



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 601 09 261 T2 2006.05.04**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 219 963 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **601 09 261.9**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **01 129 070.7**

(96) Europäischer Anmeldetag: **07.12.2001**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **03.07.2002**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **09.03.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **04.05.2006**

(51) Int Cl.⁸: **G01N 33/49 (2006.01)**

G01N 21/03 (2006.01)

G01N 15/10 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

752984 02.01.2001 US

(73) Patentinhaber:

**Becton, Dickinson and Co., Franklin Lakes, N.J.,
US**

(74) Vertreter:

**Patentanwälte von Kreisler, Selting, Werner et col.,
50667 Köln**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, CH, DE, FR, GB, IT, LI

(72) Erfinder:

Berndt, Klaus W., Timonioum, Maryland 21093, US

(54) Bezeichnung: **Vorrichtung zur Bestimmung des Volumens einer einzigen roten Blutzelle**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

GEBIET DER ERFINDUNG

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft das Gebiet der quantitativen Mikrospektroskopie und insbesondere eine Vorrichtung sowie ein Verfahren zum Messen des Volumens einzelner roter Blutkörperchen.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Die Bestimmung des Volumens einzelner roter Blutkörperchen und die auf der Grundlage dieser Messung erfolgende Berechnung des durchschnittlichen Zellvolumens (Mean Cell Volume; "MCV") und der Verteilungsbreite der roten Blutkörperchen (Red Cell Distribution Width; "RDW") ist von klinischem Interesse. Üblicherweise werden Systeme verwendet, die auf der Messung der elektrischen Impedanz (Coulter-Zähler) oder auf der Lichtstreuung (Durchflußzytometer) basieren (siehe z.B. J.B. Henry, "Clinical diagnosis and management by laboratory methods", W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1996, S. 548 ff., oder D.H. Tycko, M.H. Metz, E.A. Epstein, A. Grinbaum, "Flow-cytometric light scattering measurement of red blood cell volume and hemoglobin concentration", Applied Optics 24 (1985), 1355 – 1365). Impedanzähler sind komplexe und teure Instrumente, die eine sehr sorgfältige Einstellung und Steuerung der Instrument- und Probenparameter erfordern. Ein großer Nachteil bei Durchflußzytometern besteht darin, daß die Parameter der Lichtstreuung nicht nur vom Zellvolumen, sondern auch von der Zellform abhängig sind.

[0003] 1983 schlugen Gray, Hoffman und Hansen ein neues optisches Verfahren zur Bestimmung des Volumens von Zellen in einem Durchflußzytometer vor (M.L. Gray, R.A. Hoffman, W.P. Hansen, "A new method for cell volume measurement based on volume exclusion of a fluorescent dye", Cytometry 3 (1983), 428-432). Bei diesem Verfahren sind die Zellen in einem fluoreszierenden Farbstoff suspendiert, der die Zellmembran nicht durchdringen kann. Das Niveau der Fluoreszenz, die erzeugt wird, wenn ein dünner Strom der Zellsuspension durch einen fokussierten Laserstrahl erregt wird, bleibt konstant, bis eine Zelle in dem beleuchteten Bereich ankommt, wodurch eine Verringerung der Fluoreszenzintensität verursacht wird, die direkt proportional zum Volumen der Zelle ist. In einem Durchflußzytometer passiert eine einzelne Zelle den laserbeleuchteten Fleck innerhalb von ungefähr 10. Aufgrund dieses kurzen Datenerfassungszeitintervalls muß die elektronische Erkennungsbandbreite relativ groß sein, was ein schlechtes Signal-Rausch-Verhältnis und eine geringe Präzision bei der Volumenbestimmung zur Folge hat.

[0004] Die verfügbare Datenerfassungszeit kann

durch Suspendieren der Zellen in einer stationären Probe und Anwenden digitaler Abbildungsfluoreszenzmikroskopie bedeutend verlängert werden (siehe P.L. Becker, F.S. Fay, "Cell-volume measurement using the digital imaging fluorescence microscope", Biophysical Journal 49 (1986), A465). Bei dem Digitalfluoreszenzmikroskopieansatz ist ein Kalibrierungsvorgang zur Bestimmung des Zellvolumens erforderlich. Recktenwald und Mitarbeiter haben ein Verfahren eingeführt, bei dem die Kalibrierung mittels optischer transparenter und nicht-fluoreszierender Mikrosphären, die zusammen mit den Zellen suspendiert sind, durchgeführt wird (D. Recktenwald, J. Phi-Wilson, B. Verwer, "Fluorescence quantitation using digital microscopy", Journal Physical Chemistry 97 (1993), 2868 – 2870). Das Volumen der einzelnen Sphären wird durch Messen ihrer Projektionsfläche unter dem Mikroskop und Transformieren dieser Zahl in ein Volumen bestimmt, wobei eine ideale sphärische Form angenommen wird. Die Abnahme der Fluoreszenzintensität infolge des Volumens der Sphären, das vom Aussenden von Fluoreszenz ausgeschlossen ist, wird als der erforderliche Kalibrierungsparameter verwendet. Der Vorteil dieses Ansatzes besteht darin, daß die kalibrierenden Partikel sich in der Probe selbst befinden. Mit anderen Worten, eine Kalibrierung wird genau an diesem Probenbehälter durchgeführt und es ist keine gesonderte Kalibrierungsprobe erforderlich.

[0005] Die Verwendung von Kalibrierungssphären innerhalb einer Zellsuspension ist nicht ohne Probleme. Zunächst stellt das Einbringen der Sphären einen zusätzlichen Schritt im Arbeitsablauf dar. Bei für hohen Durchsatz ausgelegten Systemen würde dieser zusätzliche Schritt einen Nachteil darstellen. Zweitens beobachteten Recktenwald und seine Kollegen eine Tendenz der Moleküle des fluoreszenten Farbstoffs, sich auf der Oberfläche der Sphäre niederzulassen, wodurch Fehler verursacht werden. Drittens treten an den Rändern der Sphären auf der Brechung basierende Artefakte bei der gemessenen Fluoreszenzintensität auf, falls der optische Brechungsindex der Sphären nicht gut auf den Index der Flüssigkeit abgestimmt ist. Und schließlich kann die Verwendung von Mikrosphären ein Problem darstellen, falls z.B. eine dünne Probenstärke in der Ordnung von wenigen Mikrometern oder weniger benötigt wird.

[0006] EP 1 150 114 A1, die gemäß Artikel 54(3) EPÜ als Stand der Technik gilt, beschreibt ein Verfahren zur Bestimmung des Volumens von in einer Flüssigkeit suspendierten Partikeln. Die Flüssigkeit ist in einer optischen Küvette enthalten, die ein Eintrittsfenster und ein Austrittsfenster aufweist. Durch die Küvette wird Licht einer Wellenlänge gesendet, die von dem hinzugefügten Farbstoff in hohem Maße, von den suspendierten Partikeln jedoch nur schwach absorbiert wird. Um das Volumen der suspendierten

Partikel zu bestimmen, wird die Küvette vor einem abbildenden Photodetektor angeordnet und die Lichtintensitäten werden gemessen. Anstatt den Gesamtabstand zwischen den beiden Küvettenfenstern zu kennen, ist es auch möglich, auf dieser Strecke einen definierten Sprung vorzusehen. Dies erfolgt durch Aufkleben eines kleinen flachen Glasstücks auf die Küvettenfenster.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0007] Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, eine Vorrichtung zum Messen des Volumens einzelner roter Blutkörperchen oder anderer Partikel, die in Flüssigkeiten suspendiert sind, zu schaffen.

[0008] Die Vorrichtung der vorliegenden Erfindung ist durch Anspruch 1 definiert. Demnach ist die Einrichtung zum Verändern der Dicke des Behälters um einen bekannten Betrag eine Einrichtung zum Drücken auf den Behälter von außen.

[0009] Die Vorrichtung der vorliegenden Erfindung kann verwendet werden durch Einbringen einer suspendierte rote Blutkörperchen enthaltenden Flüssigkeitsprobe in eine optische Küvette mit einem Eingangsfenster und einem Ausgangsfenster, durch Hinzufügen und gleichmäßiges Verteilen eines absorbierenden Farbstoffs in die Flüssigkeit, der nicht in die roten Blutkörperchen eindringt und imstande ist, Licht bei Wellenlängen zu absorbieren, die von den roten Blutkörperchen nur schwach absorbiert werden, durch Beleuchten der Probe durch das Eingangsfenster bei einer Wellenlänge, die von dem Farbstoff absorbiert, von den roten Blutkörperchen jedoch nur schwach absorbiert wird, durch Messen der Intensität des transmittierten Lichts, das durch das Ausgangsfenster wieder austritt, in einem Bereich, der keine roten Blutkörperchen enthält, durch Verändern der Küvettendicke in diesem Bereich um einen genau festgelegten Betrag und Messen der Intensität der wieder austretenden Fluoreszenz in demselben Bereich, durch Messen der Intensität des wieder austretenden Lichts in einem Bereich, in dem sich ein rotes Blutkörperchen befindet, durch Messen der Intensität des wieder austretenden Lichts in einem Bereich nahe demselben roten Blutkörperchen und durch Berechnen des Volumens des roten Blutkörperchens auf der Basis dieser Lichtintensitätswerte und der bekannten Veränderung bei der Küvettendicke.

KURZBESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0010] [Fig. 1](#) stellt einen Meßaufbau mit einer optischen Küvette dar, die ein starres Eingangsfenster und ein flexibles Ausgangsfenster aufweist und eine suspendierte rote Blutkörperchen enthaltende Flüssigkeitsprobe enthält.

[0011] [Fig. 2](#) stellt einen vollständigen Aufbau dar, der einen Probenbehälter, einen XYZ-Objektisch, ein Durchstrahlungsmikroskop, eine CCD-Kamera und einen Computer aufweist.

[0012] [Fig. 3](#) zeigt schematisch eine optische Küvette mit einem ein schwach absorbierendes rotes Blutkörperchen enthaltenden Bereich und einem anderen, keine Zellen enthaltenden Bereich. Die Pfeile stellen den die Probe durchquerenden Photonenstrom dar, wobei die Abnahme der Breite als Anzeichen der abnehmenden Lichtintensität infolge der Absorption zu verstehen ist.

[0013] [Fig. 4](#) stellt den Kalibrierungsvorgang dar, bei dem die Küvettendicke in einem keine roten Blutkörperchen enthaltenden Bereich um einen genau festgelegten Betrag h verändert ist und die Intensitäten I_1 und I_2 des wieder austretenden Lichts vor und nach der Veränderung der Dicke gemessen werden. In diesem Fall ist die Küvettendicke verringert worden.

[0014] [Fig. 5](#) stellt den Meßvorgang dar, bei dem die Intensitäten I_4 und I_3 des wieder austretenden Lichts in einem Bereich, in dem sich ein rotes Blutkörperchen befindet, und in einem Bereich in der Nähe genau dieser Zelle gemessen werden. In [Fig. 5](#) sei eine zylindrische Zelle mit einer Höhe h_{RBC} angenommen.

[0015] [Fig. 6](#) zeigt eine berechnete Kurve der Intensität des wieder austretenden Lichts in willkürlichen Einheiten, wenn eine Küvettendicke von ungefähr 18 μm in zehn Stufen von jeweils 0,2 μm auf ungefähr 20 μm vergrößert wird. Bei diesem Beispiel sei angenommen, daß TO-PRO-3 in einer Konzentration $c = 1\text{mM/L}$ als absorbierender Farbstoff verwendet wird, der einen Absorptionskoeffizienten $a = 1,444 \cdot 10^5\text{ L/M cm}$ bei einer Wellenlänge von 640 nm hat.

AUSFÜHRLICHE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0016] Gemäß dem Verfahren und der Vorrichtung der vorliegenden Erfindung wird eine Flüssigkeitsprobe, die suspendierte rote Blutkörperchen enthält, in eine optischen Küvette mit einem Eingangsfenster und einem Ausgangsfenster eingebracht. Vorzugsweise ist die Küvette relativ dünn und eignet sich zum Positionieren auf dem Probentisch eines Durchstrahlungsmikroskops. Die Küvette kann beispielsweise durch Anordnen eines flexiblen #1-Abdeckstreifens von einer Größe von 24 mm \times 50 mm auf Abstandhaltern, die sich auf einem gewöhnlichen Mikroskop-Objektträger von einer Größe von 25 mm \times 75 mm befinden, aufgebaut werden. Die bevorzugte Höhe der Abstandhalter beträgt ungefähr 200 μm . Durch Drücken auf den flexiblen Abdeckstreifen können Dickenwerte im Mittelbereich der Küvette zwi-

schen weniger als 1 μm und 200 μm erzielt werden. Eine optische Küvette ist ein Behälter, der eine Flüssigkeitsprobe in seinem Innenraum halten kann und mindestens ein transparentes Eingangsfenster und ein transparentes Ausgangsfenster, üblicherweise auf gegenüberliegenden Seiten, aufweist, so daß eine Transmissionsmessung möglich ist. Es wäre auch noch im Sinne der Erfindung, einen Behälter mit einem transparenten Fenster auf einer Seite und einem Spiegel auf der anderen Seite zu verwenden. In diesem Falle gelangte das Licht durch das eine transparente Fenster in den Behälter, kreuzte die Flüssigkeitsprobe zweimal und verließ den Behälter durch dasselbe Fenster. Das eine Fenster würde sowohl als Eintritts- als auch als Austrittsfenster fungieren. Die Erfindung ist nicht auf Behälter für mikroskopische Analysen beschränkt, sondern läßt sich auch bei größeren Behältern anwenden, die bei anderen optischen Systemen, die keine Mikroskope sind, abgefragt werden.

[0017] Der Flüssigkeitsprobe wird ein absorbierender Farbstoff hinzugefügt, der gleichmäßig darin verteilt wird. Der Farbstoff ist so ausgewählt, daß er nicht in die roten Blutkörperchen eindringt. Außerdem sollte er innerhalb eines Spektralbereichs, in dem die Absorption innerhalb der roten Blutkörperchen nur schwach ist, Erregungslicht absorbieren. Da Hämoglobin in roten Blutkörperchen der dominierende Absorber ist, muß die Beleuchtungswellenlänge länger als 600 nm sein. Eine gute Möglichkeit für einen Farbstoff ist TO-PRO-3 (vertrieben beispielsweise von Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon), der innerhalb eines Wellenlängenbereichs um 640 nm beleuchtet werden kann, wobei er einen Absorptionskoeffizienten von $1,14 \cdot 10^5$ L/Mcm hat. Ein weiterer möglicher Farbstoff wäre TO-PRO-5 (vertrieben von Molecular Probes, Inc.), der ebenfalls nicht in die roten Blutkörperchen eindringt, um 750 nm beleuchtet werden kann und einen Absorptionskoeffizienten von $1,21 \cdot 10^5$ L/Mcm hat.

[0018] Für den Durchschnittsfachmann ist ersichtlich, daß die Erfindung nicht auf die zwei oben erwähnten Farbstoffe begrenzt ist. Es stehen viele andere Farbstoffe zur Verfügung, die die spektralen Bedingungen für Messungen an roten Blutkörperchen erfüllen, und es sind noch mehr Farbstoffe erhältlich, die die spektralen Bedingungen für andere Partikel erfüllen. Es läge natürlich auch im Rahmen der Erfindung, der Flüssigkeitsprobe den absorbierenden Farbstoff vor dem Einbringen der Probe in den Behälter zuzufügen und ihn gleichmäßig darin zu verteilen.

[0019] [Fig. 1](#) stellt einen Meßaufbau mit einer optischen Küvette (20) dar, die ein starres Eingangsfenster (1) und ein flexibles Ausgangsfenster (3) aufweist und eine suspendierte rote Blutkörperchen umfassende Flüssigkeitsprobe (4) enthält. Die Küvette ist unter Verwendung eines gewöhnlichen Mikros-

kop-Objektträgers (1), der Abstandhalter (2, 2') zum Halten eines flexiblen Abdeckstreifens (3) trägt, aufgebaut. Die Suspension der roten Blutkörperchen in einer Flüssigkeit, wie beispielsweise Blutplasma (4), ist zwischen dem Objektträger (1) und dem Abdeckstreifen (3) enthalten. Die optische Küvette ist auf einem XYZ-Objekttisch (5) eines gewöhnlichen Durchstrahlungsmikroskops (7) mit austauschbaren Objektivlinsen (8, 9 und 10) und einer Probenbeleuchtungsquelle (6) positioniert. Wie in [Fig. 2](#) gezeigt, ist das Mikroskop (7) mit einer CCD-Kamera (21) ausgestattet, die mit einem Computer (22) zur Speicherung von Daten und Durchführung von Bildbearbeitungsabläufen verbunden ist. Der Computer (22) ist ebenfalls mit dem XYZ-Objekttisch (5) verbunden, um die Küvette (20) in der erforderlichen Weise zu bewegen.

[0020] [Fig. 3](#) zeigt schematisch eine optische Küvette mit einem ein schwach absorbierendes rotes Blutkörperchen enthaltenden Bereich und einem keine Zellen enthaltenden anderen Bereich. Die Pfeile stellen den die Probe durchquerenden Photonenstrom dar, wobei die Abnahme der Breite als Anzeichen der abnehmenden Lichtintensität infolge der Absorption zu verstehen ist. Wie in [Fig. 3](#) angezeigt, ist die optische Absorption innerhalb eines roten Blutkörperchens so schwach, daß keine Abnahme der Intensität erfolgt.

[0021] Im Betrieb wird, wie in den [Fig. 1](#) und [Fig. 2](#) gezeigt, die Küvette (20) mittels des Objekttisches (5) nach oben bewegt, bis das flexible Fenster (3) in physischen Kontakt mit einem feststehenden Kolben (11) kommt, der derart auf einer Objektivlinse (10) befestigt ist, daß die Fokalebene des Mikroskops (7) innerhalb der Flüssigkeitsprobe (4) liegt, falls das flexible Fenster (3) den Kolben (11) berührt. Falls erforderlich, wird die Küvette (20) in X- und Y-Richtung bewegt, bis ein keine roten Blutkörperchen enthaltender Probenbereich ins Blickfeld gelangt. Falls die Probe Vollblut ist, ist die Verwendung einer Küvettenstärke im Bereich von 2 μm bis 30 μm angemessen, damit Bereiche, die keine roten Blutkörperchen enthalten, leicht verfügbar sind. Für verdünnte Blutproben können dickere Küvetten verwendet werden.

[0022] Sobald ein keine roten Blutkörperchen enthaltender Bereich gefunden worden ist, wird die Probe mit Licht einer geeigneten Wellenlänge mittels einer Beleuchtungsquelle (6) beleuchtet und die wieder austretende Intensität I_1 des transmittierten Lichts in diesem Bereich wird mittels einer CCD-Kamera (21) gemessen und das Ergebnis im Computer (22) gespeichert. Dies ist in [Fig. 4](#) dargestellt. In einem nächsten Schritt wird die Küvette (20) mittels eines Objekttisches (5) um eine geringe, aber genau bekannte Strecke h weiter nach oben bewegt. Das Bewegen der Küvette (20) nach oben gegen den feststehenden Kolben (11) führt zu einer Verringerung

der Länge des optischen Weges innerhalb der Küvette um einen Betrag, der gleich h ist. Wenn die Küvette (20) bewegt worden ist, wird eine neue Intensität I_2 des wieder austretenden Lichts in demselben Bereich gemessen und das Ergebnis wird im Computer (22) gespeichert. Die neue Lichtintensität I_2 hat einen höheren Wert als die erste Intensität I_1 , weil eine geringere Probendicke eine geringere Lichtabsorption innerhalb der Probe zur Folge hat.

[0023] Die beiden Intensitätswerte I_1 und I_2 des wieder austretenden Lichts können zusammen mit der Veränderung der Länge des optischen Wegs, h , zum Kalibrieren des Aufbaus durch Berechnen eines Verhältnisses "Veränderung bei der Intensität des wieder austretenden Lichts/Veränderung bei der Probendicke" verwendet werden. Mit Bezug auf Fig. 4 kann diese Kalibrierung wie folgt erläutert werden.

[0024] Wenn man annimmt, daß die Flüssigkeitsprobe gleichmäßig von dem Erregungslicht bestrahlt wird, dann wird die erste Intensität I_1 des wieder austretenden Lichts angegeben durch

$$(1) \quad I_1 = I_0 * 10^{-ac * h_1}$$

wobei I_0 die Beleuchtungsintensität, a der Absorptionskoeffizient des lichtabsorbierenden Farbstoffs, c die Konzentration des Farbstoffs ist. Die Größe h_1 ist die Länge des optischen Weges (oder Dicke) der Küvette (20) in dem gemessenen Bereich.

[0025] Die Lichtintensität I_2 , die nach Veränderung der Küvettdicke um einen Betrag h gemessen wird, wird angegeben durch

$$(2) \quad I_2 = I_0 * 10^{-ac * (h_1 - \Delta h)}$$

[0026] Durch Teilung der Gleichung (2) durch Gleichung (1) und durch Logarithmieren erhält man einen Ausdruck für das Produkt $a * c$, der die Kalibrierungsgröße darstellt:

$$(3) \quad a * c = \frac{\lg\left(\frac{I_2}{I_1}\right)}{\Delta h}$$

[0027] Gleichung (3) gibt an, daß es nicht notwendig ist, die absolute Küvettdicke h_1 zu kennen oder die Beleuchtungsintensität I_0 zu messen, da diese beiden Größen sich aufheben.

[0028] Nach Durchführung einer Kalibrierung in der oben angeführten Weise gemäß dem Verfahren der vorliegenden Erfindung wird das Volumen eines einzelnen roten Blutkörperchens wie folgt bestimmt: In einem ersten Schritt wird die Intensität I_4 des wieder austretenden Lichts in einem Bereich A_{RBC} gemessen, in dem sich ein rotes Blutkörperchen befindet. Für den Augenblick sei angenommen, daß das rote Blutkörperchen zylindrisch mit einer Fläche A_{RBC}

und einer Höhe h_{RBC} ist (siehe Fig. 5). Ferner sei eine Höhe h_2 der Flüssigkeitsprobe angenommen, die nicht gleich h_1 sein muß, und eine Beleuchtungsintensität I'_0 angenommen, die nicht gleich I_0 sein muß. Unter diesen Umständen erhält man

$$(4) \quad I_4 = I'_0 * 10^{-ac * (h_2 - h_{RBC})}$$

für die Intensität des wieder austretenden Lichts.

[0029] In einem zweiten Schritt wird die Intensität I_3 des wieder austretenden Lichts in einem Bereich derselben Größe, A_{RBC} , nahe genau diesem roten Blutkörperchen, gemessen. Unter denselben Bedingungen wie bei I_4 erhält man

$$(5) \quad I_3 = I'_0 * 10^{-ac * h_2}$$

[0030] Durch Dividieren von Gleichung (4) durch Gleichung (5) erhält man

$$(6) \quad \lg\left(\frac{I_4}{I_3}\right) = ac * h_{RBC}$$

$$(7) \quad h_{RBC} = \frac{\lg\left(\frac{I_4}{I_3}\right)}{a * c}$$

[0031] Bei einer zylindrischen Zelle mit einer Fläche A_{RBC} kann das Zellvolumen V_{RBC} durch Multiplizieren der Zellenfläche mit der Zellenhöhe, wie in Gleichung (7) angegeben, berechnet werden, woraus sich

$$(8) \quad V_{RBC} = A_{RBC} * h_{RBC} = A_{RBC} * \frac{\lg\left(\frac{I_4}{I_3}\right)}{a * c}$$

oder, mit Gleichung (3) für das Produkt $a * c$, in

$$(9) \quad V_{RBC} = A_{RBC} * \Delta h * \frac{\lg\left(\frac{I_4}{I_3}\right)}{\lg\left(\frac{I_2}{I_1}\right)}$$

ergibt.

[0032] Gleichung (9) zeigt, daß das Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung auf Differenzmessungen hinsichtlich der Dicke der Küvette sowie auf ratiometrischen Messungen hinsichtlich der Intensitäten des wieder austretenden Lichts basiert. Mit anderen Worten, die absolute Dicke der Küvette muß nicht bekannt sein. Darüber hinaus besteht keine Notwendigkeit einer Kenntnis der Erregungsintensität, die in die Küvette injiziert wird.

[0033] Gleichung (9) zeigt, daß eine Langzeitabweichung bei den Instrumentenparametern aufgehoben

wird. Dies ergibt sich daraus, daß das Volumen eines roten Blutkörperchens, V_{RBC} , aus einem Verhältnis von Photoströmen berechnet wird. Mit anderen Worten, falls der Kalibrierungsvorgang in zeitlicher Nähe zur Messung durchgeführt wird, ist das Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung sehr widerstandsfähig. Diese Bedingung wird immer erfüllt, da der Kalibrierungsvorgang an derselben Probe durchgeführt wird, die auch gemessen wird.

[0034] Bislang wurde angenommen, daß das rote Blutkörperchen zylindrisch ist. Es kann bewiesen werden, daß die Form des roten Blutkörperchens unregelmäßig sein kann und daß die Z-Position der Zelle innerhalb der Küvette keine Auswirkung auf das berechnete Zellvolumen hat. Das Volumen einer Zelle, V_{RBC} , hängt mit der räumlich abhängigen Zellhöhe h_{RBC} zusammen, und zwar über die Gleichung

$$V_{RBC} = \int h_{RBC}(\xi, \eta) d\xi, d\eta \quad (10)$$

[0035] In Gleichung (10) sind die Größen ξ und η die unabhängigen X- und Y-Variablen innerhalb des roten Blutkörperchens. Die erforderliche Integration läßt sich durch Addieren der Pixelintensitäten $I_4(\xi, \eta)$ innerhalb des Bereichs A^*_{RBC} , der von dem roten Blutkörperchen besetzt wird, bei

$$(11) \quad V_{RBC} = (1/ac) * \int \lg\left(\frac{I_4(\xi, \eta)}{I_3}\right) d\xi, d\eta$$

dem lichtempfindlichen Ziel der CCD-Kamera, durchführen. Die Kombination der Gleichungen (7) und (10) ergibt den endgültigen Ausdruck für das Volumen der roten Blutkörperchen, wie es gemäß der vorliegenden Erfindung bestimmt wird.

[0036] Der in Gleichung (11) gezeigte Integrationsvorgang muß nicht genau über dem von einem roten Blutkörperchen besetzten Bereich durchgeführt werden. Stattdessen könnte er über einem etwas größeren Bereich, der die Zelle enthält, durchgeführt werden. Außerhalb der Zelle ist $I_4(\xi, \eta)$ identisch mit I_3 ; daher ist $\lg[I_4(\xi, \eta)/I_3] = 0$. Mit anderen Worten, das Ausweiten der Integration über einen größeren Bereich über den Umfang der Zelle hinaus hätte keine zusätzlichen Beiträge zu dem berechneten Zellvolumen zur Folge. Dieser Aspekt der Erfindung ermöglicht die Verwendung einfacher Einheitsgrößen- und -formintegrationsbereiche für jede einzelne untersuchte Zelle. Folglich können die erforderlichen Berechnungen innerhalb kürzerer Zeit ausgeführt werden. Es sei darauf hingewiesen, daß davon ausgegangen wird, wie Gleichung (11) impliziert, daß die Intensität I_3 nahe der Zelle konstant ist. Während $I_4(\xi, \eta)$ in der Praxis als Intensität einzelner CCD-Pixel gemessen wird, kann I_3 mit maximaler Genauigkeit als Summe aller Pixelintensitäten über einem Bereich, geteilt durch die Anzahl der Pixel, bestimmt werden. Mit anderen Worten, I_3 ist die durchschnittliche Pi-

xelintensität nahe der Zelle.

[0037] Zur Verbesserung der Kalibrierungsgenauigkeit ist es möglich, mehr als eine Veränderung h bei der Küvettendicke vorzunehmen. **Fig. 6** zeigt eine berechnete Kurve der Intensität des wieder austretenden Lichts in willkürlichen Einheiten, wenn eine Küvettendicke von ungefähr 18 μm in zehn Stufen von jeweils 0,2 μm auf ungefähr 20 μm gesteigert wird. Bei diesem Beispiel sei angenommen, daß TO-PRO-3 in einer Konzentration $c = 1 \text{ mM/L}$ der absorbierenden Farbstoff ist, der einen Absorptionskoeffizienten $a = 1,144 \cdot 10^5 \text{ L/Mcm}$ bei einer Wellenlänge von 640 nm hat. Wie in **Fig. 6** zu erkennen, kann innerhalb des relativ geringen Dickenveränderungsbereichs die Lichtintensität in Abhängigkeit von der Dicke durch eine geradlinige Beziehung dargestellt werden. Bei Verwendung der in **Fig. 6** gestrichelt dargestellten vollen 5,4%-igen Intensitätsveränderung, die am besten geeignet ist, wird ein Wert von $a \cdot c = \lg(0,6223/0,5903)/(2,0 \cdot 10^{-4} \text{ cm}) = 114,63 \text{ cm}^{-1}$ errechnet, der natürlich gut auf den erwarteten Wert von $114,44 \text{ cm}^{-1}$ abgestimmt ist.

[0038] Das Verfahren zur Messung des Volumens einzelner roter Blutkörperchen gemäß der vorliegenden Erfindung läßt sich bei Vollblut- oder bei verdünnten Blutproben anwenden. Die vorliegende Erfindung kann auch auf einen ganzen Klumpen roter Blutkörperchen oder anderer Partikel in einer Flüssigkeits-suspension und nicht bloß auf einzelne Partikel oder Zellen angewendet werden. Es läge auch im Umfang der Erfindung, dieses Verfahren auf andere in Flüssigkeiten suspendierte Partikel, wie beispielsweise Perlen oder andere Partikel oder Zellen, beispielsweise prokaryotische, bakterielle, eukaryotische, Säugetier-, Gewebekultur- oder menschliche Zellen, anzuwenden. Für den Fachmann auf dem Gebiet ist auch klar, daß die vorliegende Erfindung auch auf Partikel oder Zellen in anderen Flüssigkeitssuspensionen oder Proben oder Verdünnungen derselben, wie beispielsweise andere medizinische oder biologische Proben, einschließlich Gewebekulturen oder andere in Kultur befindliche Zellen, einschließlich bakterieller Kulturen, und anderen Körperflüssigkeiten wie Blut, Urin, Sputum, Speichel und Lymphflüssigkeit angewandt werden kann.

[0039] Abhängig von den optischen Eigenschaften einer Flüssigkeitsprobe kann das Verfahren auch in Küvetten von größerer Dicke angewandt werden. Die Verwendung eines flexiblen Fensters ist lediglich ein Beispiel für das Erreichen einer Veränderung der Dicke der Küvette. Es wäre auch möglich, ein starres Fenster, aber Abstandhalter aus einem flexiblen Material wie Gummi zu verwenden. Eine wieder andere Ausführungsform wäre möglich bei Verwendung einer flexiblen Küvettenwand anstelle von örtlich festgelegten Abstandhaltern. Die Veränderung der Küvettendicke kann auch dadurch erreicht werden, daß

der Hauptteil der Küvette fixiert bleibt und mit einer positiven oder negativen Kraft auf das Fenster eingewirkt wird, so daß das Fenster sich bewegt. Derartige positiven oder negativen Kräfte können sogar die Verwendung von Druck oder eines Vakuums implizieren.

[0040] Wie bereits oben erwähnt, ist die Erfindung nicht auf optische Mikroskope beschränkt. Jedes Abbildungssystem, das die Messung der Intensitäten transmittierten Lichts in Bereichen, die einen Partikel enthalten, und in Bereichen, die keinen Partikel enthalten, ermöglicht, sind zur Ausführung der vorliegenden Erfindung geeignet. Das Abbildungssystem kann Linsen enthalten, kann aber auch faseroptische Elemente in sogenannten Näherungskonfigurationen verwenden. In diesem Falle ist ein kohärentes faseroptisches Bündel zwischen einem Küvettenfenster und einem Abbildungsphotodetektor angeordnet. Schließlich wäre es auch noch im Sinne der Erfindung, einen Lichtstrahl über die Küvettenfenster streichen zu lassen und das transmittierte Fluoreszenzlicht mit einem nicht-abbildenden Photodetektor zu überwachen, während die Dicke der Küvette sich verändert.

[0041] Es sei erwähnt, daß der Schritt der Kalibrierung, d.h. der Bestimmung der Größe, "Veränderung der Intensität des wieder austretenden Lichts/Veränderung der Probendicke" gemäß Gleichung (3) auch dicht bei dem untersuchten Partikel durchgeführt werden kann. In diesem Falle würde, wie in bezug auf [Fig. 4](#) deutlich wird, zunächst die Intensität des wieder austretenden Lichts in der Nähe eines einzelnen Partikels gemessen. In einem nächsten Schritt wird die Dicke der optischen Küvette in diesem Bereich um einen Betrag Δh verändert, und eine neue Intensität des wieder austretenden Lichts wird gemessen. In einem dritten Schritt wird die Intensität des wieder austretenden Lichts in dem von dem Partikel besetzten Bereich gemessen. Während die beiden ersten Schritte die erforderliche Kalibrierung liefern, liefern der zweite und der dritte Schritt die beiden Intensitätswerte des wieder austretenden Lichts, die für die eigentliche Volumenmessung notwendig sind. Dieser zweite Vorgang gemäß der vorliegenden Erfindung hat den Vorteil, daß statt vier drei Schritte erforderlich sind. Der erste Vorgang gemäß der vorliegenden Erfindung ermöglicht die Durchführung der Kalibrierung innerhalb eines Küvettenbereichs von erhöhter Dicke, was aufgrund der erhöhten Intensitätspegel des wieder austretenden Lichts einen präziseren Kalibrierungswert ermöglichte. In der Praxis muß der Benutzer auf der Grundlage der bestehenden Prioritäten entscheiden.

Patentansprüche

1. Vorrichtung zum Messen des Volumens einzelner Partikel in einer Flüssigkeit, wobei die Vorrichtung

aufweist:

(a) einen Behälter (**20**) zum Suspendieren von Partikeln in einer Flüssigkeit, wobei der Behälter zur Durchführung von Transmissionsmessungen geeignet ist;
 (b) eine Einrichtung (**6**) zum Beleuchten der Suspension mit einer Lichtwellenlänge;
 (c) eine Einrichtung (**21**) zum Messen der Intensität des transmittierten Lichts, das aus der Suspension wieder austritt; und
 (d) eine Einrichtung (**11**) zum Verändern der Dicke des Behälters um einen bestimmten Betrag durch Drücken auf den Behälter von außen.

2. Vorrichtung nach Anspruch 1, ferner mit einem Mikroskop (**7**).

3. Vorrichtung nach Anspruch 1, bei dem der Behälter (**20**) eine optische Küvette ist.

4. Vorrichtung nach Anspruch 3, bei der die optische Küvette ein Eingangsfenster und ein Ausgangsfenster aufweist.

5. Vorrichtung nach Anspruch 3, bei der die optische Küvette einen Mikroskop-Objektträger (**1**) und einen Abdeckstreifen (**3**) aufweist.

6. Vorrichtung nach Anspruch 2, bei der die Einrichtung zum Verändern der Dicke ein feststehender Kolben (**11**) ist, der den Behälter (**20**) berührt, wenn der Behälter in Richtung der Objektivlinse des Mikroskops (**7**) bewegt wird.

7. Vorrichtung nach Anspruch 6, bei der der Behälter (**20**) eine optische Küvette ist.

8. Vorrichtung nach Anspruch 7, bei der die optische Küvette ein Eingangsfenster und ein Ausgangsfenster aufweist.

9. Vorrichtung nach Anspruch 7, bei der die optische Küvette einen Mikroskop-Objektträger (**1**) und einen Abdeckstreifen (**3**) aufweist.

Es folgen 6 Blatt Zeichnungen

FIG. 1

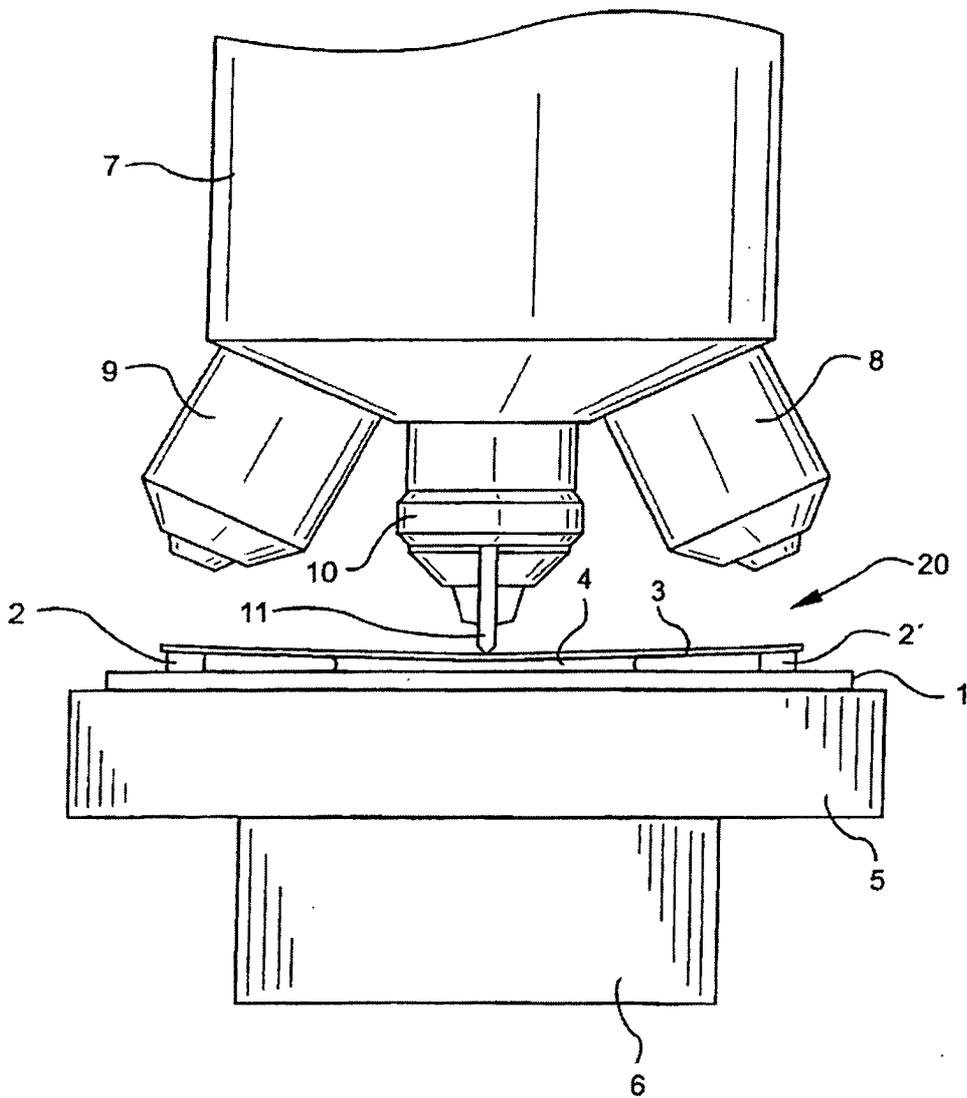


FIG. 2

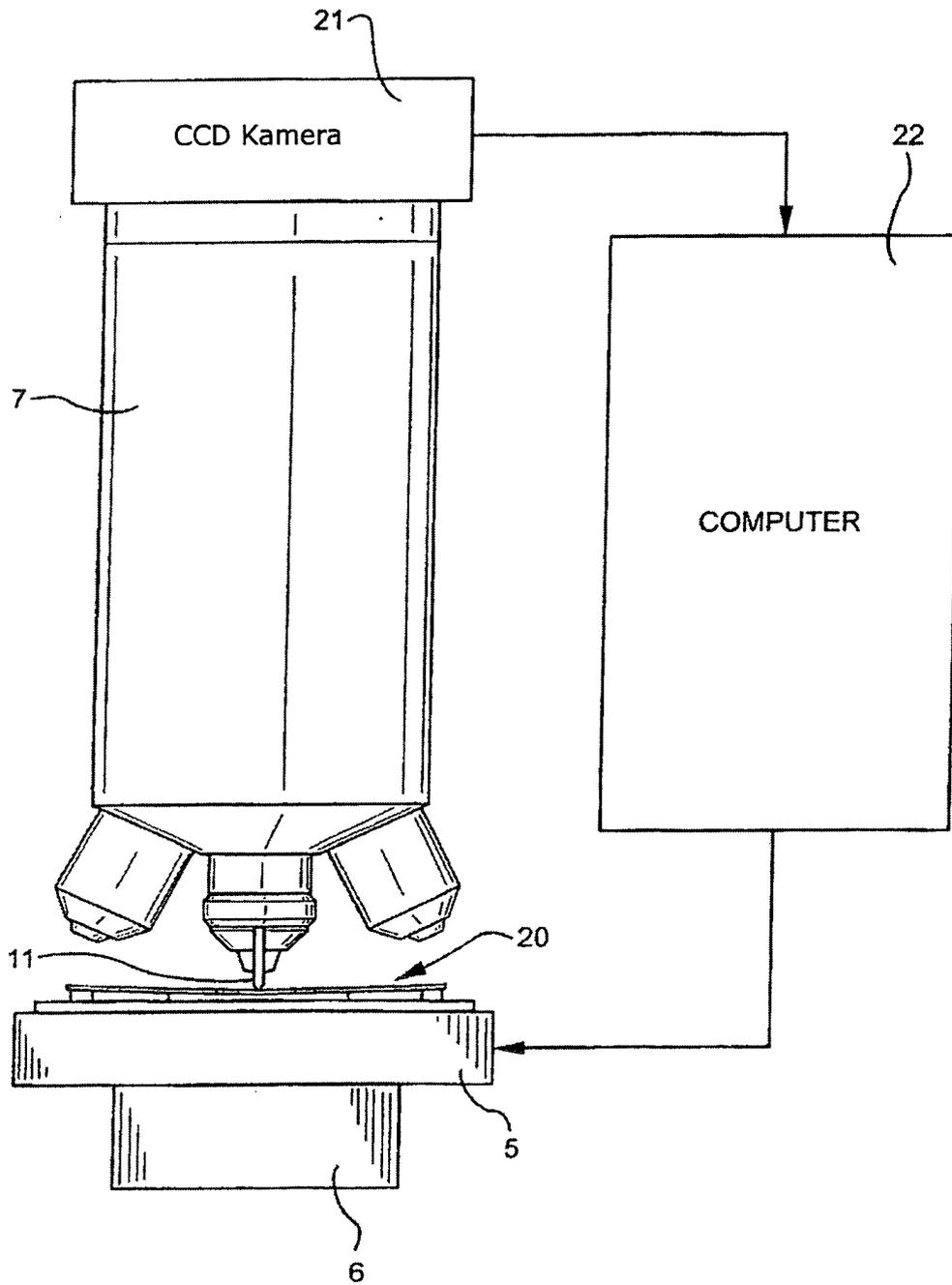


FIG. 3

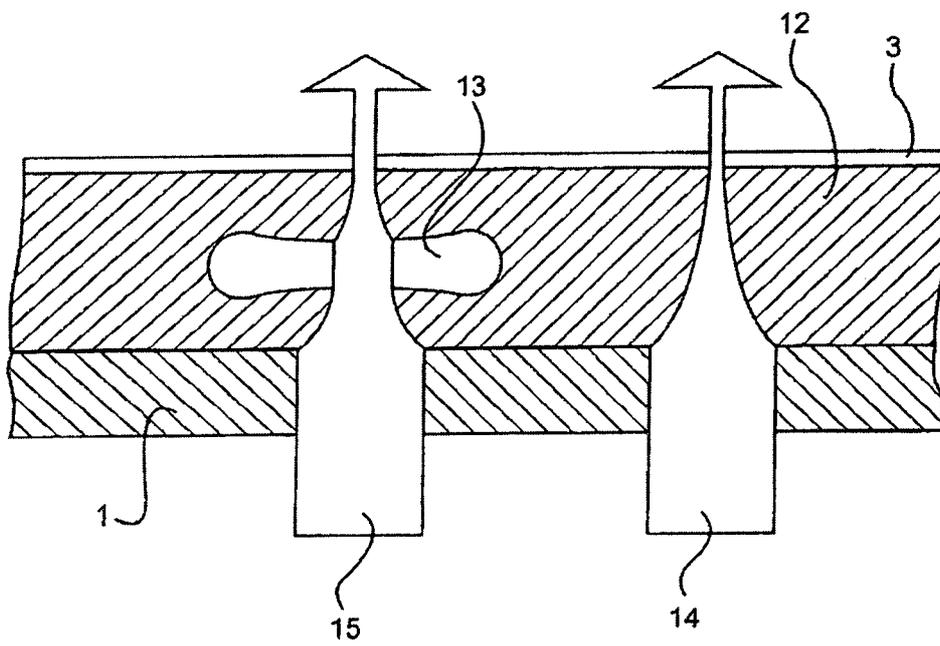


FIG. 4

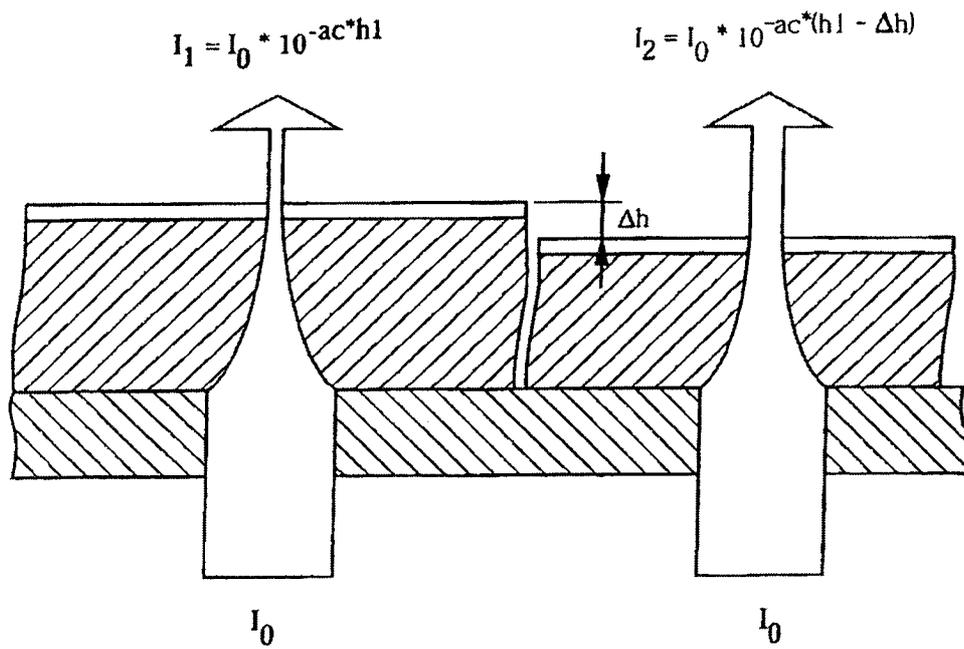


FIG. 5

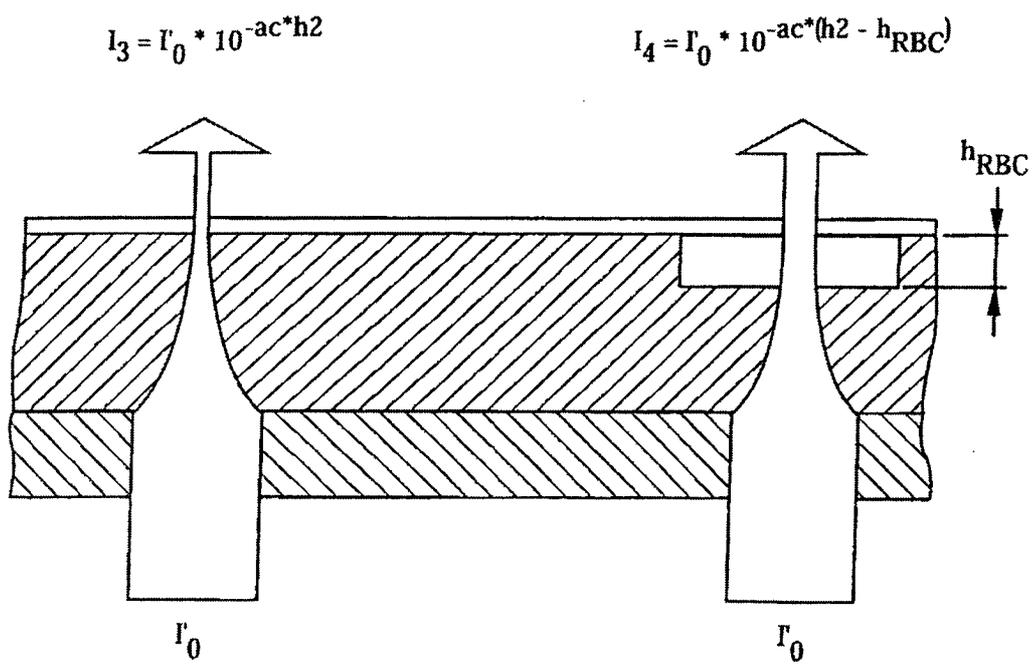


FIG. 6

