

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum

Internationales Büro

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
9. Januar 2014 (09.01.2014)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2014/005168 A2

(51) Internationale Patentklassifikation:
G01N 35/00 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/AT2013/050132

(22) Internationales Anmeldedatum:
4. Juli 2013 (04.07.2013)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
A 50268/2012 4. Juli 2012 (04.07.2012) AT

(72) Erfinder; und

(71) Anmelder : **VOGL, Wolfgang** [AT/AT]; Dorfstrasse 4, A-2295 Zwerndorf (AT).

(74) Anwalt: **SONN & PARTNER PATENTANWÄLTE**; Riemergasse 14, A-1010 Vienna (AT).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP,

KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Erklärungen gemäß Regel 4.17:

— Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv)

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts (Regel 48 Absatz 2 Buchstabe g)

(54) Title: METHOD FOR EXAMINATION OF A SAMPLE

(54) Bezeichnung : VERFAHREN ZUR UNTERSUCHUNG EINER PROBE

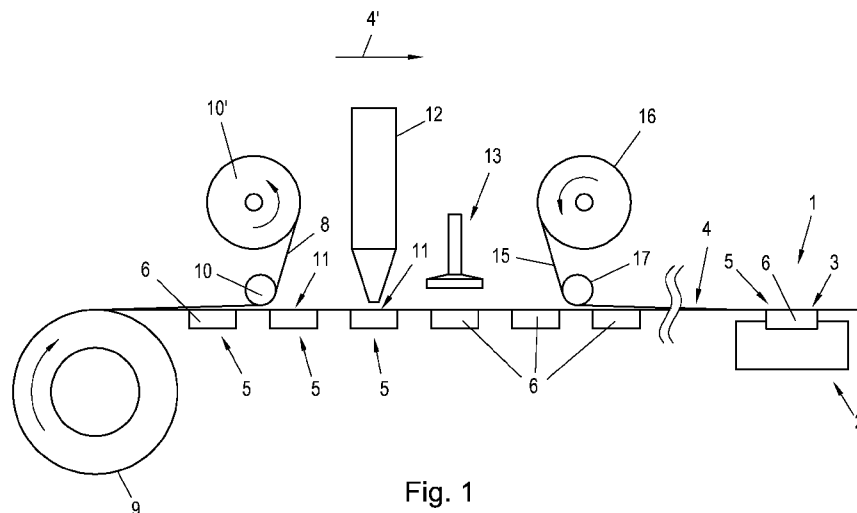


Fig. 1

(57) Abstract: A method and a device (1) for examination of a biological sample liquid, in particular for determination of microorganisms such as coliform bacteria, such as e.g. E. coli, wherein the sample liquid is conducted through an in particular photometric measuring device (2) having an excitation appliance and a detector appliance, wherein the sample liquid is divided into defined sample volumes which are conducted in succession through a measuring chamber (3) of the measuring device (2), wherein the sample volumes are examined one at a time.

(57) Zusammenfassung: Verfahren und Vorrichtung (1) zur Untersuchung einer biologischen Probenflüssigkeit, insbesondere zur Bestimmung von Mikroorganismen wie coliformen Bakterien, wie z.B. E. coli, wobei die Probenflüssigkeit durch eine insbesondere photometrische Messvorrichtung (2) mit einer Anregungseinrichtung und

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]



WO 2014/005168 A2

Verfahren zur Untersuchung einer Probe

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Untersuchung einer biologischen Probenflüssigkeit, insbesondere zur Bestimmung von Mikroorganismen wie coliforme Bakterien, wie z.B. Escherichia coli, wobei die Probenflüssigkeit durch eine insbesondere photometrische Messvorrichtung mit einer Anregungseinrichtung und einer Detektoreinrichtung geführt wird.

Weiters betrifft die Erfindung eine Vorrichtung zur Untersuchung einer biologischen Probenflüssigkeit, insbesondere zur Bestimmung von Mikroorganismen wie coliforme Bakterien, wie z.B. E.coli, mit einer eine Anregungseinrichtung und eine Detektoreinrichtung aufweisenden Messvorrichtung, und mit einer Probenzufuhrvorrichtung zur Zufuhr von Probenflüssigkeit an die Messvorrichtung.

Im Stand der Technik sind verschiedenste Verfahren und Vorrichtungen zur Untersuchung von biologischen Probenflüssigkeiten bekannt. Von besonderer Bedeutung ist hierbei die Untersuchung von Trinkwasser auf Genusstauglichkeit, wobei neben chemischen Analysen auch bakteriologische Untersuchungen durchgeführt werden. Zu den letzteren Untersuchungen zählt insbesondere der Nachweis des Vorhandenseins von Bakterien fäkalen Ursprungs, wie E.coli und Enterokokken, denn das Nicht-Vorhandensein dieser Bakterien in einem bestimmten Volumen Wasser deutet darauf hin, dass das Wasser sauber ist. Trinkwasser gilt dann als sauber, wenn in 100 ml keine E.coli- und in 250 ml keine Enterokokken-Zelle nachgewiesen werden kann.

Es gibt eine Vielzahl an Verfahren im Stand der Technik, mit denen coliforme Bakterien, wie E.coli, und Enterokokken nachgewiesen werden können. Hierbei ist es insbesondere bekannt, die kontaminierte Probenflüssigkeit photometrisch zu untersuchen. Der Nachweis von geringen Konzentrationen der Mikroorganismen in der Probenflüssigkeit hat sich jedoch bisher als ungenau und schwierig erwiesen.

Demzufolge besteht die Aufgabe der vorliegenden Erfindung darin, ein Verfahren und eine Vorrichtung der eingangs angeführten Art

zu schaffen, mit welchem bzw. mit welcher zuverlässige und genaue Untersuchungen einer Probenflüssigkeit auch bei geringen Anteilen des darin enthaltenen biologischen Materials ermöglicht wird.

Diese Aufgabe wird bei einem Verfahren der eingangs angeführten Art dadurch gelöst, das die Probenflüssigkeit in definierte Probenvolumina aufgeteilt wird, welche nacheinander durch eine Messkammer der Messvorrichtung geführt werden, wobei die Probenvolumina einzeln untersucht werden.

Demzufolge werden definierte Probenvolumina erzeugt, welche in der Messkammer der Messvorrichtung einzeln, d.h. unabhängig von den übrigen Probenvolumina, untersucht werden. Aufgrund der Aufteilung der Probenflüssigkeit in getrennte Probenvolumina kann vorteilhafterweise eine höhere Auflösung bei der Auswertung der Messsignale von der Messkammer erzielt werden. Im Vergleich zur Untersuchung eines kontinuierlichen Flüssigkeitsstroms werden bei der messtechnischen Untersuchung der getrennten Probenvolumina vergleichsweise scharfe Messsignale erhalten, welche vorteilhafterweise die Bestimmung des biologischen Anteils der Probenflüssigkeit erleichtern. Die Untersuchung einzelner Probenvolumina ermöglicht zudem vorteilhafterweise den Einsatz statistischer Auswerteverfahren, welche auf der Auswertung der Messsignale von den diskreten Probenvolumina beruhen. Vorteilhafterweise wird zudem ein unterbrechungsfreies Verfahren zur Verfügung gestellt, bei welchem die Probenvolumina schrittweise abgetrennt und einzeln untersucht werden.

Zur Aufteilung der Probenflüssigkeit in definierte Probenvolumina ist es günstig, wenn die Probenflüssigkeit in voneinander getrennte Aufnahmekammern einer Probenaufnahmevorrichtung abgefüllt wird. Demnach werden die Aufnahmekammern der Probenaufnahmevorrichtung mit den Probenvolumina der Probenflüssigkeit befüllt, welche anschließend in der Messkammer der Messvorrichtung einzeln untersucht werden. Die Messkammer der Messvorrichtung ist hierbei vorzugsweise derart dimensioniert und ausgelegt, um nur eine einzige Aufnahmekammer aufzunehmen. Aufgrund der sequentiellen Untersuchung der Probenvolumina kann die Messvorrichtung vorteilhafterweise vergleichsweise einfach und kleinvo-

lumig gestaltet werden. Die Probenaufnahmevorrichtung ist hierbei mit einer Fördervorrichtung verbunden, mit welcher die Probenaufnahmevorrichtung durch die Messvorrichtung gefördert wird.

Um die Probenvolumina hintereinander in der Messkammer der Messvorrichtung analysieren zu können, ist es von Vorteil, wenn eine langgestreckte Probenaufnahmevorrichtung verwendet wird, welche in Längsrichtung aufeinanderfolgende Aufnahmekammern aufweist, die nacheinander durch die Messkammer der Messvorrichtung geführt werden. Die langgestreckte Probenaufnahmevorrichtung wird hierbei vorzugsweise schrittweise in Längsrichtung der Probenaufnahmevorrichtung derart fortbewegt, dass die Aufnahmekammern in der Messkammer der Messvorrichtung einzeln analysiert werden können.

Zur Aufteilung der Probenflüssigkeit in die einzelnen definierten Probenpakete bzw. Probenvolumina ist es von Vorteil, wenn die Aufnahmekammer der Probenaufnahmevorrichtung eine Einfüllöffnung aufweist, welche nach dem Befüllen mit der Probenflüssigkeit, vorzugsweise mittels einer Folie oder einem Deckel, verschlossen wird. Die derart verschlossenen Aufnahmekammern der Probenaufnahmevorrichtung können anschließend durch die Messkammer der Messvorrichtung gefördert werden, in welcher die Untersuchung der biologischen Probenvolumina erfolgt.

Gemäß einer bevorzugten Ausführung wird die Aufnahmekammer der Probenaufnahmevorrichtung mit einem vorzugsweise trockenchemischen Reagenz, insbesondere mit einem Substrat zur Katalyse einer biochemischen Reaktion, versehen.

Besonders bevorzugt ist eine Ausführung, bei welcher zumindest zwei Kapseln mit unterschiedlichen trockenchemischen Reagenzien in der Aufnahmekammer angeordnet werden.

Dabei ist es insbesondere günstig, wenn die Kapseln die trockenchemischen Reagenzien einschließende Ummantelungen aufweisen, welche sich nach vorgegebenen, verschiedenen Zeiten und/oder bei verschiedenen Temperaturen auflösen. Damit lässt sich vorteilhafterweise eine gezielte Abfolge von Reaktionen in der Aufnahmekammer erreichen.

Alternativ kann das Reagenz der Probenflüssigkeit beim Befüllen der Aufnahmekammern der Probenaufnahmevorrichtung der Messflüssigkeit beigemischt werden.

Um das vorzugsweise trockenchemische Reagenz innerhalb der Aufnahmekammer der Probenaufnahmevorrichtung zu schützen, ist es von Vorteil, wenn die das Reagenz enthaltende Aufnahmekammer der Probenaufnahmevorrichtung vorzugsweise mittels einer Schutzfolie verschlossen wird, welche vor dem Befüllen mit der Probenflüssigkeit entfernt wird.

Um die Konzentration des biologischen Materials in den definierten Probenvolumina zu erhöhen, ist es günstig, wenn die Probenflüssigkeit durch einen Filter filtriert wird, welcher anschließend in der Aufnahmekammer der Probenaufnahmevorrichtung angeordnet wird, die mit einer Flüssigkeit, gegebenenfalls unter Zugabe eines Reagenz, befüllt wird. Bei der Filtration wird die Probenflüssigkeit durch den Filter, insbesondere einen Einwegfilter, filtriert. Der kontaminierte Filter kann anschließend noch einem Reinigungsschritt unterzogen werden, bei welchem eine Reinigungslösung durch den Filter geleitet wird, bevor der Filter in der entsprechenden Aufnahmekammer der Probenaufnahmevorrichtung angeordnet wird.

Je nach Art und Dauer der Reaktion zwischen dem Reagenz und der Probenflüssigkeit ist es vielfach günstig die Probe vor Ablauf einer Inkubationszeit seit der Befüllung der Aufnahmekammer der Probenaufnahmevorrichtung in der Messvorrichtung untersucht wird, wobei vorzugsweise eine weitere Messung zu Beginn der Inkubationszeit nach Befüllung der Aufnahmekammer vorgenommen wird. Die Fördervorrichtung kann hierbei derart angesteuert werden, dass bei der Förderung der Probenaufnahmevorrichtung zwischen der Befüllungsstation, in welcher die Aufnahmekammern der Probenaufnahmevorrichtung mit der Probenflüssigkeit befüllt werden, und der Untersuchungsstation, in welcher die Probenvolumina in der Messkammer der Messvorrichtung untersucht werden, die vorgegebene Inkubationszeit verstreicht. Gemäß einer bevorzugten Ausführung wird jede Aufnahmekammer nach der Befüllung und ausreichenden Durchmischung ein erstes Mal vermessen, wodurch fest-

gestellt werden kann, ob die Reagenzien im ordnungsgemäßen Zustand vorliegen. Während der Inkubationszeit kann anschließend mehrmals gemessen werden. In jedem Fall wird zumindest eine Messung am Ende der Inkubationszeit vorgenommen. Im Betrieb können zudem einzelne Aufnahmekammern mit einer Eichlösung gefüllt werden, um die Funktion und die Einstellung der Messeinheit zu überprüfen bzw. zu eichen.

Erfindungsgemäß ist die „Inkubationszeit“ der Zeitraum zwischen Vermischen der Probe mit dem oder den Reagentien und dem Messen, wobei in diesem Zeitraum das Reagenz mit einem etwaig in der Probe befindlichen Reaktanten (z.B. Enzyme) reagieren kann.

Bei der Untersuchung von Trinkwasser auf Genusstauglichkeit werden neben chemischen Analysen auch bakteriologische Untersuchungen durchgeführt. Zu den letzteren Untersuchungen zählt insbesondere der Nachweis des Vorhandenseins von Bakterien fäkalen Ursprungs, wie E.coli und Enterokokken, denn das Nicht-Vorhandensein dieser Bakterien in einem bestimmten Volumen Wasser deutet darauf hin, dass das Wasser sauber ist.

Es gibt eine Vielzahl an Verfahren im Stand der Technik, mit denen Mikroorganismen, insbesondere Bakterien wie coliforme Bakterien, wie E.coli, und Enterokokken und Pilze nachgewiesen werden können. Eine der am häufigsten eingesetzten Methoden zur Bestimmung dieser Bakterien beruht auf der Bestimmung der Kolonien bildenden Einheiten (KBE), bei welcher zunächst eine vorgegebene Menge an Wasser durch steriles Filterpapier gefiltert wird, welches eine Porengröße aufweist, bei der die nachzuweisenden Bakterien nicht durchzudringen vermögen. Dieses Filterpapier wird schließlich auf einem festen Nährboden (z.B. Petrischalenplatten) aufgebracht und inkubiert.

Weitere Verfahren zum Nachweis von Mikroorganismen, insbesondere von coliformen Bakterien und Enterokokken, basieren zum Teil auf dem Nachweis von Substanzen und Stoffen, insbesondere von Metaboliten, Sekundärmetaboliten, Enzymen oder Proteinen, welche von den Mikroorganismen beispielsweise ins Nährmedium oder Wasser abgegeben werden. Diese Substanzen und Stoffe können im Nährmedium oder Wasser entweder direkt (z.B. mittels Fluoreszenz, Ab-

sorption bei definierten Wellenlängen) oder indirekt, indem die Substanzen bzw. Stoffe als Substrat für weitere chemische oder biochemische Reaktionen dienen, bestimmt werden. Ein Verfahren, welches auf diesem Prinzip beruht und zum Nachweis von coliformen Bakterien, wie z.B. *E.coli*, eingesetzt werden kann, basiert auf der Umsetzung von 4-Methylumbelliferyl- β -D-Galactopyranosid (MUG) durch von coliformen Bakterien und Enterokokken ins Wasser bzw. Nährmedium abgegebenen β -Galaktosidasen. Diese Enzyme spalten MUG, so dass ein fluoreszierender Farbstoff entsteht, welcher es ermöglicht rückzuschließen, ob und in welchen Mengen coliforme Bakterien und Enterokokken in einer wässrigen Probe vorhanden sind.

George I et al. (J Appl Microbiol 88 (2000): 404-413) beschreiben ein Verfahren zur enzymatischen Bestimmung von coliformen Bakterien in wässrigen Proben. Dieses Verfahren beruht auf der Hydrolyse von 4-Methylumbelliferyl- β -D-Galactopyranosid und 4-Methylumbelliferyl- β -D-Glucuronid durch Enzyme, welche von coliformen Bakterien produziert und an das Medium abgegeben werden. Daher können in die Probenaufnahmevorrichtung diese Reagentien (z.B. 4-Methylumbelliferyl- β -D-Galactopyranosid und/oder 4-Methylumbelliferyl- β -D-Glucuronid) entweder in trockener Form oder in Lösung eingebracht werden.

Erfindungsgemäß können je nach zu bestimmenden Mikroorganismus als Substrate, welche von Mikroorganismen umgesetzt werden, wasserlösliche Cumarine, Resorufin freisetzende Substanzen, Fluoresceine und Naphthalene verwendet werden.

Besonders bevorzugte Cumarine sind ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus 4-Methylumbelliferyl-N-Acetyl-beta-D-Glucosaminid, 4-Methylumbelliferyl Caprylat, 4-Methylumbelliferyl-beta-D-Cellobiosid, 4-Methylumbelliferyl-beta-D-Galactopyranosid, 4-Methylumbelliferyl-beta-D-Glucuronsäure Trihydrat, 4-Methylumbelliferylphosphat, 4-Methylumbelliferyl-alpha-L-Rhamnopyranosid, 4-Methylumbelliferylsulfat, 4-Methylumbelliferyl-alpha-L-Rhamnopyranosid, 4-Methylumbelliferyl-beta-D-Ribofuranosid, 4-trifluoromethyl-7-hydroxycoumarine, L-Alanine 7-amido-4-(trifluoromethyl)Coumarin, N-alpha-CBZ-L-Arginin 7-Amido-4-Methylcoumarin, L-Citrullin 7-

amido-4-methylcoumarin, Glutaryl-Glycyl-L-Arginin 7-Amido-4-methylcoumarin, L-Histidin 7-Amido-4-Methylcoumarin, L-Hydroxyprolin 7-Amido-4-Methylcoumarin, L-Lysyl-L-Alanine 7-Amido-4-Methylcoumarin, L-Ornithine 7-Amido-4-Methylcoumarin, L-Pyroglutaminsäure 7-Amido-4-Methylcoumarin L-Tryptophan 7-Amido-4-methylcoumarin und 6,8-Difluoro-7-Hydroxy-4-Methylcoumarin (DiFMU).

Besonders bevorzugte Resorufin freisetzende Substanzen sind ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus 10-acetyl-3,7-Dihydroxyphenoxazin, 7-Ethoxyresorufin, Pentoxyresorufin, Resorufin β -D-Galactopyranosid und Resazurin.

Besonders bevorzugte Fluoresceine sind ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus 6-Carboxyfluoresceindiacetat, Fluoresceinamin Isomer I, Fluoresceinamin Isomer II, 9-Deoxy-9-N-(Fluorescein-5-Aminothiocarbonyl)Amino-N-Acetylneuraminsäure, Fluoresceindiacetat, Fluoresceinisothiocyanat Isomer I und Rose Bengal Dinatriumsalz.

Besonders bevorzugte Naphthalene sind ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus 6-Bromo-2-Naphthyl-alpha-D-Galactopyranosid, 2-Naphthyl-beta-D-Galactopyranosid, 1-Naphthyl-beta-D-Glucopyranosid, L-Alanine 2-Naphthylamid, L-Leucin beta-Naphthylamidhydrochlorid, L-Prolin beta-Naphthylamidhydrochlorid und L-Pyroglutaminsäure beta-Naphthylamid.

Die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe wird zudem durch eine Vorrichtung zur Untersuchung einer biologischen Probenflüssigkeit gelöst, bei welcher die Probenzufuhrvorrichtung eine Probenaufnahmevorrichtung mit getrennten Aufnahmekammern zur Aufnahme von definierten Probenvolumina der Probenflüssigkeit derart aufweist, dass die Aufnahmekammern nacheinander durch eine Messkammer der Messvorrichtung führbar sind, um die Probenvolumina einzeln zu untersuchen. Die hiermit erzielbaren Vorteile und technischen Effekte wurden bereits im Zusammenhang mit dem erfindungsgemäßen Verfahren beschrieben, so dass auf die vorstehenden Ausführungen verwiesen wird.

Um die definierten Probenvolumina hintereinander effizient un-

tersuchen zu können und die Messvorrichtung möglichst einfach zu gestalten, ist es von Vorteil, wenn die Aufnahmekammern der Probenaufnahmevorrichtung und die Messkammer der Messvorrichtung zumindest abschnittsweise einander entsprechende Querschnittsformen aufweisen.

Hinsichtlich der Untersuchung der Probenvolumina in der Messkammer der Messvorrichtung ist es günstig, wenn die Probenaufnahmevorrichtung im Längsschnitt polygonale, insbesondere im Wesentlichen quadratische oder im Wesentlichen rechteckige, Aufnahmekammern und/oder im Längsschnitt runde, insbesondere im Wesentlichen kreisförmige, Aufnahmekammern aufweist.

Um einen Filter während der Inkubations- und Untersuchungsphase in einer definierten Stellung innerhalb der Aufnahmekammer der Probenaufnahmevorrichtung zu halten, ist gemäß einer bevorzugten Ausführung vorgesehen, dass die Aufnahmekammer eine Auflagefläche zur Auflage eines Filters aufweist. Demnach wird der Filter auf die Auflagefläche der Aufnahmekammer aufgelegt, so dass der Filter während der Inkubations- bzw. Untersuchungsphase in einer stabilen Position angeordnet wird. Hiermit kann vorteilhafterweise die Genauigkeit und Zuverlässigkeit des Verfahrens erhöht werden. Bevorzugt ist eine im Wesentlichen horizontale Auflagefläche vorgesehen, so dass der Filter unter der Wirkung der Schwerkraft in der vorgegebenen Position gehalten wird, wenn die Probenaufnahmevorrichtung in horizontaler Richtung angeordnet wird.

Zur Abstützung des Filters, welcher insbesondere durch eine dünne Membran gebildet ist, ist es günstig, wenn die Aufnahmekammer zur Ausbildung der Auflagefläche für den Filter ein sieb- bzw. gitterförmiges Auflageelement aufweist. Hiermit kann der Filter zuverlässig in der vorgegebenen Position gehalten werden. Somit kann vorteilhafterweise verhindert werden, dass der Filter bei der Untersuchung in den Strahlengang der Messvorrichtung gelangt, wodurch die Messungen beeinträchtigt werden könnten. Das sieb- oder gitterförmige Auflageelement für die Filtermembrane kann bereits in der Aufnahmekammer angebracht sein oder alternativ vor bzw. mit der Filtermembrane in die Aufnahmekammer eingelegt werden.

Zur Erzielung einer konstruktiv einfachen, stabilen Halterung des Filters innerhalb der Aufnahmekammer ist es günstig, wenn die Auflagefläche durch eine Abstufung der Aufnahmekammer gebildet ist. Bevorzugt ist eine wannenförmige Aufnahmekammer vorgesehen, welche eine umlaufende Abstufung an einer Seitenwand der Aufnahmekammer aufweist.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform ist vorgesehen, dass die Probenaufnahmevorrichtung Aufnahmekammern eines ersten Typs mit einem ersten Aufnahmevolumen zur Aufnahme eines ersten definierten Probenvolumens und Aufnahmekammern eines zweiten Typs mit einem zweiten definierten Aufnahmevolumen zur Aufnahme eines zweiten definierten Probenvolumens aufweist. Die Probenaufnahmevorrichtung kann eine festgelegte Abfolge von Aufnahmekammern des ersten bzw. des zweiten Typs aufweisen. Bei dieser Ausführung kann vorteilhafterweise das MPN-Verfahren ("most probable number") zur statistischen Auswertung der bei der Untersuchung der Probenvolumina in der Messkammer erhaltenen Messergebnisse angewendet werden.

Um das biologische Material innerhalb der Aufnahmekammer gleichmäßig zu verteilen, ist es günstig, wenn die Aufnahmekammer der Probenaufnahmevorrichtung einen zur Durchmischung der Probenflüssigkeit elastisch verformbaren Abschnitt aufweist. Zur Durchmischung der Probenflüssigkeit wird der Abschnitt der Aufnahmekammer derart elastisch verformt, dass die darin enthaltene Probenflüssigkeit in die übrigen Bereiche der Aufnahmekammer verdrängt wird, so dass eine Pumpwirkung erzielt wird. Zur Betätigung des elastisch verformbaren Abschnitts der Aufnahmekammer sind bevorzugt Klemmbacken vorgesehen, mit welchen der elastisch verformbare Abschnitt der Aufnahmekammer zusammengedrückt bzw. entspannt wird.

Zur photometrischen Untersuchung der Probenflüssigkeit ist es günstig, wenn die Anregungseinrichtung eine Strahlungsquelle zur Bestrahlung der Probenflüssigkeit und die Detektoreinrichtung einen Strahlungsdetektor zur Erfassung von mit der Probenflüssigkeit wechselwirkender Strahlung aufweist. Je nach Anwendung können hierbei verschiedenste Arten von Strahlungsquellen, bei-

spielsweise Leuchtdioden oder mit einem kontinuierlichen Spektrum arbeitende Strahlungsquellen, vorgesehen sein. Wenn eine hohe Intensität erforderlich ist, kann insbesondere auch eine Laserquelle zum Einsatz kommen. Die Verwendung von Leuchtdioden ist jedoch vielfach bevorzugt, da diese eine sehr kostengünstige Ausführung darstellt, welche zudem für die meisten Wellenlängenbereiche allgemein verfügbar sind. Als Strahlungsdetektor werden vorzugsweise Photodioden verwendet. Alternativ können auch Photomultiplier verwendet werden. In manchen Fällen kann auch ein Spektrometer, insbesondere ein CCD-("charge coupled device")-Sensor zum Einsatz kommen, wenn nicht nur die Licht- Intensität einer oder mehrerer Wellenlängen sondern der Spektralverlauf untersucht werden soll. Der Strahlungsdetektor bevorzugt dazu eingerichtet sein, in der Probenflüssigkeit angeregte Fluoreszenzstrahlung zu messen. Zusätzlich kann der Strahlungsdetektor die transmittierte Strahlung erfassen, welche Informationen über das Absorptionsvermögen der Probenflüssigkeit enthält.

Gemäß einer bevorzugten Ausführung sind die Aufnahmekammern der Probenaufnahmevorrichtung lösbar miteinander verbunden. Somit können die Aufnahmekammern vorteilhafterweise insbesondere einzeln von der Probenaufnahmevorrichtung abgetrennt werden. Zur Erzielung der lösbaren Verbindung kann die Probenaufnahmevorrichtung beispielsweise Schwächungen, insbesondere Perforationen, zwischen den Aufnahmekammern aufweisen.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform sind die einzelnen Aufnahmekammern in einem Transportband oder einer Transportvorrichtung angeordnet aus welchem bzw. welcher sie zur Weiterverarbeitung entnommen werden können.

Die Erfindung wird nachstehend anhand von in den Zeichnungen dargestellten Ausführungsbeispielen, auf die sie jedoch nicht beschränkt sein soll, noch weiter erläutert.

Im Einzelnen zeigen in der Zeichnung:

Fig. 1 eine erfindungsgemäße Vorrichtung zur Untersuchung einer biologischen Probenflüssigkeit, bei welcher die Probenflüssigkeit zur Aufteilung in definierte Probenvolumina in voneinander

getrennte Aufnahmekammern einer Probenaufnahmevorrichtung abgefüllt wird, wobei die Probenvolumina in einer Messkammer einzeln untersucht werden;

Fig. 2 eine Ausführungsform der Vorrichtung, bei welcher die Aufnahmekammern Auflageflächen zur Anordnung von Filtern mit der konzentrierten Probe aufweisen;

Fig. 3 eine Ausführungsform der Vorrichtung, bei welcher die Probenflüssigkeit ohne Filtrierung in die Aufnahmekammern eingebracht wird;

Fig. 4a eine Draufsicht einer Ausführungsform der Probenaufnahmevorrichtung, welche im Längsschnitt quadratische Aufnahmekammern eines ersten bzw. eines zweiten Typs aufweist;

Fig. 4b eine Draufsicht einer weiteren Ausführungsform der Probenaufnahmevorrichtung, welche im Längsschnitt kreisförmige Aufnahmekammern eines ersten bzw. eines zweiten Typs aufweist;

Fig. 5 einen Schnitt entlang der Linie V-V in Fig. 4b;

Fig. 6a eine Schnittansicht einer weiteren Ausführungsform der Probenaufnahmevorrichtung, bei welcher die Aufnahmekammer einen elastisch verformbaren Abschnitt aufweist;

Fig. 6b eine Schnittansicht der Probenaufnahmevorrichtung gemäß Fig. 6a, wobei der elastisch verformbare Abschnitt zur Durchmischung der Probenflüssigkeit betätigt wird;

Fig. 6c eine Schnittansicht einer weiteren Ausführungsform der Probenaufnahmevorrichtung, bei welcher der elastisch verformbare Abschnitt ringförmig an der Seitenwand der Aufnahmekammer vorgesehen ist;

Fig. 7 eine Ansicht der Probenaufnahmevorrichtung gemäß Fig. 6 beim Durchtritt durch die entsprechend geformte Messkammer der erfindungsgemäßen Vorrichtung;

Fig. 8 eine Ansicht einer Ausführungsform der Messkammer der er-

findungsgemäßen Vorrichtung, und

Fig. 9 eine Ansicht einer weiteren Ausführung der Vorrichtung, bei welcher die Messvorrichtung zwei Messkammern zur gleichzeitigen Vermessung von zwei Probenvolumina aufweist.

In Fig. 1 ist eine Vorrichtung 1 zur Untersuchung einer biologischen Probenflüssigkeit gezeigt, welche gemäß einer bevorzugten Ausführung coliforme Bakterien, wie z.B. E. coli, enthält. Als biologische Flüssigkeit wird für die Zwecke dieser Offenbarung jedoch allgemein eine Flüssigkeit mit lebendem bzw. lebensfähigem Material betrachtet.

Wie aus Fig. 1 ersichtlich, weist die Vorrichtung 1 eine Messvorrichtung 2 auf, in welcher die Probenflüssigkeit untersucht wird. Die Messvorrichtung 2 weist eine Messkammer 3 auf, welche mit einer Anregungseinrichtung (nicht gezeigt) zur Anregung der Probenflüssigkeit und mit einer Detektoreinrichtung (nicht gezeigt) zur Detektion eines von der angeregten Probenflüssigkeit stammenden Messsignals in Verbindung steht. Als Anregungseinrichtung kann eine Strahlungsquelle, beispielsweise eine Leuchtdiode, und als Detektoreinrichtung ein Strahlungsdetektor, beispielsweise ein CCD-Sensor, vorgesehen sein. Die Messvorrichtung 2 ist mit einer Probenzufuhrvorrichtung 4 verbunden, mit welcher die Probenflüssigkeit durch die Messvorrichtung 3 geführt wird.

Um eine präzise statistische Auswertung der Messergebnisse zu ermöglichen, wird die Probenflüssigkeit in der gezeigten Ausführung in definierte Probenvolumina aufgeteilt, welche nacheinander durch die Messkammer 3 der Messvorrichtung 2 geführt werden. Die diskreten Probenvolumina werden anschließend in der Messkammer 3 der Messvorrichtung 2 einzeln untersucht. Zur Aufteilung der Probenflüssigkeit in definierte Probenvolumina weist die Probenzufuhrvorrichtung 4 eine Probenaufnahmevorrichtung 5 mit getrennten Aufnahmekammern 6 auf, in welchen die Probenvolumina aufgenommen sind. In der gezeigten Ausführung ist eine langgestreckte Probenaufnahmevorrichtung 5 vorgesehen, welche in Längsrichtung aufeinanderfolgende Aufnahmekammern 6 aufweist. Die Probenaufnahmevorrichtung 5 wird mittels einer (nicht gezeigten) Förder- bzw. Transportvorrichtung in Pfeilrichtung 4'

derart fortbewegt, dass die Aufnahmekammern 6 der Probenaufnahmevorrichtung 4 räumlich und zeitlich nacheinander in die Messkammer 3 der Messvorrichtung 2 gelangen, in welcher die Proben volumina einzeln untersucht werden.

Wie aus Fig. 1 weiters ersichtlich, werden die Aufnahmekammern 6 der Probenaufnahmevorrichtung 4 in der gezeigten Ausführung mit einem vorzugsweise trockenchemischen Reagenz 7 versehen, welches ein Substrat für die biochemische Reaktion mit der biologischen Probenflüssigkeit bildet. Die Aufnahmekammern 6 mit dem Reagenz 7 werden mittels einer Schutzfolie 8 verschlossen, welche von einer (in der Zeichnung schematisch dargestellten) Rolle 9 abgewickelt wird. Zur Versiegelung der Aufnahmekammern 6 mit der Schutzfolie 15 wird bevorzugt eine Klebe- oder Schweißverbindung vorgesehen. Die Schutzfolie 8 wird vor dem Befüllen der Aufnahmekammern 6 mit der Probenflüssigkeit entfernt. Hierfür wird die Schutzfolie 8 in der gezeigten Ausführung über eine Umlenkrolle 10 auf eine Aufwickelrolle 10' gewickelt. Durch das Entfernen der Schutzfolie 8 werden oberseitige Einfüllöffnungen 11 der Aufnahmekammern 6 freigegeben. Im nächsten Schritt werden die Aufnahmekammern 6 mittels einer Einfüllvorrichtung 12 über die freiliegenden Einfüllöffnungen 11 mit einer Messflüssigkeit befüllt. In der Ausführung gemäß Fig. 3 wird das trockenchemische Reagenz 7 zuvor in den Aufnahmekammern 6 eingeschlossen, so dass auf die Zugabe eines Reagenz über die Messflüssigkeit verzichtet werden kann. Alternativ kann die Messflüssigkeit das Reagenz enthalten. Im nächsten Schritt wird mittels einer Filteranordnung 13 ein mit der Probe kontaminierter Filter 14 in die entsprechende Aufnahmekammer 6 der Probenaufnahmevorrichtung 5 eingesetzt. Demnach werden die Bakterien aus dem Probevolumen filtriert, so dass die im filtrierten Probevolumen vorhandenen Bakterien zur enzymatischen Reaktion im Messvolumen zur Verfügung stehen.

Wie aus Fig. 1 weiters ersichtlich, werden die Einfüllöffnungen 11 der Probenaufnahmevorrichtung 5 nach der Befüllung der Aufnahmekammern 6 mittels einer Folie 15 verschlossen. Die Folie 15 wird in der gezeigten Ausführung von einer (schematisch gezeigten) Abwickelrolle 16 abgewickelt und über eine Umlenkrolle 17 der Probenaufnahmevorrichtung 5 zugeführt. Zur Versiegelung der

Aufnahmekammern 6 wird die Folie 15 vorzugsweise über eine Klebe- oder Schweißverbindung an der Probenaufnahmevorrichtung 5 angebracht. Nach dem Befüllen und Verschließen einer Aufnahmekammer 6 der Probenaufnahmevorrichtung wird eine Inkubationszeit eingehalten, bevor das entsprechende Probenvolumen in der Messvorrichtung 2 unabhängig von den Probenvolumina in den anderen Aufnahmekammern 6 untersucht wird.

Gemäß Fig. 2 weisen die Aufnahmekammern 6 der Probenaufnahmevorrichtung 5 jeweils eine umlaufende, im Wesentlichen horizontale Auflagefläche 18 zur Auflage des Filters 14 auf. Die Auflagefläche 18 kann zudem mit einem sieb- bzw. gitterförmigen Auflageelement (nicht gezeigt) versehen werden, auf welches der Filter 14 aufgelegt werden kann. Somit kann der Filter 14 während des Inkubations- bzw. Messvorgangs stabil in der gewünschten Position gehalten werden. Die Auflagefläche 17 ist durch eine Abstufung 19 der wannenförmigen Aufnahmekammer 6 gebildet.

Gemäß Fig. 3 wird die Probe gemeinsam mit der Messflüssigkeit in die Aufnahmekammern 6 der Probenaufnahmevorrichtung 5 eingebracht, wobei auf die Verwendung des Filters 14 verzichtet wird. Nach der Befüllung einer Aufnahmekammer 6 wird das darin aufgenommene Probenvolumen durchmischt, bevor die Einfüllöffnung 11 mit der Folie 15 verschlossen wird.

Wie aus Fig. 4 ersichtlich, weist die Probenaufnahmevorrichtung 5 bevorzugt Aufnahmekammern eines ersten Typs 6' mit einem ersten Aufnahmevolumen zur Aufnahme eines ersten definierten Probenvolumens und Aufnahmekammern eines zweiten Typs 6'' mit einem zweiten definierten Aufnahmevolumen zur Aufnahme eines zweiten definierten Probenvolumens auf. Diese Ausführung erleichtert die statistische Auswertung der Messergebnisse. Vorteilhafterweise kann in diesem Fall das MPV-Verfahren angewandt werden.

Gemäß Fig. 4a weist die Probenaufnahmevorrichtung 5 in Draufsicht im Wesentlichen quadratische Aufnahmekammern 6 auf, wobei eine festgelegte Abfolge von Aufnahmekammern des ersten Typs 6' und Aufnahmekammern des zweiten Typs 6'' vorgesehen ist.

Gemäß Fig. 4b, 5 sind im Wesentlichen kreisförmige Aufnahmekam-

mern 6 vorgesehen, wobei auch bei dieser Ausführung eine festgelegte Abfolge von Aufnahmekammern des ersten Typs 6' und Aufnahmekammern des zweiten Typs 6'' vorgesehen sind.

Gemäß Fig. 6 weist die Aufnahmekammer 6 der Probenaufnahmevorrichtung 5 einen elastisch verformbaren Abschnitt 20 auf. Der Abschnitt 20 der Aufnahmekammer 6 kann mit Klemmbacken 21 in Pfeilrichtung 22 elastisch verformt werden, wodurch die darin enthaltene Probenflüssigkeit in die übrigen Abschnitte der Aufnahmekammer 6 verdrängt wird (vgl. Pfeile 23 in Fig. 6b). Hiermit wird eine vorteilhafte Durchmischung der Probenflüssigkeit erzielt. In der Ausführung gemäß Fig. 6a, 6b ist der elastisch verformbare Abschnitt 20 am Boden der Aufnahmekammer 6 gebildet. Gemäß Fig. 6c ist der elastisch verformbare Abschnitt 20 ringförmig umlaufend an der Seitenwand der Aufnahmekammer 6 gebildet.

Wie aus Fig. 7 ersichtlich, weisen die Aufnahmekammer 6 der Probenaufnahmevorrichtung 5 und die Messkammer 3 der Messvorrichtung 2 zumindest abschnittsweise einander entsprechende Querschnittsformen auf. In der gezeigten Ausführung ist der elastisch verformbare Abschnitt 20 der Aufnahmekammer 6 im Wesentlichen passgenau in der Messkammer 3 der Messvorrichtung 2 aufnehmbar.

In Fig. 8 ist im Querschnitt eine alternative Ausführung der Messkammer 3 gezeigt, welche abschnittsweise entsprechend der Aufnahmekammer 6 des ersten Typs 6' gemäß Fig. 4, 5 geformt ist.

Wie aus Fig. 9 ersichtlich, kann die Messvorrichtung 2 zumindest zwei Messkammern 3 enthalten, so dass mehrere Probenvolumina gleichzeitig vermessen werden können. In der gezeigten Ausführung sind zwei Probenaufnahmevorrichtungen 5 vorgesehen, welche den getrennten Messkammern 3 zugeführt werden. Die Aufnahmekammern 6 der Probenaufnahmevorrichtung 5 weisen hierbei unterschiedliche Aufnahmevolumina auf.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Untersuchung einer biologischen Probenflüssigkeit, insbesondere zur Bestimmung von Mikroorganismen wie coliformen Bakterien, wie z.B. E. coli, wobei die Probenflüssigkeit durch eine insbesondere photometrische Messvorrichtung (2) mit einer Anregungseinrichtung und einer Detektoreinrichtung geführt wird, dadurch gekennzeichnet, dass die Probenflüssigkeit in definierte Probenvolumina aufgeteilt wird, welche nacheinander durch eine Messkammer (3) der Messvorrichtung (2) geführt werden, wobei die Probenvolumina einzeln untersucht werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Probenflüssigkeit zur Aufteilung in definierte Probenvolumina in voneinander getrennte Aufnahmekammern (6) einer Probenaufnahmevorrichtung (5) abgefüllt wird.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass eine langgestreckte Probenaufnahmevorrichtung (5) verwendet wird, welche in Längsrichtung aufeinanderfolgende Aufnahmekammern (6) aufweist, die nacheinander durch die Messkammer (3) der Messvorrichtung (2) geführt werden.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Aufnahmekammer (6) der Probenaufnahmevorrichtung (5) eine Einfüllöffnung (11) aufweist, welche nach dem Befüllen mit der Probenflüssigkeit, vorzugsweise mittels einer Folie (15), verschlossen wird.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Aufnahmekammer (6) der Probenaufnahmevorrichtung (5) mit einem vorzugsweise trockenchemischen Reagenz (7), insbesondere mit einem Substrat zur Katalyse einer biochemischen Reaktion, versehen wird.
6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass zumindest zwei Kapseln mit unterschiedlichen trockenchemischen Reagenzien in der Aufnahmekammer (6) angeordnet werden.
7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass die

Kapseln die trockenchemischen Reagenzien einschließende Ummantelungen aufweisen, welche sich nach verschiedenen Zeiten und/oder bei verschiedenen Temperaturen auflösen.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die das Reagenz (7) enthaltende Aufnahmekammer (6) der Probenaufnahmevorrichtung (5) vorzugsweise mittels einer Schutzfolie (8) verschlossen wird, welche vor dem Befüllen mit der Probenflüssigkeit entfernt wird.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Probenflüssigkeit durch einen Filter (14) filtriert wird, welcher anschließend in der Aufnahmekammer (6) der Probenaufnahmevorrichtung (5) angeordnet wird, die mit einer Flüssigkeit, gegebenenfalls unter Zugabe eines Reagenz, befüllt wird.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass das Probenvolumen zumindest nach Ablauf einer Inkubationszeit seit der Befüllung der Aufnahmekammer (6) der Probenaufnahmevorrichtung (5) in der Messvorrichtung (2) untersucht wird, wobei vorzugsweise eine weitere Messung zu Beginn der Inkubationszeit nach Befüllung der Aufnahmekammer (6) vorgenommen wird.

11. Vorrichtung (1) zur Untersuchung einer biologischen Probenflüssigkeit, insbesondere zur Bestimmung von coliformen Bakterien, wie z.B. E. coli, mit einer eine Anregungseinrichtung und eine Detektoreinrichtung aufweisenden Messvorrichtung (2), und mit einer Probenezufuhrvorrichtung (4) zur Zufuhr von Probenflüssigkeit an die Messvorrichtung (2), dadurch gekennzeichnet, dass die Probenezufuhrvorrichtung (4) eine Probenaufnahmevorrichtung (5) mit getrennten Aufnahmekammern (6) zur Aufnahme von definierten Probenvolumina der Probenflüssigkeit derart aufweist, dass die Aufnahmekammern (6) nacheinander durch eine Messkammer (3) der Messvorrichtung (2) führbar sind, um die Probenvolumina einzeln zu untersuchen.

12. Vorrichtung (1) nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Aufnahmekammern (6) der Probenaufnahmevorrichtung (5)

und die Messkammer (3) der Messvorrichtung (2) zumindest abschnittsweise einander entsprechende Querschnittsformen aufweisen.

13. Vorrichtung (1) nach Anspruch 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Probenaufnahmevorrichtung (5) im Längsschnitt polygonale, insbesondere im Wesentlichen quadratische oder im Wesentlichen rechteckige, Aufnahmekammern (6) und/oder im Längsschnitt runde, insbesondere im Wesentlichen kreisförmige, Aufnahmekammern (6) aufweist.

14. Vorrichtung (1) nach einem der Ansprüche 11 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Aufnahmekammer (6) eine Auflagefläche (18) zur Auflage eines Filters (14) aufweist.

15. Vorrichtung (1) nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass die Auflagefläche (18) durch eine Abstufung (19) der Aufnahmekammer gebildet ist.

16. Vorrichtung (1) nach Anspruch 14 oder 15, dadurch gekennzeichnet, dass die Aufnahmekammer (6) zur Ausbildung der Auflagefläche (18) für den Filter (14) ein sieb- bzw. gitterförmiges Auflageelement aufweist.

17. Vorrichtung (1) nach einem der Ansprüche 11 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass die Probenaufnahmevorrichtung (5) Aufnahmekammern eines ersten Typs (6') mit einem ersten Aufnahmevolumen zur Aufnahme eines ersten definierten Probenvolumens und Aufnahmekammern eines zweiten Typs (6'') mit einem zweiten definierten Aufnahmevolumen zur Aufnahme eines zweiten definierten Probenvolumens aufweist.

18. Vorrichtung (1) nach einem der Ansprüche 11 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass die Aufnahmekammer (6) der Probenaufnahmevorrichtung (5) einen zur Durchmischung der Probenflüssigkeit elastisch verformbaren Abschnitt (20) aufweist.

19. Vorrichtung (1) nach einem der Ansprüche 11 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass die Anregungseinrichtung eine Strahlungsquelle zur Bestrahlung der Probenflüssigkeit und die Detek-

toreinrichtung einen Strahlungsdetektor zur Erfassung von mit der Probenflüssigkeit wechselwirkender Strahlung aufweist.

20. Vorrichtung (1) nach einem der Ansprüche 11 bis 19, dadurch gekennzeichnet, dass die Aufnahmekammern (6) der Probenaufnahmevorrichtung (5) lösbar miteinander verbunden sind.

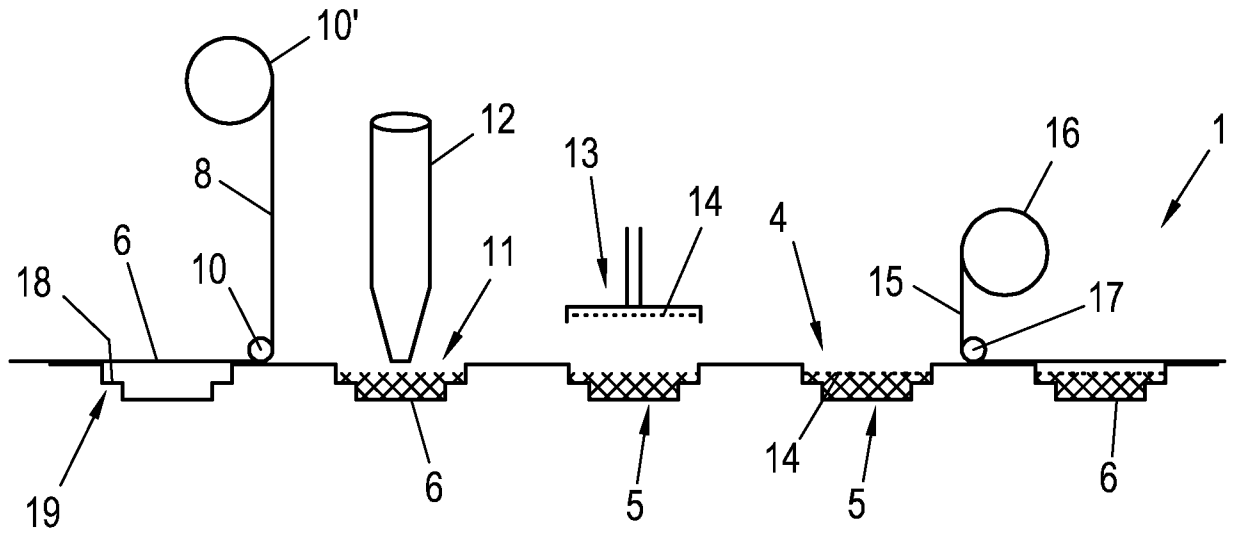


Fig. 2

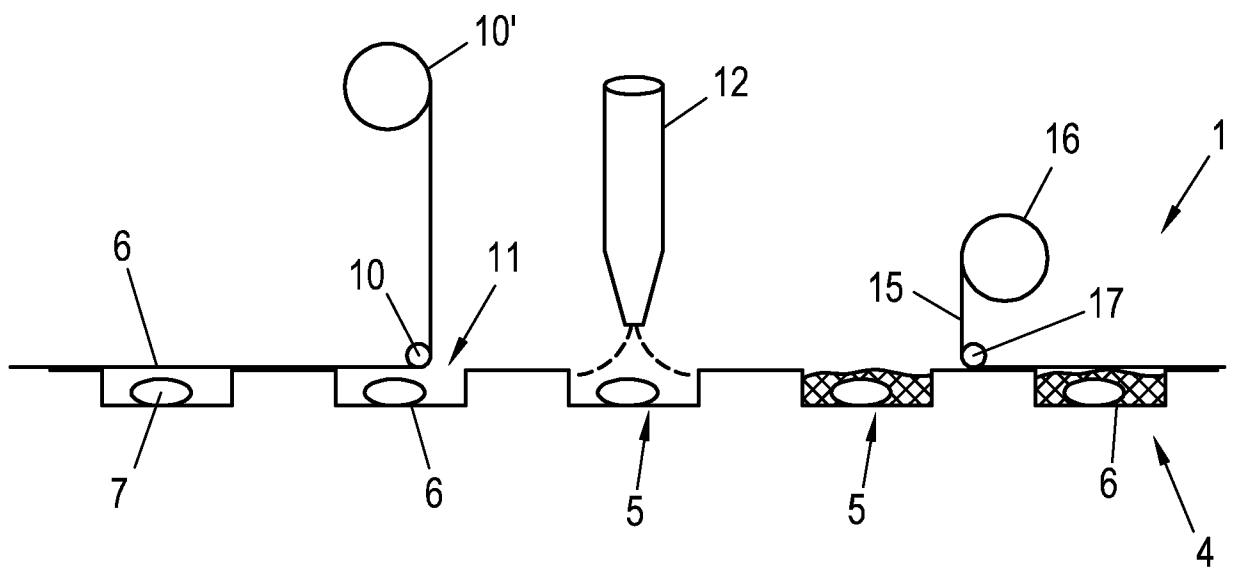


Fig. 3

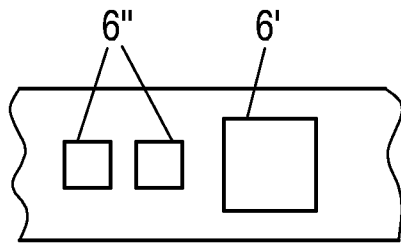


Fig. 4a

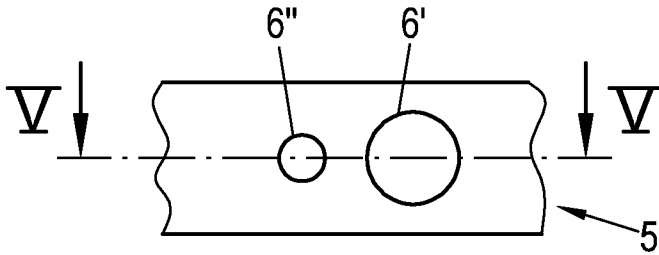


Fig. 4b

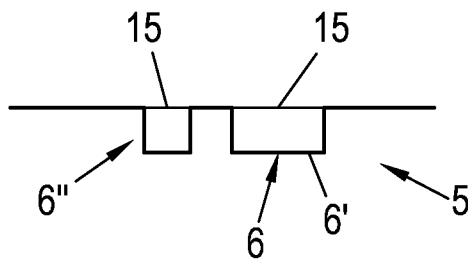


Fig. 5

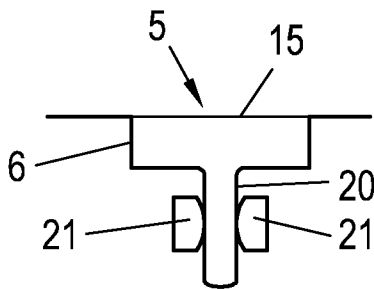


Fig. 6a

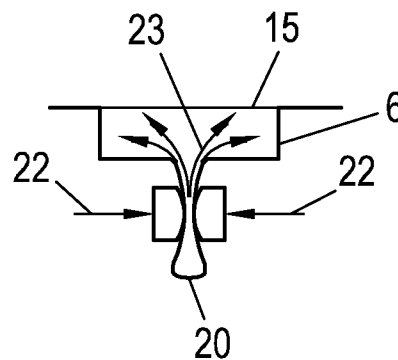


Fig. 6b

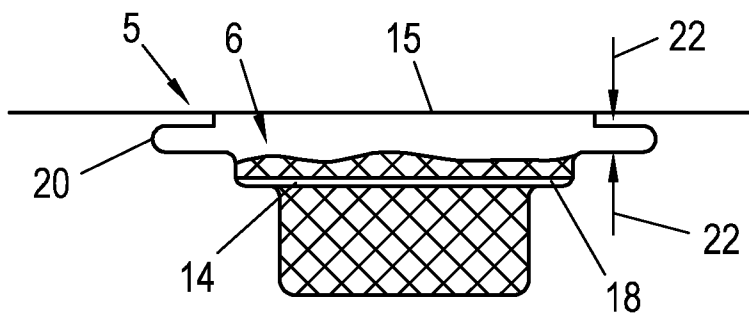


Fig. 6c

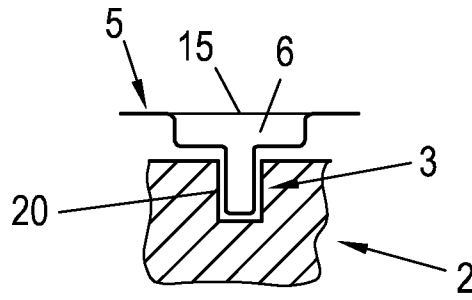


Fig. 7

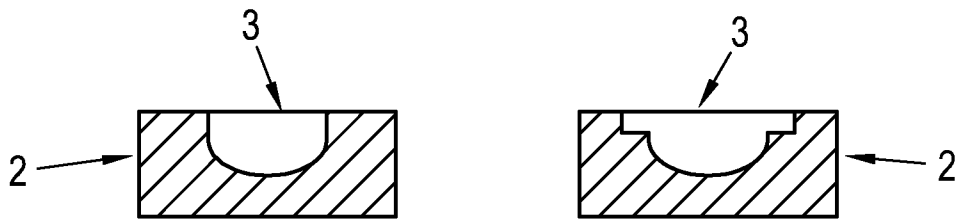


Fig. 8

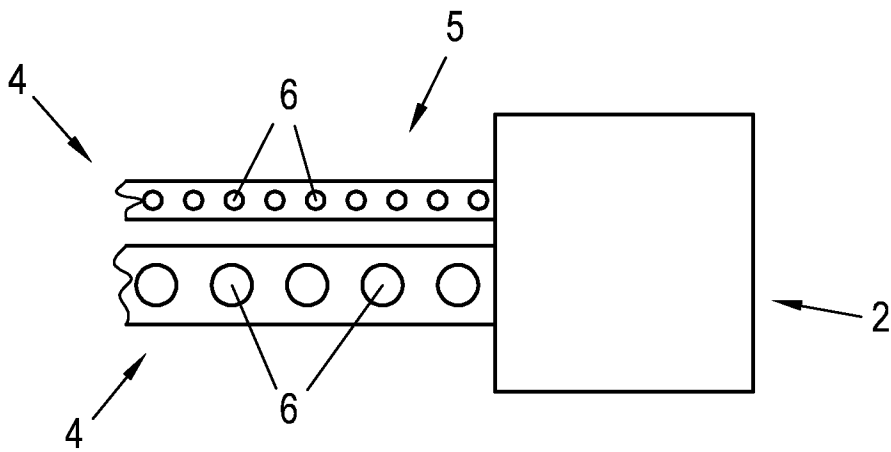


Fig. 9