

Online-Detektion von Bakterien

Identifizierung von Mikroorganismen im Reinraum

Bakterien in Minutenschnelle identifizieren: der Traum jedes Mikrobiologen. Denn die herkömmlichen Verfahren zur Identifizierung bakterieller Kontaminationen sind sehr zeitintensiv. Dabei spielt gerade die Zeit bei vielen Anwendungen der Bakterienidentifizierung eine entscheidende Rolle. Im Forschungsschwerpunkt Biophotonik, der vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) unterstützt wird, arbeiten Wissenschaftler aus universitärer und industrieller Forschung gemeinschaftlich an einer Technologie, die es in Zukunft ermöglichen soll, einzelne Bakterien innerhalb kürzester Zeit zu identifizieren.

Beispiel: Reinraumproduktion

In vielen reinen Produktionen, wie z.B. bei der Herstellung bzw. Verpackung von Medikamenten oder Lebensmitteln, ist eine ständige Kontrolle der Reinraumbedingungen notwendig. Treten partikuläre biologische Verunreinigungen beispielsweise in Form von Bakterien oder Pilzen auf, müssen die möglicherweise kontaminierten Produkte aus dem Verkehr gezogen werden. Das kann unter Umständen bedeuten, dass die Produktion des gesamten Zeitraums – von der Probennahme bis zur Erkennung einer Kontamination – vernichtet werden muss: ein extremer Kostenfaktor. Daher ist es besonders wichtig, möglichst schnelle Methoden zur Kontrolle der Reinnräume zur Verfügung zu haben, damit diese möglichst online erfolgen kann.

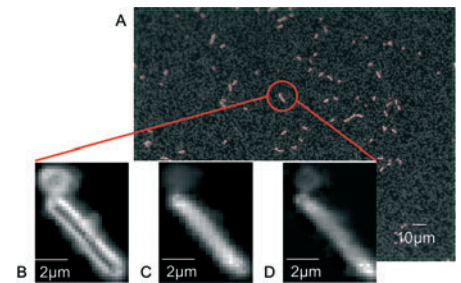


Abb. 1: Dunkelfeldaufnahmen (a, b) und Fluoreszenzaufnahmen (c, d) einer Probe unter Einsatz verschiedener Emissionsfilter. Ort, Größe und Form von einzelnen Bakterien können mittels Mustererkennungsverfahren definiert werden. Staub (rundes Partikel in b) und Bakterien (längliches Partikel in c-d) zeigen unterschiedliche Fluoreszenzeigenschaften.

Herkömmliche Verfahren zur Identifizierung von Mikroorganismen

Etablierte Nachweismethoden für Mikroorganismen sind gewöhnlich sehr zeitintensiv. Die Mikroorganismen müssen zunächst auf Nährmedien überführt und bebrütet werden. Nach dieser Voranreicherung erfolgen selektive Anreicherung, biochemisches Screening und serologische Bestätigung. Die Anzucht einer Kolonie von etwa 10^6 Mikroorganismen dauert in der Regel zwischen 18 und 24 Stunden; für die meisten medizinischen und industriellen Belange eine sehr lange Zeit. Es sind auch bereits Schnelltests auf dem Markt, die innerhalb von 2–3 Stunden ein Ergebnis liefern. Der Nachteil hieran ist, dass diese Tests sehr gezielt auf die Identifizierung einer bestimmten Bakterienart abgestimmt sind und dann lediglich als Ergebnis liefern, ob es sich bei dem Erreger um diese spezielle Art handelt oder nicht.

Neue Ansätze mit spektroskopischen Methoden

Es gibt bereits sehr gute Ansätze für neuartige schnelle Detektionsverfahren mittels optischer Methoden. Die Arbeitsgruppe Naumann vom Robert-Koch Institut in Berlin konnte sehr erfolgreich die IR-Spektroskopie zur Identifizierung von Mikroorganismen einsetzen. [1] Hierzu wird eine Mikrokolonie in definiertem Zustand eingesetzt, d.h. bei ei-

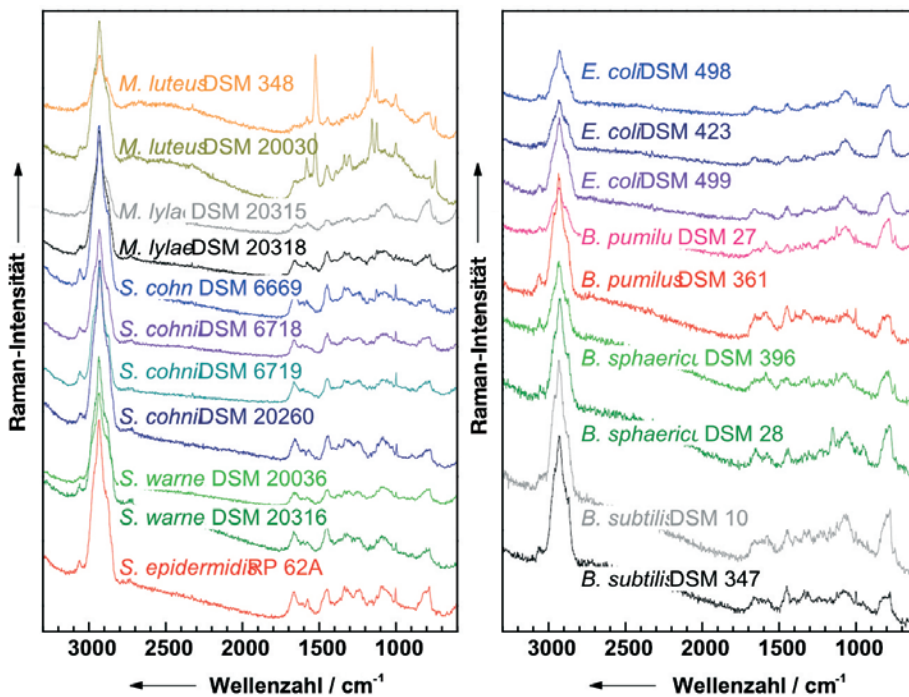


Abb. 2: Mikro-Raman-Spektren einzelner Bakterien verschiedener Stämme

ner bestimmten Temperatur, in einem bestimmten Medium kultiviert, etc. Der Vorteil beim Einsatz einer Mikrokolonie im Vergleich zu einer herkömmlichen Kolonie ist, dass deren Anzucht nur noch 6 Stunden dauert. Im Vergleich zur Anzucht von Reinkulturen ist das bereits ein extremer Zeitvorsprung. Die Probe wird vor der Untersuchung getrocknet, da sich wasserfreie Proben in der IR-Spektroskopie besser vermessen lassen. Für die Untersuchung von getrockneten Filmen von Mikroorganismen wurden auch die FT-Raman- und die UV-Resonanz-Raman-Spektroskopie eingesetzt. Der Arbeitsgruppe Puppels von der Universität in Twente (Niederlande) ist es zudem gelungen, Mikroorganismen durch konfokale NIR-Raman-Spektroskopie zu identifizieren. [2] Anhand dieser ersten Untersuchungen zur Identifizierung von Mikroorganismen mittels spektroskopischer Methoden erkennt man das hohe Potenzial dieser Techniken. Vor allem der Zeitfaktor, der von der Anzahl der zur Identifizierung notwendigen Mikroorganismen abhängt (Reinkultur benötigt etwa ein bis mehrere Tage im Vergleich zur Mikrokolonie, die nach etwa 6 Stunden verfügbar ist), kann mit spektroskopischen Techniken positiv beeinflusst werden. Ein weiterer Vorteil dieser Methoden ist außerdem, dass die Zellen, die für die Identifizierung verwendet werden, parallel den herkömmlichen mikrobiologischen Verfahren zugeführt werden können. Das Ziel der Erforschung und Weiterentwicklung spektroskopischer Methoden für die



Abb. 3: Hans Thiele von der Firma Kayser Threde mit dem Labordemonstrator aus dem Verbundprojekt OMIB auf dem Biophotonik-Symposium im März 2005 in Jena

Identifizierung von Mikroorganismen ist, eine Methode zu etablieren, bei der eine noch geringere Anzahl an Einzelzellen für eine eindeutige Identifizierung ausreichend ist. Somit könnte die Identifizierung noch schneller erfolgen.

Identifizierung einzelner Mikroorganismen

Unsere Arbeitsgruppe erforscht derzeit im Rahmen des Verbundprojekts OMIB (Online-Monitoring und Identifizierung von Bioaerosolen) die Grundlagen für eine schnelle Methode zur Identifizierung von Mikroorganismen ohne jegliche Kultivierung. Der gesamte Prozess soll hierbei in wenigen Minuten abgeschlos-

sen sein. Dank der sehr guten räumlichen Auflösung der spektroskopischen Methoden können bereits einzelne Bakterien, die sich rein äußerlich nicht voneinander unterscheiden lassen, nachgewiesen und identifiziert werden [3, 4]. Das Projekt ist in den Forschungsschwerpunkt Biophotonik eingegliedert, einem bundesweiten Schwerpunktprogramm, das vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) gefördert und vom VDI-Technologiezentrum koordiniert wird.

Optische Methoden werden sowohl zum Monitoring (Unterscheidung von biotischen und abiotischen Kontaminationen mittels Fluoreszenz, Fraunhofer IPA, Stuttgart) als auch zur Identifizierung (spektroskopische Methoden, Arbeitsgruppe Popp, Jena) eingesetzt. Dabei macht man sich zunächst die Eigenfluoreszenz biologischer Systeme zu Nutzen. Unter dem Fluoreszenzmikroskop werden sowohl Dunkelfeldaufnahmen als auch Fluoreszenzaufnahmen unter Anwendung verschiedener Fluoreszenzfilter vorgenommen, die mittels Mustererkennungsverfahren (Zusammenarbeit mit Institut für Informatik, Universität Freiburg) ausgewertet werden. So kann neben den Fluoreszenzeigenschaften, die eine Unterscheidung von biotischen (beispielsweise Bakterien) und abiotischen (beispielsweise Haarschuppen) Partikeln erlaubt auch Position, Größe und Form (Abb. 1) der Partikel detektiert werden. Diese Vorsortierung der Partikel in die beiden Klassen biotisch und abiotisch ist notwendig, um die Anzahl der zu identifizierenden Mikroorganismen möglichst gering zu halten. Im Gegensatz zu den biotischen Mikropartikeln sind die abiotischen Mikropartikel im Allgemeinen nicht besorgniserregend, kommen jedoch in reinen Produktionen sehr viele häufiger vor. Damit reduziert dieses Monitoring den späteren Identifizierungsaufwand erheblich.

Ist dann festgestellt, an welchen Stellen der Probe biologische Verunreinigungen (z.B. Mikroorganismen) vorliegen, kann man diese Stellen gezielt ansteuern und Raman-spektroskopisch untersuchen. Hierbei wird Laserlicht eingesetzt, welches dann auf die Zellen fokussiert wird. Das Laserlicht wird inelastisch an der Probe gestreut, d.h. man erhält ein charakteristisches Spektrum, welches Informationen über die chemische Zusammensetzung der Probe (in diesem Fall der Zelle) liefert (Abb. 2). Diese Informationen alleine würden jedoch noch nicht ausreichen, um die so erhaltenen Raman-Spektren einem bestimmten Bakterienstamm zuzuordnen.



Jürgen Popp



Marion Strehle

Ausgeklügelte statistische Auswerteverfahren helfen bei der Zuordnung

Um eine schnelle und sichere Identifizierung vornehmen zu können, ist der Aufbau einer umfangreichen Datenbank unerlässlich. Diese Datenbank muss zunächst mit Spektren bekannter Mikroorganismen trainiert werden. Von jeder Bakterienart werden mehrere Einzelspektren an unterschiedlichen Stellen verschiedener einzelner Zellen gesammelt. Die Auswahl der Keime für die Experimente konzentriert sich dabei zunächst auf Leitkeime nach deutschem und amerikanischem Arzneibuch und weitere für die pharmazeutische Reinraumproduktion relevante Mikroorganismen. Das Trainieren der Datenbank und die weitere Auswertung ist dann ein Fall für die Statistik. Die Computergestützte Auswertung erfolgt in Zusammenarbeit mit dem Institut für Informatik an der Universität Freiburg, wo statistische Methoden und Ähnlichkeitsrechnungen helfen, die erhaltenen Daten möglichst schnell einer bestimmten Verunreinigung zuzuordnen. Beispielsweise werden sog. Support-Vector-Maschinen hierfür eingesetzt. Derzeit liegen mehrere tausend Raman-Spektren von 50 Stämmen aus 28 Arten vor. Die Erkennungsrate (Anzahl richtig zugeordneter Spektren) liegt dabei zwischen 90 % und 100 %.

Zeitnahe Umsetzung der Forschungsergebnisse

Von gerätetechnischer Seite wird der OMIB-Verbund kompetent durch industrielle Partner unterstützt. In Kooperation mit den Firmen RapID aus Berlin und Kayser-Threde aus München sowie dem Institut für Physikalische Hochtechnologie (IPHT) Jena werden diese modernen Techniken derzeit in ein Funktionsmuster integriert (Abb. 3), das zunächst an der pharmazeutischen Prozessüberwachung erprobt wird und später auch in der Lebensmittelproduktion Einsatz finden

könnte. Die Schering AG Berlin ist als Anwender im Verbund mit der Überwachung von Testmessungen verantwortlich. Diese Messungen werden derzeit unter Normalbedingungen durchgeführt.

Zusammenfassung und Ausblick

Bakterien spielen in vielen Lebensbereichen eine wichtige Rolle. Vor allem wenn sie als Krankheits- oder Verderberreger auftreten, ist es wichtig, möglichst schnell Kontaminationen zu detektieren und die genaue Bakterienart zu identifizieren. Mit herkömmlichen Methoden vergehen ein bis mehrere Tage, bis ein Ergebnis vorliegt. Bei vielen Anwendungen könnte eine schnelle Identifizierung die teilweise erheblichen Schäden minimieren.

Im BMBF-geförderten Verbundprojekt OMIB wird derzeit an einer Methode geforscht, die eine Identifizierung von Bakterien online, d.h. innerhalb weniger Minuten ermöglichen soll. Ein Labormuster wird derzeit getestet. Die Anwendung ist dabei zunächst auf die pharmazeutische Reinraumproduktion fokussiert.

Danksagung

Für Unterstützung in wissenschaftlichen Fragen danken wir Dr. Petra Rösch und Dr. Renate Petry vom Institut für Physikalische Chemie der FSU Jena, Prof. Hans Burkhardt, Olaf Ronneberger und Klaus Peschke vom Lehrstuhl für Mustererkennung und Bildverarbeitung der Universität Freiburg, Dr. Andreas Schüle und Günther Schmauz vom Fraunhofer IPA Stuttgart, Dr. Rainer Riesenberger und Andreas Wuttig vom IPHT Jena, Dr. Markus Lankers von der Firma rap.ID GmbH Berlin, Dr. Stefan Hofer und Hans Thiele von der Firma Kayser Threde in München sowie Dr. Hans-Walter Motzkus von der Schering AG in Berlin. Dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) wird für die finanzielle Unterstützung des Forschungsschwerpunkts Biophotonik gedankt.

Referenzen

- [1] Ngo-Thi N. A. *et al.*: J. Mol. Struct. 661-662, 371-380 (2003)
- [2] Maquelin K. *et al.*: J. Microbial Meth. 51, 255-271 (2002)
- [3] Rösch P. *et al.*: Appl. Environm. Mikrobiol. 71, 1626 (2005)
- [4] Rösch P., Harz M., Schmitt M., Popp J.: J. Raman Spectrosc. 36, 377-379 (2005),

Prof. Dr. Jürgen Popp
Dr. Marion Strehle

Institut für Physikalische Chemie, Universität Jena
Helmholtzweg 4, 07743 Jena
marion.strehle@uni-jena.de