

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

G01J 3/44 (2006.01)

G01N 21/65 (2006.01)



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200480024628.X

[43] 公开日 2006 年 10 月 4 日

[11] 公开号 CN 1842696A

[22] 申请日 2004.6.24

[21] 申请号 200480024628.X

[30] 优先权

[32] 2003.6.27 [33] US [31] 10/608,470

[86] 国际申请 PCT/US2004/020266 2004.6.24

[87] 国际公布 WO2005/060380 英 2005.7.7

[85] 进入国家阶段日期 2006.2.27

[71] 申请人 坎米马吉公司

地址 美国宾夕法尼亚州

[72] 发明人 C·W·小加纳 J·S·迈尔

M·P·纳尔逊 R·C·施维策尔

P·J·特里多 G·S·文尼

J·沃尔夫

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 李波 刘玥

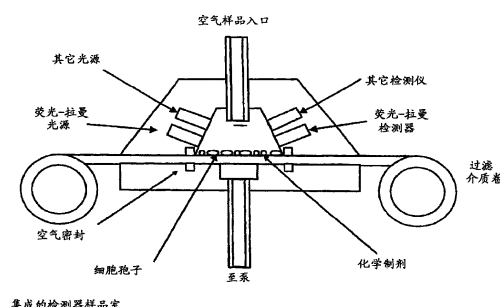
权利要求书 4 页 说明书 23 页 附图 33 页

[54] 发明名称

用于检测病原微生物的宽视域方法

[57] 摘要

病原微生物是在宽视域中检测的，并且通过来自所述微生物的拉曼光散射光以及它们的光谱分布图的数字分布图识别而进行分类。



1. 一种用于研究炭疽（炭疽芽孢杆菌）在基片上的存在的方法，包括：

a) 从所述基片的表面上选择第一区域，所述第一区域大到足以包括少量炭疽生物，

b) 在所述第一区域内选择宽视域，用于进一步研究，然后

c) 用足够的能量照射宽视域加上所述宽视域周围的区域，以便对所述照射区域进行光致褪色，

d) 收集来自所述宽视域的拉曼偏移光，

e) 分析所述拉曼偏移光中的炭疽微生物的特征性分布图。

2. 如权利要求1的方法，还包括在第二区域重复步骤a) - e)。

3. 如权利要求1的方法，其中，所述分析步骤包括分析炭疽微生物的菌株。

4. 如权利要求1的方法，其中，所述分析步骤包括分析炭疽微生物的存活力。

5. 如权利要求1的方法，其中，所述分析步骤包括分析炭疽微生物已在其中生长的生长培养基。

6. 一种用于研究病原微生物在基片上的存在的方法，包括：

a) 从所述基片的表面上选择第一区域，所述第一区域大到足以包括少量病原微生物，

b) 在所述第一区域内选择宽视域，用于进一步研究，然后

c) 用足够的能量照射所述宽视域加上所述宽视域周围的区域，以便对所述照射区域进行光致褪色，

d) 收集来自所述宽视域的拉曼偏移光，

e) 分析所述拉曼偏移光中的病原微生物的特征性分布图。

7. 如权利要求6的方法，还包括在第二区域重复步骤a) - e)。

8. 如权利要求6的方法，其中，所述分析步骤包括分析所述病原微生物的菌株。

9. 如权利要求6的方法，其中，所述分析步骤包括分析所述病原微生物的存活力。

10. 如权利要求6的方法，其中，所述分析步骤包括分析其中已生长了病原微生物的生长培养基。

11. 如权利要求 6 的方法, 其中, 来自所述宽视域的拉曼偏移光穿过点、线或图像聚焦型的分光光度计。

12. 如权利要求 6 的方法, 其中, 所述病原微生物是炭疽孢子。

13. 如权利要求 6 的方法, 其中, 所述病原微生物是原生动物。

14. 如权利要求 6 的方法, 其中, 所述病原微生物是 cryptosporidia 微生物。

15. 如权利要求 6 的方法, 其中, 所述病原微生物是大肠杆菌微生物。

16. 如权利要求 6 的方法, 其中, 所述病原微生物是大肠杆菌 157 微生物。

17. 如权利要求 6 的方法, 其中, 所述病原微生物是瘟疫(鼠疫耶尔森氏菌)微生物。

18. 如权利要求 6 的方法, 其中, 所述病原微生物是天花(重型天花)微生物。

19. 如权利要求 6 的方法, 其中, 所述病原微生物是野兔热(土拉热弗朗西斯氏菌)微生物。

20. 如权利要求 6 的方法, 其中, 所述病原微生物是布鲁氏菌病(布鲁氏菌属物种)微生物。

21. 如权利要求 6 的方法, 其中, 所述病原微生物是产气荚膜梭菌微生物。

22. 如权利要求 6 的方法, 其中, 所述病原微生物是沙门氏菌属微生物。

23. 如权利要求 6 的方法, 其中, 所述病原微生物是志贺氏菌属微生物。

24. 如权利要求 6 的方法, 其中, 所述病原微生物是鼻疽(鼻疽伯克氏菌)微生物。

25. 如权利要求 6 的方法, 其中, 所述病原微生物是类鼻疽(类鼻疽伯克氏菌)微生物。

26. 如权利要求 6 的方法, 其中, 所述病原微生物是鹦鹉热(鹦鹉热衣原体)微生物。

27. 如权利要求 6 的方法, 其中, 所述病原微生物是 Q 热(伯氏考克斯氏体)微生物。

28. 如权利要求 6 的方法, 其中, 所述病原微生物是斑疹伤寒(普氏立克次氏体)微生物。

29. 如权利要求 6 的方法, 其中, 所述病原微生物是霍乱弧菌微生物。

30. 如权利要求 6 的方法, 其中, 所述病原微生物选自下组: 线状病毒(如埃博拉和马尔堡病毒), naviruses(如拉萨热和 Machupo 病毒)和甲病毒(如委内瑞拉马脑炎, 东方马脑炎, 和西方马脑炎)。

31. 如权利要求 6 的方法, 其中, 所述病原微生物是贾第鞭毛虫微生物。

32. 如权利要求 6 的方法, 其中, 所述病原微生物是白色假丝酵母微生物。

33. 如权利要求 6 的方法, 其中, 所述病原微生物是粪肠球菌微生物。

34. 如权利要求 6 的方法, 其中, 所述病原微生物是表皮葡萄球菌微生物。

35. 如权利要求 6 的方法, 其中, 所述病原微生物是金黄色葡萄球菌微生物。

36. 如权利要求 6 的方法, 其中, 所述病原微生物是产气肠杆菌微生物。

37. 如权利要求 6 的方法, 其中, 所述病原微生物是白喉棒状杆菌微生物。

38. 如权利要求 6 的方法, 其中, 所述病原微生物是铜绿假单胞菌微生物。

39. 如权利要求 6 的方法, 其中, 所述病原微生物是醋酸钙不动杆菌微生物。

40. 如权利要求 6 的方法, 其中, 所述病原微生物是肺炎克雷白杆菌微生物。

41. 如权利要求 6 的方法, 其中, 所述病原微生物是粘质沙雷氏菌微生物。

42. 如权利要求 6 的方法, 其中, 所述照射光在紫外光谱区内, 波长小于 410nm。

43. 如权利要求 6 的方法, 其中, 所述照射光在可见光谱区内,

波长小于 780 nm 并且大于 410 nm。

44. 如权利要求 6 的方法，其中，所述照射光在近红外光谱区内，波长小于 2500 nm，并且大于 780 nm。

45. 如权利要求 6 的方法，其中，所述分析步骤包括分析所述病原微生物的菌株。

46. 如权利要求 6 的方法，其中，所述分析步骤包括分析所述病原微生物的存活力。

47. 如权利要求 6 的方法，其中，使用小型元件，以便能够实现手持式检测仪。

用于检测病原微生物的宽视域方法

对相关申请的交叉引用

本申请根据 35 U. S. C. § 119 (e) 的规定要求申请日为 2002 年 1 月 10 日的美国临时申请流水号 60/347, 806, 以及申请日为 2003 年 1 月 10 日的美国专利申请流水号 10/339, 807 的优先权, 以上申请, 包括附录材料以它们的全文形式收作本文的参考。

发明领域

本发明涉及化学和生物学分析领域, 更具体地讲, 涉及使用宽视域拉曼 (Raman) 和荧光光谱学快速鉴定生物剂和病原体。

发明背景

恐怖分子采用化学和/或传染性生物剂作为大规模杀伤武器威胁平民的安全。公众的关心业已增加, 特别是在我国, 因为恐怖分子使用诸如炭疽的生物威胁制剂正在变成现实。几乎每一个人在心灵上都在出现数以万计的受感染和死亡的无辜受害者的梦魇。生物战和化学战是意义重大的, 不仅是因为生命的损失, 而且还由于美国经济的代价。据疾病控制中心估计, 丧失十万条生命, 将会产生 290 亿美元的经济损失。生物战剂 ("BWAs") 和化学战剂 (CWAs) 的大规模杀伤潜能被很多人认为是与核武器相当或者比核武器威胁更大。核武器具有影响有限区域的可能, 尽管所述区域很大, 并且使用这样的武器在事后会马上表现出来。另一方面, BWAs 和 CWAs 几乎是没有边界的, 并且具有在从爆心投影点无声地扩散并且通过人群不受控制的扩散的潜力。同样, 快速检测并且定量很低水平的放射性污染的技术被广泛地使用。不幸的是, 用于类似水平的 BWAs 和 CWAs 的所述技术是不确定的、不能广泛利用的并且在很多场合下不是非常快速的。

这种类型的威胁在心理学上的影响同样是非常重要的。公众正越来越了解新出现的病原体。对 BWAs 和 CWAs 看不见的性质的担心, 使得这种性质以及所述微生物本身成为非常有效的威慑武器。除了感觉之外, 由于生物技术的难于置信的发展, 存在非常现实的危险。现在可以改变毒性最强的细菌或病毒, 或者增强它的致命性和对常规治疗的耐受性。分子生物学革命业已进行了超过 30 年时间, 并且具有专

门技能的制造这种大规模杀伤武器的专业技能的人员的数量因此也在增加。在这种发达的全球旅行的年代,任何类型的 BWA 在世界范围内在极短的时间内快速扩散的可能性是很大的,并且普通公众也十分清楚这一事实。

使用诸如特异性抗体、遗传学标记或在培养物中繁殖的生物学工具鉴定病原体的常规方法基本上是缓慢的,并且需要大量的手工操作。另外,由于新的 BWAs 和 CWAs 是通过工程方法制造的,上述常规工具变得越来越没有效果。随着 BWAs 和 CWAs 被恐怖分子所利用变得越来越现实,越来越需要能够在分子水平上快速并且准确地检测少量上述制剂并且对它们进行分类,而又不接触它们的方法。需要节省成本的和使用起来简单的方法,以便它们能够被广泛地采用。还需要有助于增加我们对所述战用毒剂的生物学和化学基础的了解,以及对人体的潜在影响的方法。另外,通过所述分子分析获得的知识,有助于鉴定治疗和预防剂的新的目标。

发明概述

披露了宽视域观察和光谱学检测系统,还被披露为分子光谱学鉴定系统,该系统采用拉曼,荧光,W-可见反射/吸收和/或近红外(NIR)反射/吸收光谱学技术,用于表征 BWAs 和 CWAs。

光谱学是用于从化合物到有机分子的元素、分子或化学分析的广泛使用的方法。采用振动光谱学进行分析,使得人们能够确定多种材料的详细的结构和化学特性。所述方法在分析均质简单材料时是理想的,如分析化学物质,塑料,聚合物等。有机生物分子倾向于是更复杂的材料。微生物明显更为复杂,并且即使在最小单位,即细胞水平上,也是由复杂系列的功能性生物学结构组成,它们分别构成了它们自身特有的,复杂的有机生物分子大分子。它们包括这样的功能性单位,如细胞核,微丝,质膜,色素,线粒体,内质网,微绒毛,溶酶体,中心粒,高尔基体和各种保护层。所述复杂的结构和结构/化学变化产生了生物可变性,它使得光学分析变得复杂。

材料的现有分析性光学测量通常属于两种类型中的任意一种。其中一种类型是将纯的分批材料用于作为大块的宏观样品进行测量,即大的采样体积,而第二种类型利用微量分析技术分析单一的小的物体。在实际场合下,宏观体积的采样不具备观察低浓度病原体的灵敏

度，这种灵敏度对于评估 BWAs 和 CWAs 来说是特别重要的条件。另一方面，微量分析方法使得人们能够通过使用高度聚焦的激发光束对各个用显微镜可见的物体进行集中分析。所述聚焦光束光学方法对于无机和有机颗粒来说是有效的，但是，对于微生物来说可能是无效的，这是微生物的生物可变性和对照射的敏感性。生物可变性以两种形式出现：一种来自由于微生物的不同的定位而导致的信号变化，即采样探头小于所述生物，而另一种形式来自相同类型生物之间的小的差异。另外，生物学微生物在高度聚焦的入射光束的高能密度下可能会分解或'燃烧'。这就需要减少对所述微生物的光照，以便不破坏任何一种生物，并因此更长时间收集光学发射，以便补偿减弱的照射强度。为了降低生物利用度的影响，还需要采集很多小的物体的样品。因此，使用光学微量分析方法连续采集很多生物的样品，是非常耗费时间的。我们的方法通过使用宽视域和光学激发的宽视域以平均来自少量病原微生物的光学发射，从而消除了上述限制。所得到的灵敏度使得我们能够检测并且可靠地鉴定少量微生物，即使在存在外源材料，即所谓的'掩蔽剂'的基质的条件下也是如此。

业已将红外、拉曼、可见反射、荧光和近红外光谱学应用于检测微生物，并且取得了有限的成功。红外和拉曼光谱学能够提供光谱丰富的指纹信息，而如果产生特殊的荧光特征，可以使用荧光。使光学散射技术的应用变得复杂的是以下事实，即很多材料在可见光照射下会产生宽的荧光背景。所述荧光产生了显著的光谱背景，这种背景有可能使在被分析的视域中的其他物体的光谱分布图变得模糊。这种背景通常根据基片而改变，特别是在处理包括多种成分或成分的混合物的实际样品时更是这样。我们发现，这种空间依赖型荧光背景能够通过用光学探针束照射略大于采样区域的区域显著地减弱。这种减弱被称作光致褪色。这种技术与使用宽视域补偿少量微生物的组合，使得本发明能够常规地并且精确地应用于检测上述微生物。

这种消除干扰荧光信号的方法有别于增加荧光辅助的其他方法。将可以导入的荧光配体工程改造成能结合生物体中的某些生物分子特征。其中通常涉及某些生物活性剂，如抗体，它能识别并且结合特殊的生物分子特征。在这里，所述荧光配体随后起着所述生物或生物部分的标记，标签或标志的作用。尽管所述外部荧光标记/标志可能增加

有助于特殊生物学特征、生物或生物材料的光学检测的反差，它们造成了可消耗的，有问题的试剂，这些试剂增加了成本、时间和对检测过程的额外的操作。

诸如拉曼和红外线的-optical方法同样具有比纯化合物显著更弱的来自生物学大分子的信号，因此因为对检测低浓度的某些类型的信号放大而获益。在红外线中，它可能包括样品的多次反射，以便增加所得到的信号。不过，这随后需要某些特化的样品大小或采样方式，这有可能制约应用和增加采样装置的成本。在拉曼光谱学中，可以通过使用特殊的底物增强信号，所述底物能将拉曼信号增加 3-7 个数量级。不过，并非所有的分子都能结合 SERS 活性表面，这限制了这种方法的应用。我们的发明不需要特殊的底物，并且通过使用宽视域改善了信噪比。

为了增强拉曼信号，业已将共振拉曼应用于生物学系统，这是通过使用高能量光照（波长小于大约 400nm）激发生物分子或生物体而实现的。尽管拉曼信号在共振条件下得到增强，较高的激发能量激发了生物分子的电状态，从而产生了更大的激光能量吸收，并且通过样品加热，这样可降解或破坏所述微生物。另外，所述光学元件和 UV 检测器需要支持 UV 发光，并且检测更加昂贵，并且比常用的可见光光学元件更加特殊。

本发明披露如何利用宽视域光谱学检测病原微生物，这种方法避免了很多可能的光谱学的很多缺陷和限制，这种方法可应用于检测低浓度的微生物。我们的宽视域分子光谱学方法减弱了若干伪迹，以及固有的采样问题，因此能够进行高度可靠的检测，这是现有研究所无法预期的，并且是迄今为止尚未认识到的，尽管当今拉曼光谱学已经被广泛地使用。我们的方法使用了光谱学系统，我们的宽视域发光方法和数字光谱分布图识别系统，能识别病原微生物。与现有方法不同，该方法提供了高灵敏度，并且使得病原微生物的识别可靠而且可行。

本发明的关键因素是将宽视域用于观察并且照射目标基片的受控制的区域，同时采集并且分析来自所述宽视域的相同区域的光发射。我们将宽视域确定为这样的区域，它等于或小于接受研究的微生物。我们的发明使用若干种方法解决了用于鉴定微生物的常规光学方法所产生的若干关键问题。

在用于显微镜生物学研究的最广泛使用的拉曼方法中，使用了显微-拉曼光谱学。在这里，业已校正的激光的紧凑的聚焦光束导致了大约 1 微米和更小的发光点尺寸，以便增加感兴趣的目标上的拉曼信号强度。这种高度焦距的光束在试图测量微生物时有可能破坏微生物。减弱照射光束的能量，会导致需要更长的数据采集时间。另外，这种小点尺寸的使用，可能导致赋予微生物的生物可变性的不可再现的信号，因为它们分布在被分析的标本上的不同的区域。另外，荧光背景信号通常随着时间和在不同的样品区域而改变，这进一步干扰了对病原微生物的检测。

本发明涉及一种替代的方法，用于靶定、照射并且检测微生物，并因此构成了微生物检测的新方法。所述靶定包括发现具有若干种推测特征的基片的区域，所述特征是病原体掩蔽材料的特征或病原体本身的各种特征，如孢子、粉末、团聚物或团块的形状、大小或颜色，以及在上述物体内的荧光特征。这一目的可以通过人工检查或使用自动化图像识别技术通过光学观察装置而实现。一旦靶定结束，强度会增强，并且选择较小的区域，以便能够收集通过靶定的区域内的拉曼或荧光激发产生的光发射的更大的立体角。该区域在通过光学观察装置观察时，仍然能发现所述目标材料的宽视域，而不是单个显微镜可见的物体。光谱学的所述激发光源然后照亮该宽视域周围的区域，它具有足够高的能量密度，以便使该区域光致褪色，并且能够获得稳定的光谱。稍微的超量装载是有利的，因为它消除了与稍微的偏移相关的光谱变化或在采集光谱期间样品位置的改变，以及在照射区的相邻区域的随后的数据采集期间的样品位置的变化。在明显大于宽视域区域使用宽范围照射的照射方法，不能提供产生适当光致褪色的足够能量。拉曼散射光的采集，是在宽视域上进行的，以便有效地收集并且平均来自少量微生物的光谱，然后对病原微生物的光谱特征进行分析。这种宽视域采样方法与用于拉曼光谱学的点或线聚焦激发光源相比提供了若干关键优点。与很多光学微量分析方法不同，我们采用了非共焦无限校正光学系统，并且在宽视域中观察目标区，使用具有大量孔的物镜。与将能量集中在研究物体上的其他方法不同，我们将光束分散在所使用的视域中。该方法可以对目前使用的光谱学方法提供以下改进：

1. 接受研究的样品的较大区域的有效的光致褪色，降低了总体荧光背景信号，以便增强信噪比，并且避免局部荧光波动，这种波动可能降低信噪比，这种现象通常出现在常规微量分析仪器上。

2. 照射的宽视域降低了生物学信号波动，改善了热控制，增强了信号水平和可再现性。

3. 发光的宽视域改善了目标病原微生物的信噪比。

4. 基于标本或目标微生物的某些客观参数，例如，所述生物的固有尺寸的人工或自动观察并且选择基片区域的能力，增强了信噪比。

5. 将类似的宽视域用于观察、照射和发射，确保了在基片上选择确定的和合适的区域用于分析。

6. 使用的构型和方法使得可以采用低成本紧凑分光光度计，例如，具有简单的波长分散元件的分光光度计，具有足够的分辨率以便检测能接受研究的标本中发射的光谱成分。所述可放大的光学元件与这种宽视域方法的有效使用使得所述检测系统能够按比例缩小到更小的尺寸，从而能够形成便携式手持单元。

7. 可以将多种基片用于通过该分析方法分析微生物，以便能够使该方法具有更大的灵活性。在它上面能够产生所述材料的很多材料也可用作基片，例如纸张。

大范围照射和检测需要某些简单的样品制备。样品制备涉及采集样品，并且将样品放置成薄的均匀的层。选择目标区域用于这种制备，需要建立正确的图像轮廓，如大小和形状。目标密度将决定所使用的视域，以及所需要的照射强度，这两者都基于获得的或事先计算的校正数据。所述校正曲线可以由本领域技术人员方便地建立。

在一种实施方案中，可以将拉曼显微光谱学和/或荧光显微光谱学用于检测、分类、和/或鉴定 BWAs, CWAs 和非威胁化合物。显微分散光谱学检测、分类并且鉴定包括单一细菌的材料。对所得到的拉曼光谱进行适当的数字分析，可以分辨在存在非威胁性的‘掩蔽’化合物的条件下来自 BWAs 和 CWAs 的目标微生物信号。

在另一种实施方案中，可以将荧光和拉曼放大光谱学用于检测、分类、和/或鉴定 BWAs、CWAs 和非威胁性化合物。所述放大光谱学技术可以进行 BWAs 和 CWAs 的亚微米大小的颗粒检测、分类、鉴定（即，聚集的细菌和内生孢子检测和鉴定）。另外，如果采用合适的

数据分析技术，荧光和拉曼放大光谱学可以在存在非威胁性‘掩蔽’化合物的条件下，对 BWAs 和 CWAs 进行检测、分类和鉴定。

在另一种实施方案中，在采用合适的数据分析技术时，基于拉曼光导纤维的光谱学可以检测、分类和/或鉴定 BWAs, CWAs 和非威胁性化合物。

上述所有不同的实施方案可以采用计算机分析方法比较观察到的光学光谱和在类似条件下获得的已知光学光谱，以便鉴定微生物。

上述系统和方法是以多种方式使用的。该系统是作为实验室或可运输的野外拉曼显微镜使用的，它集成了分散的拉曼分光光度计和数字数据分析模块。该系统还可用作 UV/Vis/NIR 荧光、拉曼、或 UV/Vis/NIR/Mid-IR 吸收/反射低倍放大镜（macroscope）系统，如 ChemImage's CONDOR 低倍放大镜系统。另外，该系统还可用作实验室或野外显微镜，如 ChemImage's RAVEN 内窥镜。上述用途的每一种模式是单独使用的或者彼此组合使用，以便获得需要的速度和结果。另外，所述大面积检测方法的特性是能够成比例地缩小接受研究的大范围的尺寸，以便能够将所需要的硬件小型化，使得形成具有局部采样和/或遥控分析能力的手持装置。

将光谱学技术应用在被设计用于检测、分类、鉴定环境空气中的 BWAs、CWAs 和非威胁化合物的传感器。在图 1 中示出了这种传感器的示意图。通过空气采样泵产生的真空，通过样品入口，并且通过过滤器吸出环境空气。过滤器材料可以包括多孔聚丙烯或纤维素，是圆盘或卷筒形式的。空气样品中的颗粒物被捕获在过滤介质的表面上，并且保持在光谱成像系统的视域中。使用专门选择用于分子光谱学类型的光源，照射大范围的捕获的颗粒物，并且诱导从所述样品上发射拉曼光或荧光。收集发出的光线，并且重新聚焦到检测器上，由检测器测量一系列波长的发射光，并且产生用于进一步分析的数据文件。该检测器的入口可以是成像光纤或常规光纤。将先进的化学计量技术和已知光谱的数据库用于检测，分类，和/或鉴定 BWAs, CWAs 和非威胁化合物。

所述系统可以通过使用机器人技术或组合的低倍放大/显微仪器自动化，以便靶定 BWAs, CWAs 和非威胁性制剂。使用激光消融和/或化学消融方法，该系统还可以实现自动化，以便根除 BWAs 和 CWAs

后定向。

可以将多种数据处理方法用于该系统。可以将加权光谱数据扣除常规方法用于抑制由基片或显微镜载玻片产生的影响。另外，涉及主要因素分析的多变量图像分析，以及随后的因素轮换可用于区分 BWAs、CWAs 和非威胁性“掩蔽”化合物的纯的分子特征。

附图简述

图 1 是基于光谱学检测的环境空气 BWA 和 CWA 传感器的示意图。

图 2 表示三种不同的细菌孢子类型，包括炭疽模拟物的宽视域分散拉曼光谱。

图 3 是两种不同的细菌孢子类型的显微成像视域荧光-光谱学。

图 4A-4Q 表示由 US Armed Forces Institute of Pathology (AFIP) 送检样品的分散光谱学检查的初步结果，专家对生物威胁检测技术进行客观评估。所述样品包括六种未知粉末和一种 BG 孢子样品。

图 4A 表示通过管形瓶的 6 种未确定的粉末的分散的拉曼光谱（绿色激光激发）。

图 4B 表示 6 种未确定的粉末的分散的拉曼光谱（红色激光激发）。

图 4C-4E(样品 1331-002)表示 6 种未确定的粉末中第一种粉末的分散的拉曼、IR 和 SEM-EDS 结果。所述样品是无机样品，并且最有可能是滑石。

图 4E-4F(样品 1325-002)表示 6 种未确定样品中的第二种粉末的分散的拉曼、IR 和 SEM-EDS 结果。所述样品是有机的，并且最有可能是淀粉，可能是玉米淀粉。

图 4G-4H(样品 1303-002)表示 6 种未确定样品中的第三种粉末的分散的拉曼、IR 和 SEM-EDS 结果。所述样品是有机的，并且最有可能是淀粉，可能是玉米淀粉。

图 4I-4N(样品 1291-006)表示其余未确定粉末的分散的拉曼、IR 和 SEM-EDS 结果。在该样品中存在三种不同类型的粉末。所有三种粉末都具有有机成分，同时三种粉末中有两种还富含硅铝酸盐。所述粉末之一可能是复杂的芳香烃。

图 4O 表示用作掩蔽剂的常见白色粉末的拉曼光谱。

图 4P 表示各种芽孢杆菌属孢子的拉曼光谱差异。

图 4Q 表示宽视域拉曼图像,其中两种类似的孢子是根据自发荧光差异区分的。

图 5A-5F 表示来自其他孢子样品的结果,这些样品是由于区分这些物种的固有难度而专门选择的。它们可能包括苏云金芽孢杆菌 (BT), 蜡状芽孢杆菌 (BC) 和 BG。来自这三种孢子的拉曼光谱是不同的。这些差异表明了区分炭疽和非威胁物质的很大可能。

细节为:

图 5A 表示 BT 和悬浮液残余物的原始分散拉曼光谱。所述残余物来自所述悬浮液。

图 5B 表示 BT 和残余物的背景校正光谱。孢子光谱和残余物光谱是通过显微镜载玻片的光谱分离的。

图 5C 表示 BC 和悬浮液残余物的原始分散拉曼光谱。

图 5D 表示 BC 和残余物的背景校正的分散光谱。

图 5E 表示用显微镜载玻片背景校正的样品 BT, BC 和 BG 分散光谱的汇编。所述光谱是不同的。所述差异在指纹区最大。

图 5F 表示在基线扣除和对 CH 区光谱特征归一化之后的三种孢子的汇编 (大约 2950cm^{-1})。

图 6 表示如何将拉曼光谱用于区分单一物种中的多种不同的细菌菌株。

图 7 表示如何将拉曼光谱用于区分在不同条件下生长的细菌的相同的菌种和菌株。

图 8 表示炭疽芽孢杆菌 (炭疽) 孢子的不同区域的测量的可再现性。

图 9 表示如何将分散拉曼光谱用于区分存活和非存活的内生孢子,它是确定实际威胁水平的关键参数。

图 10 表示使用这种宽视域方法通过荧光或拉曼光谱检测获得的 S/N。通过它对检测低浓度微生物的能力进行定量。

图 11 表示使用这种宽视域方法和我们的数字光谱分析通过分散光谱仪获得的 ROC 曲线,它证实了在检测炭疽方面的高灵敏度和选择性。

图 12 表示基于本发明的宽视域拉曼方法的手持式病原微生物检测单元。

优选实施方案的详细说明

在以下被转让给本发明受让人的美国专利和专利申请中广泛地披露了拉曼化学成像和光谱学方法：美国专利号 6, 002, 476；美国非临时申请 09/619, 371, 申请日为 7/19/2000；美国非临时申请 09/800, 953, 申请日为 3/7/2001；美国非临时申请 09/976, 391, 申请日为 10/12/2001；美国非临时申请 10/185, 090, 申请日为 6/28/2002；美国非临时申请 10/184, 580, 申请日为 6/28/2002；美国临时申请号 60/144, 518, 申请日为 1999 年 7 月 19 日；美国临时申请号 60/347, 806, 申请日为 01/10/2002；美国临时申请号 60/187, 560, 申请日为 3/7/2000；美国临时申请号 60/239, 969, 申请日为 10/13/2000；美国临时申请号 60/301, 708, 申请日为 6/28/2001；美国临时申请号 60/422, 604, 申请日为 10/31/02。

上述专利和专利申请被收作本文参考，包括所引用的材料。

光谱学是对光和物质相互作用的研究。在受到外部能源激发时，光能够被处于电磁谱（包括 γ 射线，X 射线，紫外线（UV），可见光，红外线，微波，和射频照射）的特征性波长（即，颜色）的物质吸收、反射、传输、发射、或散射。上述特征性波长随后可以导致对材料元素和/或分子组成的鉴定。实验通常由光源、光反射元件（即，棱镜或光栅）组成，以便产生光谱和检测装置。

在拉曼光谱学中，感兴趣的光子是通过材料散射的。如果入射光是单色的（单一波长），在它被用作激光光源时，小部分的散射会不同于激光的频率（波长）。另外，对于所存在的分子类型来说，散射光的频率是独一无二的，这种现象被称作拉曼效应。

在拉曼光谱学中，通过监测存在于散射光中的频率偏移，检测分子的能量水平。典型的实验包括单色光源（通常是激光），所述光源被导向样品。然后会发生若干种现象，包括使用诸如分光光度计和电荷耦合器件（CCD）检测器进行监测的拉曼散射。

与红外光谱类似，拉曼光谱揭示了材料的分子组成，包括存在于有机和无机分子中的特殊的官能团。可以使用拉曼光源，因为光谱反应表现出特征性的“指纹”光谱，使它服从各种选择规则。还可以将波峰形状，波峰位置，和对选择规则的顺应性用于确定分子构像信息（晶相，有序程度，张力，粒度等）。与红外光谱学不同，单个拉曼

分光光度计可用于同时对有机和无机材料进行分子表征。拉曼相对常规红外光谱学的其他优点包括分析水相材料的能力，和分析少有或没有样品制剂的材料的能力。与红外光谱学不同，对使用拉曼光谱学的阻碍包括拉曼现象的相对弱的性质，和由于荧光造成的干扰。在过去若干年中，业已将多种关键技术引入多种用途，这些技术使得科学家能够在很大程度上克服拉曼光谱学所固有的问题。所述技术包括高频固态激光，有效的激光排斥过滤器，和硅 CCD 检测器。

在荧光光谱学中，光子是在激发步骤之后从材料中发射的，其中，发生光子的吸收。实验通常包括多色激发光源，如水银 (Hg) 或氙 (Xe) 灯或单色光源，如用于样品激发的激光。然后可以将一部分发射光导入分散单色仪，诸如 CCD 的检测器装置连接在它上面。通过测定来自材料的荧光光谱，可以推测来自无机和有机物质的定性和定量信息。与拉曼光谱学相比，荧光本身更灵敏。十亿分之几的检测极限是常见的。另一方面，荧光比拉曼光具有更弱的选择性，并且不是所有的化学系统都能发出荧光。

分子 UV/可见和 NIR 吸收光谱学涉及分别通过 UV/可见光 (185-780 nm (54, 054 -12, 800 cm^{-1}) 和 NIR (780 nm - 2.5 μm (12, 800 - 4, 000 cm^{-1})) 光谱区的光子吸收。典型的仪器包括多色光源，如氙或石英钨卤素灯，诸如单色仪或干涉仪 的分散元件，以及诸如 Si CCD 或 InGaAs 聚集平面阵列检测器的检测装置。基于 UV-可见或 NIR 照射的吸收测量具有多种用途，可用于对无机和有机物质进行定性和定量测定。NE 光谱来自基本中-红外 (MIR) 波段的谐波和组合波段。与荧光类似，吸收光谱学是高度敏感的，但是只具有中等的选择性。

拉曼光谱学是多用途的技术，它十分适合对简单的和复杂的异质材料进行分析。光谱学分析的应用范围涉及分析聚合物混合物，对半导体进行缺陷状态分析，包括在人类乳腺组织中，表征腐蚀样品和检测分类，以及现在用于鉴定 BWAs 和 CWAs。宽视域拉曼光谱学与数字光谱分析组合，提供了比其他光谱学方法和成像或'湿'化学方法成本更低或更快速获得有关分子组成的定性和定量信息的潜在的解决方案。

宽视域拉曼光谱学和数字光谱处理分别组合了拉曼，荧光，UV/可见吸收/反射和 NIR 吸收/反射光谱学与对材料的分子特异性分析的

数字加工。这使得这种技术能够使样品的光谱在分散的波长（能量）下记录。光谱是从样品表面的所有点通过在一定波长范围内调整拉曼分光光度计，并且间断性地收集信号而产生的。根据选择的材料和光谱学方法，还可以通过使用不同的激发波长或通过于增加的聚焦平面而获得光谱学信息。根据样品中不同类型的物质产生的相对量的拉曼散射，荧光发射，UV/可见吸收/反射或 NIR 吸收/反射，在接受研究的材料中产生反差。由于光谱是一次从若干种成分材料中产生的，将数字分析方法用于光谱数据，以便提取有可能被普通的单变量测定所忽略的相关信息，所述数字分析方法如使用相关分析，主要成分分析（PCA）和因素轮换，包括多变量曲线解析（MCR）的化学计量分析。

基于宽视域拉曼光谱学仪器的即时炭疽检测系统

有多种基于宽视域拉曼光谱学的即时仪器构造能满足关键的仪器要求，前面所提到所述要求是有效的即时炭疽检测系统所必须的。上述构造包括基于显微镜、低倍放大镜、内窥镜、空气取样器设计或手持式设计的平台。上述每一种构造在下面将进行简单地说明。

基于显微镜的系统

所述宽视域显微-光谱学系统在单一平台上组合了用于样品激发的固态激光（仅为拉曼和激光诱导的荧光），折射光学显微镜底座，它装有无限校正的显微镜物镜，自动化的 XYZ 平移显微镜载物台和石英钨卤素（QTH）灯和/或水银（Hg）灯。所述显微镜系统的另一部分是模拟颜色电荷耦合器件（CCD）检测器，用于普通光学图像收集和分光光度计电介质或其他带通过滤器，和装有用用于光谱采集的 CCD 检测器的光学单色器。所述光学单色器以多种形式出现，涉及可调过滤器，线或点聚焦分散元件或傅里叶变换分光光度计。还包括室温或任选冷却的 IR FPA，用于 IR 图像捕获或热电冷却的（TE）Si CCD 检测器，用于 UV /可见、和荧光光谱捕获。使用 QTH 光源或其他宽带白色光源，包括金属卤化物，Hg 弧光灯或 Xe 弧光灯或使用 QTH 的透射光构造，或折射光学显微镜平台的其他合适的光源，将遥控的、UV、可见或 NIR 发光导向反射光构造中的样品。在拉曼或激光诱导的荧光实验中，通过使用拉曼发光器将激光照射导入样品。通过无限校正的显微镜物镜收集来自放置在自动化 XYZ 平移显微镜载物台上的样品的散射、发射、反射或透射光。在每一种照射方案中，选择照射的宽视域，

以便优化接受研究的样品的质量和可靠性以及完整性。

发射的普通光学图像可以使用插入显微镜钻台轮中的镜子或分光器或棱镜结构获得，并且通过模拟或数字颜色或单色电荷耦合器件（CCD）或 CMOS 检测器采集图像。可以在宽的视域/区域内获得完整的光谱，或者通过成像分光光度计连接放大的光学图像，并且收集在 NIR 或中-IR 聚焦平面阵列（FPA）检测器（用于 IR 光谱成像）或 Si CCD 检测器（用于 UV/可见吸收/反射、荧光和拉曼光谱成像）。IR FPA 通常包括砷化铟镓（InGaAs），不过，可以包括其他 IR 敏感材料，包括硅化铂（PtSi），铋化铟（InSb）或碲化汞镉（HgCdTe）。

将中央处理器，通常是奔腾计算机用于光谱学强度与波长收集和處理。用商业化软件，如与 ChemAnalyze（ChemImage Corporation.）组合的 ChemAcquire（ChemImage Corporation）操纵模拟颜色 CCD、IR FPA 和/或 Si CCD、通过控制器控制的自动化 XYZ 平移显微镜载物台和液晶或其他成像光谱仪（通过合适的成像分光光度计控制器）。

还可以使用以下类型的分光光度计：固定的滤器分光光度计；基于光栅的分光光度计；傅里叶变换分光光度计；或声-光分光光度计。不依赖于极化的干涉仪如：Michelson 干涉仪；Sagnac 干涉仪；Twynam-Green 干涉仪；Mach-Zehnder 干涉仪，可以用作过滤器。优选能够进行小规模光学标度的分光光度计设计，以便能够获得便携性更好的野外使用的装置。

可以将宽视域光谱学方法用于厚度测量，这是通过沿轴向 Z 方向的焦点移动样品，在聚焦平面上和聚焦平面外收集数据，并且在软件中重建样品的容量谱。对于具有某种体积的样品（填充材料，表面，界面，间相）来说，业已证实测定容量的光谱成像可用于故障分析，产品开发和常规质量监测。还存在同时进行定量分析和厚度分析的潜力。还能够以非接触方式进行容量的成像，不需要通过使用数字共聚焦技术改变样品，所述技术需要在分散的聚焦平面上进行测量。对得到的光谱分布图进行处理，重建，和显现。业已证实了基于多种策略的计算性光学截面重建技术，包括最近邻分析法和迭代解卷积法。

基于显微镜的宽视域光谱学系统具有例如能够对单一细菌的 BWAs 进行检测，分类，鉴定和观察的独特优点。该系统推广的光谱分辨率在 8cm^{-1} 的数量级，并且空间厚度分辨为大约 200 nm，采用数

字解卷积法。

基于低倍放大镜的系统

宽视域低倍放大镜-光谱学系统将照射组件组合在单个平台上，所述组件由照射光源（通常为 QTH，Xe，Hg 或其他金属卤素灯），屏障滤光器和光导向模块（即，定向光束，光学纤维或液体光导照射）组成。将模拟颜色电荷耦合器件（CCD）检测器用于普通的光学和数字图像采集。拉曼波长选择是使用成像或非-成像分光光度计进行的。所述检测器是室温或任选冷却的 NIR FPA，用于 NIR 图像捕获，或热电冷却的（TE）Si CCD 检测器，用于 UV/可见和荧光图像捕获。

在反射光构造中，使用 QTH 光源或其他宽带白色光源，包括金属卤化物，Hg 弧光灯或 Xe 弧光灯或透射光构造，或使用 QTH 或其他合适的光源，通过直接照射、光学纤维或液体光导，将 UV、可见或 NIR 照射导向样品。通过大镜头采集放置在低倍放大镜样品底座上的样品的发射，反射，或透射光。

样品的普通光学图像可以使用插入低倍放大镜收集叠层的镜子或分光器或棱镜结构获得，并且使用模拟或数字颜色或单色电荷耦合器件（CCD）或 CMOS 检测器采集图像。在拉曼光谱学模式下，通过成像或非-成像光谱仪获得光谱学信息。还可用于补充它的是聚焦平面阵列（FPA）检测器（用于 NIR 光谱成像）或 Si CCD 检测器（用于 UV/可见吸收/反射、荧光和拉曼光谱成像）。NIR FPA 通常包括砷化铟镓（InGaAs），不过，可以包括其他 NIR 敏感材料，包括硅化铂（PtSi），碲化铟（InSb）或碲化汞镉（HgCdTe）。

将中央处理器，通常是奔腾计算机用于光谱学强度与波长收集和处理。用商业化软件，如与 ChemAnalyze（ChemImage Corporation.）组合的 ChemAcquire（ChemImage Corporation）操纵模拟颜色 CCD、NIR FPA 和/或 Si CCD 和液晶或其他成像光谱仪（通过合适的成像分光光度计控制器）。

基于低倍放大镜的系统的使用具有能够在甚至更大范围内对潜在的 BWAs 和 CWAs 进行快速检测的优点。以前的研究业已证实了使用低倍放大镜系统对 200 mm 半导体晶片上的 0.01 mm 图像缺损进行检测的能力。

基于内窥镜的系统

拉曼光谱学在很大程度上是在实验室设置中进行的，使用研究级光学显微镜技术作为图像采集平台。不过，拉曼光谱学还可用于原位工业加工监测和体内临床分析。工业和临床设置通常需要紧凑的，重量轻的仪器，适合在常规光谱学装置无法接近的遥远区域进行检查。

业已开发出了具有数字分析能力的可靠的宽视域光谱学系统。与这种光谱学系统集成的成像内窥镜提供了具有光谱分析的实时视频检查能力。所述内窥镜与视频 CCD 结合，用于对分析区域进行实时视频成像。这使得能够对样品进行快速肉眼筛选。业已将内窥镜顶端工程改造成过滤激光照射并且采集拉曼散射和荧光发射（用于拉曼和荧光用途）。对来自激光输送纤维的光进行过滤，以便在样品中只存在激光波长。将所述激光从采集的光中除掉，以便拉曼信息在激光曲线的 200cm^{-1} 的范围内是可见的。拉曼内窥镜的远端是对环境具有抵抗能力的，并且能够承受在高温下连续工作，并且业已证实了能够在 $0-315^{\circ}\text{C}$ 下工作，同时保持高的信号与背景（S/B）性能。所述远端可以与基于显微镜的系统结合，以便能够遥控进行分散光谱学和光谱成像。

基于内窥镜的宽视域拉曼光谱学系统的使用，具有能够在诸如盒子或信封内的遥远区域检测怀疑的 BWAs 和 CWAs 的优点。

环境空气传感器系统

环境空气传感器系统由两部分，即采样系统和光谱成像系统组成。采样系统的关键是光学模块，在图 1 中示意性地示出。该模块必须支撑一部分过滤介质并且在采样区域周围提供了完全的空气密封。该模块还必须便于打开，以便可以将新的过滤器（分散过滤器）或新的过滤器部分（连续过滤器）放入采样/光学通道。

所述采样系统具有入口，该入口是通向要检测的大气的。对它的尺寸进行优化，以便适应采样流速和预期的粒度范围。对于颗粒或气溶胶采样来说，重要的是，所述入口没有锐弯或低线性速度区域，这些区域可能导致颗粒物在收集过滤器之前沉降。所述采样系统还具有采样泵，提供真空，以便通过过滤器抽环境空气。预期的流速在 $0.5-2.0\text{ L/分钟}$ 范围内，并且预期的真空为 100 mm-Hg （ 180 mm-Hg ）范围内。

采样系统通常不是连续运行的，而是以一系列不连续的采样周期运行的。在每一个周期结束时，可能必须更换过滤介质。这一目的可

以通过操作者完成或自动地完成。为了进行连续采样，过滤介质可以是带样构型，并且可以通过类似于盒式录音磁带的带传送机制将过滤器的新的样品放置在光学模块上。

一旦颗粒物被捕捉在过滤介质上，利用宽视域光谱学检测存在的 BWA 或 CWA，并且进行分类。如果激发光源是使用常规或光学纤维与所述光学模块连接的激光（它的光是在整个采样区域均匀地分布的），可以使用拉曼成像。在另一种构造中，可以使用包括宽带 UV/Vis，过滤的 UV/Vis，或 UV/Vis 激光的光源激发自发荧光。所述成像器可以是液晶可调类型的或其他成像分光光度计类型，正如以前所披露的，CCD 或其他阵列照相机可用于对多种波长的采样区域进行成像。检测器与光学模块的连接可以通过基于纤维的或常规光学元件完成。使用化学计量学和图像分析工具，如存在于 ChemAnalyze 软件（ChemImage Corporation）中的那些，处理所述检测器数据。

这种类型的环境空气监测器的典型的操作模式通常是一系列的采样周期，在此期间，定期进行光谱学图像测量。通过系统计算机分析来自以前的和当前的采样周期的结果，所述计算机能够显示结果，并且启动报警和危险警报，或启动某些动作，如关闭建筑物外部进风口。

手持式生物威胁检测器

现有的基于光谱学的生物威胁检测系统在尺寸和重量上受到产生并聚焦照射、采集发射光或散射光、以及进行所需要的光谱分析的所需各个组件的限制。检测病原微生物的宽视域方法的优点之一是该方法的简单性，允许对激发和检测系统进行设计、配置和集成。

该方法的功能和结构要求，允许实现若干可小型化的部件，而又没有显著的性能降低或限制。例如，能够设计包括波长可调过滤器或 MOEMS 装配的波长分散元件的低成本紧凑分光光度计，并且以足够的分辨率装配，以便检测由被研究的标本发射的光谱成分。工作像素 CMOS CCD 检测器或雪崩式光电二极管的发展，同样使得能够用小的紧凑传感器检测所得到的光谱特征并进行空间解析。这种可缩放的光学元件与这种宽视域方法的有效使用，使得它能够将这种检测系统的总体尺寸和重量按比例地缩小，从而能够生产出便携式手持装置。

结果

使用传统光谱学方法产生的光谱能够有效地揭示有关 BWAs 和

CWAs 的分子特征的大量的信息。目前所述的宽视域光谱学使得这种分析更可行和可靠，甚至在必要时能够检测存在的单个细菌。它还使得能够用于在存在非威胁'掩蔽'剂的情况下鉴定细菌孢子，并且体现在检测和鉴定 BWAs 和 CWAs 时的关键的组织。在试图分辨来自不同的细菌菌种的孢子时存在困难。图 2 表示三种不同细菌孢子类型的分散宽视域拉曼光谱。尽管存在遗传学和形态学相似性，业已将宽视域拉曼光谱学用于充分地分辨不同的细菌孢子。

图 3 表示如何将通过成像分光光度计获得的宽视域荧光光谱成像用于分辨不同类型的细菌孢子。附图中下面部分的荧光光谱是从上面的浓缩荧光光谱图像的颜色编码的加方框的区域获得的。可以看出，枯草杆菌孢子和短小芽胞杆菌孢子分别在 540 和 630nm 波长下表现出荧光波峰。

图 4 表示对由 US Armed Forces Institute of Pathology (AFIP) 提供的未确定的样品进行快速宽视域光谱学检查的结果。所述样品包括四个样品，包括六种未知的粉末和 BG 孢子样品。

图 4A 表示通过管形瓶的 6 种未确定的粉末的宽视域拉曼光谱(绿色激光激发)。

图 4B 表示 6 种未确定的粉末的宽视域拉曼光谱(红色激光激发)。

图 4C-4D(样品 1331-002)表示 6 种未确定的粉末中的第一种样品的宽视域拉曼、IR 和 SEM-EDS 结果。所述样品是无机的，并且极有可能是滑石。

图 4E-4F(样品 1325-002) 表示 6 种未确定的粉末中的第二种样品的宽视域拉曼、IR 和 SEM-EDS 结果。所述样品是有机样品，并且极有可能是淀粉，可能是玉米淀粉。

图 4G-4H(样品 1303-002) 表示 6 种未确定的粉末中的第三种样品的宽视域拉曼、IR 和 SEM-EDS 结果。所述样品是有机样品，并且极有可能是淀粉，可能是玉米淀粉。

图 4I-4N(样品 1291-006)表示其余未确定的粉末的宽视域拉曼、IR 和 SEM-EDS 结果。在该样品中存在三种不同类型的粉末。所有三种粉末都具有有机成分，同时三种粉末中有两种还富含硅铝酸盐。所述粉末之一可能是复杂的芳香烃。

图 4O 表示两种普通白色粉末的宽视域拉曼光谱和图像，这两种粉

末通过拉曼化学成像能够方便地区分。

图 4P 表示样品 BG 孢子与通过商业渠道获得的 BG 孢子的宽视域拉曼光谱的比较。同样示出了两种样品的混合物的拉曼光谱。拉曼光谱表明，所述样品是相似的，几乎相同的。

图 4Q 表示宽视域拉曼图像，其中两种类似的孢子是根据自发荧光差异区分的。

图 5 表示来自其他孢子样品的结果，所述样品是因为区分这些菌种的固有的难度而专门选择的。这些菌种包括苏云金芽孢杆菌（BT），蜡状芽孢杆菌（BC）和 BG。来自 3 种孢子的宽视域拉曼光谱是不同的。以上差异表明了，对区分炭疽和非威胁物质的良好的改善。细节如下：

图 5A 表示 BT 和悬浮液残余物的原始宽视域拉曼光谱。所述残余物来自悬浮液。

图 5B 表示 BT 和残余物的背景校正宽视域光谱。业已通过显微镜载玻片的光谱分开了孢子光谱和残余物光谱。

图 5C 表示 BC 和悬浮液残余物的原始拉曼光谱。

图 5D 表示 BC 和悬浮液残余物的背景校正光谱。

图 5E 表示样品 BT, BC 和 BG 光谱与显微镜载玻片背景校正的汇编。所述光谱是不同的。所述差异在指纹区最大。

图 5F 表示在基线扣除之后 3 种孢子的汇编，和对 CH 区光谱特征（约 2950cm^{-1} ）的归一化。

图 6 表示如何将宽视域拉曼光谱学应用于区分同一菌种内的多种不同的细菌菌株。

图 7 表示如何将宽视域拉曼光谱学应用于在不同条件下区分在不同条件下生长的相同菌种和细菌菌株。

图 8 表示感兴趣的炭疽芽孢杆菌（炭疽）孢子的宽视域拉曼光谱学的各个区域，和可再现性地地区分类似材料的能力。

图 9 表示如何将宽视域拉曼光谱学用于区分存活的和未存活的内生孢子，它是决定实际威胁水平的关键参数。

图 10 表示作为存在的孢子的函数的宽视域荧光和拉曼信噪比，以及该方法的总的灵敏度。

图 11 表示宽视域拉曼光谱学结果的 ROC 分析，示出了该方法区

分炭疽和其他模拟物的特异性。

图 12 表示手持式病原微生物检测单元，它能测量大约 6 英寸 x 3 英寸 x 1 英寸的面积，并且是基于宽视域拉曼方法的。这种特殊单元具有叠层的或组件式功能层，包括包含显示器和用户界面的顶层，容纳发光器，分光光度计，传感器和控制电子元件的中间层，以及支持采样模块的下层。每一层都可以改变，以便满足特殊需要和功能要求。例如，所述采样模块可以针对不同环境中的病原体采样而不同，并且是以环境空气监测或表面检测模式示出的。该下部采样模块还可以更换成其他形式，以便采集各种流体，如水或血液中的病原体。

业已将炭疽孢子应用于在可靠的生物危害实验室中进行宽视域拉曼分析（图 8）。业已通过宽视域拉曼方法区分了不同的炭疽孢子的菌株（图 6）。另外，业已将宽视域拉曼光谱学用于区分在不同环境条件下和/或生长培养基生长的相同的菌种和菌株（图 7）。这种能力可用于研究目的。并且，业已将宽视域拉曼光谱学用于区分存活的和未存活的内生孢子（图 9）。怀疑的孢子的存活力是决定构成实际威胁的关键参数。

本发明人期望以下病原微生物可以通过宽视域拉曼方法和所得到的光谱分布图进行菌种、菌株和存活力的检测和分类：cryptosporidia；大肠杆菌；瘟疫（鼠疫耶尔森氏菌；天花（重型天花）；野兔热（土拉热弗朗西斯氏菌；布鲁氏菌病（布鲁氏菌；产气荚膜梭菌；鼻疽（鼻疽伯克氏菌；类鼻疽（类鼻疽伯克氏菌；鹦鹉热（鹦鹉热衣原体；Q 热（伯氏考克斯氏体；斑疹伤寒（普氏立克次氏体；弧菌；贾第鞭毛虫；白色假丝酵母；粪肠球菌；表皮葡萄球菌；金黄色葡萄球菌；产气肠杆菌；白喉棒状杆菌；绿脓假单胞菌；醋酸钙不动杆菌；肺炎克雷伯氏菌；粘质沙雷氏菌；线状病毒（如埃博拉和马尔堡病毒），naviruses 病毒（如拉萨热和 Machupo 病毒）和甲病毒（如委内瑞拉马脑炎，东方马脑炎，和西方马脑炎）。

先进的光谱分析和化学计量学工具利用拉曼或荧光光谱的差异而鉴定菌种，如图 11 所示。可以将类似方法用于建立图像，包括依次从接受研究的基片表面的至少两个不同区域获得光谱的图像。以下是用于进行这种分析的典型的算法：

- 1) 通过背景图象（在没有样品的条件下获得）划分原始图像

2) 被所得到的图像进行大范围过滤(对像素进行中等过滤, 它的值与局部相邻的区域的平均值显著不同)

3) 利用排列方法校正在数据采集期间样品的轻微运动

4) 采用空间平均过滤器

5) 进行光谱归一化(有助于纠正通过样品的变化的照射)

6) 对每一组的三个光谱点进行光谱运行平均

7) 提取相当于 550-620 nm 的一组图象。在该范围内, 两种细菌孢子(枯草芽孢杆菌黑色变种和短小芽胞杆菌)的光谱大体上是线性的。枯草芽孢杆菌黑色变种具有正的斜率, 而短小芽胞杆菌具有负的斜率。

8) 建立单帧图像, 其中, 每一个强度值是光谱亚区的斜率(从最后的图像)。所述斜率是通过最小二乘法拟合确定的。

9) 放大 0-4095 之间的所得到的图像, 保持从 0→4095 的点的轨迹, 它相当于先前图像中的 0("零点")。

10) 根据下面一系列步骤产生掩蔽图像:

a) 根据排列的图像(第三个步骤)计算单帧“最亮”图像, 其中, 每一个像素的强度是每一种光谱的最大强度值。

b) 对 0-4095 之间的最亮的图像进行标度。

c) 根据所述标度的图像产生二进制图像, 其中, 将强度大于 900 的每一个像素在新的图像中设定为 1, 并且将强度小于 900 的每一个像素在新的图像中设定为 0。900 的值是通过检查与标度的图像相关的直方图选择的。所述算法的未来的改进是通过对特定图像的直方图进行数字分析自动选择阈值。

11) 通过来自步骤 10 的掩蔽图像倍增来自步骤 9 的标度的影像。这将视觉显示仅局限于相当于孢子的区域。所述结果是灰色标尺图像, 其中, 在步骤 9 中确定的低于零点的强度相当于短小芽胞杆菌, 而高于零点的强度值相当于枯草芽孢杆菌黑色变种。

12) 然后通过将所有的“负”值设定为红色, 将所有的“正”值设定为绿色产生最终的 RGB 图像。

应用

存在对光谱学和数字分析系统的巨大需求, 该系统能够提供对 BWAs 和 CWAs 的高处理量, 非接触, 实时检测, 分类和鉴定, 具有

高的精确性，并且需要有限的或不需样品制备。适合对 BWAs 和 CWAs 进行客观评估的仪器的用户基础包括有害材料（HAZMAT）工作组；政府和私人机构，在这里存在较高的潜在威胁，邮件处理机构，学术机构，工业和医学研究实验室等。

对即时炭疽或其他微生物威胁检测系统的目标用户的好处是明显的。在低倍放大镜形式的技术中，可以利用光谱成像对怀疑有 BWAs 和 CWAs 的大的区域进行快速评估，这种评估是基于它们的荧光，NIR 和/或 UV/可见光反应。在显微镜模式下，可以进行怀疑的 BWAs 和 CWAs 的阳性检测、分类、鉴定和观察。在内窥镜模式下，可以对 BWAs 和 CWAs 进行遥控检测、分类、鉴定和观察。在 FAST 模式下，可以在远处对 BWAs 和 CWAs 进行检测、分类、鉴定和观察或在显微镜下进行实时检测。对于空气取样器结构来说，可以对 BWAs 和 CWAs 进行明确的检测。

在以组合方式进行时，有可能增强表征 BWAs 和 CWAs 的效果。优点包括，但不局限于以下所列举的：

- 快速大面积筛选，以便检测怀疑的 BWAs 和 CWAs。
- 怀疑的 BWAs 和 CWAs 的阳性检测，分类，鉴定和观察。
- 无接触
- 需要有限的或不需样品制备。
- 怀疑的 BWAs 和 CWAs 的遥控检测，分类，鉴定和观察。
- 对固体或气体样品中怀疑的 BWAs 和 CWAs 的实时检测，分类，鉴定和观察。

用于即时炭疽检测的宽视域成像和光谱学系统的具体用途包括以下所列举的：

- 分辨威胁和非威胁'掩蔽'剂
- BWAs 和 CWAs 的空间分布
- 低到单个细菌孢子的 BWAs 和 CWAs 的空间分布

相对现有技术的优点

检测 BWAs 和 CWAs 的传统方法包括接种方法，酶联免疫吸附测定（ELISA）方法，生物威胁报警（BTA）检测条，基于 DNA 的检测，DNA 芯片分析和质谱分析。接种方法涉及将怀疑的培养物或标本接种到动物体内，然后观察疾病的发展。除了动物残酷问题之外，这些方

法存在的缺陷包括需要大量时间达到检测点。

ELISA 测验涉及抗体检测。该技术同样是缓慢的，并且存在高假阳性（不相关的抗体与抗原非特异性反应）和较差的，高假阴性（存在于血液中的干扰化合物或浓度不足以检测的抗体）。另外，患者可以在患者恢复之后长时间检测出抗体是阳性的。

BTA 检测条是小的塑料装置，它的作用与家庭妊娠试验非常类似。所述检测条包括特异性抗体，它能改变检测条的颜色，表明生物威胁剂的存在。阴性结果意味着在所述检测条的检测极限内不存在生物威胁剂。尽管结果能够在较短的时间（15 分钟）内获得，假阴性和假阳性的几率很高。

基于 DNA 的检测通过识别它们的遗传序列检测各种物质。尽管比 BTA 检测条更灵敏，基于 DNA 的检测更容易受掩蔽剂的影响，并且涉及长的分析时间。DNA 芯片分析涉及将 DNA 链固定在 Si 或玻璃晶片芯片上。DNA 能够结合或者与杂交于检测样品中的互补的 DNA 链。特别设计的显微镜能够检测 DNA 在何处杂交。扩增是通过聚合酶链反应（PCR）完成的。据报道生物威胁剂的检测可以在数分钟内完成。

基于 DNA 的方法的限制是双倍的。首先，将 DNA 方法设计成能通过它的独特的 DNA 序列检测特殊的威胁剂。因此，每一次 DNA 检测对一种物质是专一的，如果需要检测其他物质，必须开发其他的检测试剂。第二种限制涉及由于环境污染造成的假阴性和假阳性问题。众所周知的是，DNA 检测在“现实世界”样品中产生正确结果中存在问题。

当细胞或孢子在高真空下进行离子化处理以便鉴定生物体，质谱分析（MS）利用了大量片段模式。它具有能够进行非常灵敏的检测的优点，但是需要复杂的采样系统，以便将代表性的样品输入到离子发生器。MS 的主要限制是它需要使用高真空泵，这种泵本身是精密的和昂贵的。其他的限制是，与光谱学化学成像相比，它是一种破坏性的技术，而化学成像是完全无破坏性的技术。

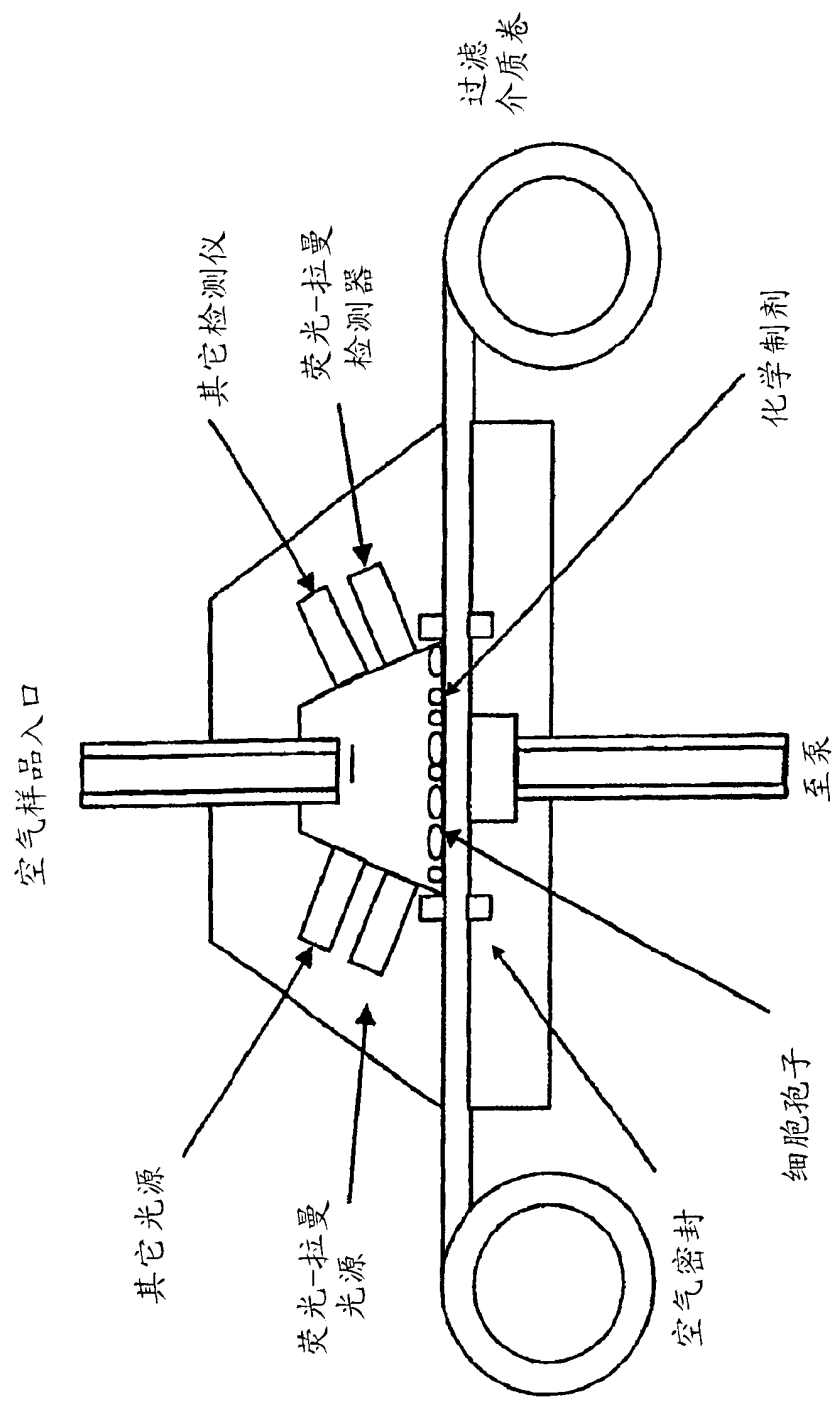
其他技术/机会包括基于显微-光谱学方法的显微-探头或显微镜方法，包括拉曼，荧光，NIR 等，用于对 BWAs 和 CWAs 进行快速，非接触和精确检测。这些类型的工具提供了在局部或遥远环境中存在其他 BWAs，CWAs 和/或非威胁‘掩蔽’剂的条件对 BWAs 和 CWAs 的

分布进行检测，分类，鉴定和观察的能力，所述特征是传统方法不能提供的。所述工具能够大大降低假阳性和假阴性的可能性，并且提供了能够在几分钟内确定是否存在真正的生物威胁的方法。

其他基于光谱学的方法

能够与上述方法竞争的光谱学技术包括红外（IR）光谱学。IR 光谱学由于在 IR 中强的水吸收导致的困难而无法竞争。因此，BWA IR 光谱可能具有非常强的水信号。

很显然，在阅读以上说明之后，可以对本发明进行很多改进和改变。因此，应当理解的是，在所附权利要求书的范围内，本发明能够以除了具体所述方式以外的形式实施。



集成的检测器样品室

图 1

炭疽模拟物的分散的拉曼光谱
使用ChemIcon FALCON™ Raman化学成像显微镜

- 来自水性悬浮液的沉积在显微镜载玻片上的细菌
- 从样品光谱中扣除的显微镜载玻片背景光谱

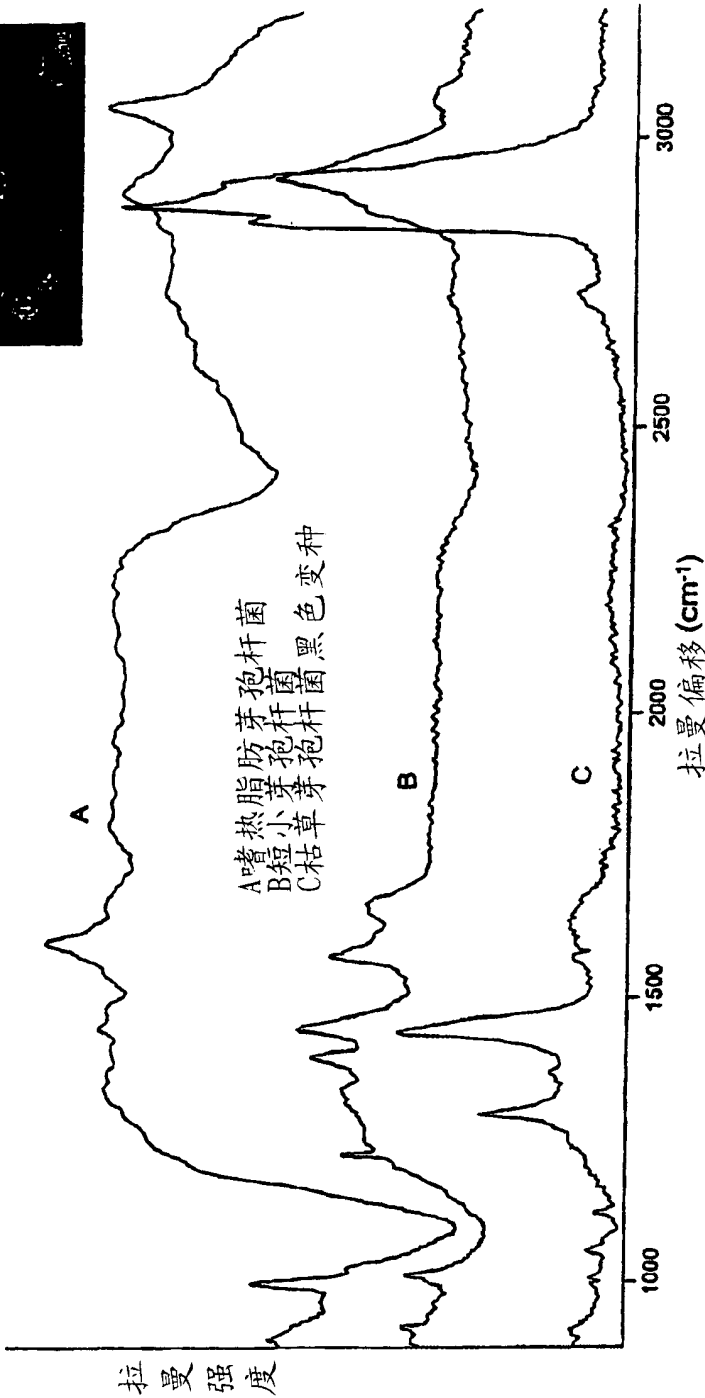
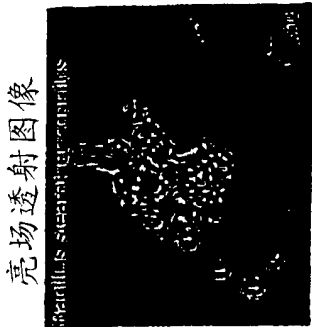


图 2

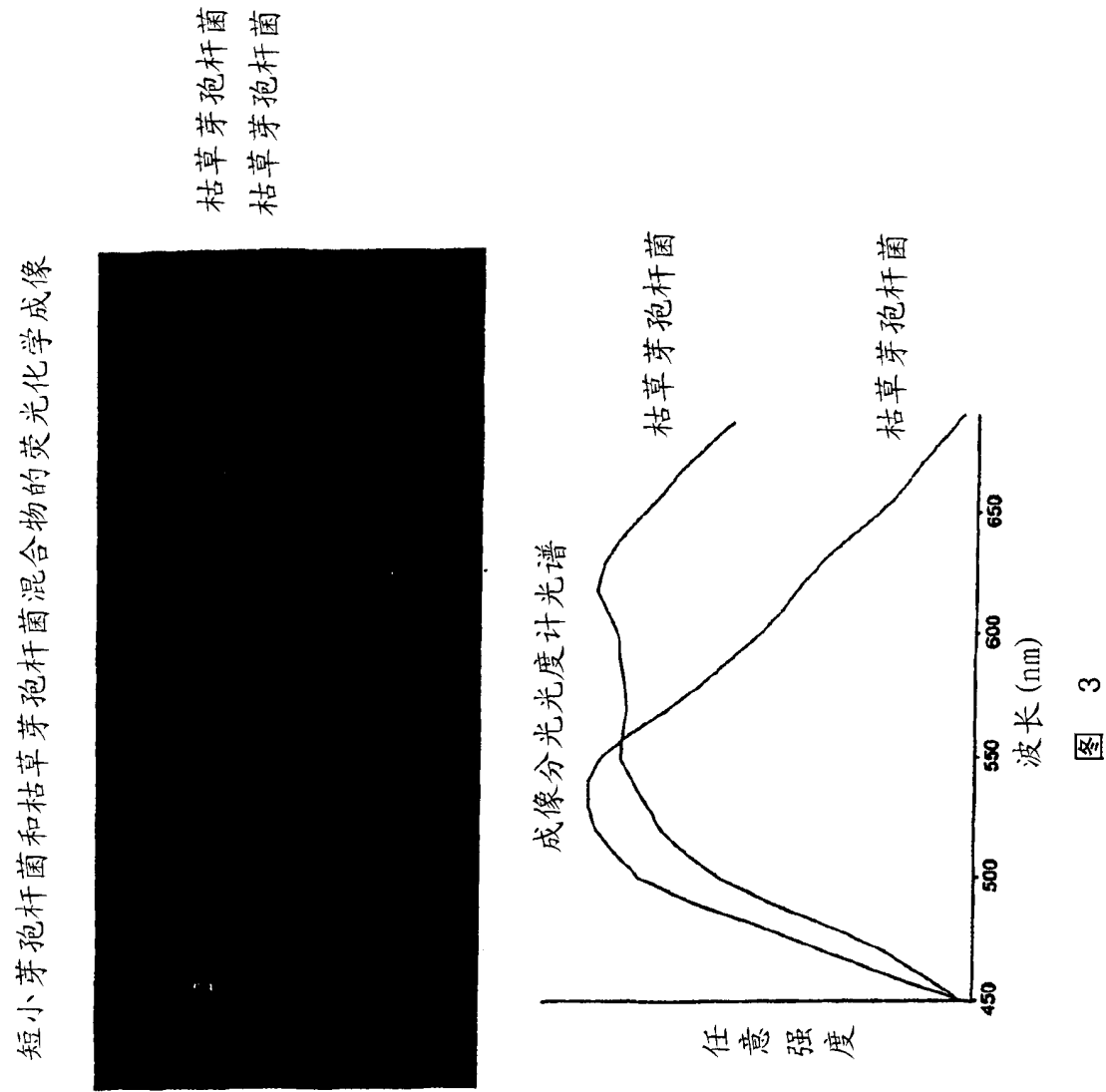


图 3

AFIP粉末样品的分散拉曼光谱
532nm激光激发-通过管形瓶收集的(原始光谱)

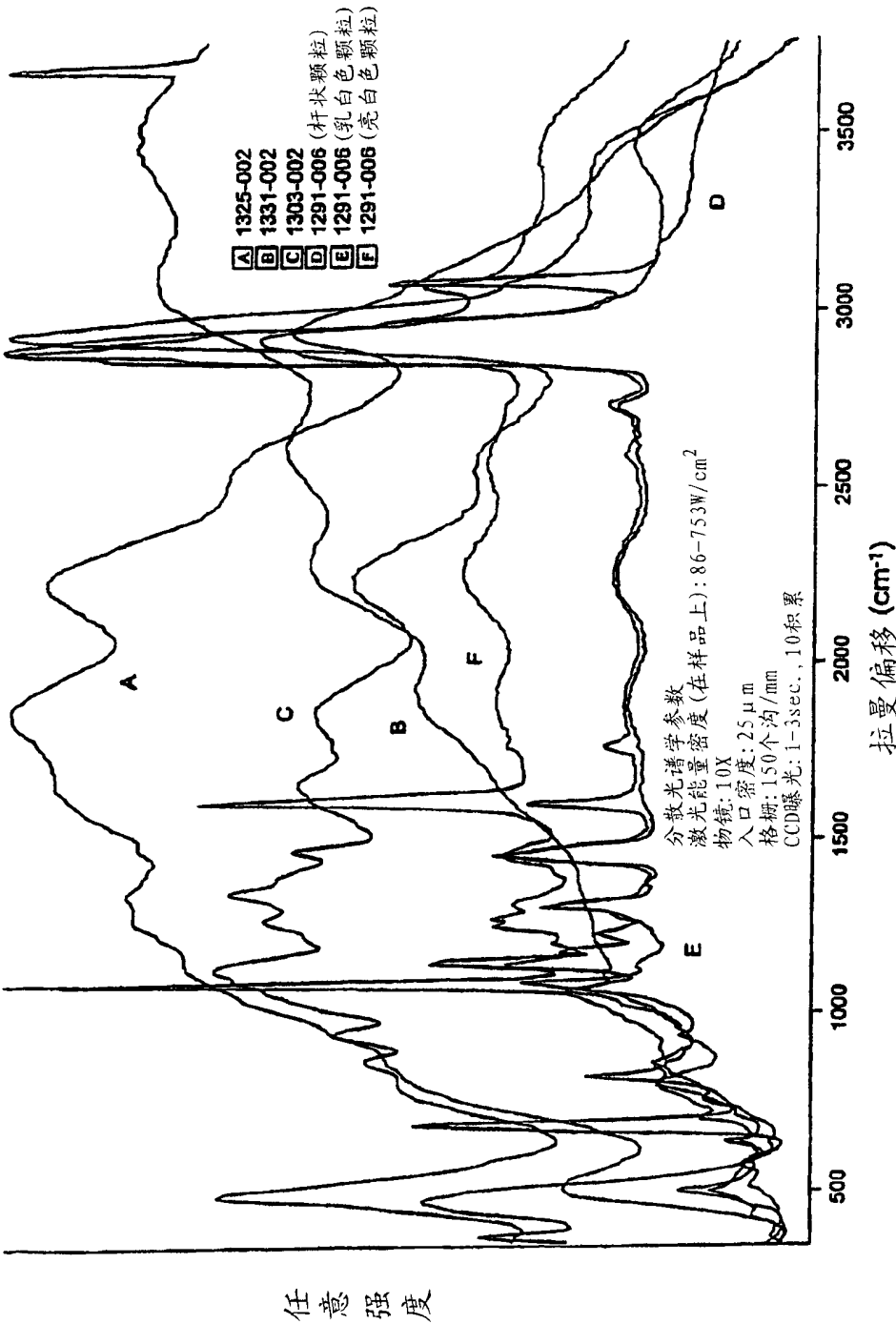


图 4A

AFIP粉末样品的分散拉曼光谱
789.5nm激光激发-直接在粉末上采集(背景校正)

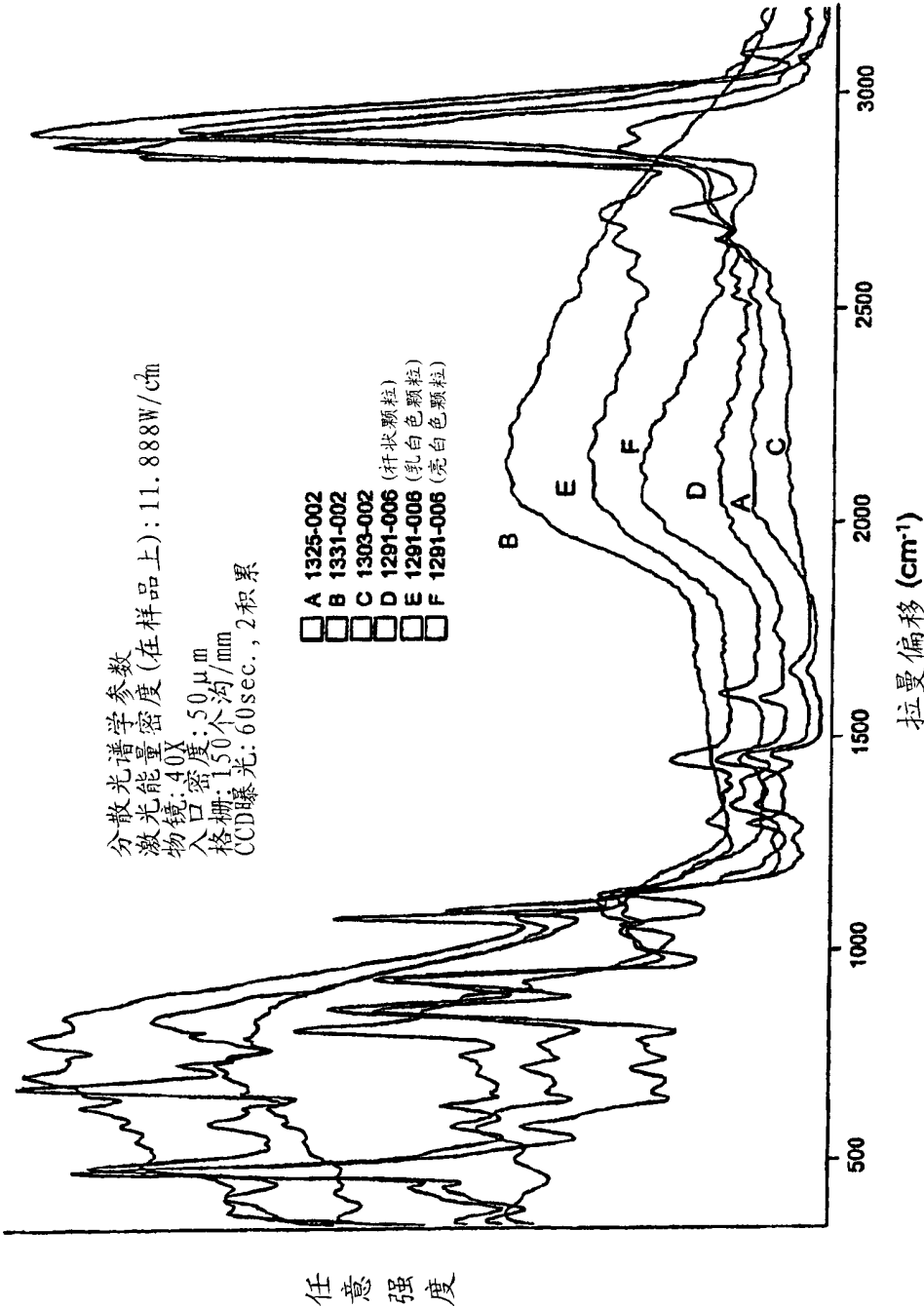


图 4B

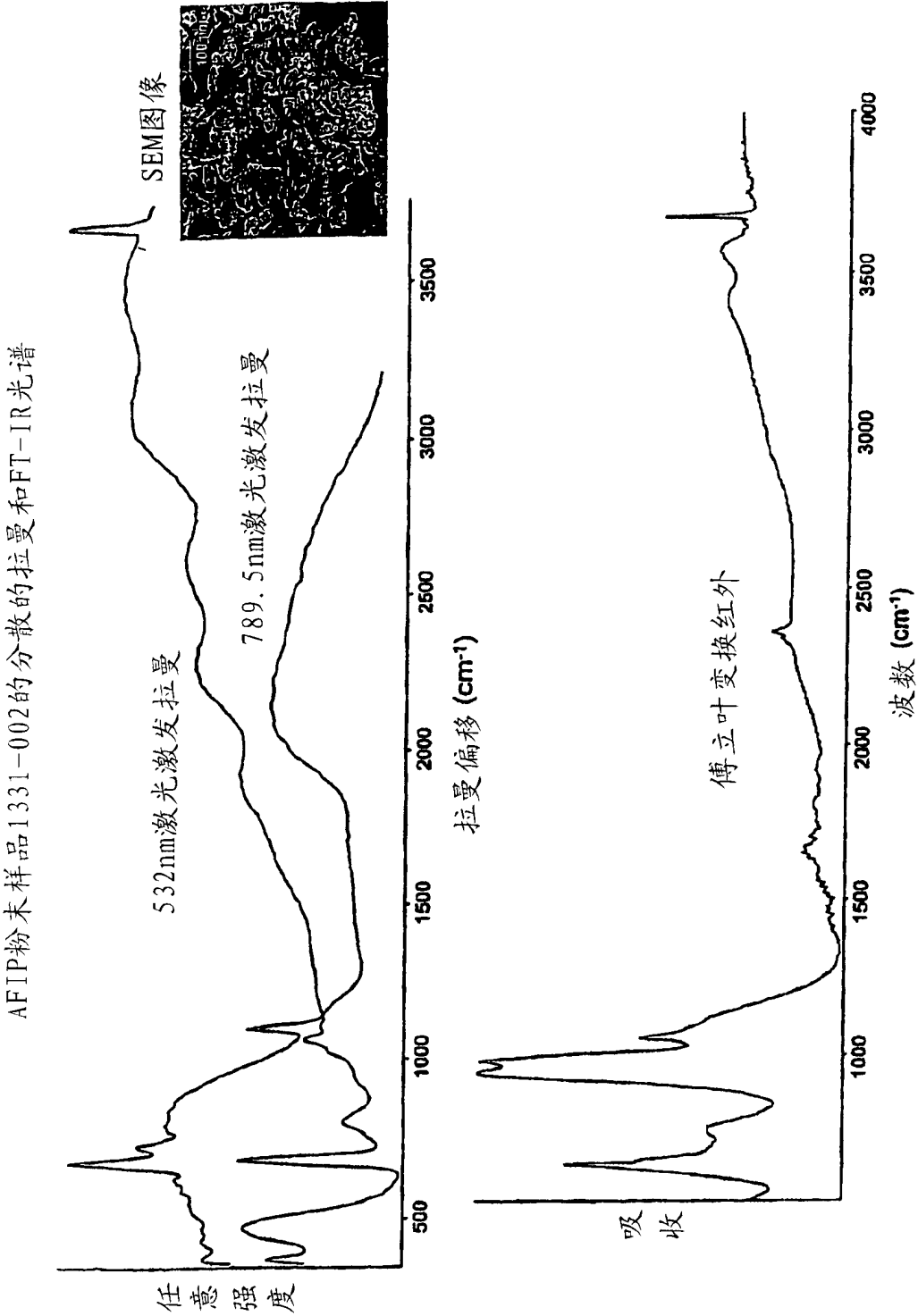
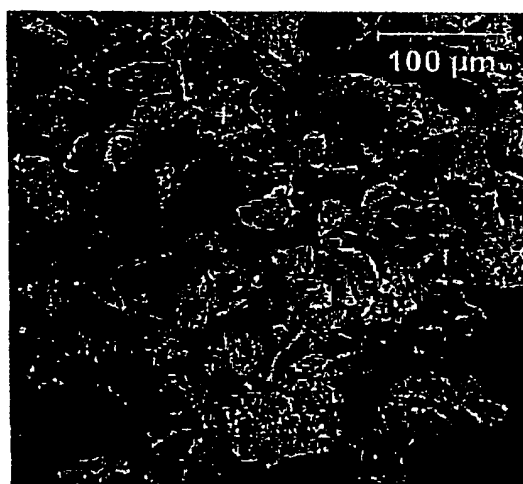


图 4C

AFIP粉末样品1331-002的SEM/EDS

反向散射电子图像



能量分散光谱

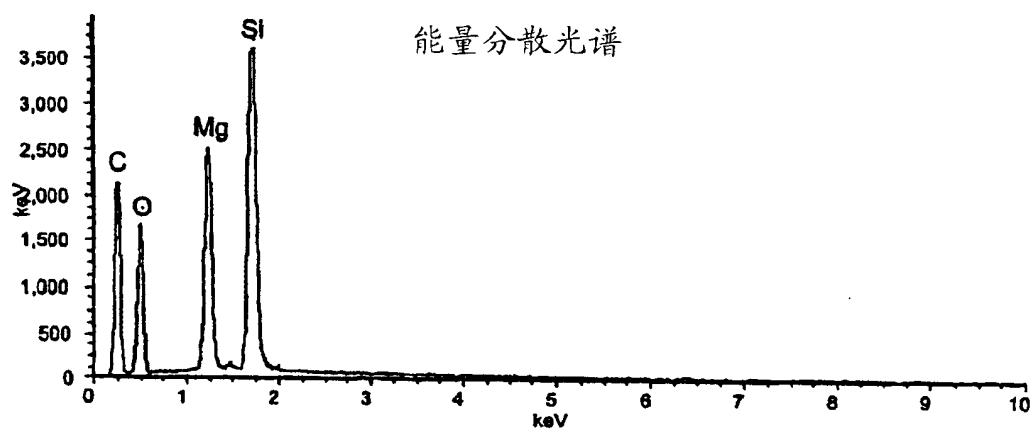


图 4D

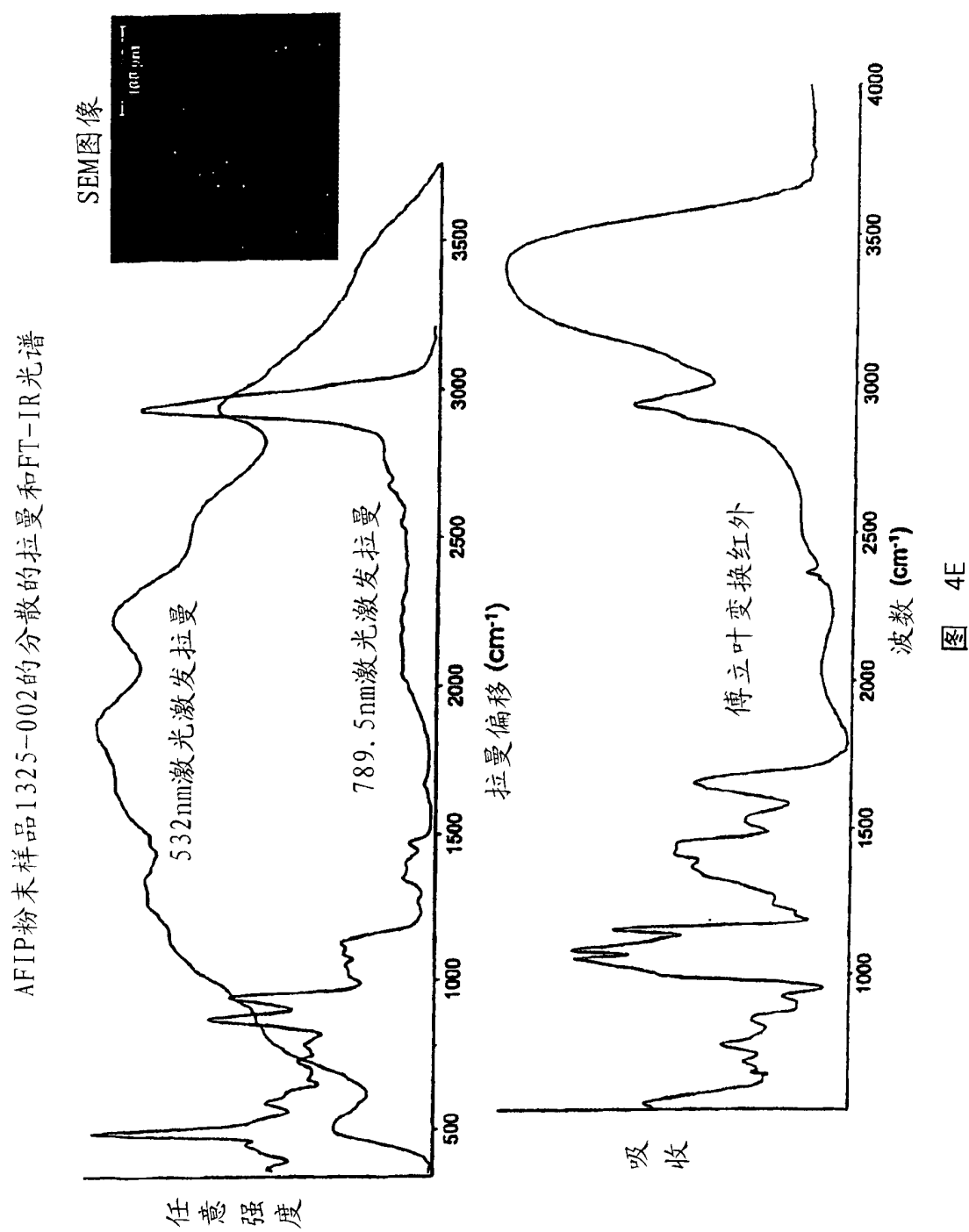


图 4E

AFIP粉末样品1325-002的SEM/EDS

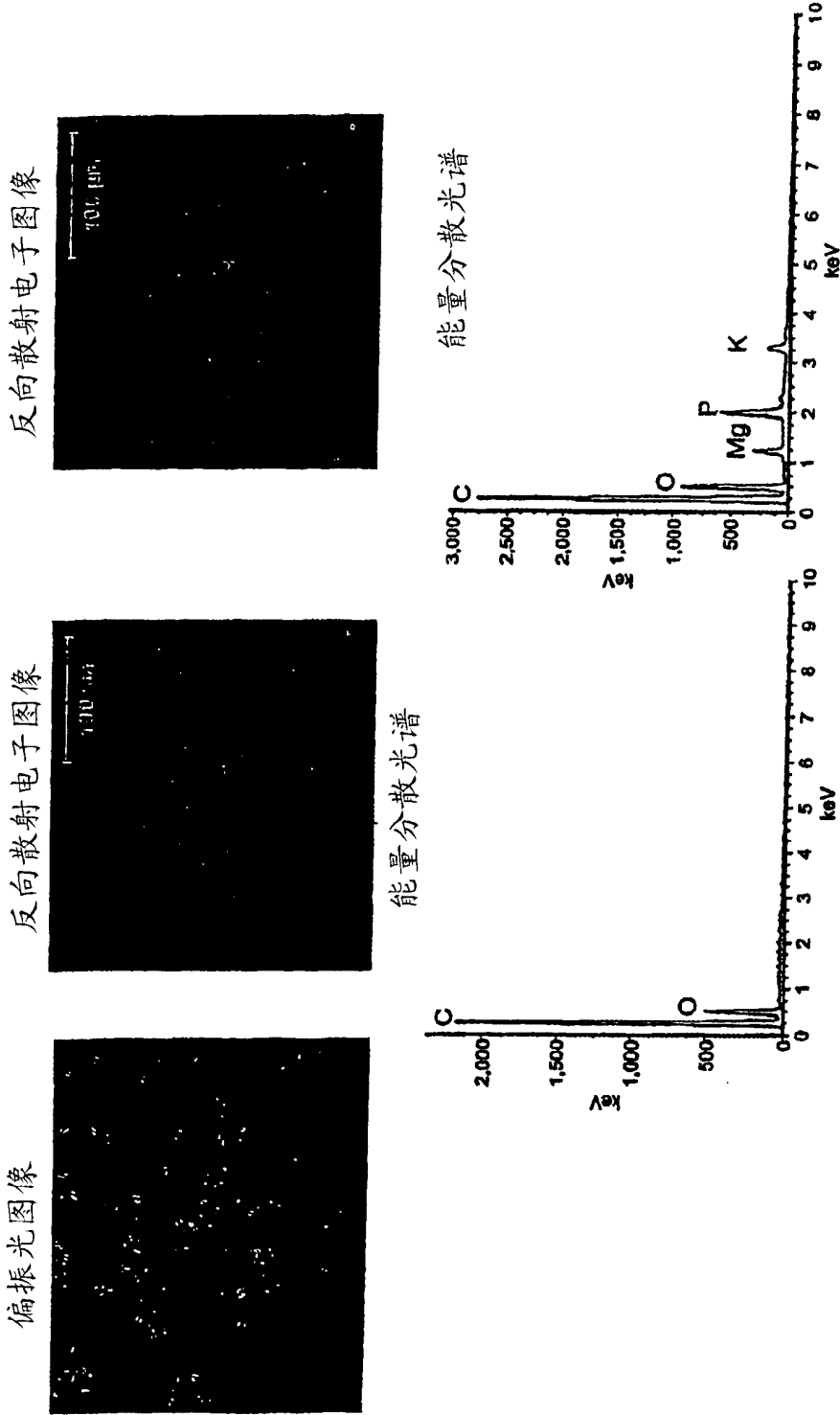


图 4F

AFIP粉末样品1303-002的分散的拉曼和FT-IR光谱

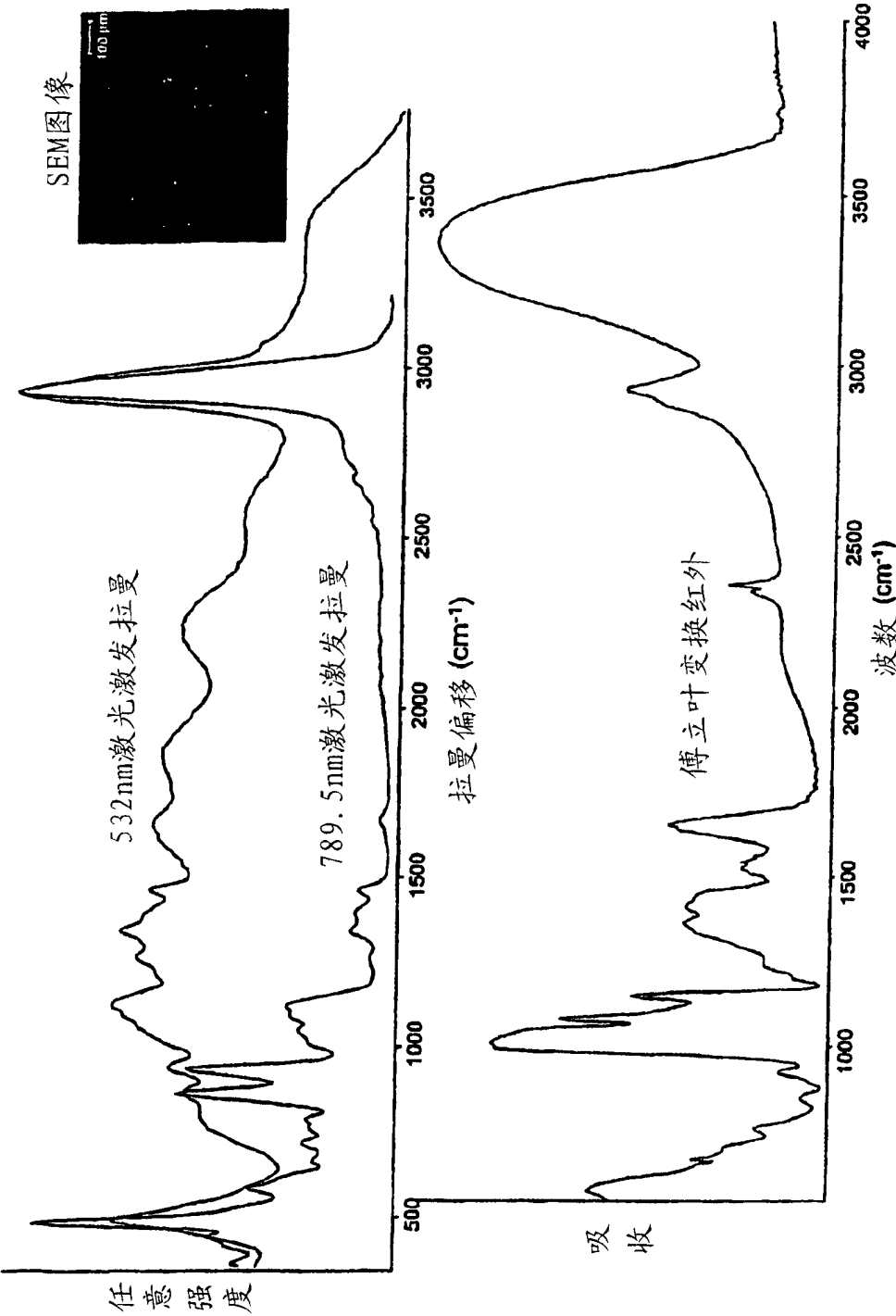


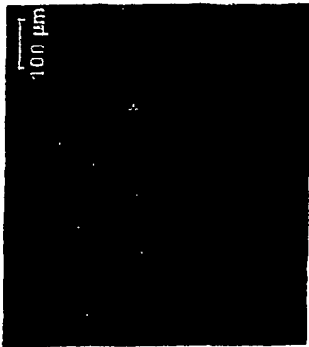
图 4G

AFIP粉末样品1303-002的SEM/EDS

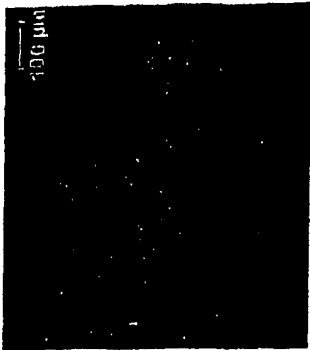
偏振光图像



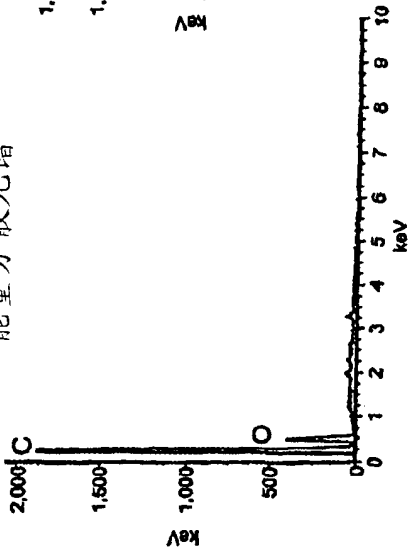
反向散射电子图像



反向散射电子图像



能量分散光谱



能量分散光谱

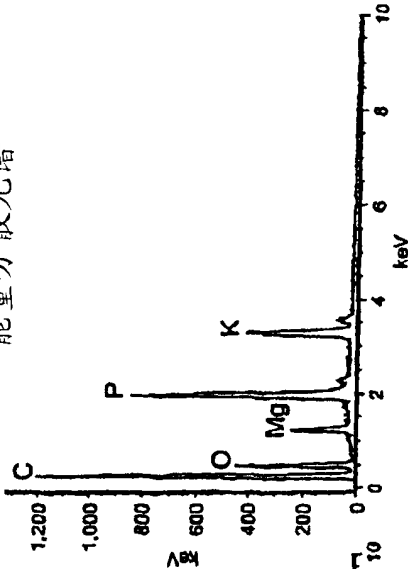


图 4H

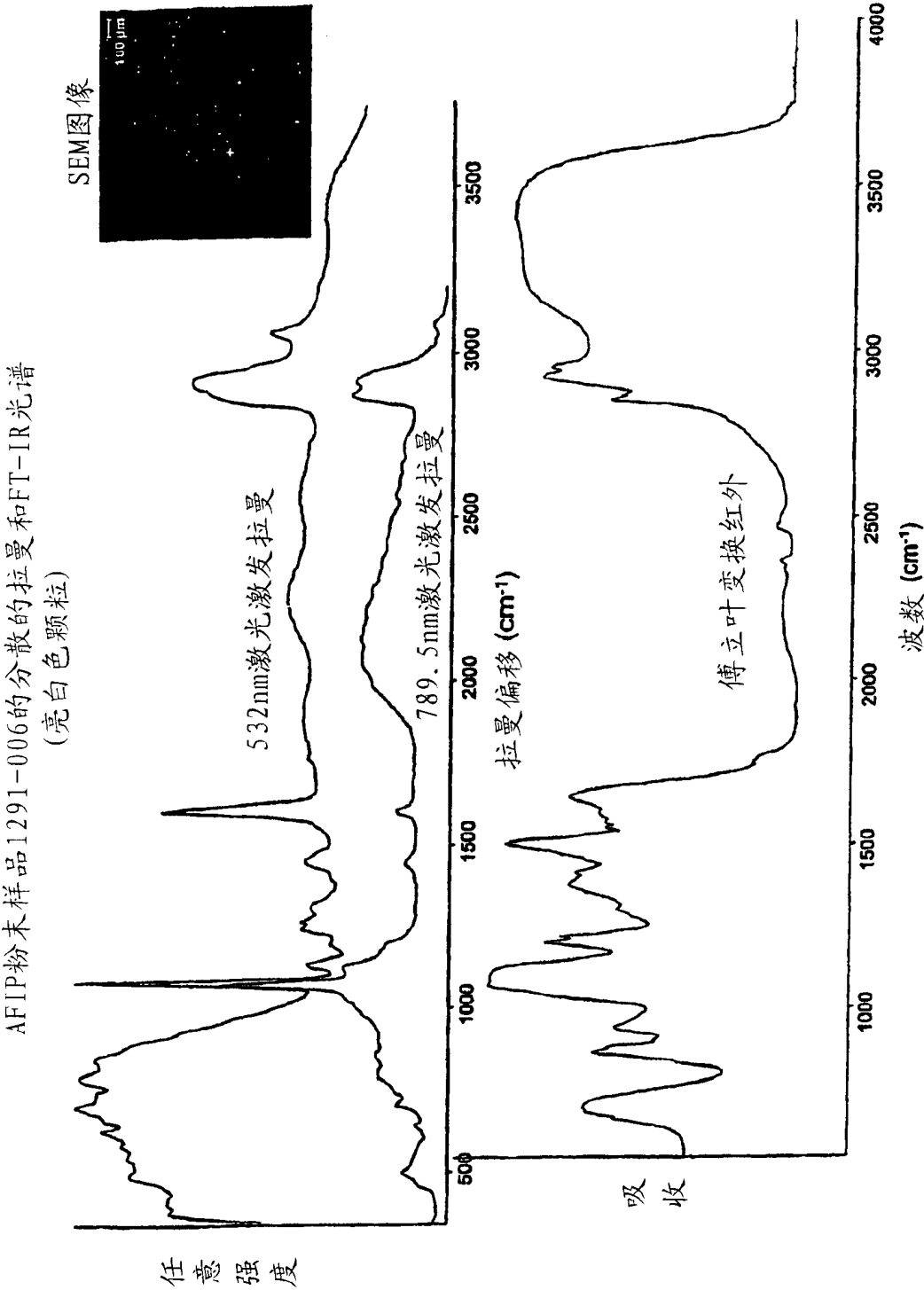
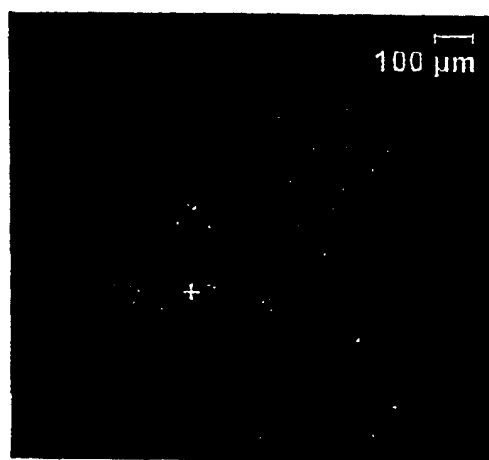


图 41

AFIP粉末样品1291-006的SEM/EDS (亮白色颗粒)

反向散射电子图像



能量分散光谱

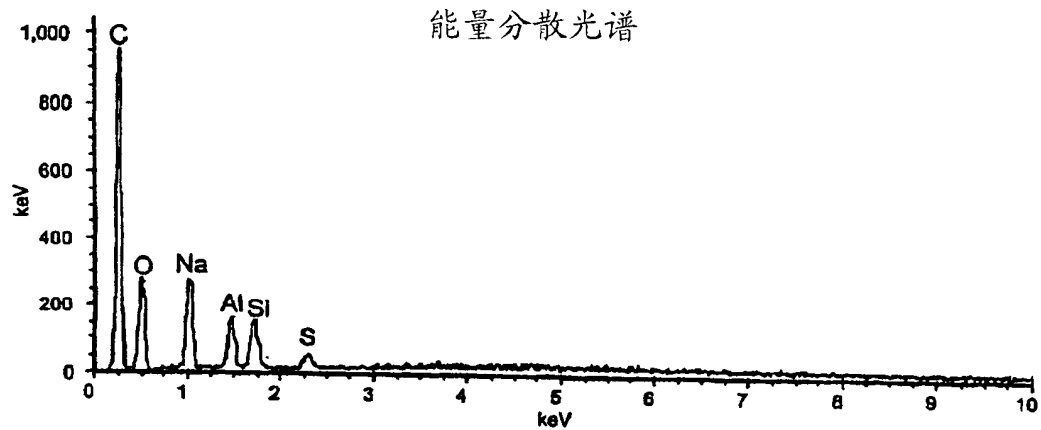


图 4J

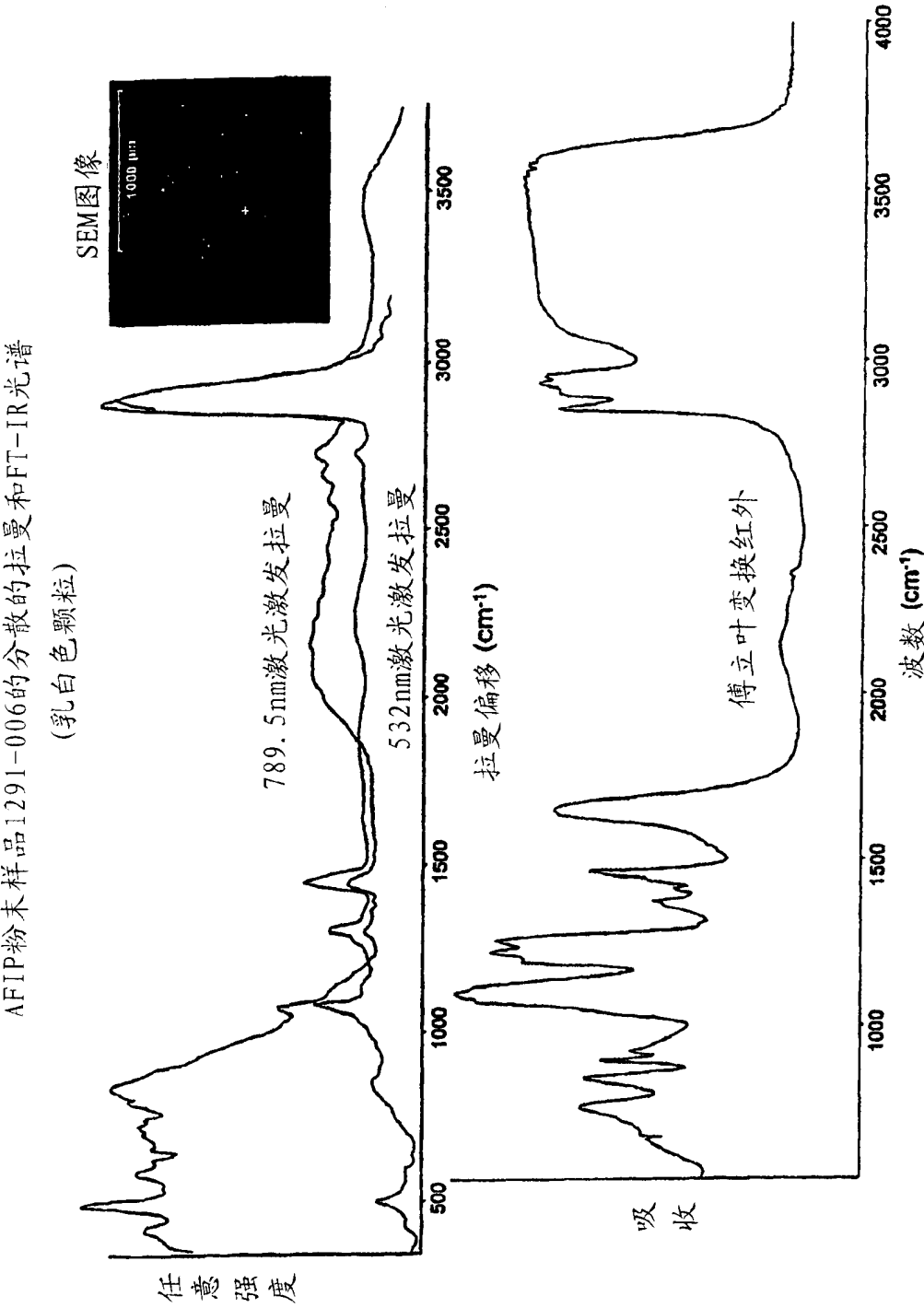
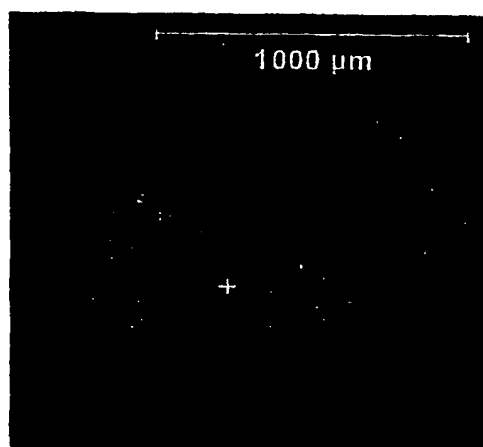


图 4K

AFIP粉末样品1291-006的SEM/EDS (乳白色颗粒)

反向散射电子图像



能量分散光谱

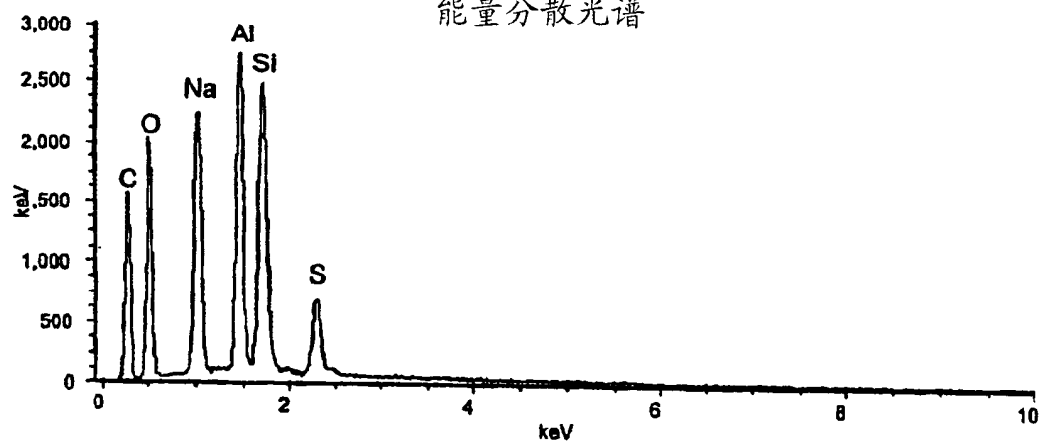


图 4L

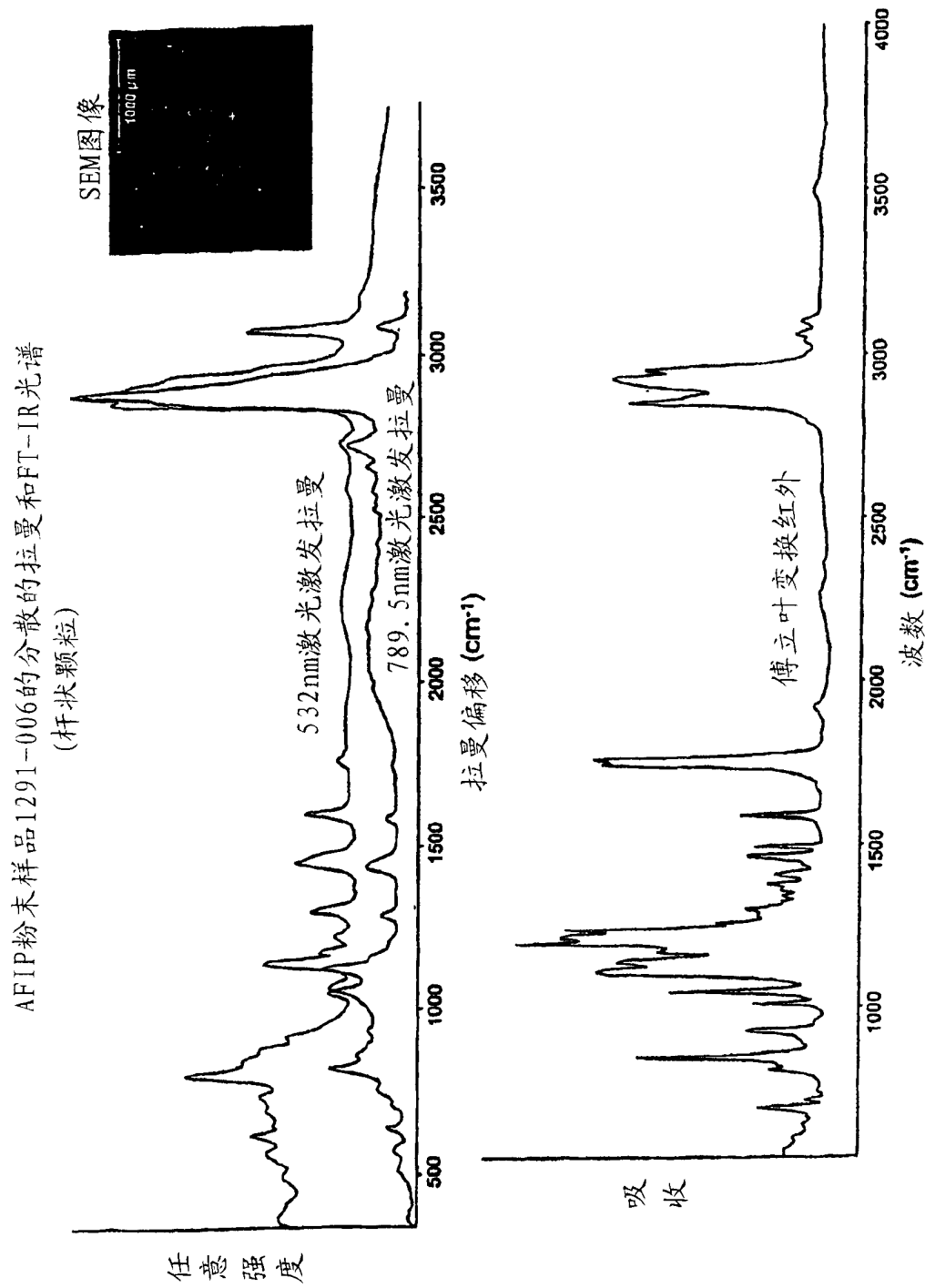
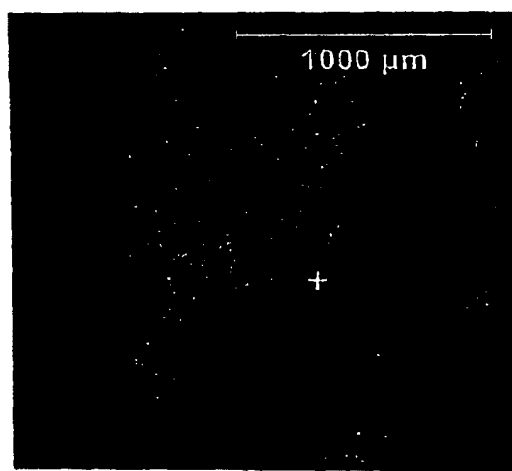


图 4M

AFIP粉末样品1291-006的SEM/EDS (杆状颗粒)

反向散射电子图像



能量分散光谱

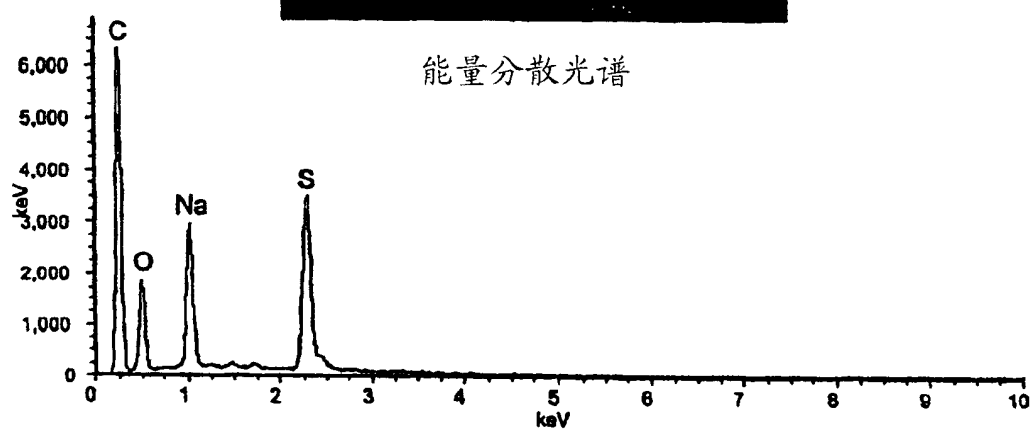


图 4N

普通白色粉末的分散拉曼光谱学

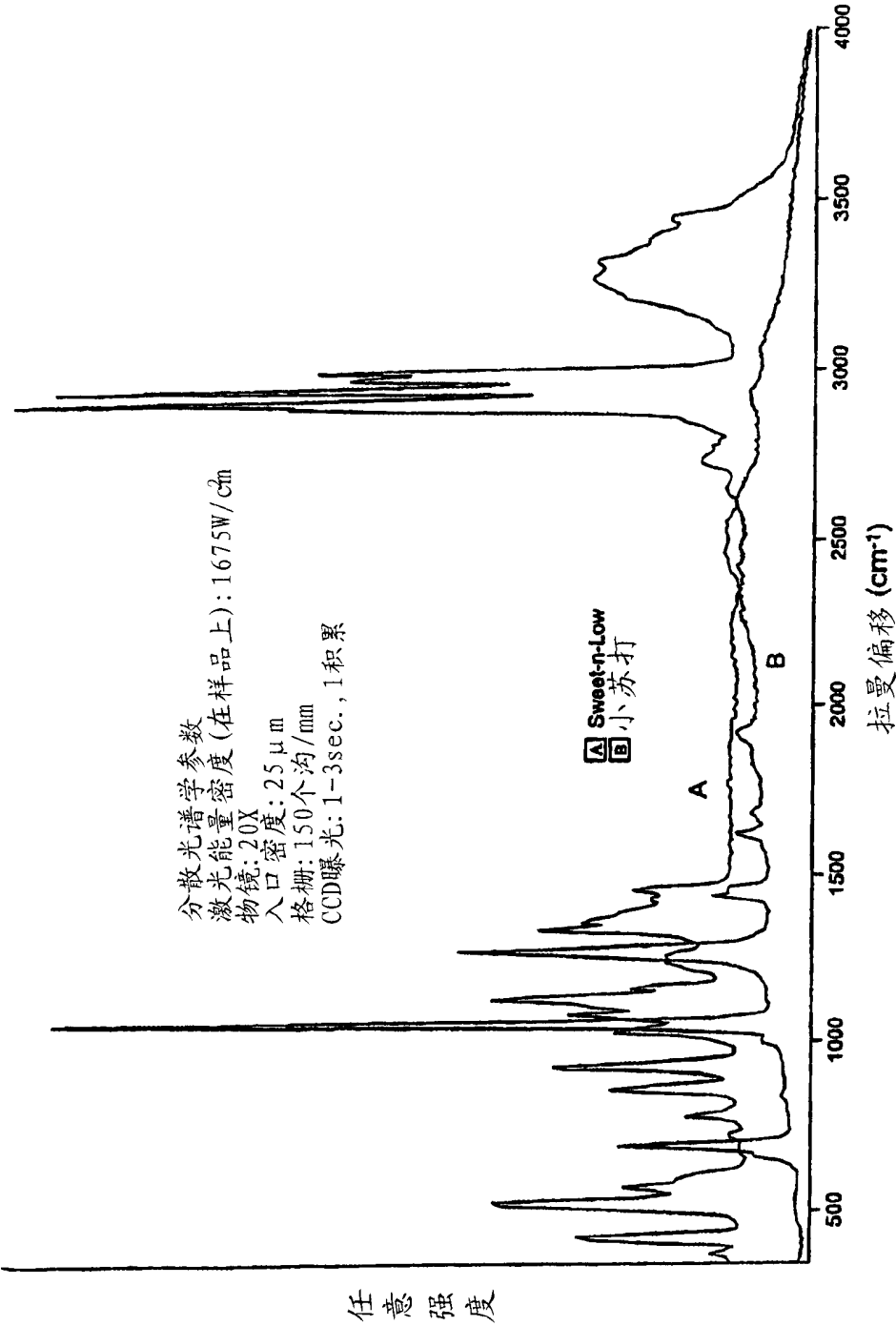


图 40

孢芽杆菌孢子的分散拉曼光谱学

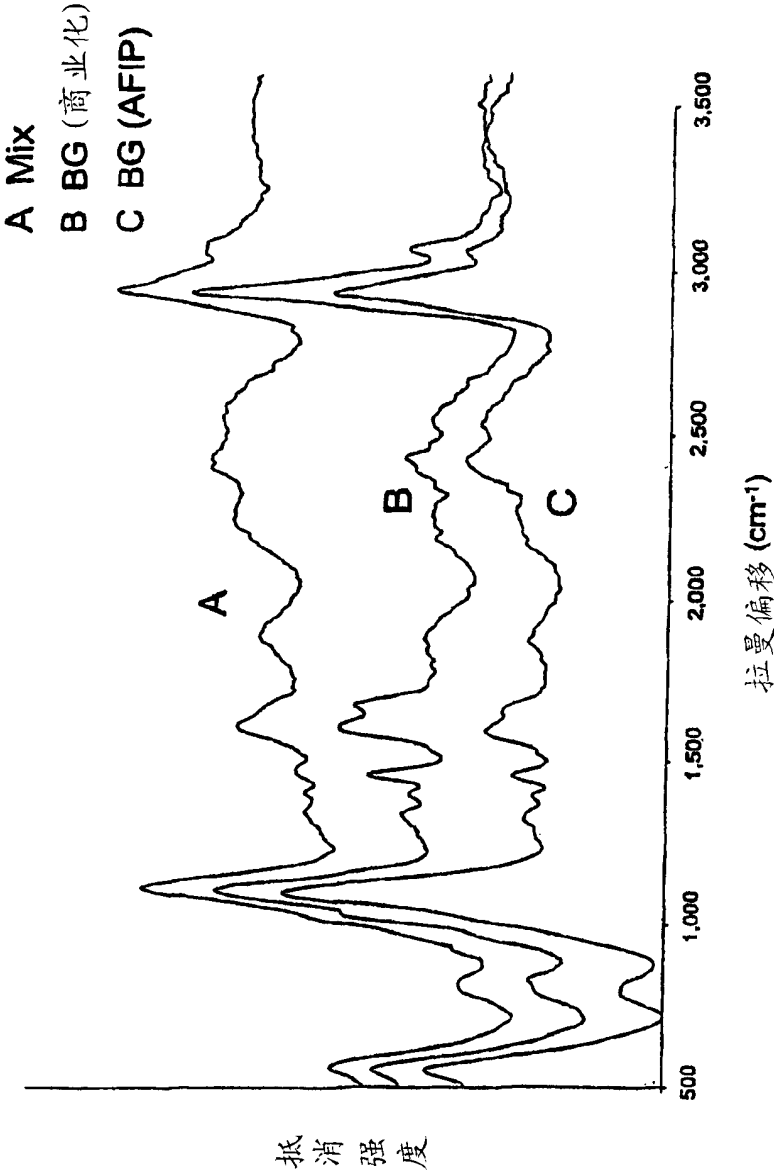


图 4P

枯草芽孢杆菌BG (AFIP) 和BG (商业化) 孢子混合物的拉曼化学成像

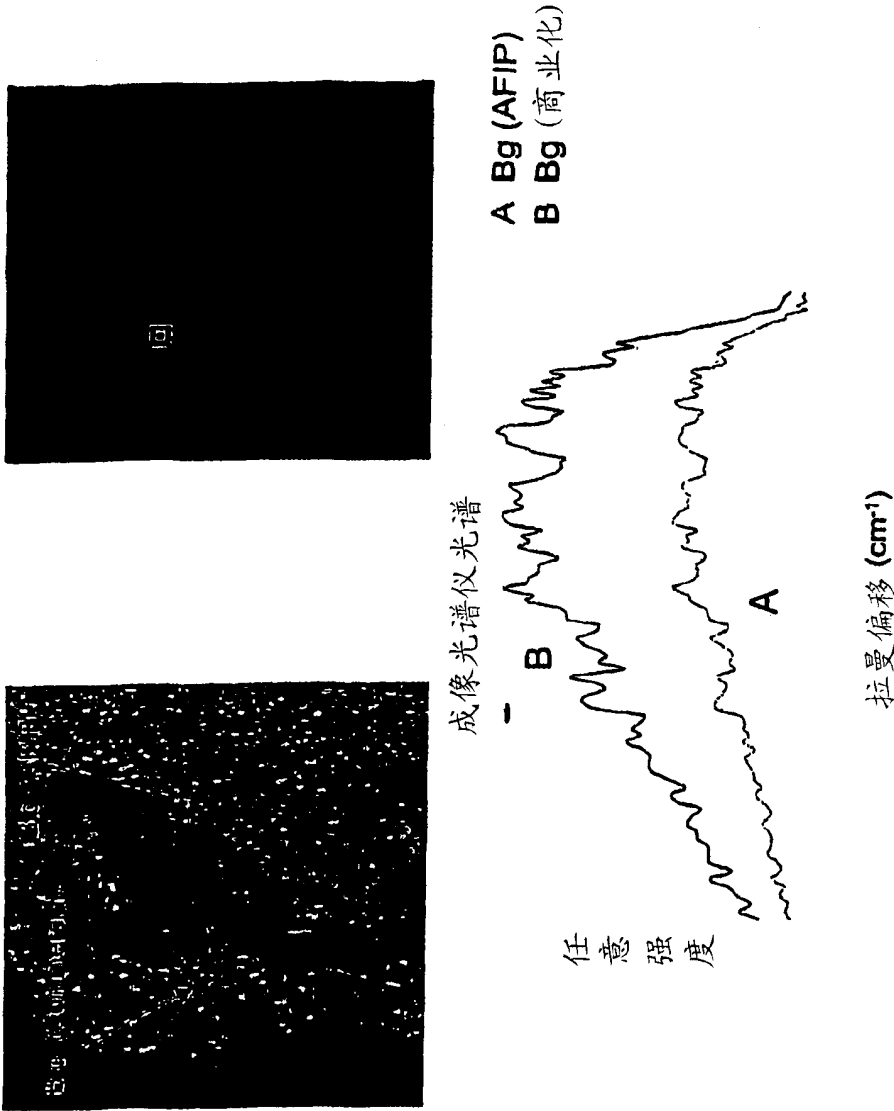


图 4Q

苏云芽孢杆菌样品的分散拉曼光谱
原始光谱

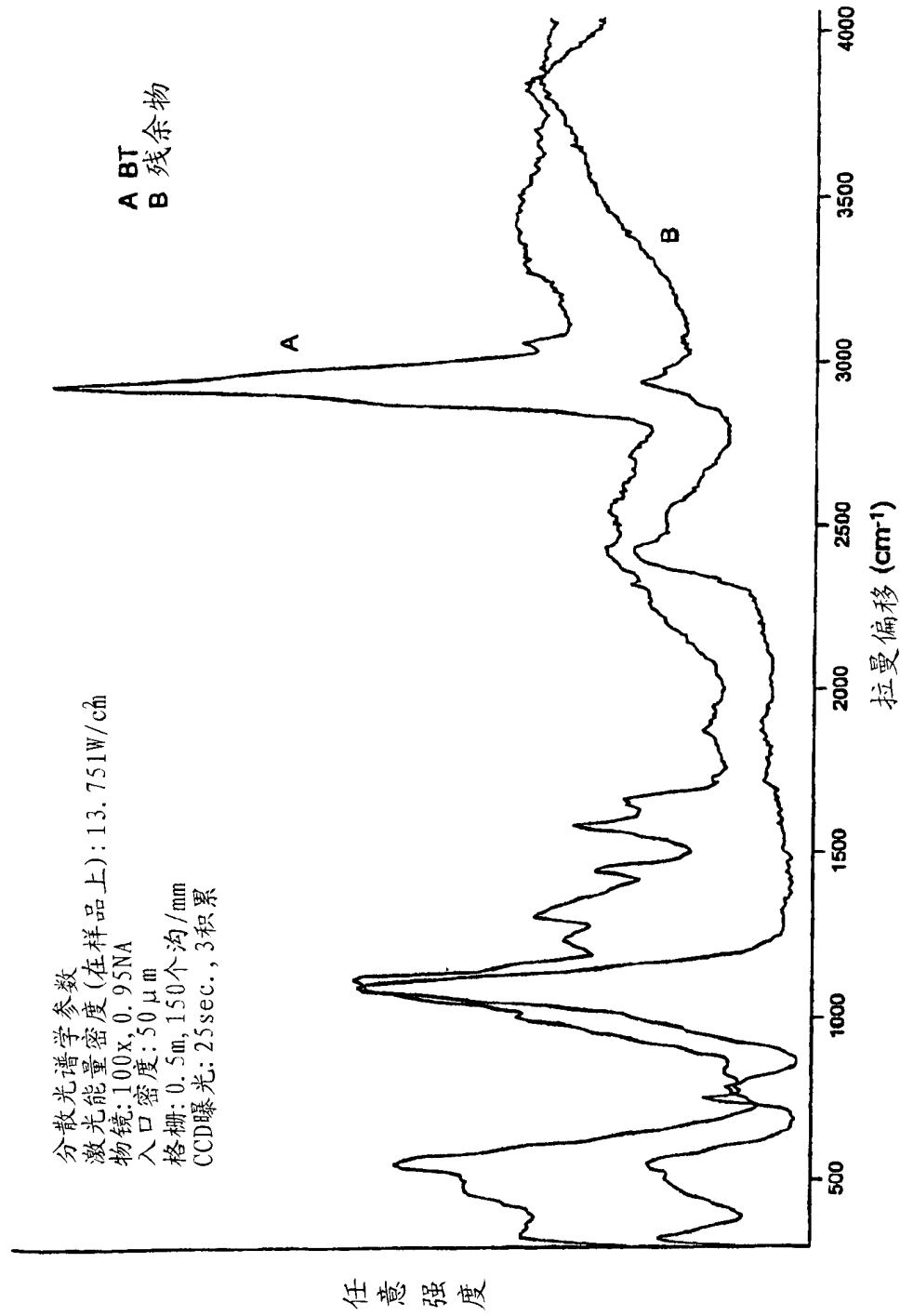


图 5A

苏云金芽孢杆菌样品的分散拉曼光谱
分开的光谱

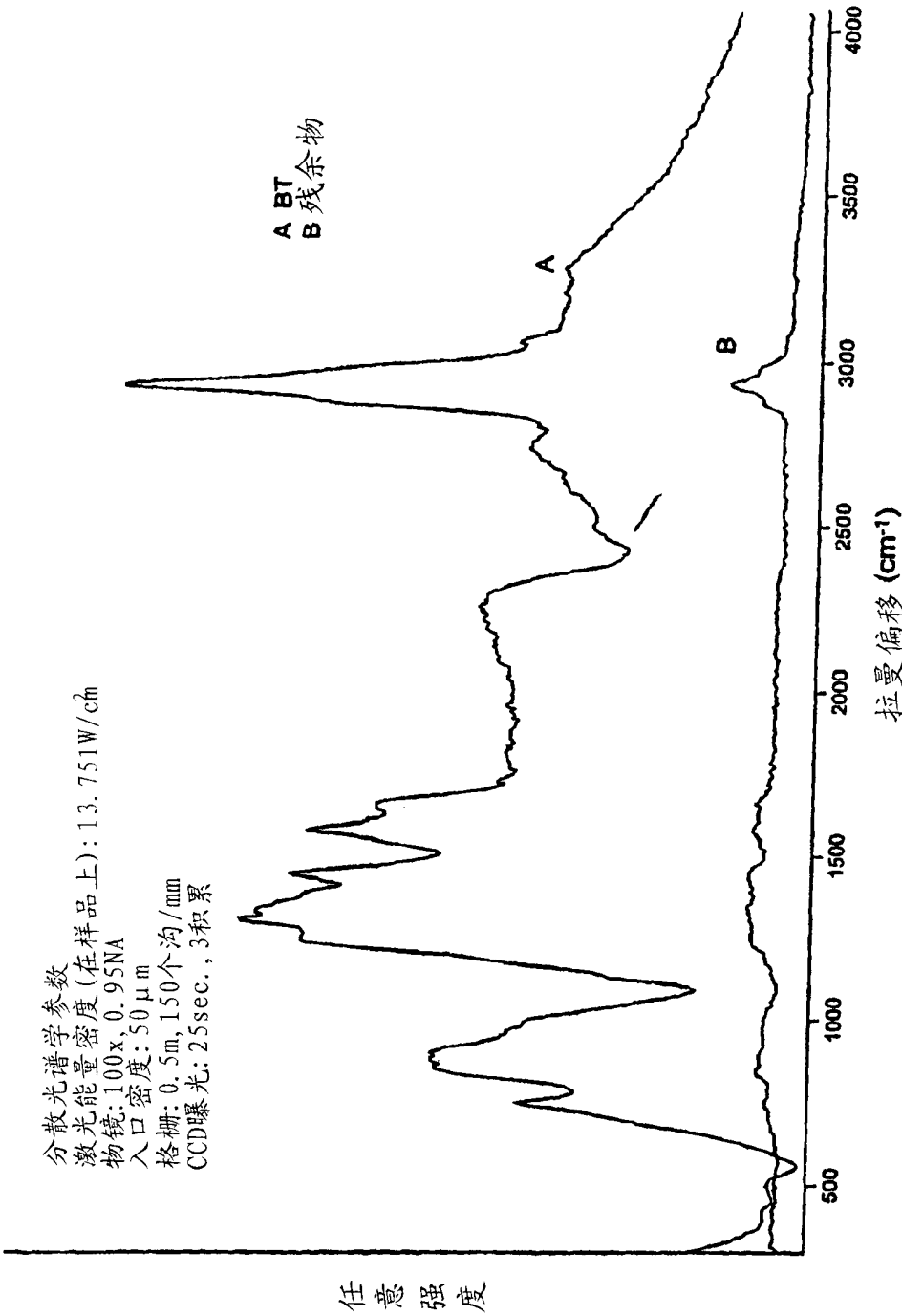


图 5B

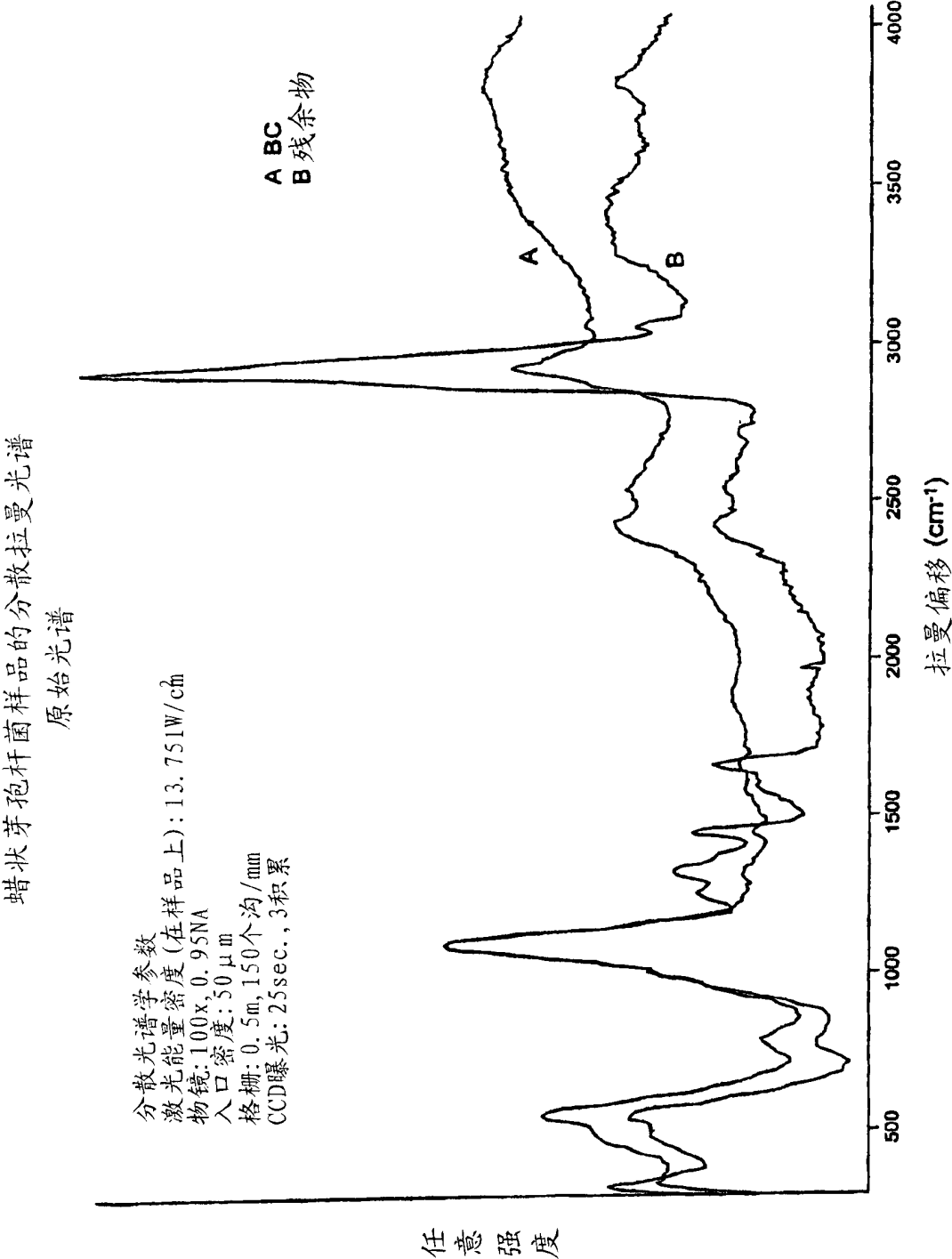


图 5C

仙人掌芽孢杆菌样品的分散拉曼光谱
分开的光谱

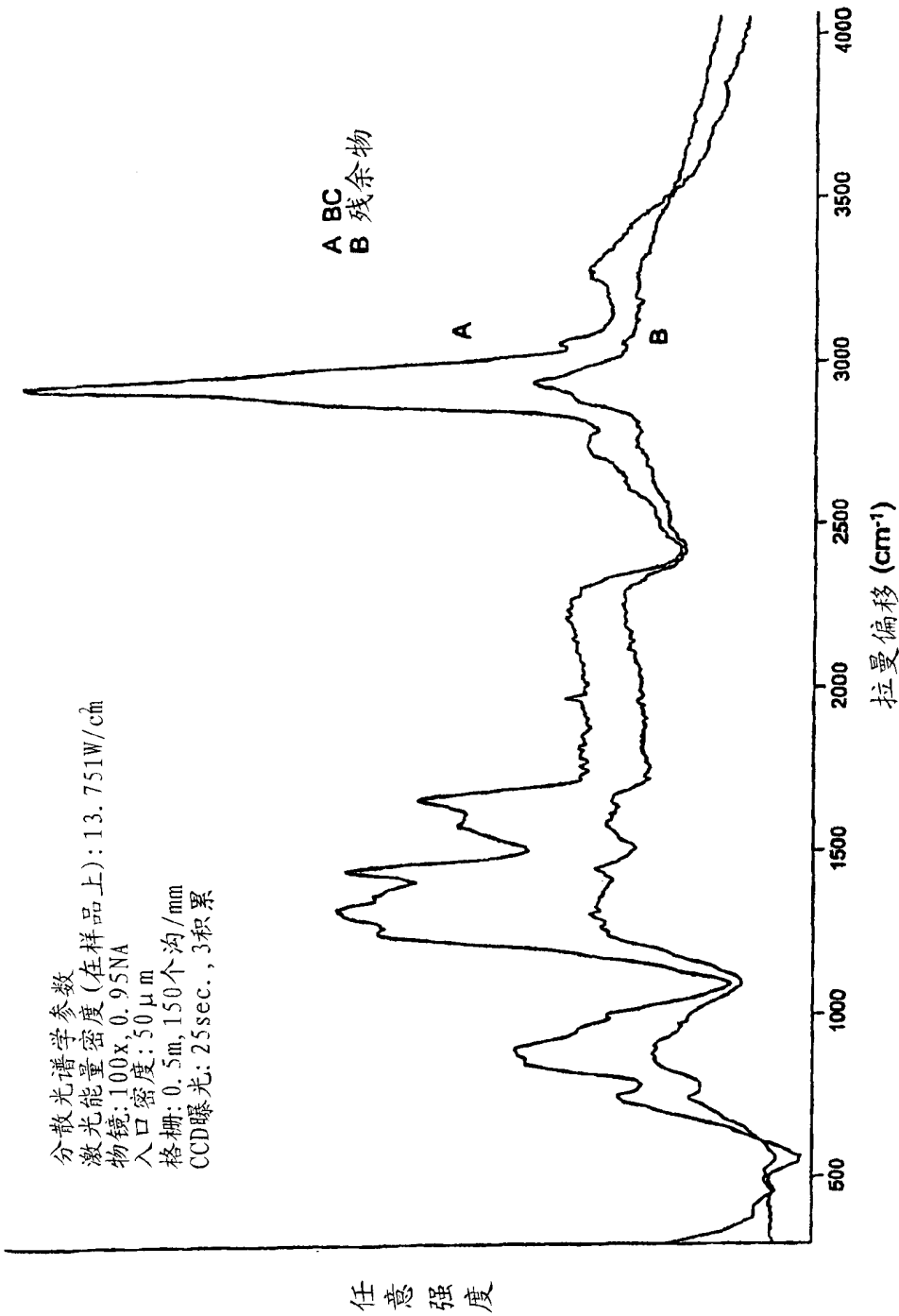


图 5D

AFIP样品的分散的拉曼光谱
分开的光谱

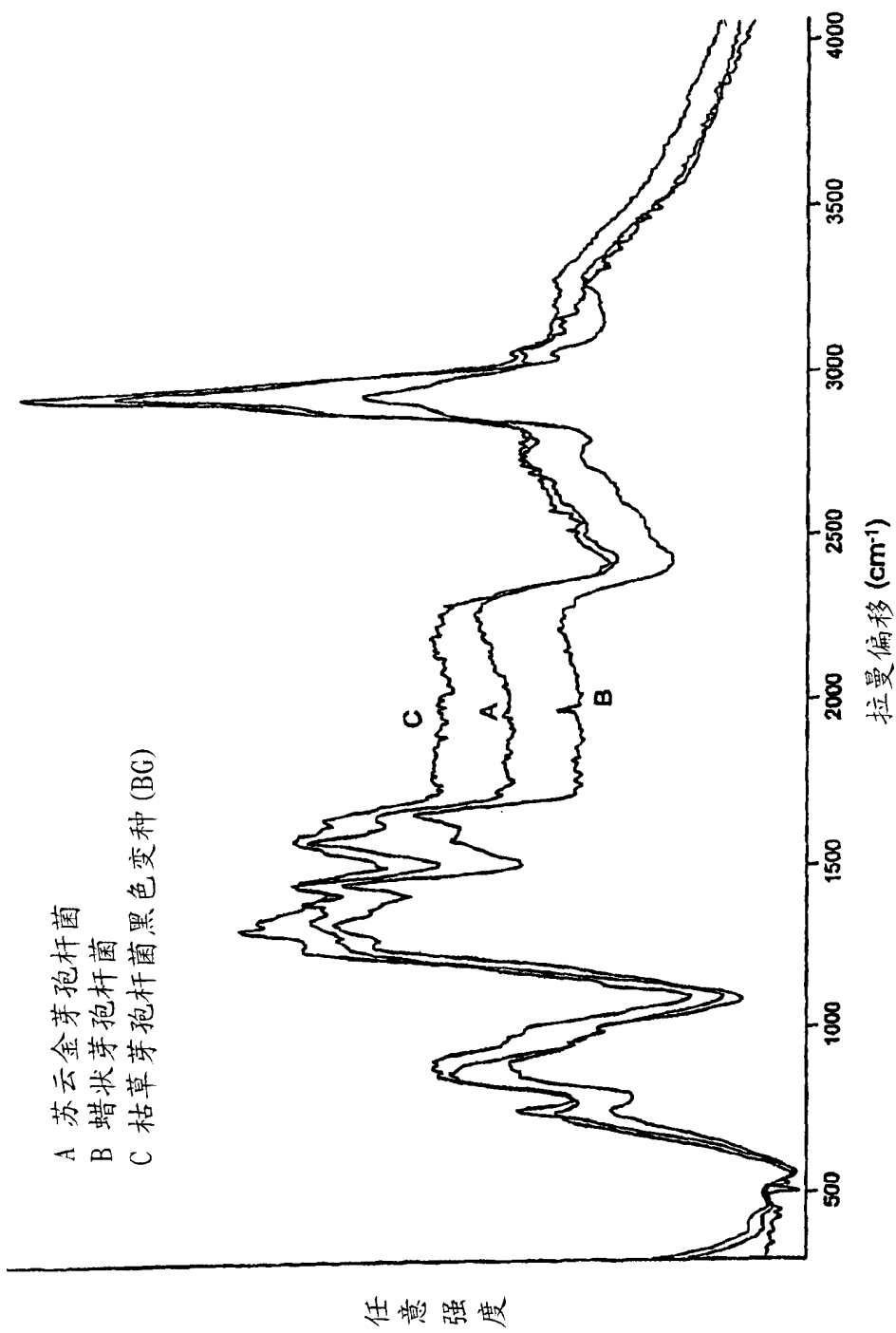


图 5E

AFIP样品的分散的拉曼光谱
基线校正的

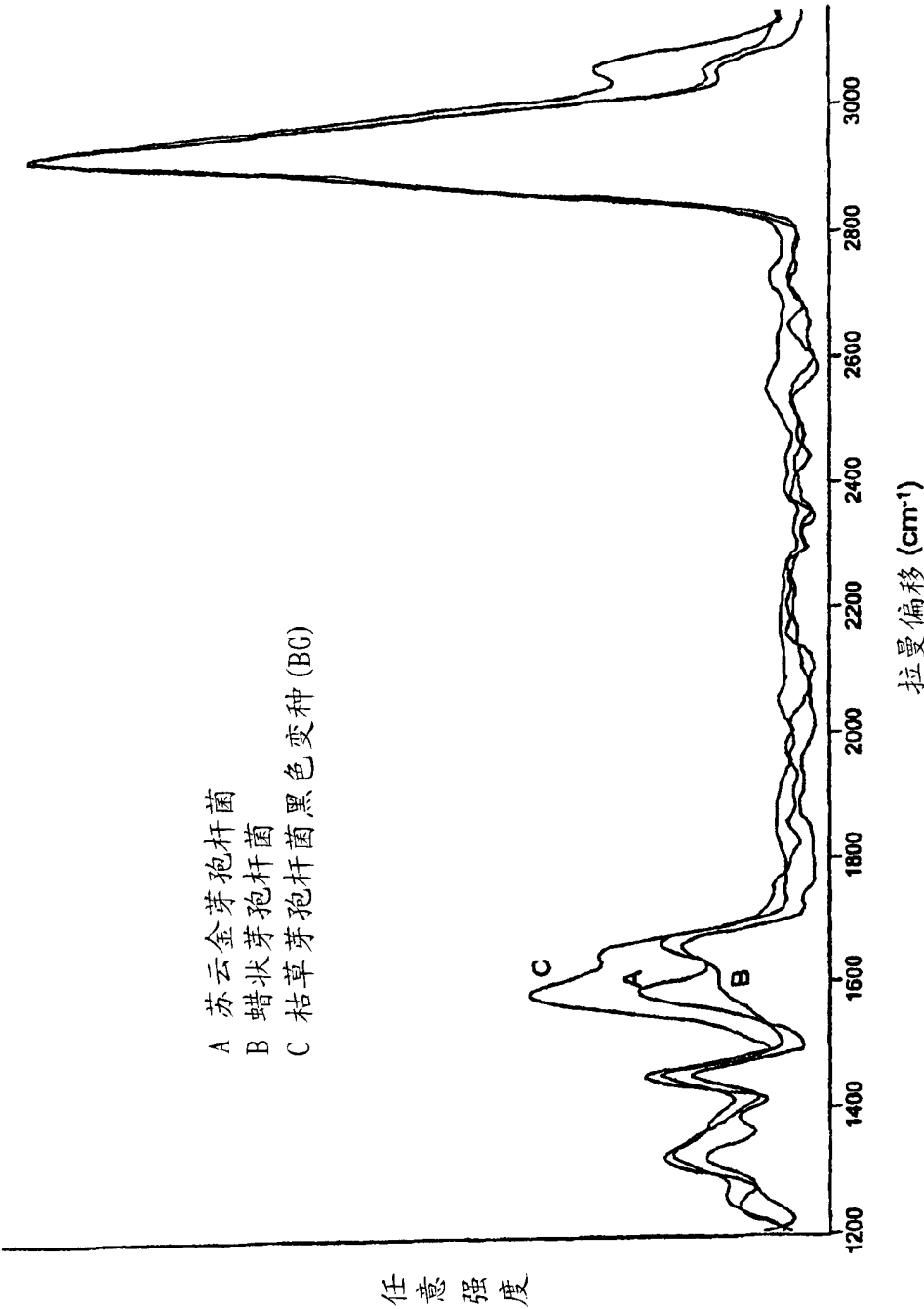


图 5F

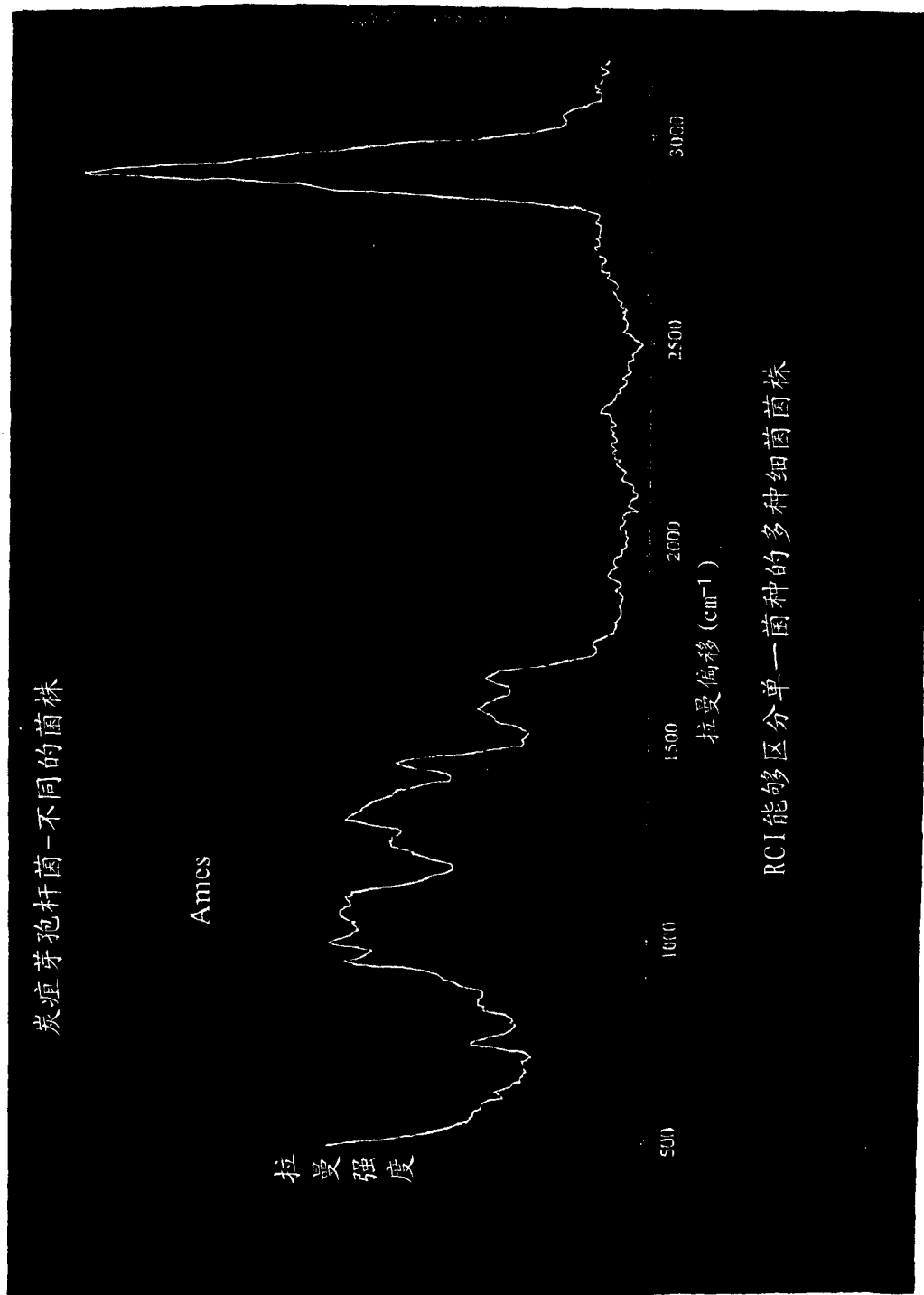


图 6

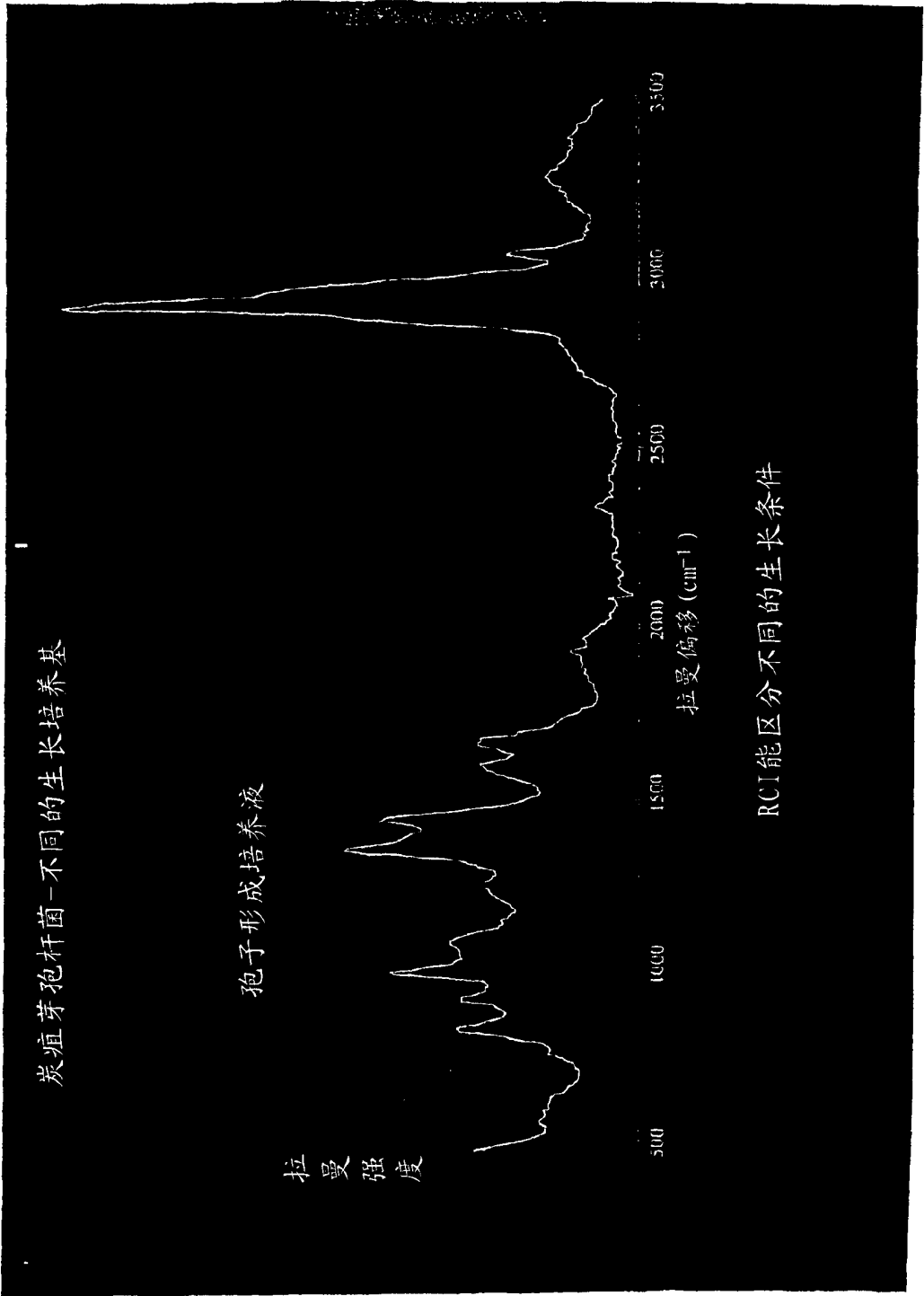


图 7

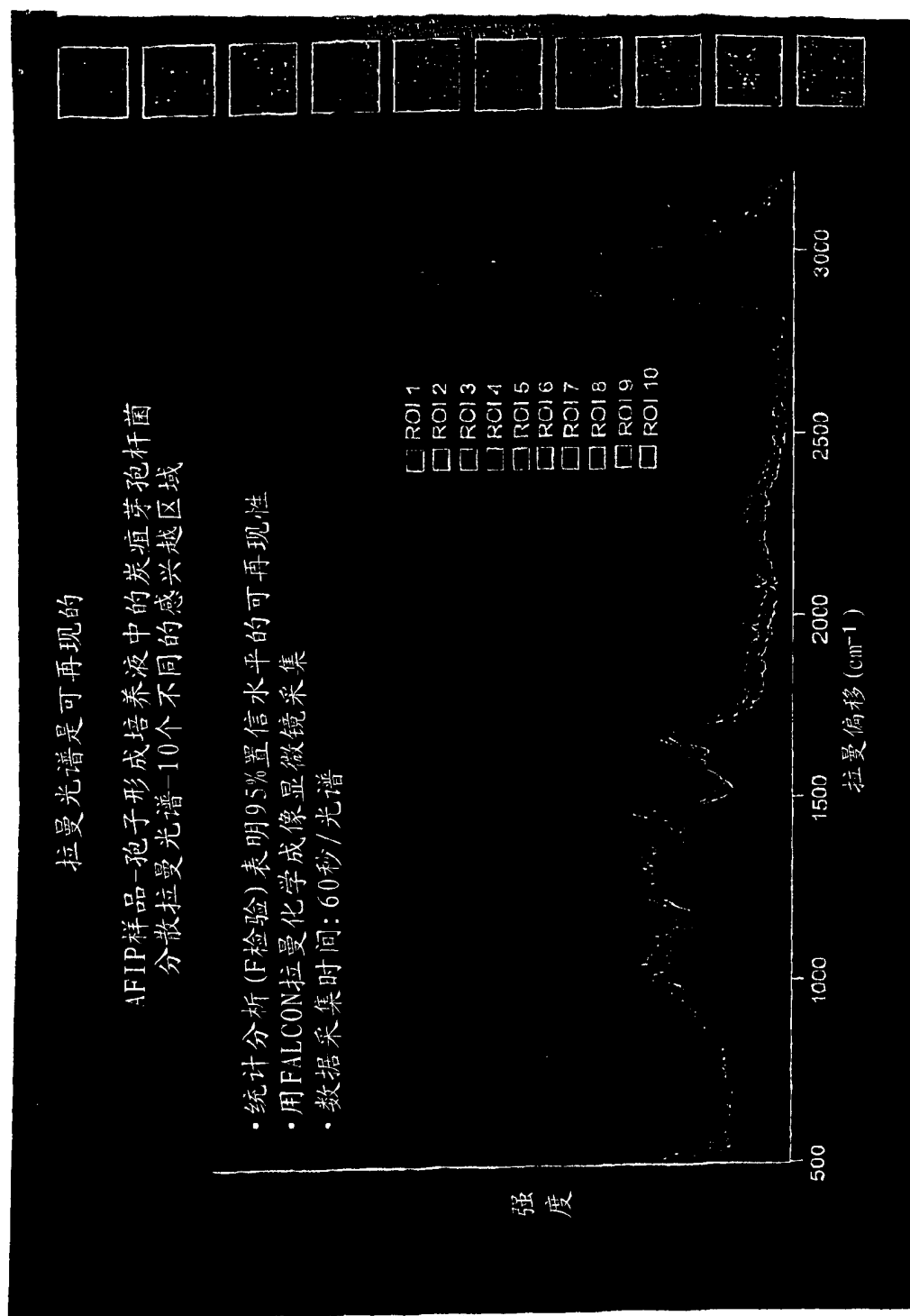


图 8

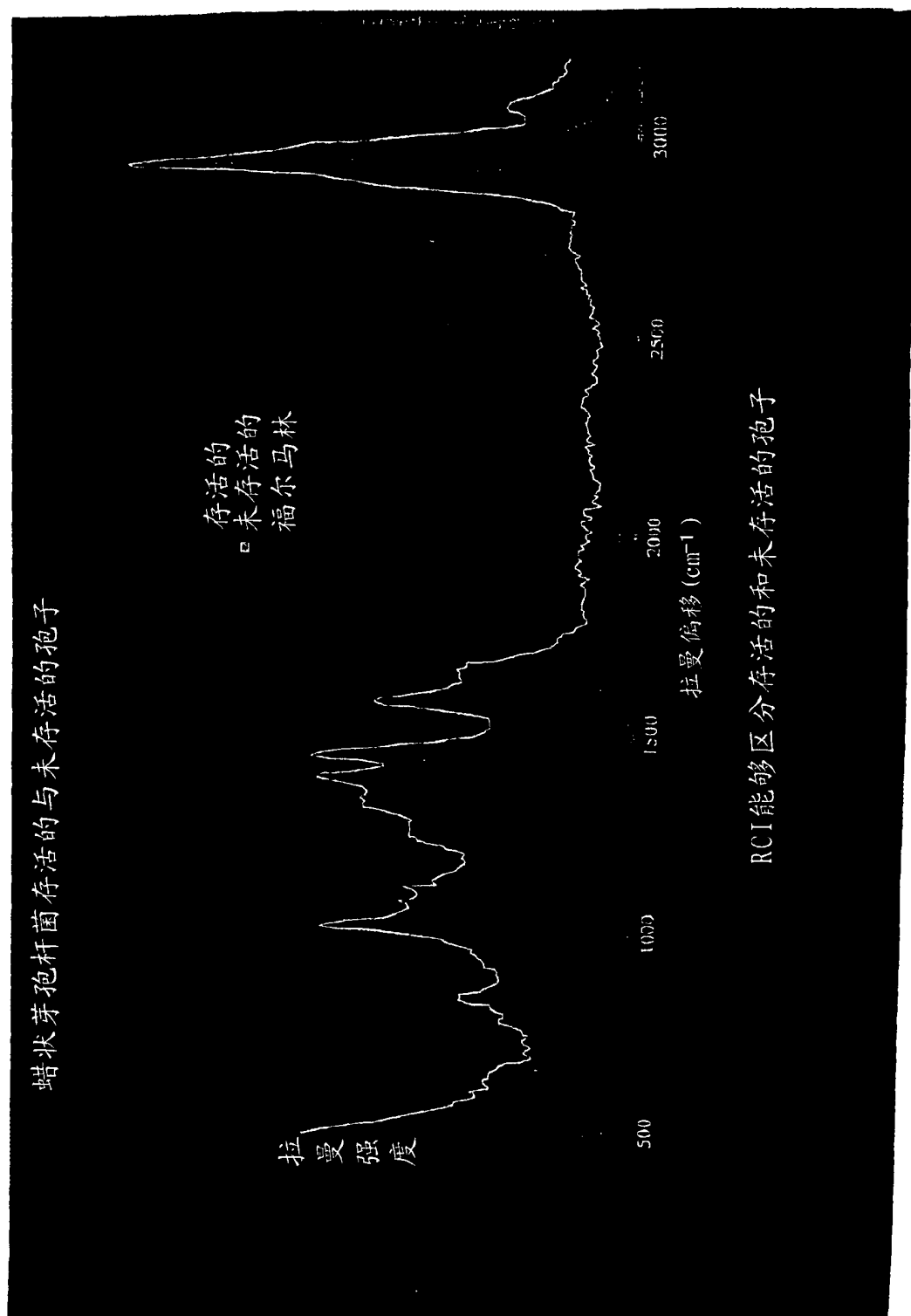
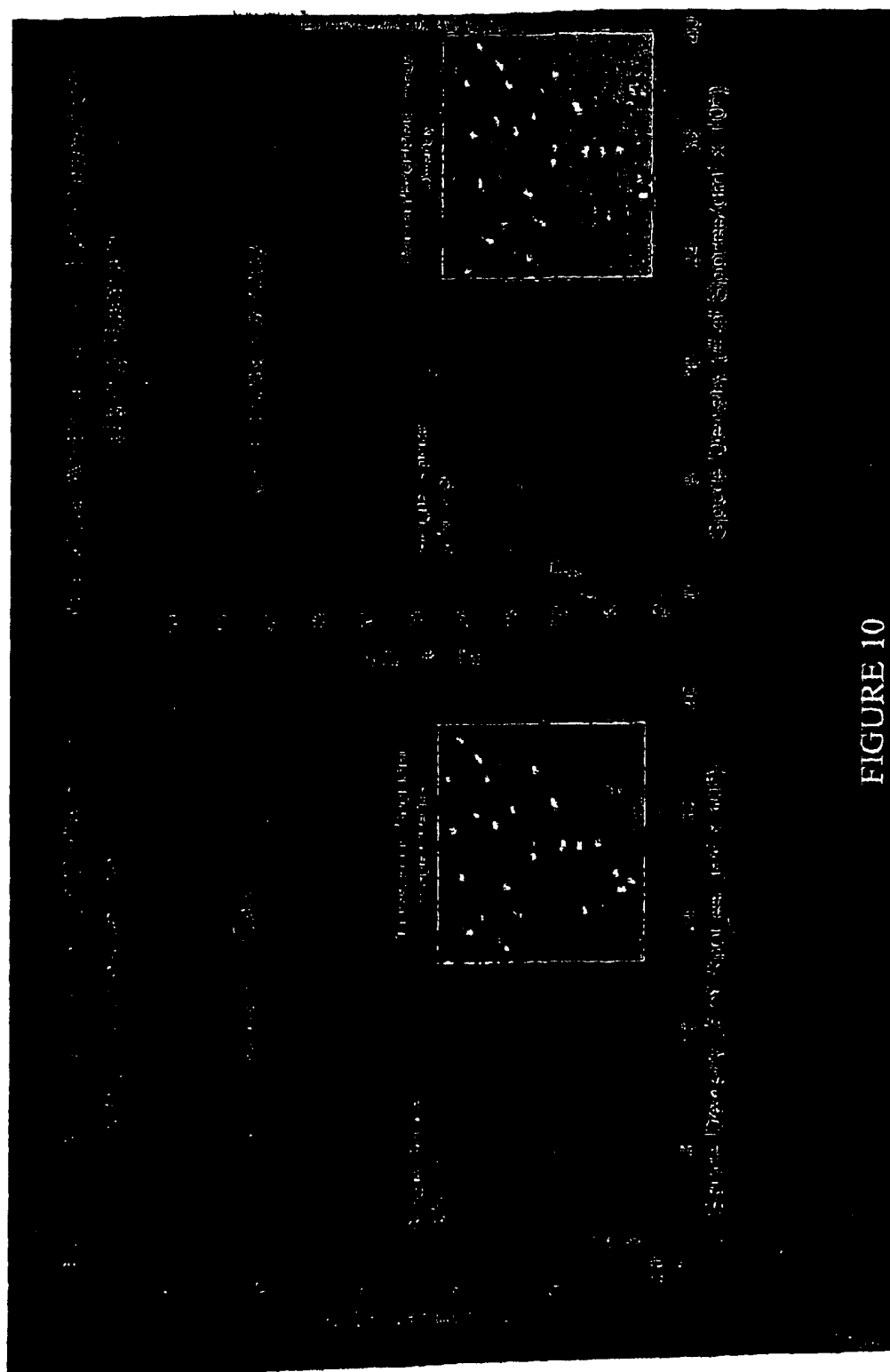


图 9



10

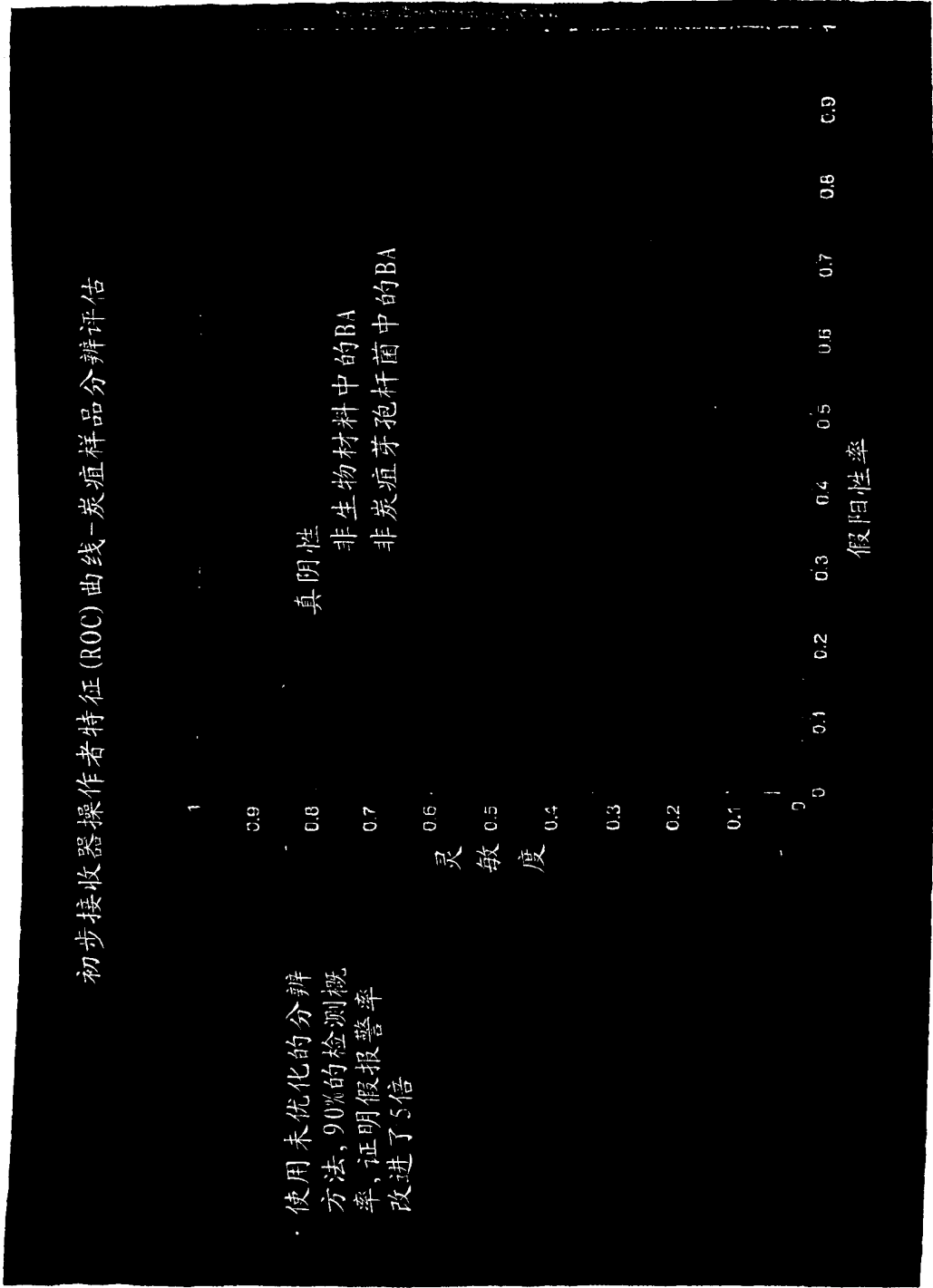


图 11

手持式病原微生物检测器

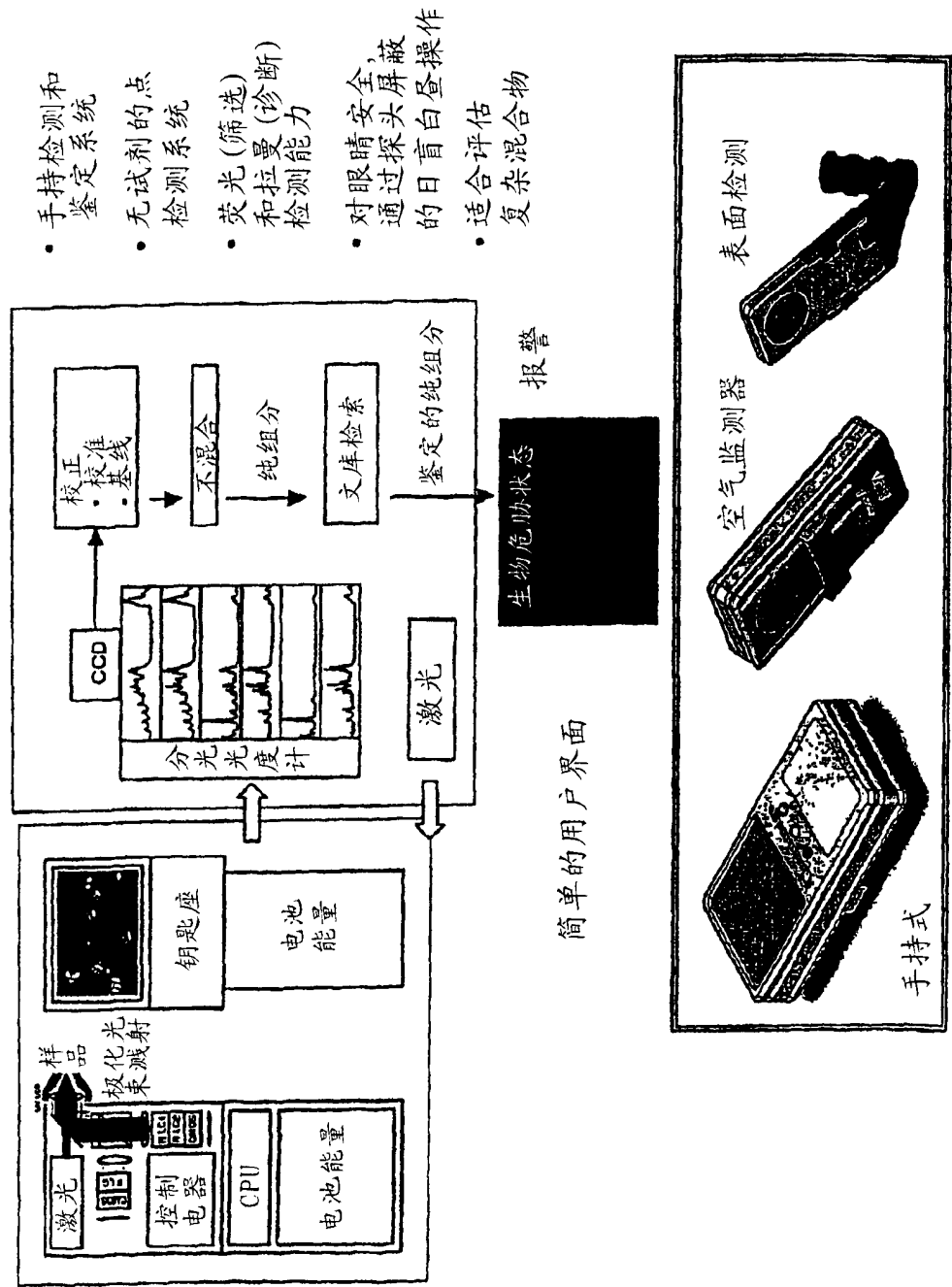


图 12