

Plasmonen-unterstützte Mikroskopie zur Detektion von Viren

Frank Weichert¹, Marcel Gaspar¹, Alexander Zybin², Evgeny L. Gurevich²,
Alexander Görtz¹, Constantin Timm³, Heinrich Müller¹, Peter Marwedel³

¹Lehrstuhl für Graphische Systeme, Technische Universität Dortmund

²ISAS - Institut for Analytical Science, Dortmund

³Lehrstuhl für Eingebettete Systeme, Technische Universität Dortmund

`frank.weichert@tu-dortmund.de`

Kurzfassung. In Anbetracht zunehmend epidemisch auftretender viraler Infektionen ist eine effiziente und ubiquitär verfügbare Methode zur sicheren Virusdetektion hoch relevant. Mit der Plasmonen-unterstützten Mikroskopie steht hierzu eine neuartige Untersuchungsmethode bereit, die aber große Anforderungen an die Bildverarbeitung zur Differenzierung der Viren innerhalb der Bilddaten stellt. In dieser Arbeit wird hierzu ein erster erfolgversprechender Ansatz vorgestellt. Über bildbasierte Mustererkennung und Zeitreihenanalysen in Kombination mit Klassifikationsverfahren konnte sowohl die Differenzierung von Nanoobjekten als auch die Detektion von Virus-ähnlichen Partikeln nachgewiesen werden.

1 Einleitung

Im Kontext medizinisch-biologischer Fragestellung nehmen Biosensoren eine zunehmend hohe Bedeutung ein. Insbesondere der Anstieg epidemisch auftretender viraler Infektionen verlangt eine schnelle und zuverlässige Virusdetektion [1]. Mit der neuartigen Plasmonen-unterstützten Mikroskopie von Nanoobjekten (kurz: PAMONO-Technik, engl. **Plasmon assisted Microscopy of Nano-Size Objects**) [2] steht eine Methode zur Verfügung, welche die damit verbundenen Anforderungen in besonderer Weise unterstützt. Da bei der PAMONO-Technik auch einzelne Viren (allg. Nanoobjekte) in einer Flüssigkeit, z.B. Blut, nachgewiesen werden können, verbessert sich die Nachweisstärke signifikant gegenüber alternativen Verfahren und ermöglicht zusätzlich den Nachweis von Viren bereits ab einer Konzentration von 10^3 V/ml in der Probe. Damit ist die Nachweisfähigkeit vergleichbar zu etablierten Methoden wie beispielsweise ELISA oder PCR, bietet aber grundsätzliche Vorteile, da sie weniger empfindlich gegenüber Störungen ist. Die Zielsetzung des Projektes ist die Entwicklung einer portablen Echtzeit-Analysehardware, die es ermöglicht, einen Nachweis von Viren auch außerhalb spezieller Labore zu automatisieren. Die Schwierigkeiten liegen in den zu untersuchenden großen Datenmengen, dem relativ hohen Rauschanteil und den örtlich recht kleinen Ausprägungen der gesuchten Strukturen. Um dieses Ziel zu erreichen, wird in der vorliegenden Arbeit ein kombinierter Ansatz aus Zeitreihenanalyse [3] und bildbasierter Mustererkennung innerhalb einer mehrstufigen Klassifikationskaskade genutzt [4].

2 Material und Methoden

Im Folgenden wird der Versuchsaufbau des PAMONO-Sensors einleitend aufgezeigt, das aktuell umgesetzte Konzept der Datenaufbereitung und Merkmalsextraktion beschrieben und schließlich auf die Klassifikationen der gesuchten Strukturen eingegangen.

2.1 Plasmonen-unterstützte Mikroskopie

Die PAMONO-Technik beruht konzeptionell auf einer Ausnutzung der optisch-elektronischen Phänomene im Zusammenhang mit Oberflächen-Plasmonen und orientiert sich vom Versuchsaufbau her an der konventionellen Oberflächen-Plasmonen-Resonanz-Technik. Das Prinzip des PAMONO-Sensors (Abb. 1(a)) ist die Erkennung von markierungsfreien biomolekularen Bindungsreaktionen an einer Sensoroberfläche. Zur Detektion von Bindungsereignissen wird der Effekt ausgenutzt, dass polarisiertes Licht (Laser), welches gebündelt über ein Prisma auf eine Metallschicht trifft, reflektiert wird, dieses zu einer Anregung der Oberflächen-Plasmonen innerhalb der Metallschicht führt und eine Virusbindung die reflektierte Intensität verändert. Der Versuchsaufbau beinhaltet eine 12-Bit CCD-Kamera mit einer Auflösung von einem Megapixel (Pixelgröße $6.45 \mu\text{m} \times 6.45 \mu\text{m}$). Für die Aufnahme wurde bei einer auf $\sim 0.2 \text{ m}^2$ eingeschränkten Sensorfläche eine Frame-Rate von 40 fps (frames per second) an verfügbaren Bildern bei einer Auflösung von 100×1000 Pixeln erzielt. Für weitere Details zum Versuchsaufbau sei auf die Literatur verwiesen [2].

2.2 Merkmalsextraktion

Der initiale Schritt zur Merkmalsextraktion ist die Entfernung von irrelevanten systematischen Intensitätsvariationen und die Kompensierung des inhärenten Rauschens durch einen kombinierten Ansatz, der eine Hintergrundbereinigung mit gleitendem Referenzbild und eine zeitliche Mittelung aufeinanderfolgender

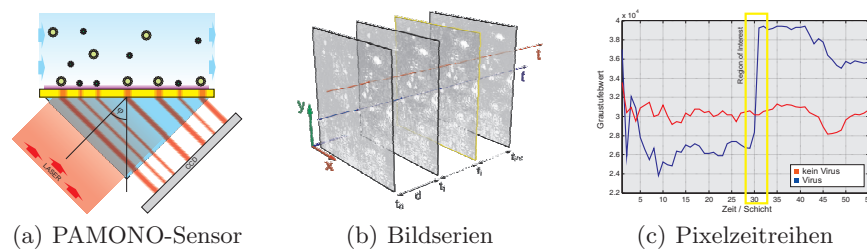


Abb. 1. Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. (a) Ausgehend vom PAMONO-Sensor wird (b) eine Bildfolge aufgenommen. (c) Vergleich des zeitlichen Intensitätsverlaufs an zwei beispielhaften Bildpositionen: die Anhaftung eines Virus an der Detektoroberfläche führt zu einem sprunghaften Anstieg.

Bilder beinhaltet. Die Abb. 1(b,c) vermitteln hierzu das Prinzip der Datenextraktion und Merkmalsgewinnung respektive das Konzept der Differenzierung zwischen Virus und Nicht-Virus. Aufgetragen über die Zeit resultiert bei dieser Vorgehensweise pro Pixel eine Signalkurve, dessen Charakteristik sich zwischen beiden Ausprägungen unterscheidet – signifikant ist der Sprung innerhalb der Viruskurve. Zum Zweck der Artefaktbehebung wird im Vorfeld der weitergehenden Analyse zunächst ein systematischer Intensitätstrend durch Subtraktion eines angepassten Polynoms entfernt. Desweiteren erfolgt zur signifikanten Reduktion von Fehlidentifikationen neben der zeitlichen auch die Ausnutzung der örtlichen Intensitätsänderung an einer Partikelposition. Dementsprechend werden durch nichtlineare Filterung der Bilder partikelähnliche Intensitätsverläufe mit zu geringer örtlicher Ausbreitung unterbunden.

2.3 Spektrale Zeitreihenanalyse

Zur Reduktion des Analyseaufwandes dient eine vorherige „schwache“ Partikelidentifizierung mittels einfachem Intensitätsschwellwert, sodass nur derart generierte Partikelkandidaten einer genaueren Analyse unterzogen werden. Im Hinblick auf die Klassifikation der Partikelkandidaten erfolgt eine Merkmalsextraktion über eine gewichtete Kombination aus Koeffizienten einer Zeit-Frequenz-Repräsentation und Differenzenquotienten mit zeitlich mittelndem Operatorfenster. Als Zeit-Frequenz-Repräsentation einer diskreten Funktion f dient dabei die S-Transformation $S_f(t_0, k)$ [5] gemäß

$$S_f(t_0, k) = \begin{cases} \frac{1}{N} \sum_{t=0}^{N-1} f(t) & \text{für } k = 0 \\ \sum_{m=0}^{N-1} F(m+k) \cdot e^{-\frac{2\pi^2 m^2}{k^2}} \cdot e^{i2\pi \frac{m}{N} t_0} & \text{für } k = 1, \dots, N-1 \end{cases} \quad (1)$$

mit $t_0 \in \{0, \dots, N-1\}$ und $k \in \{0, \dots, \lceil N/2 \rceil\}$. Dabei korreliert die S-Transformation die Zeitreihe mit einer Menge verschobener und frequenzmodulier-

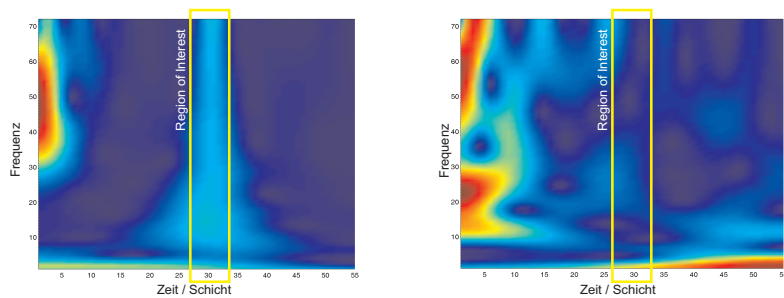


Abb. 2. Ausprägung von zwei Zeit-Frequenz-Darstellungen mittels der S-Transformation im Vergleich zwischen einer Virus- (links) und einer Nicht-Virus-Zeitreihe (rechts).

ter gaussförmiger Fensterfunktionen mit frequenzadaptiver Auflösung des Zeit-Frequenz-Bereiches. Abb. 2(a, b) zeigen die S-Transformationen der beiden Zeitreihen aus Abb. 1(c), welche mittels Gleichung 1 berechnet wurden. Die Abszisse zeigt die zeitliche Verschiebung t_0 des Analysefensters, und die Ordinate dessen zum Parameter k gehörige Frequenz ν_k in der Einheit Hz, wobei ν_k gegeben ist durch $\nu_k = k / (N \Delta T)$ mit $\Delta T = 1/40$ s.

2.4 Modellbasierte Klassifikation

Die extrahierten Partikelkandidaten werden modellbasiert gemäß ihrer Ähnlichkeit zum entsprechenden Klassenprototyp als Partikelpositionen bestätigt oder als partikelfreie Positionen verworfen. Bereiche aus benachbarten Partikelpixeln werden danach mittels Marching-Squares durch ein geschlossenes Polygon zusammengefasst. Ausgehend von Formmerkmalen findet abschließend eine Nachauswahl statt, um irrelevante Störungen mit partikelähnlichem zeitlichen Intensitätsverlauf anhand Eigenschaften ihrer örtlichen Ausdehnung zu verwerfen.

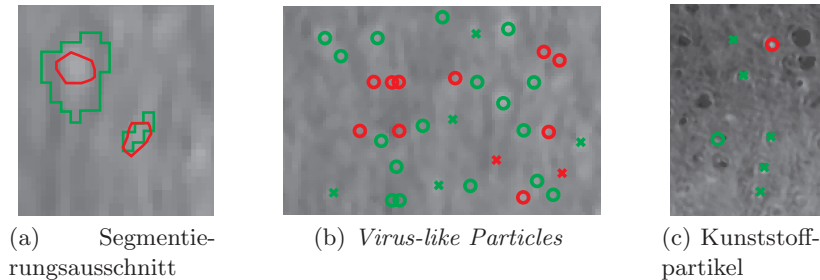
3 Ergebnisse

Zur Validierung der Klassifikation dienten Proben mit definierter Zusammensetzung – im Hinblick auf die Virus-Detektion ist die Verwendung von „*Virus-like Particles*“ (VLPs) zu nennen [6]. In Anlehnung an die ROC-Analyse wird die Nicht-/Fehl- bzw. korrekte Identifikation eines Partikels anhand von Überschneidungen der extrahierten Partikelpolygone mit manuell erstellten Referenzpolygone, welche nach Expertenwissen relevante Partikel markieren, ausgewertet (Abb. 4(a)). Überschneidungen extrahierter Polygone mit Referenzpolygone zählen dabei als True-Positive (TP), nicht geschnittene extrahierte Polygone als False-Positive (FP) und nicht geschnittene Referenzpolygone als False-Negative (FN). Der Ergebnistyp True-Negative (TN) ist auf diese Weise jedoch nicht eindeutig definierbar, da dies im Prinzip der Fall eines nicht erzeugten nicht geschnittenen Polygons wäre. Abb. 4(b) zeigt das Klassifikationsergebnis für die VLPs. In der quantitativen Analyse ergibt über drei ausgewertete Datensätze, bei einer Mittelung der Ergebnisse, mit 17 TPs und 3 FNs, eine TP-Rate von 0.85. Aufgrund des nicht definierbaren TN-Falles lässt sich keine FP-Rate definieren, aber eine durchschnittliche Anzahl von 9 FPs, welche noch als etwas zu hoch eingestuft wird. Zum Abgleich dieser Aussagen wurden zusätzlich Auswertungen mit Kunststoffpartikeln definierter Größe (80nm) durchgeführt, ebenfalls über drei Datensätze und Mittelung der Ergebnisse. Abb. 4(c) zeigt einen Ausschnitt der zugehörigen Segmentierung. In der quantitativen Analyse ergibt sich für die Kunststoffpartikel mit 17 TPs und 5 FNs eine TP-Rate von 0.77, bei durchschnittlich 3 FPs.

4 Diskussion

Ausgehend von der Motivation, ein sicheres und effizientes Verfahren zur Virusdetektion zur Verfügung zu stellen, wurde die PAMONO-Sensorik entwickelt.

Abb. 3. Partikelidentifikation: (a) Referenzpolygone sind rot (schwarz) und extrahier- te grün (grau). (b, c) Kreise markieren identifizierte Partikel, Kreuze Bereiche ohne erkennbare Partikel, grüne Markierungen korrekte und rote inkorrekte Klassifikationen der Pixelzugehörigkeit. Rote Kreise entsprechen Fehlalarmen, rote Kreuze unerkannten Partikeln, und grüne mittels Signalanalyse korrekt verworfenen Kandidaten.



Der neuartige Ansatz erlaubt insbesondere die explizite Detektion einzelner Viren auch in Proben mit geringer Konzentration. Da aber für eine ubiquitäre Nutzung dieser Technik eine automatische Auswertung unabdingbar ist, wurde innerhalb dieser Arbeit ein erster Schritt in diese Richtung unternommen. Durch die Kombination von Zeitreihenanalysen und merkmalsbasierter Klassifikation konnte aufgezeigt werden, dass eine Detektion von Nanopartikeln möglich ist. Insbesondere in Anbetracht unterschiedlicher Artefakte in den Datensätzen ist die quantitative Analyse positiv zu bewerten. Da zudem die Sensorik kontinuierlich weiter entwickelt wird, kann im Zuge der damit verbundenen Verbesserung der Bilddaten auch von einer deutlichen Reduktion der aktuell noch etwas hohen Anzahl von falsch positiven Strukturen ausgegangen werden. Neben der Verbesserung der Sensorik werden überwachte Lernverfahren zur automatisierten Parameteroptimierung und Generalisierung in den Ansatz integriert. Zudem wird an einer Modellierung der raum-zeitlichen Intensitätsvariation von Partikeln gearbeitet, um eine robustere und differenziertere Identifikation zu erlauben. Im Hinblick auf die angestrebte portable Analysehardware liegt ein übergeordnetes Ziel in der Überführung der Bildverarbeitungs- und Klassifikationsalgorithmen direkt auf Intelligente Kameras. Hierzu sind die Algorithmen weiter zu optimieren, damit eine Analyse derart großer Bild- und Datenmengen möglich ist.

Literaturverzeichnis

1. Mairhofer J, Roppert K, Ertl P. Microfluidic systems for pathogen sensing: A review. *Sensors*. 2009;9:4804–23.
2. Zybin A, inventor; Deutsche Patentanmeldung 10 2009 003 548.6. ; 2009.
3. Allen RL, Mills DW. *Signal Analysis*. Wiley-Interscience; 2004.
4. Niemann H. *Klassifikation von Mustern*. 2nd ed. Springer, Berlin; 2003.
5. Stockwell RG. *S-Transform analysis of gravity wave activity from a small scale network of airglow imagers [PhD Thesis]*. UWO; 1999. PhD Thesis.
6. Grgacic EV, Anderson DA. Virus-like particles: Passport to immune recognition. *Methods*. 2006;40(1):60–5.