

(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
13. November 2008 (13.11.2008)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2008/135452 A2

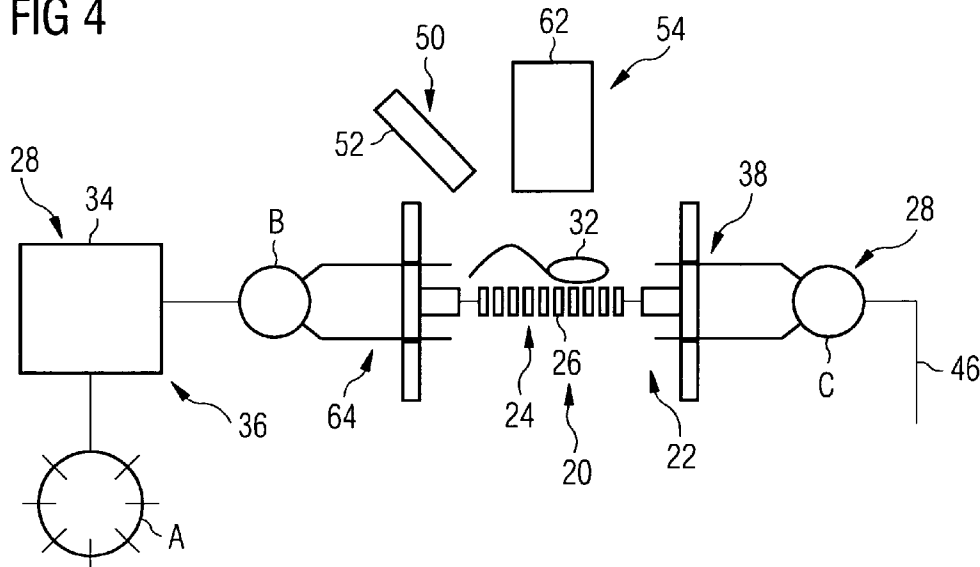
- (51) Internationale Patentklassifikation:
C12Q 1/68 (2006.01) *C12M 1/34* (2006.01)
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2008/055231
- (22) Internationales Anmeldedatum:
29. April 2008 (29.04.2008)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
10 2007 021 387.7 4. Mai 2007 (04.05.2007) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): EADS Deutschland GmbH [DE/DE]; Willy-Messer-
schmitt-Strasse, 85521 Ottobrunn (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): FRIEDBERGER,
Alois [DE/DE]; Am Stierberg 50, 85667 Oberpfaffmarn
(DE). REIDT, Ulrich [DE/DE]; Am Grossen Wallgraben
- 1, 34613 Schwalmstadt (DE). MÜLLER, Gerhard
[DE/DE]; Sudetenstrasse 126, 85567 Grafing (DE).
- (74) Anwälte: KASTEL, Stefan usw.; Flügel Preissner Kastel
Schober, Nymphenburgerstr. 20a, 80335 München (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, 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, KM, 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, PG, PH,
PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV,
SY, 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, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: DETECTION DEVICE FOR DETECTING BIOLOGICAL MICROPARTICLES SUCH AS BACTERIA, VIRUSES,
SPORES, POLLEN OR BIOLOGICAL TOXINS, AND DETECTION METHOD

(54) Bezeichnung: DETEKTIONSVORRICHTUNG ZUR DETEKTION VON BIOLOGISCHEN MIKROPARTIKELN WIE
BAKTERIEN, VIREN, SPOREN, POLLEN ODER BIOLOGISCHE TOXINE, SOWIE DETEKTIONSVERFAHREN

FIG 4



(57) Abstract: The invention relates to a device and a method for detecting microparticles that can be labeled by probes, which can be detected by radiation, or antibodies. In order to allow a fast, straightforward and automated detection, the fluid to be assayed for microparticles is guided across a filter (24) in order to filter out the microparticles (72) and the labeling steps are carried out by guiding corresponding labeling substances towards the filter (24). The invention especially allows an automatic detection of living bacteria by means of in situ hybridization.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2008/135452 A2



ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— *ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts*

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung und ein Verfahren zur Detektion von Mikropartikeln, die durch mittels Strahlung erfassbarer Sonden oder Antikörper markierbar sind. Um eine schnelle, unkomplizierte und automatisierbare Detektion durchzuführen, wird vorgeschlagen, das nach Mikropartikel zu untersuchende Fluid über ein Filter (24) zum Ausfiltern der Mikropartikel (72) zu leiten, und die Markierungsschritte durch Leiten entsprechender Markierungsstoffe zu dem Filter (24) durchzuführen. Insbesondere ist damit eine automatische Detektion von lebenden Bakterien mittels in-situ-Hybridisierung möglich.

Detektionsvorrichtung zur Detektion von biologischen Mikropartikeln wie Bakterien, Viren, Sporen, Pollen oder biologische Toxine, sowie Detektionsverfahren

- 5 Die Erfindung betrifft eine Detektionsvorrichtung zur Detektion von biologischen Mikropartikeln wie z.B. lebende oder tote Bakterien, Viren, Sporen, Pollen oder biologische Toxine, die durch mittels Strahlung erfassbarer Sonden markierbar sind, insbesondere eine Detektionsvorrichtung zur Detektion von lebenden Bakte-
- 10 Sonden oder Proteinen als Sonden. Die Erfindung betrifft außerdem ein Detektionsverfahren zum Detektieren von biologischen Mikropartikeln wie lebende Bakterien, Viren, Sporen, Pollen und/oder biologische Toxine in einem Fluid.

- Bisherige Detektionsmethoden für lebende Bakterien benötigen einen zeitaufwän-
- 15 digen Kultivierungsschritt der Mikroorganismen. Diese herkömmliche Art der Lebenddetektion bzw. der Lebendzellzahlbestimmung ist enorm zeitaufwändig und kann nur in geeigneten biologischen Laborräumen (S1-Labor bis S4-Labor) durchgeführt werden. Eine alternative Methode zur Detektion von lebenden Bakterien ist die in-situ-Hybridisierung. Die in-situ-Hybridisierungs-Methode ist eine Standard-
- 20 technik, die bereits häufig in der Molekularbiologie angewendet wird. Zahlreiche Publikationen sind zu dieser Methode veröffentlicht worden.

- In bezug auf Bakteriendetektion bietet die Firma Vermicon AG, München, fertige Detektionskits, d. h. Ensembles von Chemikalien, für unterschiedliche Bakterien-
- 25 stämme an.

Bisherige Detektionsverfahren einschließlich der in-situ-Hybridisierung sind in der WO 01/68900 A2, der WO 02/101089 A2, der DE 103 07 732 A1, der WO 2005/031004 A2, der US 6844157B2, der US 2005/064444 A1, der US/20050202

477 A1, der US 2005/0202476 A1 sowie der US 2005/0136446 A1 näher beschrieben. Es wird für weitere Einzelheiten ausdrücklich auf diese Dokumente aus dem Stand der Technik verwiesen.

- 5 Zurzeit ist die Analysemethode der in-situ-Hybridisierung in der Praxis jedoch nur mit einem sehr teuren und hochempfindlichen Fluoreszenzmikroskop möglich.

Die Erfindung hat sich zur Aufgabe gestellt, eine Vorrichtung und ein Verfahren zur Verfügung zu stellen, mit dem insbesondere lebende Bakterien, aber auch andere durch spezifische Sonden markierbare Mikropartikel und Mikroorganismen, wie insbesondere Viren oder biologische Toxine, schnell, sicher und unkompliziert automatisch detektierbar sind.

15 Diese Aufgabe wird durch eine Detektionsvorrichtung mit den Merkmalen des Patentanspruchs 1 sowie ein Detektionsverfahren mit den Schritten des Patentanspruchs 24 gelöst.

Vorteilhafte Ausgestaltungen der Erfindung sind Gegenstand der Unteransprüche. Eine vorteilhafte Verwendung ist Gegenstand des weiteren Nebenanspruches.

20 Vorteilhafte Ausgestaltungen der Erfindung ermöglichen insbesondere eine automatische Lebenddetektion von pathogenen Bakterien in Trinkwasser und Luft.

Insbesondere schafft die Erfindung ein Gerät zur schnellen, vorzugsweise automatischen Detektion von lebenden Bakterien ohne die Zuhilfenahme eines Fluoreszenzmikroskops.

25 Die Messergebnisse sind insbesondere dazu verwendbar, eine Korrelation zur LZZ (Lebendzellzahl; englisch CFU colony forming units) zu erreichen mit dem

Ziel, eine Alternative zur zugelassenen Methode der zeitaufwändigen Kultivierung zu schaffen (welche den LZZ-Wert liefert).

Erfindungsgemäß ist ein Filter vorgesehen, das zum Ausfiltern der zu detektierenden Mikropartikel geeignet ist. Die Stoffe oder Chemikalien, die für unterschiedliche Markierungsschritte zum Markieren der Mikropartikel zwecks Detektion dienen, werden beispielsweise über ein Versorgungssystem bereitgestellt und ebenfalls zu dem Filter, insbesondere über das Filter, geleitet. Mittels eines Detektionssystems lässt sich die Strahlung zum Erfassen der Sonden erfassen und somit lassen sich die Mikropartikel erfassen.

Insbesondere für die Detektion von lebenden Bakterien wird beispielsweise ein mikromechanisches Filter eingesetzt. Ein Versorgungssystem liefert in einem solchen Fall insbesondere die für die einzelnen Schritte einer in-situ-Hybridisierung einzusetzenden Chemikalien, beispielsweise aus den zum Erfassen bestimmter Bakterien auf dem Markt erhältlichen Detektionskits.

Das Versorgungssystem kann vorzugsweise über Ventile und/oder Pumpen automatisch gesteuert werden, so dass eine vollautomatische Durchführung des Detektionsverfahrens ermöglicht ist.

Vorzugsweise ist das Filter mehrmals verwendbar, indem es durch geeignete Chemikalien regeneriert und/oder konditioniert wird. Dies wird durch entsprechend gesteuerte Pumpen und Ventile ermöglicht.

Insbesondere kann das Versorgungssystem Teil eines Fluidiksystems sein, das nicht nur Chemikalien zum Markieren und/oder späteren Spülen und Reinigen der Vorrichtung liefert, sondern auch zu messende Fluide zu dem Filter liefern kann. Die Messung der Strahlung ist jeweils an die verwendeten Sonden angepasst.

- Damit die Sonden Strahlung emittieren, können Fluoreszenzfarbstoffe verwendet werden, oder beispielsweise auch Raman-Labels, Quantum Dots, oder ähnliches. Falls mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierte Sonden eingesetzt werden, wie dies aus der in-situ-Hybridisierung bekannt ist, wird vorzugsweise eine Lichtquelle
- 5 zum Anregen des Fluoreszenzfarbstoffes, beispielsweise ein Laser, eingesetzt. Als Strahlungsmessgerät zum Messen von mit den Sonden korrelierter Strahlung wird vorzugsweise ein auf die bestimmte Fluoreszenzstrahlung sensitiver Lichtdetektor eingesetzt.
- 10 Der Lichtdetektor kann beispielsweise einen Photomultiplier aufweisen, um so die Intensität des Fluoreszenzlichtes festzustellen. Alternativ oder zusätzlich kann ein ortsauflösender Lichtdetektor, beispielsweise ein zweidimensional ortsauflösender Lichtdetektor eingesetzt werden. Ein solcher wird beispielsweise durch ein zweidimensionales CCD-Array gebildet. Ein solcher ortsauflösender Sensor kann
- 15 Lichtimpulse sowie die Position ihres Ursprunges auf dem Filter feststellen. Aufgrund der größeren Auflösung sowie der einzelnen Sensorelemente lässt sich eine vorzugsweise softwaregesteuerte Auswerteeinheit anschließen, die z. B. die Lichtpunkte zählt und damit die Sonden und damit wiederum die Mikropartikel zählt.
- 20 Zum Ausfiltern von lebenden Bakterien ist beispielsweise ein mikromechanisches Filterelement einsetzbar. Vorzugsweise werden mikromechanische Filter mit Porengrößen deutlich unterhalb der Größe der auszufilternden Mikropartikeln verwendet. Ein mikromechanisches Filter hat beispielsweise eine Porengröße von weniger als 0,8 μm , beispielsweise von etwa 0,45 μm , so dass Bakterien mit typi-
- 25 schen Dimensionen von 1 μm sicher zurückhaltbar sind.

Andere interessante Mikropartikel, wie beispielsweise Viren oder biologische Toxine, haben teilweise geringere Abmessungen. Zum Ausfiltern dieser Mikropartikel lässt sich ein mikromechanisches Filter mit geringerer Porengröße oder ein ande-

res Filter, insbesondere ein Nitrocellulose-Filter, verwenden. Hierzu wird beispielsweise ein mikromechanisches Filter oder ein anderer poröser Körper als Auflage mit Nitrocellulose überschichtet. Die Nitrocellulosemembran kann beispielsweise durch eine Bahn bereitgestellt werden, die zum Austausch der wirksamen

5 Nitrocellulosemembran bewegbar ist, so dass ein frisches Bahnstück als Filter für neue Messungen verwendbar ist.

Zum Nachweis insbesondere von Viren oder biologischen Toxinen können durch Strahlung erfassbare Proteine, zum Beispiel mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierte Antikörper oder markierte Nukleinsäure-Sonden verwendet werden.

10

Zur Erfassung von lebenden Bakterien werden vorzugsweise entsprechend markierte DNA-Sonden eingesetzt, die sich an die mRNA, welche nur von lebenden Bakterien mit ausreichender Lebensdauer bereitgestellt wird, anlagern.

15

Zusätzlich zu dieser bei der in-situ-Hybridisierung verwendeten Sonden-Markierung kann auch ein PCR-Modul verwendet werden, um alternativ oder zusätzlich eine PCR-Detektionsmethode durchzuführen.

20 Bei der zum Beispiel auch in der Kriminalistik eingesetzten PCR-Methode werden DNA-Stücke multipliziert und anschließend detektiert.

Soll die Konzentration von Mikropartikeln in Flüssigkeiten festgestellt werden, beispielsweise die Anzahl von lebenden Bakterien im Trinkwasser, kann diese Flüssigkeit direkt in die Detektionsvorrichtung eingeleitet und über das Filter geleitet werden. Wenn eine Konzentration von Mikropartikeln in gasförmigen Medien, wie beispielsweise in der Luft, festgestellt werden soll, kann man diese Mikropartikel in einer vorgeschalteten Sammelvorrichtung, beispielsweise in einem Biosampler, zunächst in einer Flüssigkeit sammeln, und anschließend diese Flüssigkeit in das

25

Detektionssystem übergeben, oder die Partikel aus der Luft direkt sammeln, indem die Luft durch den Filter geleitet wird.

Vorteile der Erfindung und/oder von deren vorteilhaften Ausgestaltungen sind:

5

- Eine automatische, schnell, unkomplizierte und sensitive Detektion von lebenden Bakterien ist mit der Detektionsvorrichtung an jedem beliebigen Ort möglich.
- Es kann auf aufwändige Kultivierungsschritte der Bakterien in einem biologischen Labor verzichtet werden.
- Eine mobile Detektion von lebenden Zellen ist möglich. Dadurch ist zum Beispiel eine schnelle Trinkwasseruntersuchung in einem Fahrzeug oder Flugzeug oder Raumfahrzeug oder in Verbindung mit einem Roboter, für zivile und/oder militärische Nutzung möglich.
- Die Vorrichtung und das Verfahren ermöglichen zum Beispiel eine schnelle Untersuchung von verdächtigen Flüssigkeiten zur Verhinderung eines biologischen Anschlags. Somit kann ein Beitrag zur öffentlichen Sicherheit geliefert werden.
- Als medizinische Nutzung ist z. B. eine schnelle Diagnose von bakteriellen Erkrankungen ohne eine aufwändige mikroskopische Untersuchung denkbar.

10

15

20

Ausführungsbeispiele der Erfindung werden nachfolgend anhand der beigefügten Zeichnungen näher erläutert: Darin zeigt:

25

Fig. 1 eine DNA-Sequenz zur Erläuterung der Grundlagen einer in-situ-Hybridisierung;

Fig. 2 eine schematische Darstellung des Prinzips der in-situ-Hybridisierung;

Fig. 3 eine schematische Darstellung einer schnellen Detektionsvorrichtung zur Erfassung lebender Bakterien in Trinkwasser;

5 Fig. 4 eine schematische Darstellung eines Ausführungsbeispiels einer schnellen Detektionsvorrichtung zur Erfassung lebender Bakterien in Fluiden mit einem Fluidiksystem mit Pumpen und Ventilen, sowie einer Detektionskammer mit Laser und Photomultiplier;

10 Fig. 5 eine schematische Zeichnung der Detektionskammer von oben mit einem mikromechanischem Filter

Fig. 6 eine schematische Darstellung der Detektionskammer sowie eines Detektor einer weiteren Ausführungsform einer Detektionsvorrichtung;

15

Fig. 7 eine schematische Darstellung der Detektionskammer sowie von Detektoren einer weiteren Ausführungsform der Detektionsvorrichtung, mit welcher eine Kombination von in-situ-Hybridisierung mit einer PCR-Detektion durchführbar ist;

20

Fig. 8 eine schematische Darstellung der Detektionskammer nach einer weiteren Ausführungsform; und

Fig. 9 eine schematische Darstellung zur Erläuterung der Verwendung der
25 Detektionsvorrichtung nach Fig. 8 zur Dektektion von Viren und biologischen Toxinen.

Im Folgenden werden Ausführungsbeispiele eines Verfahrens und eine Vorrichtung zur Detektion von Mikropartikeln, die durch mittels Strahlung erfassbare Son-

den markierbar sind, anhand der Zeichnungen näher erläutert. Die Vorrichtung und das Verfahren sind insbesondere zur Detektion von lebenden Bakterien mittels Nukleinsäure-Sonden oder von Viren oder biologischen Toxinen mittels Proteinen einschließlich Antikörpern als Sonden geeignet. Bevor auf die Einzelheiten der Vorrichtung sowie das Verfahren eingegangen wird, werden zunächst die allgemeinen Verfahren zum Markieren von solchen Mikropartikeln mittels derartiger Sonden näher erläutert.

Im Trinkwasser befinden sich unterschiedliche lebende und tote Bakterien. Ein Teil davon kann pathogen sein. Relevant sind nur die lebenden Bakterien, da nur diese sich vermehren und zu einer Gesundheitsgefährdung führen können. Viele gebräuchliche Detektionsverfahren basierend auf Antikörpern oder PCR können jedoch nicht zwischen lebenden und toten Bakterien unterscheiden. Im Folgenden werden eine Vorrichtung und ein Verfahren vorgestellt, mit denen nur die tatsächlich lebenden – und dadurch relevanten – Bakterien erfasst werden können.

Bisherige Detektionsmethoden für lebende Bakterien benötigen einen zeitaufwändigen Kultivierungsschritt der Mikroorganismen. Die bakteriellen Proben werden hierzu auf speziellen Nährböden ausgestrichen und eine bestimmte Zeit bei bestimmter Temperatur inkubiert (bebrütet). Je nach Art der Bakterien kann dieser Kultivierungsschritt mehrere Tage dauern. Nach Beendigung der Inkubationszeit wird die „Colony forming Unit“ (CFU), die Anzahl der entstandenen Bakterienkolonien, bestimmt. Diese herkömmliche Art der Lebenddetektion bzw. Lebendzellzahlbestimmung ist enorm zeitaufwändig und es besteht bisher keine Möglichkeit, lebende Bakterien schnell und unkompliziert zu detektieren.

Eine alternative Methode zur Detektion von lebenden Bakterien ist die in-situ-Hybridisierung. Gegenwärtig ist diese Analysemethode jedoch nur mit einem sehr teuren und hochempfindlichen Fluoreszenzmikroskop möglich. Mobile Feldversu-

che sind praktisch unmöglich, außerdem ist qualifiziertes Laborpersonal für die Bedienung erforderlich.

Zur Detektion von Mikroorganismen werden sehr oft weitere Detektionsmethoden herangezogen, wie zum Beispiel „Polymerase Chain Reaction“ (PCR) oder „enzyme linked immuno sorbant assay“ (ELISA). Diese Methoden erfassen aber ausschließlich die Anzahl der lebenden und toten Zellen, also die Gesamtzellzahl einer Probe. Eine Erfassung der Lebendzellzahl ist mit diesen Methoden nicht möglich.

10

2. Methoden zur Bakteriendetektion

A) PCR

15 Die PCR-Methode (Polymerase Chain Reaktion) ist ein Verfahren, mit dem in einer Kettenreaktion kleinste Mengen eines DNA-Abschnitts vervielfältigt werden können (Amplifikation). Die PCR-Methode wird heute sehr oft eingesetzt, wenn anhand bestimmter DNA-Sequenzen Nachweise geführt werden sollen so etwa:

- in der Kriminalistik oder beim Vaterschaftstest,
- 20 • in der Mikrobiologie zur Detektion von lebenden und toten Bakterien (Gesamtzellzahl)
- in der medizinischen Diagnostik, wenn im Blut Viren-DNA nachzuweisen ist, oder
- in der Evolutionsbiologie, um Verwandtschaftsbeziehungen und Abstammungslinien zu verfolgen.

25

Um einen PCR-Nachweis führen zu können, müssen zwei kurze DNA-Stücke (Primer) vorhanden sein, die zu dem gesuchten DNA-Strang passen. Die von ihnen gestartete Kettenreaktion durchläuft bis zu 30 Zyklen, in denen die DNA-Menge

jeweils verdoppelt wird. Aufgrund der Detektion über das Erbgut werden tote und lebende Bakterien nachgewiesen. Eine Detektion von ausschließlich lebenden Zellen ist mit der PCR-Methode nicht möglich.

5 B) ELISA

ELISA (enzyme-linked immuno sorbent assay) ist ein verbreitetes Verfahren, um einzelne Proteine (Antigen) nachweisen zu können. Dabei nutzt man die Mechanismen des Immunsystems: Wird eine Substanz vom Immunsystem als fremd erkannt, bildet es Antikörper, die an das fremde Molekül andocken und es so markieren. Diese so genannte Antikörper-Antigen-Interaktion wird für den ELISA-Test genutzt. Soll ein bestimmtes Protein nachgewiesen werden, müssen die dazu passenden Antikörper bekannt sein und zuvor mit verschiedenen gentechnischen oder zellbiologischen Verfahren hergestellt worden sein. Ist in einer Probe das gesuchte Protein vorhanden, binden es die auf ein Trägermedium aufgebrauchten Antikörper. Nach der Antigen-Antikörper-Interaktion wird eine von Enzymen gesteuerte Reaktion ausgelöst, die zu einem sichtbaren Farbniederschlag führt. ELISA-Tests sind heute in der medizinischen Diagnostik weit verbreitet. Sie werden aber auch in vielen anderen Bereichen genutzt, wenn einzelne Proteine nachzuweisen sind. Im Falle einer Bakteriendetektion werden die bakterienspezifischen Oberflächenproteine von dem Antikörper erkannt. Es werden sowohl lebende als auch tote Bakterien erkannt (Gesamtzellzahl).

C) In-situ-Hybridisierung

25

Im Folgenden wird auf Fig. 1 Bezug genommen. Eine DNA-Sequenz 10 kann man sich als einen „Reißverschluss“ vorstellen. Die „Zähne“ dieses Reißverschlusses sind die Basen Adenin (A), Cytosin (C), Guanin (G) und Thymin (T). Die Information, die die DNA enthält, ist verschlüsselt in der Reihenfolge dieser vier Buchsta-

ben entlang des „Reißverschlusses“. Gegenüberliegend „Zähne“ bilden dabei immer nur entweder AT- oder GC-Paare. Die Sequenz ACGCT etwa hat als komplementäres Gegenüber die Buchstabenfolge TGCGA.

- 5 Bei der Hybridisierung wird der „Reißverschluss“ durch Erhitzen geöffnet, so dass Einzelstränge vorliegen. Kurze, ebenfalls einzelsträngige DNA-Stücke, die als Sonden verwendet werden, sollen nun ihr passendes Gegenstück auf dem langen Einzelstrang finden. An dieser Stelle schließt sich der Reißverschluss beim Abkühlen wieder.

10

Man kann dies anhand von Markierungen an der Sonde (z. B. durch einen Fluoreszenzfarbstoff 11, siehe Fig. 2) sichtbar machen. Auf diese Weise kann herausgefunden werden, ob spezifische Sequenzen, die z. B. für bestimmte Marker-

15 PCR).

Im Fall der in-situ-Hybridisierung, die im Folgenden näher anhand Fig. 2 erläutert wird, binden die fluoreszenzmarkierten Sonden 12 nicht an DNA, sondern an die mRNA 14 an, die sogenannte "Abschrift" der DNA. Die mRNA 14 ist eine Art Kopie
20 der DNA. Aus der in der mRNA transkribierten Information werden Proteine erzeugt (Proteinbiosynthese).

In toten Bakterien hat diese mRNA 14 eine sehr kurze Lebensdauer (Mikrosekunden) und wird sofort nach dem Ableben der Bakterien abgebaut.

25

Mit der in-situ-Hybridisierungs-Methode wird die mRNA der lebenden Zellen konserviert (Fachausdruck: „fixiert“) und dann detektiert. D. h. es werden ausschließlich die lebenden Bakterien detektiert (Lebendzellzahl), da tote Bakterien keine mRNA mehr enthalten.

Da bei diesem Verfahren DNA an (m)RNA bindet, spricht man von Hybridisierung.

Auch eine Kombination von in-situ-Hybridisierung und PCR ist möglich. Hierbei wird
5 die ebenfalls fixierte DNA der Bakterien zu einer Amplifikation herangezogen. Zum
Beispiel wird diese als in-situ-PCR bezeichnete Methode für einen Parallelnach-
weis von Viren in der zu untersuchenden Probe verwendet.

Die in-situ-Hybridisierungs-Methode hat sich mittlerweile zu einer Standardtechnik
10 entwickelt, die bereits häufig in der Molekularbiologie angewendet wird. Für weite-
re Einzelheiten zu den einzelnen Schritten der in-situ-Hybridisierung sowie der
übrigen hier vorgestellten Detektionsverfahren wird ausdrücklich auf die WO 01/68
900, WO 02/101089 A2, DE 103 07 732 A1, WO 2005/031004, US 6 844 157 A1,
US 2005/064444 A, US 2005/0202477 A1, US 2005/202476 A1, US
15 2005/0136446 A1 verwiesen.

Es sind auch bereits fertige Detektionskits mit Ensembles von Chemikalien auf
dem Markt erhältlich, beispielsweise von der Fa. Vermicon AG, Emmy-Noether-
Strasse 2, D-80992 München, Deutschland. Allerdings bedürfen die derzeit auf
20 dem Markt erhältlichen Detektionskits eines Fluoreszenzmikroskops. Zudem müs-
sen die Chemikalien fachgerecht angewendet werden. Dafür bedarf es Fachper-
sonal.

Ausführungsbeispiele:

25

In Fig. 3 ist hingegen eine Detektionsvorrichtung 20 dargestellt, mit der eine voll-
automatische Detektion lebender Bakterien ohne Verwendung eines Fluores-
zenzmikroskops durchführbar ist. Die Detektionsvorrichtung 20 weist eine Detekti-
onskammer 22 auf, in der ein Filter 24 untergebracht ist, das zum Ausfiltern der zu

detektierenden Mikropartikeln oder Mikroorganismen aus dem zu untersuchenden Fluid geeignet ist.

5 Zur Detektion von lebenden Bakterien ist das Filter 24 als mikromechanisches Filter aufgebaut und weist hierfür ein mikromechanisches Filterelement 26 auf. Das mikromechanische Filter und dessen Filterelement haben beispielsweise einen Aufbau, wie er näher in der nicht vorveröffentlichten deutschen Patentanmeldung DE 10 2006 026 559.9 beschrieben und gezeigt ist. Es wird für weitere Einzelheiten ausdrücklich auf die DE 10 2006 026 559 verwiesen. Der Inhalt dieser deutschen Patentanmeldung gehört durch Inbezugnahme auch zum Offenbarungsgehalt der hier vorliegenden Patentanmeldung.

15 Die Detektionsvorrichtung 20 weist weiter ein Fluidiksystem 28 auf, mit dem das zu untersuchende Fluid, beispielsweise Trinkwasser 30, welches auf das Vorhandensein von lebenden Bakterien 32 untersucht werden soll, zum und durch das Filter 24 geleitet wird.

20 Das Fluidiksystem 28 hat eine oder mehrere Pumpen 34, 35 sowie mehrere Motorventile A, B, C, D. Die Pumpen 34, 35 und die Ventile A, B, C, D sind durch eine nicht näher dargestellte Steuerung, beispielsweise ein angeschlossenes Computersystem mit entsprechender Software, automatisch steuerbar. Ein Teil des Fluidiksystems 28 dient außerdem als Versorgungssystem 36, mit dem Chemikalien zur Markierung der Bakterien 32 oder der sonstigen zu detektierenden Mikroorganismen oder Mikropartikel mit durch Strahlung erfassbarer Sonden, beispielsweise die fluoreszenzmarkierten Sonden 12, zu dem Filter 24 geleitet werden können.

25 Ein weiterer Teil des Fluidiksystems 28 dient als Entsorgungssystem oder Abflusssystem 38 zum Abführen der Stoffe und Proben aus der Detektionskammer 22.

Das Versorgungssystem 36 des Fluidiksystem 28 weist genauer ein Motorventil A mit einem Ausgang A1 und mehreren Eingängen A2 bis A9 auf. Die Tabelle 1 zeigt die Belegung der Eingänge für ein Anwendungsbeispiel

5

Tabelle 1: Belegung der Eingänge des Motorventils A in einem Anwendungsbeispiel

Ventileingang	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9
	20%EtoH	H ₂ O	Reserve (Eingang ist frei)	PBS	Trinkwas- serprobe	Anti- körper	“wash buffer” (Wasch- puffer)	0,5 M NaOH

10

An den Ausgang A1 schließen sich zwei parallel geschaltete Pumpen 34 und 35 mit unterschiedlichen Pumpleistungen an. Eine erste Pumpe 34 arbeitet beispielsweise in einem Arbeitsbereich von 6 bis 70 ml/min und eine zweite Pumpe 35 arbeitet in einem Bereich von 0,1 bis 7 ml/min. Je nach Steuerung und Schal-

15 tung der Pumpen 34, 35 lassen sich genau dosierte Mengen von aus dem Motorventil A gelieferten Fluiden in Richtung Detektionskammer 22 pumpen.

20

Auf die Pumpen 34, 35 folgt ein 3/2-Wege-Ventil B, mit dem der Ausgang der Pumpen 34, 35 wahlweise auf eine der beiden Seiten des Filters 24 geleitet werden kann. Die Detektionskammer 22 ist hierzu durch eine Trennung 40 in zwei Teilkammern 42 und 44 geteilt, die über das Filter 24 miteinander verbunden sind. Während der Eingang B1 des Ventils B mit dem Ausgang der Pumpen 34, 35 verbunden ist, ist ein Ausgang B2 des Ventils B mit der ersten Teilkammer 42 und ein zweiter Ausgang B3 des Ventils B mit der zweiten Teilkammer 44 verbunden. Je

nach Beschickung der ersten oder zweiten Teilkammer 42 bzw. 44 kann so das Filter 24 durch entsprechende Flüssigkeiten belegt, gereinigt und/oder konditioniert werden. Entsprechende Strömungen können auch über das Abfluss-System 38 erreicht werden, wo ein erster Eingang C1 eines 3/2-Wege-Ventils C mit der ersten Teilkammer 42 und ein zweiter Eingang C3 mit der zweiten Teilkammer 44 verbunden ist. Mit dem 3/2-Wege-Ventil C kann wahlweise der erste Eingang C1 oder der zweite Eingang C3 auf einen Ausgang C2 geschaltet. Der Ausgang C2 ist wiederum mit einem Eingang D1 eines weiteren 3/2-Wege Ventils D verbunden. Dieser Eingang D1 kann durch das Ventil D wahlweise auf einen Abfluss 46 zur Entsorgung oder auf einen Sammelanschluss 48 zum Sammeln von Antikörpern geschaltet werden.

Das heißt, durch die Anordnung von Öffnungen zur Flüssigkeitszufuhr auf beiden Seiten des Filters und Öffnungen zur Abfuhr der Flüssigkeit auf beiden Seiten des Filters, sowie durch die Ventile B und C wird erreicht, dass der Filter 24 in beiden Richtungen durchströmbar ist. Durch das umschaltbare Ventil A, das an zwei oder mehr Flüssigkeitsbehälter angeschlossen ist, kann der Filter mit Chemikalien zum Markieren, Reinigen oder Konditionieren durchströmt werden.

Zur Detektion der mit den Hybridisierungs-Sonden oder fluoreszenzmarkierten Proteinen bzw. Antikörpern markierten Bakterien 32 ist weiter ein Strahlenmessgerät 50 an der Detektionskammer 22 angeschlossen.

Um z. B. Bakterien 32, die mittels fluoreszenzmarkierten Sonden 12 markiert sind, zu detektieren, ist eine Lichtquelle in Form eines Lasers 52, der zum Anregen des Fluoreszenzfarbstoffes 11 geeignete Strahlung, beispielsweise Licht mit der Wellenlänge 405nm, aussendet. Diese Einschränkung der Wellenlänge lässt sich weiter verbessern durch ein der Lichtquelle nachgeschaltetes optisches Filter.

Das Strahlenmessgerät 50 weist in dem dargestellten Ausführungsbeispiel einen Lichtdetektor 54 auf, um die hier verwendete Strahlung, nämlich Fluoreszenzlicht 56 von den Bakterien 32 zu detektieren. Zur genaueren Erfassung solcher Strahlung weist das Strahlenmessgerät 50 weiter ein optisches Filterelement 58 auf,
5 das nur die zu messende Strahlung, also hier das zu messende Fluoreszenzlicht 56, beispielsweise Fluoreszenzlicht bei einer Wellenlänge von 455nm, durchlässt.

Zum Anschluss des Strahlenmessgeräts 50 ist die Detektionskammer 22 an einer Seite mit einem Quarzglas 60 verschlossen. Durch das Quarzglas 60 hindurch
10 erfolgt die Anregung mittels des Lasers 52 sowie die Lichtdetektion mittels des Lichtdetektors 54.

In Fig. 4 ist eine Übersichtszeichnung über eine speziellere erste Ausführungsform der Detektionsvorrichtung 20 dargestellt, wobei die Detektionskammer 22 sowie
15 das Fluidiksystem 28 lediglich schematisch angedeutet ist. In dem in Fig. 4 dargestellten Ausführungsbeispiel weist der Lichtdetektor 54 ein Gerät zur Messung der Lichtintensität, hier in Form eines Photomultipliers 62 auf. Es kommt hier ein vereinfachtes Fluidiksystem 28 mit nur einer Pumpe 34 und einem vereinfachten Abfluss-System 38 zum Einsatz.

20 Mit der in Fig. 3 und 4 dargestellten Detektionsvorrichtung 20 lässt sich eine vollautomatische Detektion von lebenden Mikroorganismen mit der Methode der in-situ-Hybridisierung durchführen. In diesem System werden nun erstmals lebende Bakterien 32 mit der in-situ-Hybridisierung-Methode schnell und sicher detektiert.
25 Herzstück des Gerätes bzw. der Detektionsvorrichtung 20 ist die Detektionskammer 22, die das mikromechanische Filter 26 enthält. Durch das an die Detektionskammer 22 angeschlossene Fluidiksystem 28 (Pumpen 34, 35, Leitungen oder Verschlauchungen sowie Ventile A, B, C, D) wird die zu untersuchende Probe (zum Beispiel Wasser 30 mit Bakterien 32) über das Filterelement 26 gepumpt.

Da das mikromechanische Filterelement 26 eine Porengröße von zum Beispiel 0,45µm aufweist und Bakterien 32 einen Durchmesser von z. B. ca. 1 µm besitzen, reichern sich die Bakterien 32 auf der Filteroberfläche an.

5

Nach der Anreicherung werden die Bakterien 32 für die eigentliche Detektion präpariert. Hierzu werden mit Hilfe des Fluidiksystems 28, insbesondere mit Hilfe des Versorgungssystems 36, die für in-situ-Hybridisierung notwendigen Chemikalien über das Filterelement 26 gepumpt.

10

Die eigentliche Detektion erfolgt mit einer Lichtquelle, also zum Beispiel dem Laser 52, die den Fluoreszenzfarbstoff 11, mit dem die DNA-Sonde 12 markiert wurde, anregt. Das durch den angeregten Fluoreszenzfarbstoff 11 emittierte Fluoreszenzlicht 56 wird im Anschluss mit dem Photomultiplier 62 (PMT) detektiert. Spezielle optische Filter – hier das optische Filterelement 58 – sorgen dafür, dass ausschließlich von den markierten Bakterien 32 abgegebenes Fluoreszenzlicht 56 in den Photomultiplier gelangt.

15

Fig. 5 zeigt eine schematische Darstellung der Detektionskammer 22 mit dem Filter 24 von oben. Das zu erkennende Gitter stellt das mikromechanische Filterelement 20 dar. Außerdem sind Anschlüsse 64 und 66 an das Versorgungssystem 36 bzw. das Abfluss-System 38 des Fluidiksystems 28 dargestellt.

20

Zielorganismen für eine Lebenddetektion sind z. B. pathogene Keime. Aufgrund der Basensequenz der fluoreszenzmarkierten Sonde 12 ist es möglich, nicht nur ganz spezifisch eine pathogene Bakterienart (z. B. *E. coli*) zu detektieren, sondern es ist auch möglich, Bakterien auf einer höheren taxonomischen Ebene zu erfassen. So wäre es im Falle *E. Coli* möglich, dass alle Coli-Formen in einer Probe detektiert werden könnten.

25

Indem die Basissequenz der DNA-Sonde 12 unspezifischer gestaltet wird, kann es möglich werden, auf noch höherer taxonomischer Ebene, z. B. viele Enterobakterien, zu detektieren.

5

Auch ein gleichzeitiges Detektieren von unterschiedlichen Bakterienarten ist möglich. Hierzu kann man eine Mischung von unterschiedlich markierten Sonden 12 einsetzen, wobei für die jeweilige Bakterienart ein bestimmter Fluoreszenzfarbstoff 11 verwendet werden kann. Dadurch lässt sich bestimmen, welche Bakterien 32 in
10 welcher Konzentration vorhanden sind, wenn mit unterschiedlichen Wellenlängen angeregt wird.

In Fig. 6 ist die Detektionskammer 22 mit dem Filter 24 sowie der Lichtdetektor 54 einer weiteren Ausführungsform der Detektionsvorrichtung 20 schematisch dargestellt. Bei dieser Ausführungsform gemäß Fig. 6 weist der Lichtdetektor 54 keinen
15 Photomultiplier, sondern einen ortsauflösenden Detektor, nämlich hier genauer einen zweidimensionalen ortsauflösenden Detektor in Form eines zweidimensionalen CCD-Arrays auf, das an eine Auswerteeinheit, beispielsweise ein Computersystem 70, angeschlossen ist.

20

Erfolgt die Detektion nicht über einen Photomultiplier 62, sondern mit einem zweidimensionalen ortsauflösenden Detektor, wie zum Beispiel dem CCD-Array 68, flächig über dem Filter 24, so lässt sich die Position der einzelnen Bakterien 32 auf dem Filter 24 bestimmen. Mittels einer Optik bestehend aus optischen Linsen
25 lässt sich die Darstellung bzw. Auflösung auf dem CCD-Array verbessern.

Mit einer geeigneten Software lassen sich dadurch die einzelnen Bakterien 32 zählen. Dadurch kann sich die tatsächliche Anzahl der Bakterien 32 genauer bestimmen lassen als bei einer Messung mit Photomultiplier 62. Bei letzterem wird

nämlich nur die gesamte Lichtintensität gemessen. Aus der durch den Photomultiplier 62 erhaltenen Lichtintensität wird über eine geeignete Eichung abgeleitet, wie viele Bakterien 32 vorhanden waren. Das in Fig. 6 dargestellte Detektionssystem kann dagegen gleich eine Anzahl der Bakterien ausgeben.

5

Die Ungenauigkeit einer Messung über die Lichtintensität ist umso größer, je unterschiedlicher die Konzentration von mRNA 14 in unterschiedlichen Bakterien 32 ist.

- 10 Um mit den zuvor beschriebenen Ausführungsbeispielen der Detektionsvorrichtung 20 Bakterien in Luft oder sonstigen gasförmigen Medien zu detektieren, können diese, zum Beispiel automatisch, über eine geeignete Sammelvorrichtung in einer Flüssigkeit gesammelt werden und mit der Flüssigkeit, beispielsweise über den Anschluss A6 in die Detektionsvorrichtung 20 überführt werden. Geeignete
- 15 Sammelvorrichtungen sind zum Beispiel unter der Bezeichnung Biosampler von der Fa. SKC Inc., Eighty Four, PA, USA auf dem Markt erhältlich.

Alternativ lässt sich Luft direkt durch den Filter leiten, um darauf die Partikel anzureichern.

20

- Das mit der Detektionsvorrichtung 20 durchführbare Detektionsverfahren kann die heute zertifizierten Kultivierungsmethoden zur LZZ-Bestimmung (Lebendzellzahl) ersetzen. Hierzu werden die verwendeten Sonden 12 so ausgewählt, dass die damit detektierten Bakterien 32 ähnlich repräsentativ sind, wie die durch die kon-
- 25 ventionellen LZZ-Bestimmung detektierten Bakterien.

In Fig. 7 ist noch die Detektionskammer 22 mit dem Filter 24 sowie dem Strahlungsmessgerät 50 einer weiteren Ausführungsform der Detektionsvorrichtung 20 schematisch dargestellt.

Die Ausführungsform gemäß Fig. 7 weist, hier in der zweiten Teilkammer 44, ein Zusatzmodul 72 zur PCR-Detektion von DNA-Sequenzen auf. Das Zusatzmodul 72 ist beispielsweise eine Vorrichtung zum Durchführen einer real-time PCR. Solche Vorrichtungen sind auf dem Markt erhältlich, beispielsweise von der Fa. Fluidigm Corp., South San Francisco, USA.

Durch das Zusatzmodul 72, das zusätzlich zu der eigentlichen Detektionsvorrichtung 20 eingesetzt wird, ist eine Kombination von in-situ-Hybridisierung und PCR möglich. Beispielsweise kann eine sogenannte in-situ-PCR für eine nachträgliche Detektion von Viren verwendet werden. Die eigentliche Detektion könnte mit dem Verfahren der real-time-PCR ablaufen. Dabei werden während der Amplifikation Reporter-Moleküle freigesetzt, die aufgrund ihrer Fluoreszenz mit einem Photomultiplier detektiert werden können.

Hierzu ist das Zusatzmodul 72 mit einem eigenen Strahlenmessgerät zur Fluoreszenzlichtmessung ausgerüstet, oder es nutzt das entsprechend ausgebildete Strahlenmessgerät 50 der Detektionsvorrichtung 20.

Mit der Ausführungsform von Fig. 7 kann insbesondere die im Folgenden näher dargestellte besondere Ausführungsform des Detektionsverfahrens durchgeführt werden. Es wird eine Kombination von in-situ-Hybridisierung mit PCR durchgeführt. Bei der in-situ-Hybridisierung werden nach dem Fixieren der Bakterien 32 DNA-Sonden 12 zugegeben. Die nicht gebundenen DNA-Sonden 12 werden anschließend weggespült. Werden nun die gebundenen DNA-Sonden 12 wieder von der mRNA 14 gelöst und durch PCR amplifiziert, so lässt sich dadurch eine Lebendbakteriendetektion durchführen, wodurch sogar extrem kleine Bakterienkonzentrationen nachgewiesen werden können.

Die PCR-Methode dient hierbei also nicht zur Bestimmung der Gesamtzahl (toter und lebender Bakterien); es werden vielmehr die zuvor an die mRNA 14, die nur in Lebendbakterien mit ausreichender Lebensdauer vorhanden sind, angebundenen an DNA-Sonden detektiert, die durch die PCR um ein Vielfaches multipliziert werden.

In Fig. 8 ist noch die Detektionskammer 22 sowie das Filter 24 einer weiteren Ausführungsform der Detektionsvorrichtung 20 dargestellt, mit der auch Viren und biologische Toxine automatisch detektierbar sind. Hierzu ist eine Membran, insbesondere eine Nitrocellulosemembran 74 vorgesehen. Die Nitrocelluloseschicht 74 kann beispielsweise auf irgendeinem durchlässigen Körper als Auflage vorhanden sein. In der in Fig. 8 und Fig. 9 dargestellten Ausführungsform der Detektionsvorrichtung 20 ist die Nitrocellulosemembran 74 als Überschichtung des mikromechanischen Filterelements 26 vorgesehen.

Fig. 9 zeigt das Prinzip der Filterung von Viren 76 und biologischen Toxinen 78 mittels der Nitrocellulose sowie die Detektion mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper als Sonden, die bei diesem Detektionsverfahren zum Nachweis eingesetzt werden.

Fig. 8 und 9 verdeutlichen somit eine weitere Anwendung der schnellen Detektionsvorrichtung 20 zur Detektion von pathogenen Viren 76 und biologischen Toxinen 78.

Viren 76 sind kleine Partikel (25 – 500nm), die aus einer Proteinhülle und je nach Virusart einem RNA- oder DNA-Genom bestehen. Sie besitzen keinen eigenen Stoffwechsel, sondern vermehren sich ausschließlich durch lebende Zellen. Bekannte Beispiele sind Influenzaviren, Ebolaviren oder Pockenviren.

Biologische Toxine 78 sind äußerst stabile Proteine, die meistens von Bakterien, Einzellern oder Pflanzen als Stoffwechselprodukte gebildet werden. Oft werden diese Toxine in das umgebende Medium abgegeben und reichern sich dort in hohen Konzentrationen an. Im militärischen Bereich können biologische Toxine als

5 biologische Waffen eingesetzt werden.

Bekannte Vertreter biologischer Toxine sind das Botulinumtoxin (Botox) und das Rizin, das aus den Kernen der Rizinuspflanze gewonnen werden kann.

10 Aufgrund der geringen Größe können Viren 76 und biologische Toxine 78 nur eingeschränkt auf mikromechanischen Filtern angereichert werden. Durch eine Übersichtung des mikromechanischen Filterelementes 26 oder eines anderen durchlässigen Körpers, der als Auflage dient, mit einem geeigneten absorbierenden Material, insbesondere Nitrocellulose 74, ist es dennoch möglich, Viren 76 und biolo-

15 gische Toxine 78 erfolgreich zu filtrieren.

Nitrocellulose besitzt eine sehr hohe Affinität gegenüber Proteinen und Nukleinsäuren. In Bezug auf seine Oberflächenbeschaffenheit werden Proteine irreversibel an die Nitrocellulosemembran 74 gebunden. So können ganze Viren mit ihren

20 Oberflächenproteinen fest an die Nitrocellulosemembran 74 gebunden werden.

Das Binden von Proteinen und ganzen Viren auf Nitrocellulose ist in der biologischen Forschung eine verbreitete Methode und wird in zahlreichen Publikationen beschrieben ("Westernblot" oder "Dotblot").

25 Nachdem die Viren 76 an der Membran 74 haften, können die noch freien Stellen der Membran mit bestimmten Proteinen (z. B. BSA Bovines Serum Albumin) 82 aufgefüllt werden. Dieser Vorgang wird als Blocken der Membran bezeichnet.

Nach dem Blocken erfolgt die eigentliche Detektion mit spezifischen Antikörpern 80, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff 11 markiert wurden.

5 Durch die besondere Eigenschaft der Nitrocellulose ist es möglich, die Probe und sämtliche Flüssigkeiten, die für die Detektion notwendig sind, durch die Membran 74 zu saugen. Sollte das Saugen durch die Membran 74 durch irgendwelche Gründe eingeschränkt oder nicht möglich sein, so wäre auch ein oberflächliches Abspülen der Membran 74 mit dem Detektionsgerät möglich. Hierzu wäre nur eine andere Schaltfolge der 3/2-Wege-Ventile B, C notwendig, die sich links und rechts
10 neben der Detektionskammer 22 befinden (Fig. 4).

Alle Schritte aller oben beschriebenen Detektionsverfahren können mit dem hier entwickelten Gerät – Detektionsvorrichtung 20 – vollautomatisch ablaufen, so dass Analysen auch ohne speziell ausgebildetes Fachpersonal möglich sind.

15 Neben der Untersuchung von Flüssigkeiten könnte ein mit Nitrocellulose ausgerüstetes Gerät auch für Luftuntersuchungen eingesetzt werden. Soll nun die Detektion der in der Luft befindlichen Viren 76 oder Toxine 78 erfolgen, so kann das gleiche automatische Programm wie für die Flüssigkeiten angewendet werden,
20 wobei die Luft oder ein anderes gasförmiges Medium durch das Filter gepumpt wird.

Um zahlreiche Messungen hintereinander durchzuführen, lässt sich zum Verfügungsstellen der Membran 74 eine Endlosrolle aus Nitrocellulose verwenden, die
25 z. B. nach jeder Messung eine Einheit weitergespult wird, wodurch das Filter 24 vor jeder neuen Messung frisch ist.

Bezugszeichenliste

	10	DNA-Sequenz
	11	Fluoreszenzfarbstoff
5	12	fluoreszenzmarkierte Sonde
	14	mRNA
	20	Detektionsvorrichtung
	22	Detektionskammer
	24	Filter
10	26	mikromechanisches Filterelement
	28	Fluidiksystem
	30	Trinkwasser
	32	Bakterien
	34	Pumpe
15	35	Pumpe
	36	Versorgungssystem
	38	Abfluss-System
	40	Trennung
	42	erste Teilkammer
20	44	zweite Teilkammer
	46	Abfluss
	48	Sammelanschluss
	50	Strahlenmessgerät
	52	Laser
25	54	Lichtdetektor
	56	Fluoreszenzlicht
	58	optisches Filterelement
	60	Quarzglas
	62	Photomultiplier

	64	Zulauf
	66	Ablauf
	68	CCD-Array
	70	Computersystem (Auswerteeinheit)
5	72	Zusatzmodul
	74	Membran, insbesondere Nitrocellulose
	76	Viren
	78	biologische Toxine
	80	fluoreszenzmarkierte Proteine
10	82	Proteine, insbesondere BSA
	A	Ventil
	B	Ventil
	C	Ventil
	D	Ventil

15

20

Patentansprüche

1. Detektionsvorrichtung (20) zur Detektion von biologischen Mikropartikeln (32, 76, 78), die durch Sonden (12, 80) markierbar sind, die mittels Strahlung (56) erfassbar sind, wobei Strahlung emittierende Nukleinsäure-Sonden (12) oder Strahlung emittierende Proteine als Sonden (80) verwendet werden, mit:
5 einem zum Ausfiltern der zu detektierenden Mikropartikel (32, 76, 78) aus einem zu messenden Fluid (30) geeigneten Filter (24),
einem Versorgungssystem (36), mittels dem Chemikalien zum Markieren der zu
10 detektierenden Mikropartikel (32, 76, 78) mittels der Sonden (12, 80) durch das oder zu dem Filter (24) leitbar sind, und mittels dem Chemikalien zum Regenerieren des Filters mit Reinigen bzw. Konditionieren des Filters und des Fluidiksystems durch das oder zu dem Filter (24) leitbar sind, und
einem Detektionssystem (50, 52, 54) zum Erfassen (12, 80) der Sonden durch
15 Erfassung von Strahlung (56).
2. Detektionsvorrichtung (20) nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
dass das Versorgungssystem (36) wenigstens eine Pumpe (34, 35) aufweist, so-
20 wie ein Ventilsystem (A), das an Quellen (A2 – A5, A7 – A9) für verschiedene Chemikalien für die Sondenmarkierung angeschlossen ist, um die jeweils für einzelne Markierungsschritte notwendige(n) Chemikalie(n) zu dem Filter (24) zu leiten.
- 25 3. Detektionsvorrichtung (20) nach Anspruch 2,
dadurch gekennzeichnet,
dass das Ventilsystem wenigstens ein Motorventil (A) aufweist, mit dem wahlweise einer von mehreren Versorgungssystem-Zuläufen (A2 – A5, A7 – A9) mit einem zu

dem Filter (24) hin führenden Versorgungssystemablauf (A1) verbunden werden kann.

4. Detektionsvorrichtung (20) nach einem der voranstehenden Ansprüche,
5 dadurch gekennzeichnet,
dass das Filter und/oder das Fluidiksystem der Detektionsvorrichtung mittels Chemikalien regeneriert, gereinigt und/oder konditioniert wird.
5. Detektionsvorrichtung (20) nach einem der voranstehenden Ansprüche,
10 dadurch gekennzeichnet,
dass das Versorgungssystem (36) Teil eines Fluidiksystems (28) ist, mittels dem auch das zu messende Fluid (30) zu dem Filter (24) leitbar ist.
6. Detektionsvorrichtung (20) nach Anspruch 5 und nach Anspruch 2 oder 3,
15 dadurch gekennzeichnet,
dass eine Quelle (A6) für das zu messende Fluid (30) an das Ventilsystem (A) angeschlossen ist, um es wahlweise zu dem Filter (24) zu leiten.
7. Detektionsvorrichtung (20) nach einem der voranstehenden Ansprüche,
20 dadurch gekennzeichnet,
dass das Filter (24) in einer Detektionskammer (22) untergebracht ist, die an das Versorgungssystem (36) und/oder das Fluidiksystem (28) angeschlossen ist.
8. Detektionsvorrichtung (20) nach einem der voranstehenden Ansprüche,
25 dadurch gekennzeichnet,
dass das Detektionssystem ein Strahlungsmessgerät (50) zum Messen der von den Sonden (12, 80) stammenden Strahlung (56) und eine Auswerteeinheit (70) aufweist, die aufgrund der Messung durch das Strahlungsmessgerät (50) die Konzentration und/oder die Anzahl der Mikropartikel (32, 76, 78) bestimmt.

9. Detektionsvorrichtung (20) nach Anspruch 8,
dadurch gekennzeichnet,
dass das Strahlungsmessgerät (50) einen ortsauflösenden, insbesondere einen
5 wenigstens zweidimensional ortsauflösenden, Detektor (68) aufweist, der Strahlung (56) und deren Ursprungsposition auf dem Filter (24) erfassen kann.
10. Detektionsvorrichtung (20) nach Anspruch 8 oder 9,
dadurch gekennzeichnet,
10 dass die Auswerteeinheit (70) zum Zählen von Strahlimpulsen oder der Ursprungspositionen ausgebildet und eingerichtet ist.
11. Detektionsvorrichtung (20) nach einem der voranstehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
15 dass das Detektionssystem eine Lichtquelle (52) zum Anregen von fluoreszierenden Sonden (12, 80) und einen Lichtdetektor (54) zum Erfassen einer von angeregten fluoreszierenden Sonden (12,80) ausgestrahlten Lichtstrahlung (56) aufweist.
- 20 12. Detektionsvorrichtung (20) nach Anspruch 11,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Lichtquelle einen Laser (52) oder eine LED aufweist.
13. Detektionsvorrichtung (20) nach Anspruch 11 oder 12,
25 dadurch gekennzeichnet,
dass der Lichtdetektor (54) einen Photomultiplier (62) und/oder ein zweidimensionales CCD-Array (68) aufweist.
14. Detektionsvorrichtung (20) nach Anspruch 13 und nach Anspruch 8,

dadurch gekennzeichnet,
dass die Auswerteeinheit (70) aus der mit dem Photomultiplier (62) gemessenen Lichtintensität die Konzentration der Mikropartikel (32, 76, 78) bestimmt.

- 5 15. Detektionsvorrichtung (20) nach einem der Ansprüche 11 bis 14,
dadurch gekennzeichnet,
dass wenigstens ein optisches Filterelement (58) vorgesehen ist, das ausschließ-
lich das von den Sonden (12, 80) ausgesandte Fluoreszenzlicht (56) zu dem
Lichtdetektor (54) durchlässt.

10

16. Detektionsvorrichtung (20) nach einem der voranstehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
dass eine Steuerung zum vollautomatischen Steuern der Detektionsvorrichtung
(20) vorgesehen ist.

15

17. Detektionsvorrichtung (20) nach einem der voranstehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
dass das Versorgungssystem (36) zur Lieferung von Chemikalien in der Weise
ausgebildet und gesteuert ist, dass sich am Filter (24) befindliche lebende Bakteri-
20 en (32) durch in-situ-Hybridisierung markiert werden, wobei sich die als DNA-
Sonde (12) ausgebildete Sonde jeweils an die mRNA der zu detektierenden Bak-
terien (32) anlagert.

18. Detektionsvorrichtung (20) nach Anspruch 17,
25 dadurch gekennzeichnet,
dass das Versorgungssystem (36) an eine Quelle angeschlossen ist, die mittels
Strahlung (56) detektierbare DNA-Sonden (12) anliefert, die aufgrund einer Ba-
sensequenz derart ausgebildet sind, dass sie zu mehreren Bakterienarten einer
Bakteriengruppe passt.

19. Detektionsvorrichtung (20) nach einem der voranstehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
dass das Versorgungssystem (36) zur Lieferung mehrerer unterschiedlich markier-
5 ter Sonden (12, 80) zur gleichzeitigen Detektion unterschiedlicher Mikropartikel
(32, 78, 76) ausgebildet ist.
20. Detektionsvorrichtung (20) nach einem der voranstehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
10 dass ein Sammelssystem vorgesehen ist, in dem Mikropartikel (32) aus einem gas-
förmigen zu messenden Medium in einer Flüssigkeit gesammelt werden, wobei ein
Flüssigkeitsablauf des Sammelsystems über das Filter (24) leitbar ist.
21. Detektionsvorrichtung (20) nach einem der voranstehenden Ansprüche,
15 gekennzeichnet durch ein Zusatzmodul (72), mittels welchem eine PCR-Detektion
von Mikropartikeln durchführbar ist.
22. Detektionsvorrichtung (20) nach einem der voranstehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
20 dass das Filter (24) ein mikromechanisches Filterelement (26) und/oder eine Mik-
ropartikel anziehende Membran (74), insbesondere eine Nitrocellulosemembran
(74), aufweist.
23. Detektionsvorrichtung (20) nach Anspruch 22,
25 dadurch gekennzeichnet,
dass zum Vorsehen der Nitrocellulosemembran (74) eine Nitrocellulosebahn vor-
gesehen ist, die zwischen Messungen weiterspulbar ist.

24. Detektionsverfahren (20) zum Detektieren von biologischen Mikropartikeln, insbesondere von lebenden Bakterien (32), Viren (76) und/oder biologischen Toxinen (78)

gekennzeichnet durch die Schritte:

- 5 a) Leiten eines die biologischen Mikropartikel (32, 76, 78) enthaltenden Fluids (30) durch ein zum Ausfiltern der biologischen Mikropartikel (32, 76, 78) geeignetes Filter (24),
- b) Leiten von Chemikalien durch das, über das, oder zu dem Filter (24), um die daran anhaftenden biologischen Mikropartikel (32, 76, 78) mittels spezi-
10 scher Sonden (12, 80), die mittels Strahlung (56) erfassbar sind, zu markieren,
- c) Detektieren der mit den Sonden (12, 80) korrelierten Strahlung (56).

25. Detektionsverfahren nach Anspruch 24,
15 dadurch gekennzeichnet,
dass in Schritt a) eine zu untersuchende Flüssigkeitsprobe (30) mittels eines Fluidsystems (28), das wenigstens eine Pumpe (34, 35) und wenigstens ein Ventil (A, B, C, D) zur Steuerung enthält, über das Filter (24) gepumpt wird.

- 20 26. Detektionsverfahren nach einem der Ansprüche 24 oder 25,
dadurch gekennzeichnet,
dass in Schritt b) auf dem Filter (24) befindliche Bakterien (32) einer in-situ-Hybridisierung unterzogen werden.

- 25 27. Detektionsverfahren nach einem der Ansprüche 24 bis 26,
dadurch gekennzeichnet,
dass in Schritt b) mit einem Fluoreszenzfarbstoff (11) versehene DNA-Sonden (12) verwendet werden und dass in Schritt c) mittels einer Lichtquelle (52) der Fluoreszenzfarbstoff (11) angeregt wird und das durch den angeregten Fluoreszenz-

farbstoff (11) ausgesandte Licht (56) mittels eines Lichtdetektors (54) detektiert wird.

28. Detektionsverfahren nach Anspruch 27,
5 dadurch gekennzeichnet,
dass mittels des Lichtdetektors (54) die Lichtintensität gemessen wird.

29. Detektionsverfahren nach Anspruch 28,
dadurch gekennzeichnet,
10 dass für den Lichtdetektor (54) ein Photomultiplier (62) verwendet wird.

30. Detektionsverfahren nach Anspruch 27,
dadurch gekennzeichnet,
dass mittels eines ortsauflösenden Lichtdetektors (68) Lichtstrahlung oder Licht-
15 impulse und die Position ihres Ursprungs auf dem Filter (24) detektiert werden und
die Lichtimpulse und/oder die Positionen mittels eines Datenverarbeitungssystems
(70) gezählt werden.

31. Detektionsverfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche,
20 dadurch gekennzeichnet,
dass durch Verwendung entsprechend unspezifischer DNA-Sonden (12), die zu
Nukleinsäuren oder mRNA (14) unterschiedlicher Bakterienarten passen, die Ge-
samtkonzentration von Bakterien (32) mehrerer Bakterienarten erfasst wird.

25 32. Detektionsverfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
dass durch die Verwendung einer Mischung von unterschiedlich markierten Son-
den (12) mehrere unterschiedliche Bakterienarten gleichzeitig detektiert werden.

33. Detektionsverfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
dass die biologischen Mikropartikel (32, 76, 78) aus der Luft oder einem anderen
gasförmigen Medium in einer Flüssigkeit gesammelt werden und mit der Flüssig-
5 keit über das Filter (24) geleitet werden.

34. Detektionsverfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche,
gekennzeichnet durch den Schritt:
d) Durchführen eines PCR-Verfahrens.

10

35. Detektionsverfahren nach Anspruch 34,
dadurch gekennzeichnet,
dass in Schritt d) eine in-situ-PCR-Methode zur nachträglichen Detektion von Vi-
ren durchgeführt wird.

15

36. Detektionsverfahren nach Anspruch 34 oder 35,
dadurch gekennzeichnet,
dass in Schritt d) nach dem Verfahren der real-time-PCR während einer Amplifika-
tion Reporter-Moleküle freigesetzt werden, die aufgrund ihrer Fluoreszenz mittels
20 eines Lichtdetektors, insbesondere eines Photomultipliers, detektiert werden.

37. Detektionsverfahren nach einem der Ansprüche 34 bis 36,
dadurch gekennzeichnet,
dass in Schritt b) eine in-situ-Hybrisierung in der Weise durchgeführt wird, dass
25 nach dem Fixieren der Bakterien (32) DNA-Sonden (12) zugegeben werden, an-
schließend nichtgebundene DNA-Sonden weggespült werden, gebundene DNA-
Sonden von der mRNA (14) gelöst und durch PCR amplifiziert werden.

38. Detektionsverfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche,

dadurch gekennzeichnet,
dass in Schritt a) die Probe durch ein mikromechanisches Filterelement (26)
und/oder durch eine Nitrocellulosemembran (74) geleitet wird, die als das oder
anstelle des oder zusätzlich zu dem mikromechanische(n) Filter(s) verwendet
5 wird.

39. Detektionsverfahren nach Anspruch 38,
dadurch gekennzeichnet,
dass in Schritt b) noch freie Stellen der Nitrocellulosemembran (74) mit Proteinen
10 (82) aufgefüllt werden.

40. Detektionsverfahren nach einem der Ansprüche 38 oder 39,
dadurch gekennzeichnet,
dass in Schritt b) die biologischen Mikropartikel (32, 76, 78), die in der Membran
15 (74) anhaften, mittels spezifischer Proteine, vorzugsweise Antikörper (80), oder
markierter Sonden (12), die durch Strahlung (56) detektierbar sind, markiert wer-
den.

41. Detektionsverfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche,
20 dadurch gekennzeichnet,
dass es vollautomatisch gesteuert durchgeführt wird.

42. Verwendung des Detektionsverfahrens nach einem der voranstehenden An-
sprüche als Ersatz für eine Kultivierungsmethode zur Bestimmung der Lebendzell-
25 zahl in einer zu messenden Probe.

FIG 1

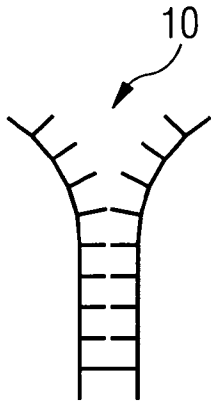


FIG 2

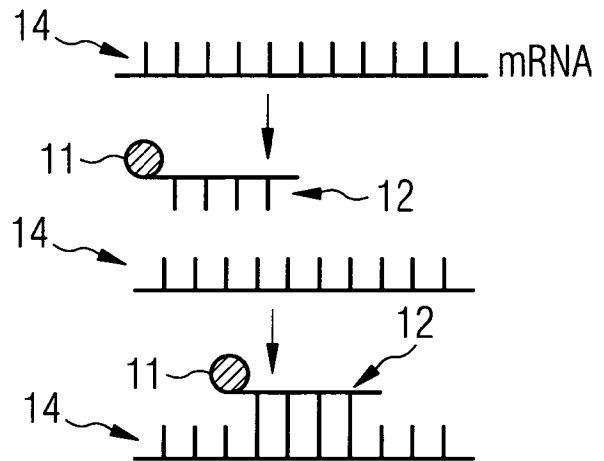


FIG 3

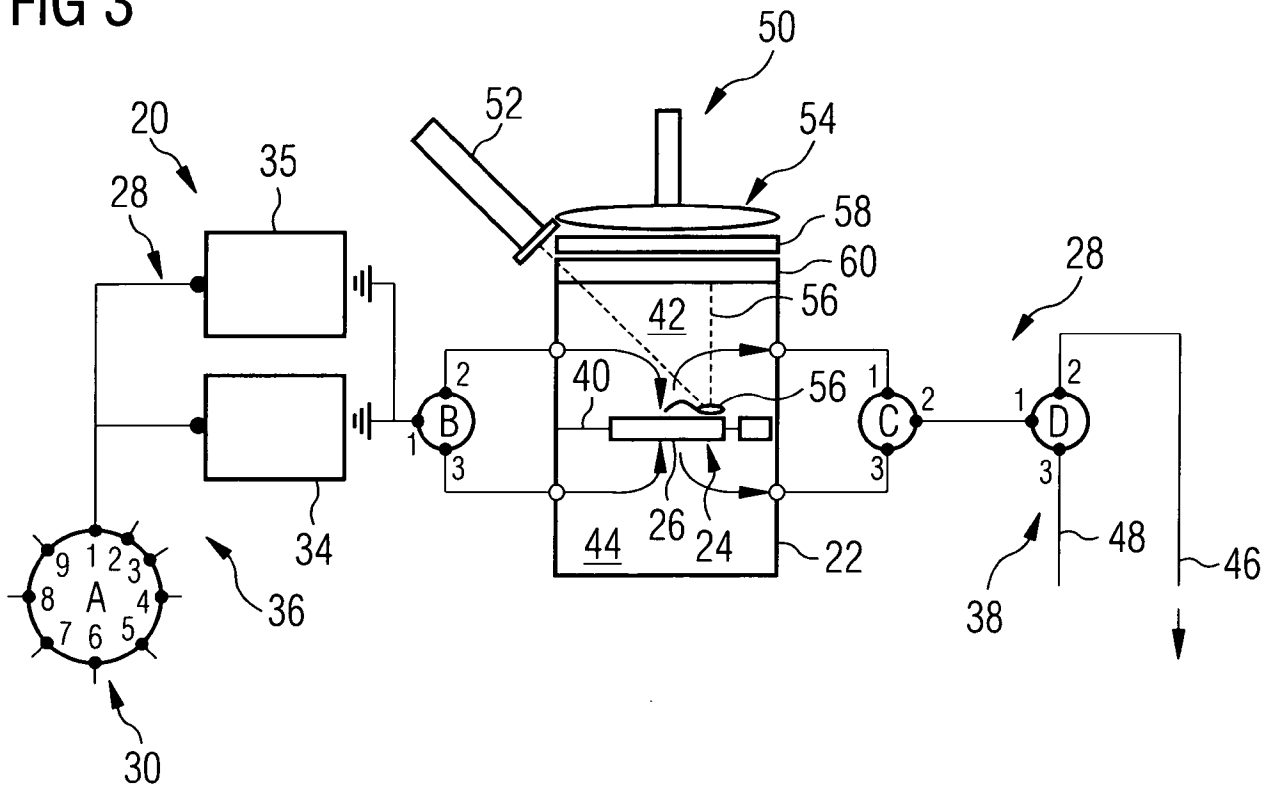


FIG 4

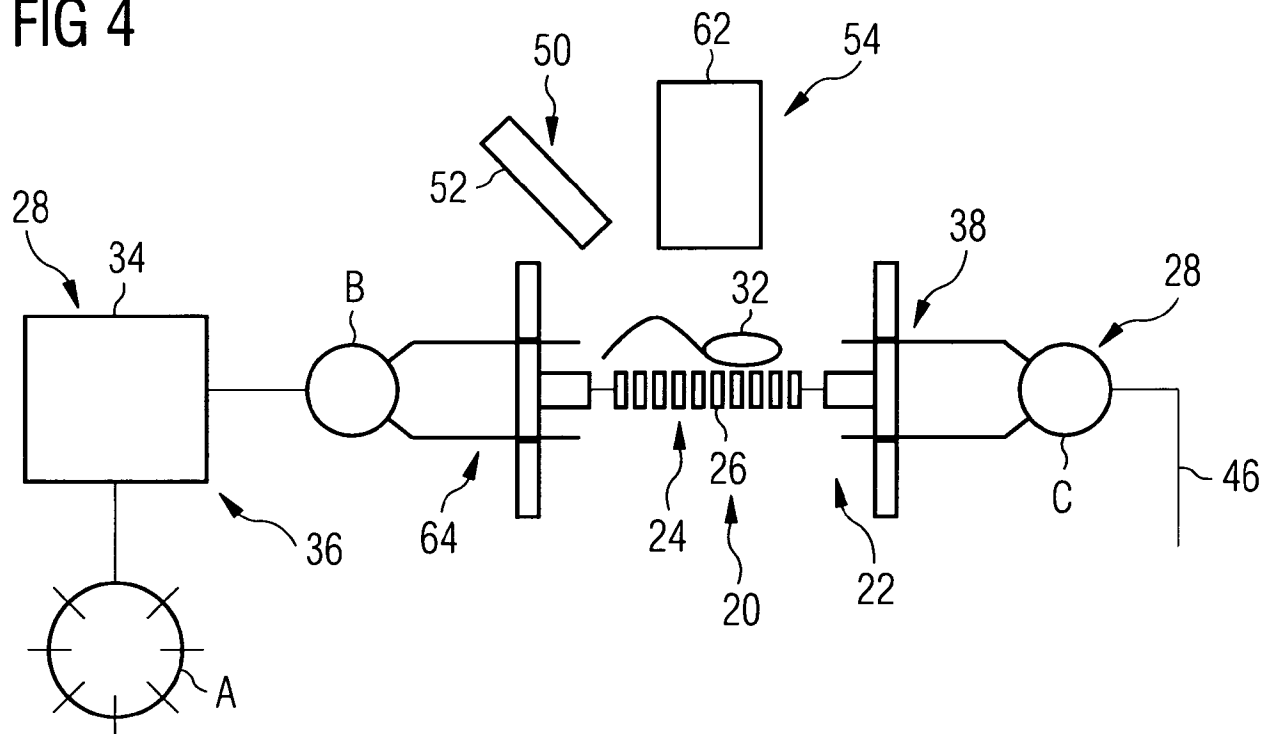


FIG 5

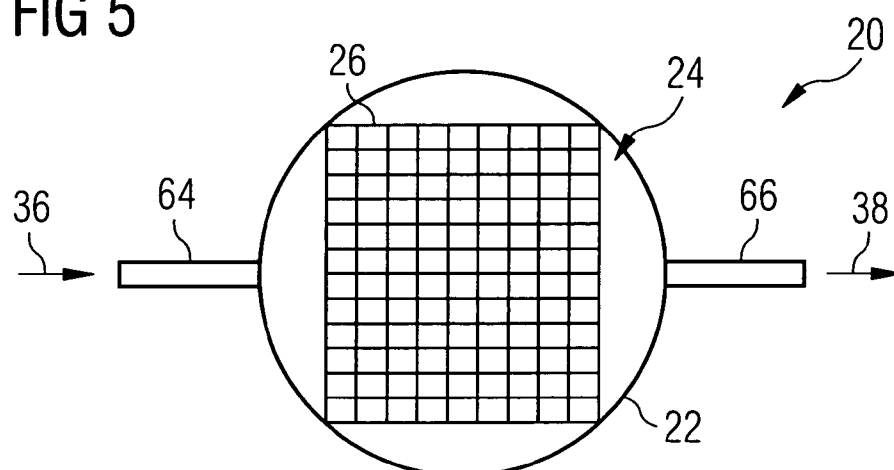


FIG 6

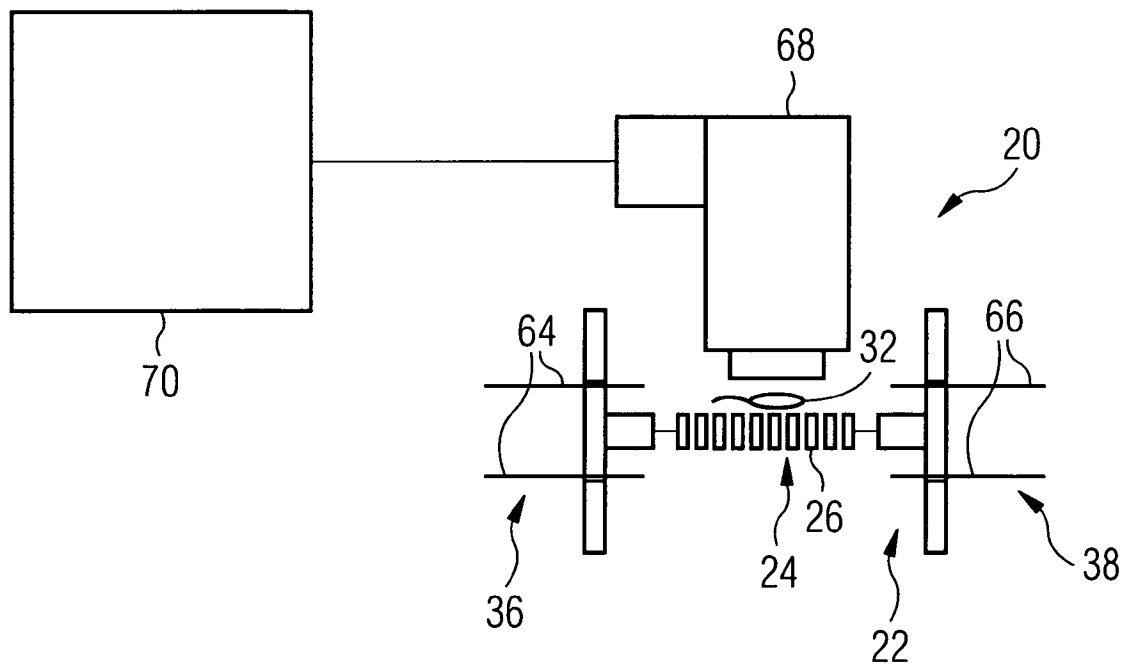


FIG 7

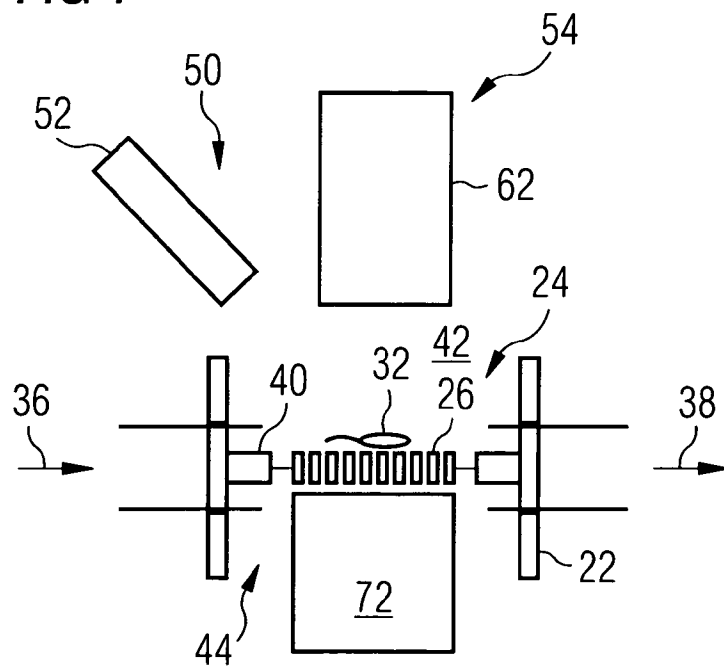


FIG 8

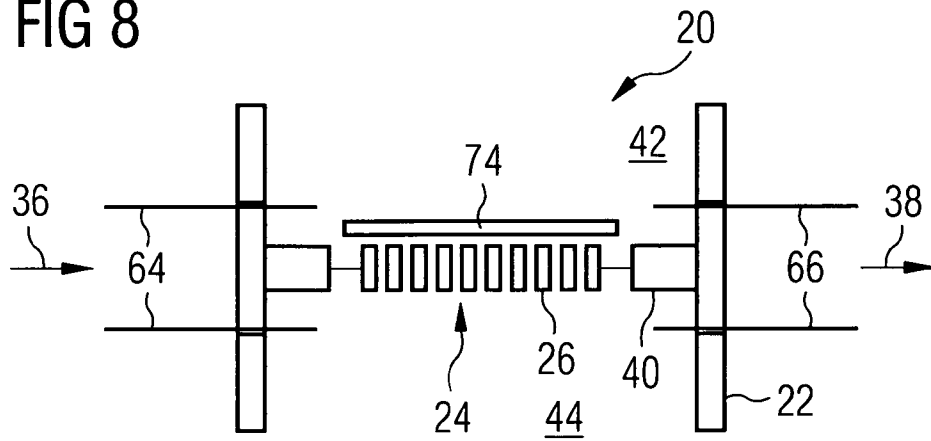


FIG 9

