30 insbesondere bevorzugt 16 aufeinanderfolgende Abbildungen erzeugt werden, und zu einer kombinierten Abbildung verarbeitet werden.

[0033] Es hat sich gezeigt, dass ein Bereich von 32µm ausreicht, um bei üblichen Filtern der eingangs beschriebenen Art eine brauchbare kombinierte Abbildung zu erhalten.

[0034] Des Weiteren ist es bevorzugt, die Fokusebene kontinuierlich oder Schrittweise zu verändern. Ob eine kontinuierliche oder Schrittweise Veränderung der Fokusebene gewählt wird, hängt von der Belichtungszeit einerseits und vor allem der Verstellgeschwindigkeit der Fokusebene ab. Als vorteilhaft hat es sich erwiesen, die Fokusebene in Stufen zu verfahren, eine Wartezeit einzuhalten, und dann die Fokusebene um eine weitere Stufe zu verfahren. Dies kann dadurch geschehen, dass die Belichtungszeit der Kamera und das Mittel zum Verstellen der Fokusebene synchronisiert werden. Alternativ ist es auch möglich, nur über eine Zeitsteuerung der Kamera und des Mikroskoptisches sicherzustellen, dass eine Mehrzahl von Abbildungen des selben Ausschnitts mit unterschiedlichen Fokusebenen zu erhalten. Dies ist insbesondere dann vorteilhaft, wenn ein komplizierter Aufbau und eine komplizierte Steuerung vermieden werden sollen.

[0035] Die erfindungsgemäße Vorrichtung zur Ausführung des oben genannten Verfahrens umfasst einen Mikroskoptisch zum Anordnen eines Trägers, eine Digitalkamera und eine vergrößernde Optik zum Abbilden einer Vergrößerung eines Ausschnitts des Trägers, Mittel zum Verändern einer Fokusebene der Digitalkamera und der vergrößernden Optik in Bezug auf den Träger, eine Steuerung zur Steuerung der Abbildung durch die Digitalkamera und der Veränderung der Fokusebene, um so mehrere Abbildungen eines Ausschnitts des Trägers mit unterschiedlichen Fokusebenen zu erzeugen, und eine Auswertungseinheit, die ausgestaltet ist, um eine kombinierte Abbildung aus den mehreren aufeinanderfolgenden Abbildungen zu erzeugen und um die kombinierte Abbildung zur Bestimmung der mikroskopischen Proben auszuwerten.

[0036] Im Folgenden wird die Erfindung anhand von bevorzugten Ausführungsformen und anhand der beiliegenden Figuren beschrieben.

Fig. 1: ist eine schematische Ansicht der erfindungsgemäßen Vorrichtung;

Fig. 2: ist eine schematische Ansicht des Trägers mit dem Ausschnitt und den Proben, die erfindungsgemäß auszuwerten sind;

Fig. 3: ist ein Flussdiagramm zur Erläuterung des Verfahrens der Erfindung.

[0037] Die Erfindung beruht im Wesentlichen darauf, das anstatt für jedes Gesichtsfeld/Ausschnitt des Trägers, zu versuchen, ein scharfes fokussiertes Bild aufzunehmen, eine schnelle Folge von Bildern aufgenommen wird, während gleichzeitig der Mikroskoptisch **9** in **Fig. 1** in Z-Richtung verfahren wird. Innerhalb dieser aufgenommenen Abbildungsfolge (beispielsweise 16 Bilder mit einem Abstand in Z-Richtung von 2µm) befinden sich mehrere Abbildungen, in denen die Mikroorganismen/Zellen scharf abgebildet sind. Durch ein Verrechnungsverfahren wird aus diesem Abbildungsstapel ein Gesamtbild errechnet, welches alle Informationen der nacheinander aufgenommenen Abbildungen enthält, und damit natürlich auch die Information der fluoreszenzmarkierten Zellen.

[0038] Die Darstellung der Zellen unterscheidet sich dabei naturgemäß von derjenigen, wie sie für eine fokussierte Abbildung der Zellen zu finden wäre. Da zur Objekterkennung ein lernender Algorithmus eingesetzt wird, kann die Zelle dennoch als Zelle erkannt werden, da der Erkennungsalgorithmus auf die Darstellung im Gesamtbild trainiert ist, und nicht auf ein fokussiertes Bild der Zelle abstellt.

[0039] Durch dieses Verfahren ist es möglich, auf eine automatische Fokussierung zu verzichten, um es auch einfachen Mikroskopen ohne mechanische und elektronische Fokussierung in einer möglichst kurzen Zeit von weniger als zwei Stunden zu ermöglichen, einen Träger der eingangsgenannten Art zu vermessen und auszuwerten. Durch den Verzicht auf eine technisch aufwendige und teure Autofokussierung können kostengünstige Fluoroszenzmikroskope für eine automatische Auswertung aufgerüstet werden.

[0040] Wie oben ausgeführt, wird ein Abbildungsstapel aus Einzelbildern, die in verschiedenen Ebenen fokussiert sind, an einer beliebigen Position auf einem Filter/Träger aufgenommen. Die Abbildungen eines so aufgenommenen Abbildungsstapels unterscheiden sich nur von der Fokusebene in Z-Richtung, wobei die X- oder Y-Richtung nicht verändert wird, d.h. die Bilder eines Stapels gehören zu einer festen XY-Koordinate auf dem Filter/Träger. Die Größe des Stapels wird dabei so gewählt, dass sich die Ebene, die eine scharfe Abbildung der Zellen liefert, über den gesamten Filter/Träger immer innerhalb der Abbildungen des Stapels befindet. Der durchschnittliche Unterschied in Z-Richtung über ein typisches Filter/Träger bewegt sich im Bereich von 20µm, wobei bevorzugt eine Abdeckung von 32µm eingestellt wird.

[0041] Erfindungsgemäß wird bevorzugt die Bewegung des Mikroskoptisches **9** in Z-Richtung von der reinen Belichtungszeit der Abbildung entkoppelt. D.h., dass die Verfahrbewegung des Mikroskoptisches **9** nicht mit der Aufnahme einzelner Abbildungen durch die Digitalkamera **5** synchronisiert ist. Dafür muss die Digitalkamera **5** parametrisiert sein und kontinuierliche Bilder liefern, und andererseits zur gleichen Zeit der Mikroskoptisch **9** entsprechend angepasst verfahren werden.

[0042] Durch die zusätzliche Entkopplung der Abbildung und der anschließenden Verarbeitung der Abbildungen des Stapels zu einer kombinierten Abbildung ergibt sich die Abtastgeschwindigkeit für das Filter/Träger im Wesentlichen aus den Werten der Belichtungszeit, der Anzahl der aufzunehmenden Abbildungen sowie dem Abstand zwischen den Bildern in Z-Richtung und der dafür benötigten Zeit zum Verfahren des Mikroskoptisches **9**.

[0043] Die benötigte Zeit zur Aufnahme eines Abbildungsstapels ergibt sich dann zu:

$$T_{Stapel} = T_{Belichtung} * n,$$

wobei n die Anzahl der Abbildungen des Stapels ist.

[0044] In einer bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens werden 16 Abbildungen aufgenommen, wobei die Belichtungszeit in Abhängigkeit der Signalintensität, der Empfindlichkeit der Kamera und der Blendeneinstellung zu ermitteln ist.

[0045] Der Abstand bezogen auf die Z-Richtung der Abbildungen innerhalb des Stapels und damit der gesamte Verfahrweg während der Z-Bewegung berechnet sich aus:

$$S_{Stapel} = S_{Abbildung} * n$$

Wobei S_{Stapel} der gesamte Verfahrweg in Z-Richtung und $S_{Abbildung}$ der Verfahrweg einer einzelnen Abbildung ist.

[0046] Die sich daraus ergebende Geschwindigkeit ist in bekannter Weise geben durch:

$$V = S_{Stapel} / T_{Stapel}.$$

[0047] In der Praxis ist die sich ergebende Geschwindigkeit V für handelsübliche Z-Motoren von Mikroskoptischen **9** zu gering, d.h. die Verfahrgeschwindigkeit muss durch zusätzliche Wartezeiten künstlich gedrosselt werden, um den Anforderungen der Belichtungszeit der Kamera gerecht zu werden. Das Verfahren des Mikroskoptisches **9** in Z-Richtung kann hierzu durch einen getakteten Betrieb ersetzt werden. Dazu wird der Mikroskoptisch während der Erstellung des Stapels der Abbildungen nicht kontinuierlich mit konstanter Geschwindigkeit in Z-Richtung verfahren, sondern der Mikroskoptisch **9** wird in Stufen mit zwischen geschalteten Wartezeiten bewegt. Dabei wird der Mikroskoptisch **9** zunächst nur um den gewünschten Abstand der Fokusebenen von zwei aufeinanderfolgenden Abbildungen verfahren. Anschließend wird eine definierte Zeit gewartet und danach der Motor erneuert um diesen Abbstand verfahren, während die Kamera **5** kontiuierlich eine Abbildung nach der anderen erstellt. Die Wartezeit zwischen zwei Verfahrbefehlen wird errechnet aus:

$$T_{Warten} = T_{Belichtung} * n_{Anzahl\ der\ Bilder} / m_{Anzahl\ der\ Schritte}.$$

[0048] Mit m_{Anzahl} der Schritte ist die Anzahl der gewünschten Fahrunterbrechungen des Motors gemeint. Diese kann sich von der Anzahl der Abbildungen unterscheiden. Insbesondere kann die Anzahl der Schritte größer als die Anzahl der Abbildungen eines Stapels sein. Es ist beispielsweise möglich, zunächst mit der Belichtung einer Abbildung zu beginnen, während der Mikroskoptisch **9** stillsteht, dann den Mikroskoptisch **9** zu verfahren, während die Belichtung der gleichen Abbildung durch die Kamrea **5** fortgesetzt wird. Anschließend das Verfahren erneut zu unterbrechen, während weiterhin die selbe Abbildung durch die Kamera belichtet wird. Nach Ende der Abbildungszeit kann der Motor weiter verfahren werden. In dem Fall sind in einer Abbildung zwei oder mehrere Fokusebenen im Sinne einer „Mehrfachbelichtung“ überlagert.

[0049] Die Schrittweite, die der Mikroskoptisch **9** in Z-Richtung während der Belichtung einer Abbildung zurücklegt darf dabei nicht größer als der Schärfebereich einer Zellenebene bzw. nicht größer als die Zellengröße selbst sein. Ansonsten besteht die Möglichkeit, dass eine Zelle überhaupt in keiner der Abbildungen „scharf“ abgebildet ist. Sie könnte dadurch der Detektion verloren gehen. Ein bevorzugter Wert für den Z-Abstand zwischen zwei Bildern beträgt erfindungsgemäß 1 bis 10µm besonders bevorzugt 2µm.

[0050] Die gesamte Verfahrzeit lässt sich unter einbeziehen der herstellerspezifischen Motorgeschwindigkeit beispielsweise dann errechnen aus:

$$T_{Fahrzeit\ pro\ Schritt} = S_{Abbildung} / V_{Motor}.$$

Hierbei wird davon ausgegangen, dass für das Beschleunigen und Abbremsen des Motors keine signifikante Zeit benötigt wird.

[0051] Da das Erstellen von Abbildungen durch die Kamera **5** nicht mit der Verfahrbewegung des Mikroskoptisches **9** in Z-Richtung synchronisiert ist, treten in der Praxis zusätzliche Abweichungen auf, die korrigiert werden können. Der Korrekturfaktor dazu ist:

$$K = n_{Gesamtzahl\ der\ Abbildungen} / n_{Anzahl\ der\ bereits\ aufgenommenen\ Abbildungen}$$

[0052] Zur Kompensation der zusätzlichen Abweichungen wird die Wartezeit mit Hilfe des Korrekturfaktors bei der laufenden Abtastung dynamisch ständig angepasst:

$$T_{\text{Warten korrigiert}} = T_{\text{Warten}} * K$$

[0053] Erfindungsgemäß ist es darüber hinaus sinnvoll eine Startposition der Fokusebene für das Erstellen der Abbildungen zu bestimmen.

[0054] Zu Beginn der automatisierten Erfassung eines Filters/Trägers **3** wird daher erfindungsgemäß in einem ersten Schritt die Startposition der Fokusebene des Stapels so festgelegt, dass sich die Zellen zumindest in einem Bereich befinden, der durch das Verfahren des Mikroskoptisches **9** in Z-Richtung abgedeckt wird. Hierzu werden in der einfachsten Ausführungsform drei wahlfreie Punkte auf dem Filterrand manuell optimal fokussiert und der sich so ergebene Mittelwert für die Fokusebene (Z-Wert) als Startpunkt verwendet.

[0055] In einer weiteren Ausführungsform werden mehrere Punkte auf dem Filter manuell optimal fokussiert und anschließend zur Berechnung einer Topologieebene des Filters verwendet. Basierend auf dieser Topologieebene wird der Startpunkt in Z-Richtung für den Abbildungsstapel dynamisch anhand der XY-Koordinaten des gewählten Ausschnitts auf dem Filter/Träger korrigiert.

[0056] Die Position für den Start des Abbildungsstapels ergibt sich dann beispielsweise aus:

$$P_{\text{Abbildungsstapel}} = P_{\text{Mittelwert}} - \left(\left(S_{\text{Bilder}} * n_{\text{Anzahl Schritte}} \right) / 2 \right)$$

[0057] Bei einem erfindungsgemäßen Beispiel wurde ein Leica Fluoroszenzmikroskop DMRB mit einem 40 fach Objektiv und einer 14 Megapixel Farbkamera (Basler acA4600-10uc USB3 Kamera) verwendet. Das Mikroskop wurde durch einen automatischen XYZ-Tisch OptiScanII® der Firma Prior Scientific, Inc. erweitert.

[0058] Bei einer durchschnittlichen Belichtungszeit der Kamera **5** von 100 Millisekunden und einem Abstand der gewählten 20 Abbildungen untereinander von 2µm bei 16 Schritten ergeben sich folgende Werte:

$$\text{Gesamtheit für einen Stapel}: 20 * 100\text{ms} = 2000\text{ms}$$
$$\text{Gesamtverfahrweg für den Stapel}: 2\mu\text{m} * 16 = 32\mu\text{m}$$
$$\text{Wartezeit}: 100\text{ms}*20/16 = 125\text{ms}$$

[0059] Bei diesem Beispiel ist die Anzahl der Abbildungen größer als die Anzahl der Verfahrschritte. Auch wenn zwei Abbildungen die identische Fokusebene haben sollten, spielt dies bei der vorgeschlagenen Auswertung keine Rolle, da immer nur der maximale Wert eines Pixels unter den Abbildungen des Stapels berücksichtigt wird, wenn die kombinierte Abbildung erstellt wird.

[0060] Es wird also der Motorfahrbefehl für 2µm an die Motorsteuerung gesendet und gleichzeitig der Timer für die Wartezeit gestartet. Der Motor bleibt automatisch nach 2µm stehen und bekommt erneut ein Fahrbefehl, wenn der Timer für die 125ms abgelaufen ist. Wichtig ist, dass der Motor für die Strecke nicht länger braucht als 125ms, was aber in der Realität sicher der Fall ist.

[0061] Im folgenden Fall beträgt die Motorgeschwindigkeit 200µm pro Sekunde

[0062] Dann gilt:

$$T_{\text{Fahrzeit pro Schritt}} = 2\mu\text{m}/200\mu\text{m/s} = 0{,}01\text{s} = 10\text{ms}$$

[0063] Bei diesem Beispiel dauert die Aufnahme eines Abbildungsstapels **2** Sekunden. Innerhalb dieser Zeit nimmt die Kamera bei einer Belichtungszeit von 100ms 20 Abbildungen auf. Bei der verwendeten Vergrößerung von 40 gibt sich dabei für das gesamte Filter/den Träger **1** eine Abtastzeit von 1h 54min. Die gesamte Abtastzeit verlängert sich zusätzlich um den deutlich geringeren Anteil für das Verfahren des Mikroskoptisches **9** in XY-Richtung auf maximal 2 Stunden.

[0064] Auf den einzelnen Bildern eines Abbildungsstapels wird, wie Eingangs dargelegt, eine kombinierte Abbildung errechnet, welche die Informationen aller Einzelabbildungen des Stapels enthält. Hierzu wird der maximale Pixelwert (PW) über alle Abbildungen des Stapels an jeder Position ermittelt, und an die gleiche Pixelposition in der kombinierten Abbildung eingetragen. Dies wird für jedes Pixel der Abbildungen des Stapels

durchgeführt. Alle Abbildungen des Stapels haben die gleiche durch die Kamera vorgegebene Pixelzahl in XY-Richtung.

$$PW(X,Y)_{\text{kombinierte Abbildung}} = PW(X,Y)_{\text{Max aller Einzelbilder}}.$$

[0065] Auf diese Art ergibt sich zwar ein für das menschliche Auge unscharfes Bild bzw. Abbildung, da die Pixelwerte, vorzugsweise Helligkeitswerte, von unscharfen Bildern/Abbildungen - einschließlich der Bewegungsunschärfe - zu entsprechenden Pixeln in der kombinierten Abbildung führen. Eine Auswertung dieser kombinierten Abbildungen kann aber dadurch erfolgen, dass ein lernfähiger Erkennungsalgorithmus speziell auf diese „neuen" für Zellen spezifische Abbildungsobjekte trainiert wird. Hierzu werden in dem dargestellten Verfahren eine Kombination aus der Objekterkennung basierend auf HOG (Histogram of Oriented Gradients) zusammen mit Lernalgorithmus SVM (Support Vector Machine) auf diese Abbildungsobjekte trainiert, so dass diese stellvertretenden für eine fluoreszenzmarkierte Zelle erkannt werden. Einzelheiten der Mustererkennung werden hier nicht weiter ausgeführt, sie sind aber dem Fachmann aus dem bei der oben genannten Druckschriften für andere Zwecke, beispielsweise Handschrifterkennung oder Gesichtserkennung, bekannt.

[0066] In **Fig. 1** ist zu sehen, wie die Vorrichtung prinzipiell aus dem Mikroskoptisch **9**, dem darauf angebrachtem Filter oder Träger **1**, der Optik **11** und der Digitalkamera **5** aufgebaut ist. Die Mikroskopoptik **11** und die Kamera **5** sind hier nur schematisch als einzelne Linse und einfacher Kasten gezeigt. Der Fachmann ist jedoch mit dem Aufbau dieser Komponenten gut vertraut.

[0067] **Fig. 2** zeigt eine Aufsicht auf den Träger **1** mit -darin markiertem Ausschnitt **3**, auf dem die Mikroorganismen **7** angeordnet sind.

[0068] Das erfindungsgemäße Verfahren setzt, wie Eingangs beschrieben, voraus, dass zunächst, nach dem das Filter/Träger **1** auf dem Mikroskoptisch **9** angeordnet und ein Ausschnitt ausgewählt wurde, eine Ausgangsfokusebene eingestellt wird.

[0069] Anschließend wird ein Ausschnitt **7** des Filters/Trägers **1** mit der Digitalkamera **5** abgebildet und diese Abbildung gespeichert. In einem nächsten Schritt - vorzugsweise aber gleichzeitig mit der Belichtung der Abbildung - wird die Fokusebene verändert, beispielsweise in dem der Mikroskoptisch **9** in Z-Richtung um 2µm verfahren wird.

[0070] Das Verfahren prüfte dann, ob die maximale Veränderung der Fokusebene bereits erreicht ist oder ob die gewünscht Anzahl an Abbildungen des Stapels erstellt wurde. Ist dies nicht der Fall, so wird eine weitere Abbildung des gleichen Ausschnitts hergestellt und gespeichert. Das Ausbilden einer Abbildung und das Verfahren der Fokusebene können gleichzeitig oder aufeinander abgestimmt erfolgen, so dass das Verfahren in den Pausen zwischen zwei Abbildungen erfolgt. Dies ist aber nicht bevorzugt, da es die Zeit zur Erstellung des Abbildungsstapels verlängern kann und da eine Synchronisation zwischen Mikroskoptisch **9** und Kamera **5** eingerichtet werden muss.

[0071] Ist einmal die maximale Veränderung der Fokusebene/maximale Anzahl der Abbildungen des Stapels erreicht, wird aus den gespeicherten Abbildungen eine kombinierte Abbildung erstellt, indem, wie beschrieben, für den Wert eines Pixels der kombinierten Abbildung der Maximalwert der korrespondierenden Pixel der einzelnen Abbildungen gewählt wird.

[0072] Auf die so gewonnene kombinierte Abbildung wird ein Mustererkennungsverfahren angewendet und die Zahl der Mikroorganismen/Zellen bestimmt.

[0073] In einem nächsten Schritt wird der Mikroskoptisch **9** in XY-Richtung zur Einstellung eines neuen Ausschnitts verfahren. Es ist denkbar, bereits während dieser Bewegung in XY-Richtung den Mikroskoptisch **9** auch in Z-Richtung auf die neue Ausgangsfokusebene zu verfahren. Alternativ kann die Z-Bewegungsrichtung bei der Erstellung aufeinanderfolgender Abbildungsstapel auch umgekehrt werden, so dass die Fokusebene der letzten Abbildung eines ersten Stapels die Ausgangsfokusebene des nächsten Stapels ist.

[0074] Es wird geprüft, ob bereits alle Ausschnitte des Filters abgetastet wurden. Ist dies der Fall, so beendet die Vorrichtung das Verfahren. Ist dies nicht der Fall, wird erneut die Ausgangsfokusebene eingestellt und ein neuer Stapel von Abbildungen erstellt.

[0075] Obwohl die Erfindung vorangehend anhand von einer bevorzugten Ausführungsform beschrieben wurde, ist die Erfindung hierauf nicht beschränkt. Verschiedene Abänderungen und Modifikationen können vorgenommen werden, die für den Fachmann geläufig sind.

[0076] Die hier beschriebene Mustererkennung ist nur ein Beispiel. Andere Mustererkennungsverfahren sind dem Fachmann geläufig, und können angewendet werden.

[0077] Mit der Erfindung ist es möglich, die üblichen Verarbeitungszeiten zum automatischen Abtasten eines Filters von 12 Stunden auf annähernd 2 Stunden zu verkürzen. Dies erhöht den Durchsatz und die Produktivität bei der Auswertung derartiger Filter beachtlich und senkt die Kosten.

[0078] Die Erfindung wurde anhand des Abtastens eines Filters beschrieben. Sie ist darauf jedoch nicht beschränkt. Es ist ebenfalls möglich, die Oberfläche einer Schale, beispielsweise einer Petrischale mit Agarmedium, mikroskopisch zu untersuchen.

[0079] Bei der Erfindung wurde Fluoreszenz eingesetzt. Auch dies ist nicht zwingend, wenn andere optische Möglichkeiten zur Erkennung von Mikroorganismen oder Mikrokolonien gegeben sind, beispielsweise im Durchlicht.

[0080] Bei dem geschilderten Beispiel wurde der Helligkeitswert als Pixelwert ausgewählt. Es ist jedoch auch möglich, den Helligkeitswert einer bestimmten Farbe zu verwenden, um eine bessere Selektivität zu erreichen.

ZITATE ENTHALTEN IN DER BESCHREIBUNG

Diese Liste der vom Anmelder aufgeführten Dokumente wurde automatisiert erzeugt und ist ausschließlich zur besseren Information des Lesers aufgenommen. Die Liste ist nicht Bestandteil der deutschen Patent- bzw. Gebrauchsmusteranmeldung. Das DPMA übernimmt keinerlei Haftung für etwaige Fehler oder Auslassungen.

Zitierte Nicht-Patentliteratur

- Amman et. all Microbial. Rev. 59 (1995), Seiten 143 - 169 [0003]
- Hamayun A. Khan, „MCS HOG Features and SVM Based Handwritten Digit Recognition Systems“, Journal of Intelligent Learning Systems and Applications, 2017, 9, Seiten 21-33 [0020]
- Chandrasheka, T.R. et. all. „Face Recognition Based on Histogram of Oriented Gradients, Local Binary Pattern and SVM/HMM Classifiers“, International Journal of Engineering Sciences and Research Technology, August 2014, Seiten 344-352 [0020]

Patentansprüche

1. Verfahren zur Bewertung von mikroskopischen Proben, mit den Schritten:
Bereitstellen einer Trägers (1) mit mikroskopischen Proben (7);
Anordnen des Trägers (1) auf einem Mikroskoptisch (9);
Abbilden unter Vergrößerung eines Ausschnitts (3) des Trägers (1) mittels einer Digitalkamera (5) und einer vergrößernden Optik (11);
dadurch gekennzeichnet, dass
der gleiche Ausschnitt (3) mehrfach abgebildet wird, wobei während des Abbildens von aufeinanderfolgenden Abbildungen eine Fokusebene der Abbildungen verschoben wird;
Erstellen einer kombinierten Abbildung aus den mehreren aufeinanderfolgenden Abbildungen; und
Auswerten der kombinierten Abbildung zur Bewertung der mikroskopischen Proben.

2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass die kombinierte Abbildung dadurch erhalten wird, dass für jedes Pixel der kombinierten Abbildung der maximale Wert der positionsmäßig korrespondierenden Pixel der mehreren aufeinanderfolgenden Abbildungen bestimmt wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass die kombinierte Abbildung mittels automatischer Mustererkennung, insbesondere basierend auf einem Histogram of Oriented Gradient (HOG) in Kombination mit einem Lernalgorithmus mittels Support Vector Machine (SVM) ausgewertet wird.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, dass sequenziell verschiedene Ausschnitte des Trägers (1) in ein Gesichtsfeld der Digitalkamera und der Optik (11) gebracht werden, wobei für jeden Ausschnitt mehrere Abbildungen mit verschiedenen Fokusebenen erstellt werden, für jeden Ausschnitt eine kombinierte Abbildung erstellt und ausgewertet wird, und wobei anhand der Auswertung aller Ausschnitte die mikroskopischen Proben bewertet werden.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Träger (1) ein Filter ist, das zur Filtrierung einer mit Mikroorganismen kontaminierten Flüssigkeit verwendet und eingefärbt wurde.

6. Verfahren nach Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet**, dass zwischen je zwei aufeinanderfolgenden Abbildungen der Abstand zwischen dem Träger (1) und der Digitalkamera um 1 - 10 µm, bevorzugt um 2µm verändert wird, um so die Fokusebene zu verändern.

7. Verfahren nach Anspruch 5 oder 6, **dadurch gekennzeichnet**, dass zur Bestimmung einer Ausgangsfokusebene verteilt über das Filter (1) mehrere Fokuswerte zur scharfen Abbildung einzelner Ausschnitte ermittelt werden, und wobei die Ausgangsfokusebene für die aufeinanderfolgenden Abbildungen der übrigen Ausschnitte beruhend auf dem Mittelwert der mehreren Fokuswerte, dem Ausmaß der Veränderung der Fokusebene zwischen aufeinanderfolgenden Abbildungen und der Anzahl der aufeinanderfolgenden Aufnahmen für eine kombinierte Aufnahme berechnet wird.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, **dadurch gekennzeichnet**, dass für jeden Ausschnitt 5 bis 50, vorzugsweise 10 bis 30, insbesondere bevorzugt 16 aufeinanderfolgende Abbildungen zu einer kombinierten Abbildung verarbeitet werden.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Fokusebene schrittweise verändert wird.

10. Vorrichtung zur Ausführung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 9, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Vorrichtung umfasst:
einen Mikroskoptisch (9) zum Anordnen eines Trägers (1);
eine Digitalkamera (5) und eine vergrößernde Optik zum Abbilden unter Vergrößerung eines Ausschnitts (3) des Trägers (1),
Mittel zum Verändern einer Fokusebene der Digitalkamera (5) und der vergrößernden Optik in Bezug auf den Träger (1);
eine Steuerung (11) zur Steuerung der Abbildung durch die Digitalkamera (5) und der Veränderung der Fokusebenen, um so mehrere Abbildungen eines Ausschnitts des Trägers (1) mit unterschiedlichen Fokusebenen zu erzeugen; und

eine Auswertungseinheit, die ausgestaltet ist, um eine kombinierte Abbildung aus den mehreren aufeinanderfolgenden Abbildungen zu erzeugen und um die kombinierte Abbildung zur Bestimmung der mikroskopischen Proben auszuwerten.

Es folgen 3 Seiten Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

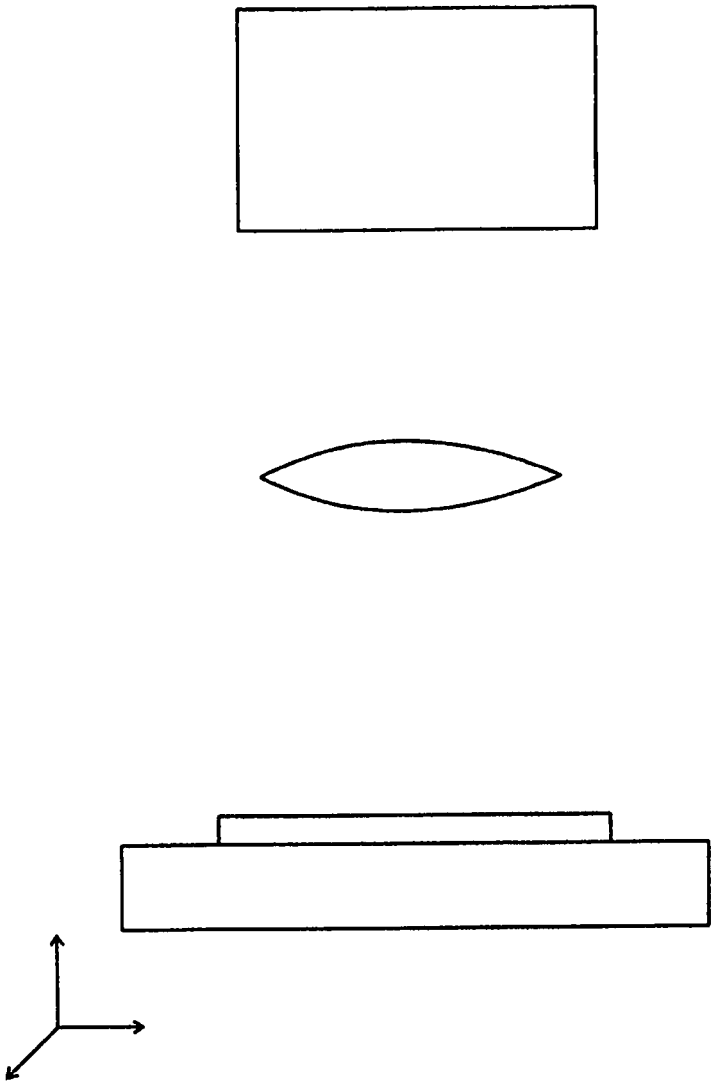


Fig. 1

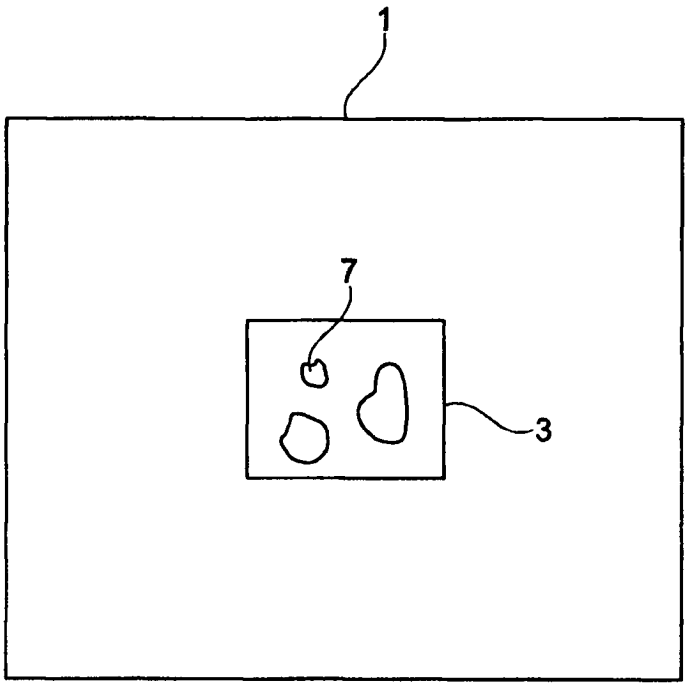


Fig. 2

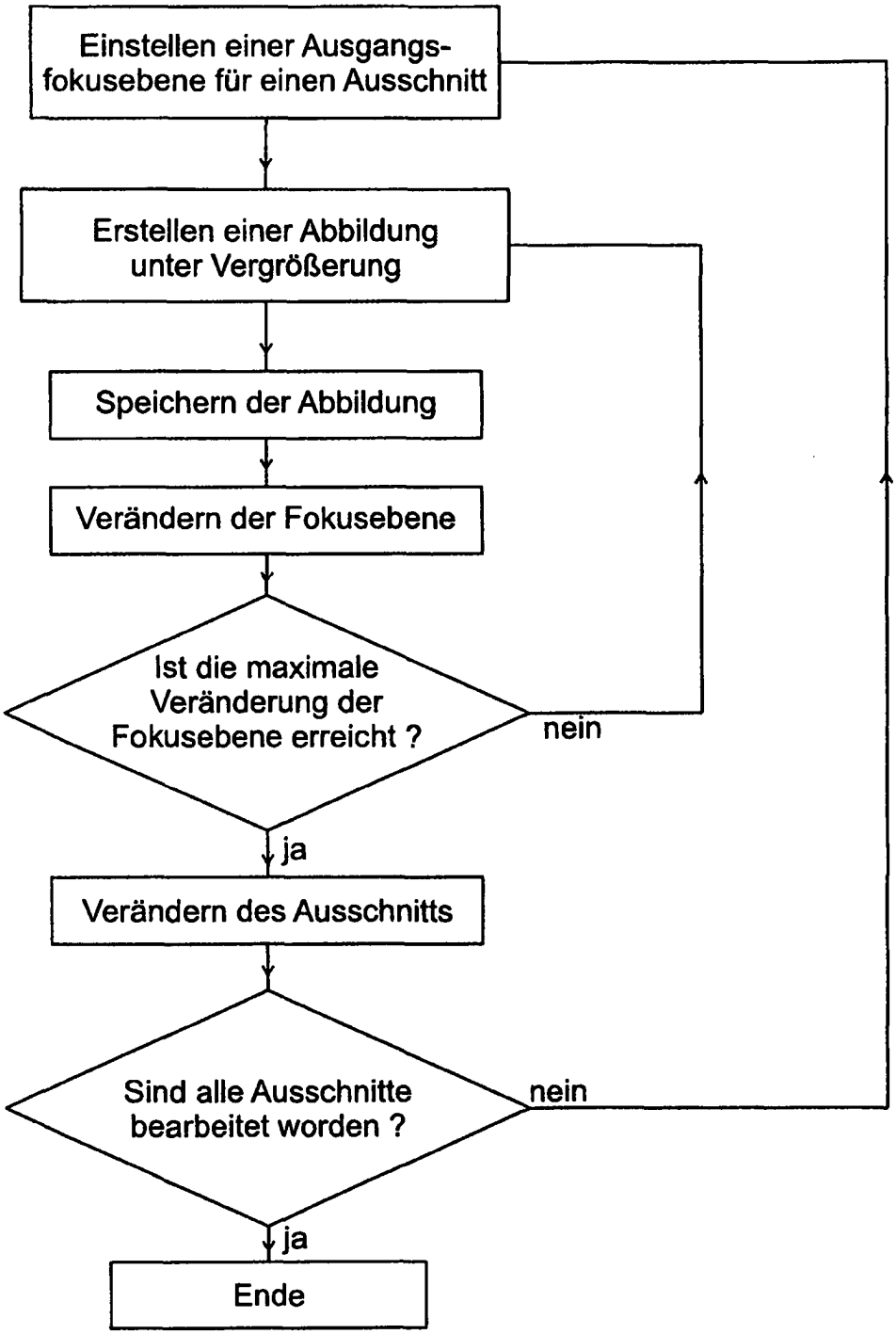

Einstellen einer Ausgangs-fokusebene für einen Ausschnitt
Erstellen einer Abbildung unter Vergrößerung
Speichern der Abbildung
Verändern der Fokusebene
Ist die maximale Veränderung der Fokusebene erreicht ?
nein
ja
Verändern des Ausschnitts
Sind alle Ausschnitte bearbeitet worden ?
nein
ja
Ende

Fig. 3