



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 12 928 T2 2004.03.04**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 980 516 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 12 928.8**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/DK98/00175**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 919 085.5**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 98/050777**

(86) PCT-Anmeldetag: **05.05.1998**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **12.11.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **23.02.2000**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **02.04.2003**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **04.03.2004**

(51) Int Cl.⁷: **G01N 15/14**
C12Q 1/00

(30) Unionspriorität:

50997	05.05.1997	DK
143197	09.12.1997	DK

(73) Patentinhaber:

ChemoMetec A/S, Allerød, DK

(74) Vertreter:

Kroher, Strobel Rechts- und Patentanwälte, 80336 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(72) Erfinder:

**HANSEN, Ejner, Frans, DK-8000 Aarhus C, DK;
GLENSBJERG, Martin, DK-2700 Broenshoej, DK;
ARNVIDARSON, Børkur, DK-2990 Niva, DK;
JEPPESEN, Myron, Jesper, DK-2100 Copenhagen O, DK**

(54) Bezeichnung: **BESTIMMUNG VON PARTIKELN IN EINER FLÜSSIGEN PROBE**

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

Bereich der Endung

[0001] Die Erfindung betrifft ein Verfahren und ein System zur Bestimmung oder Bewertung zumindest eines Quantitätsparameters und/oder zumindest eines Qualitätsparameters von biologischen Partikeln in einem flüssigen Analysematerial. Als ein wichtiger Quantitätsparameter kann die Anzahl biologischer Partikel in einem Volumen des Analysematerials erwähnt werden, wie z. B. die Anzahl somatischer Zellen in Milch oder Blut, oder die Anzahl an Bakterien in einer Urinprobe. Ein weiteres wichtiges Beispiel eines Quantitätsparameters, ob analytisch oder nicht, wie z. B. ein flüssiger Analyt, der durch selektive Anreicherung einer Nahrungsprobe erhalten wird, enthält eine spezielle bakterielle Spezies, wie z. B. *Salmonella typhimurium*. Als Beispiele von Qualitätsparametern können morphologische Eigenschaften biologischer Partikel erwähnt werden, wie Größe und/oder Form oder die Identifizierung einer oder mehrerer Arten biologischer Partikel in einem Gemisch aus mehr als einer Art von biologischen Partikeln.

Beschreibung des Standes der Technik

[0002] Bestimmungen oder Bewertungen der oben genannten Arten wurden durch verschiedene Verfahren durchgeführt. Eines dieser Verfahren ist die Flußzytometrie; Gerätschaften zur Durchführung von Flußzytometrie sind beispielsweise erhältlich von Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes. Flußzytometrie erfordert ziemlich komplizierte und kostspielige Ausrüstung, teilweise wegen der hohen Genauigkeit der Flußrate, die notwendig ist, um verlässliche Ergebnisse zu liefern, und teilweise wegen der hohen Sensitivität, die benötigt wird, um die schwachen Signale von den fraglichen Partikeln während der relativ kurzen Zeitdauer zu detektieren, in denen das Partikel sich im Detektor befindet.

[0003] Ein weiteres bekanntes Verfahren zur Bestimmung somatischer Zellen oder Bakterien in Milch basiert auf der Detektion von Signalen von Partikeln, die auf dem Rand einer polierten rotierenden Scheibe verstreut sind, wobei ein solches Instrument von Foss Electric, Hillerod, erhältlich ist. Die Genauigkeit in der Bewertung der Anzahl an Partikeln unter Verwendung dieses Verfahrens hängt ab von der physikalischen Form des dünnen Films der Probe, die auf der Scheibe verstreut ist, und eine hohe Sensitivität wird benötigt, um die schwachen Signale von den fraglichen Partikeln während der relativ kurzen Zeitdauer zu detektieren, in der sich das Partikel im Detektor befindet.

[0004] Ein weiteres bekanntes Verfahren zur Bestimmung somatischer Zellen in Milch basiert auf der Ausbreitung eines Milchfilms auf einem bandartigen Film, der dann mittels eines Mikroskops analysiert wird, vgl. Europäisches Patent 0 683 395. Dieses Verfahren scheint eine komplexe mechanische Lösung zu benötigen, um verlässlich zu arbeiten.

[0005] US 5,457,526 (TOA MEDICAL ELECTRONICS) offenbart ein Flußzytometer zur Analyse von Partikeln, die sich mit hoher Geschwindigkeit durch einen Detektor bewegen. Das Volumen, das vom Detektor betrachtet wird, ist extrem klein. Aus der Spezifizierung ist eine lineare Vergrößerung von mindestens 85x ableitbar.

[0006] GB 2 152 660 A (SOCIETE INTERINFORMATIQUE) offenbart eine Analyse biologischer Partikel in einer Probe. Die Proben werden z. B. auf eine horizontale Scheibe oder auf ein kontinuierliches Band gebracht. Abbildungen werden durch eine Kamera gemacht. Die Referenz offenbart nicht das durch die Kamera betrachtete Volumen und auch nicht die Vergrößerung, die für die Projizierung auf die Kamera verwendet wird.

[0007] US 4,896,967 (HAMILTON-THORN RESEARCH) offenbart einen Bewegungsscanner zur Charakterisierung der Bewegung beispielsweise von Sperma. Die Spermazellen werden unter einer relativ geringen Vergrößerung von ungefähr vier zu eins auf eine Kamera abgebildet. Das Volumen, das auf den Detektor abgebildet wird, ist nicht offenbart, aber aus der erhältlichen Information ist klar, daß nur ein sehr kleiner Bruchteil der Probe im Probenhalter betrachtet wird. Der Scanner ist nicht darauf angepaßt, sich nicht bewegendende Zellen zu zählen. Um die Motilität von Spermazellen einzuschätzen, wird eine Abbildung des Probenhalters mit der Probe von den späteren Abbildungen, die über eine bestimmte Zeitdauer genommen werden, subtrahiert. Diese erste Abbildung enthält Signale sowohl von sich bewegendenden als auch von sich nicht bewegendenden Spermazellen. Nachdem die sich bewegendenden Spermazellen identifiziert wurden, werden sie gezählt. Unter Verwendung von Informationen über die optische Helligkeit und die linearen Abmessungen der sich bewegendenden Objekte kann das System sich nicht bewegendende Objekte mit ähnlichen Charakteristika identifizieren. Das System kann nicht die Anzahl sich nicht bewegendender Partikel bestimmen, für die es kein sich bewegendes Gegenstück gibt.

[0008] Wegen der relativ hohen Komplexität und Kosten der Gerätschaften, die heute verwendet werden, werden die meisten Bewertungen biologischer Partikel in einem Labor durchgeführt, in dem fachmännisches Personal die Gerätschaften bedient.

Zusammenfassung der Erfindung

Die Erfindung ist in den Ansprüchen 1 und 48 definiert.

[0009] Die vorliegende Erfindung liefert eine wesentliche Vereinfachung der Bewertung von Quantitätsparametern und/oder Qualitätsparametern biologischer Partikel in flüssigen Analytmaterialien und macht es somit für Bedienungspersonen möglich, auch ohne besondere Fähigkeiten in diesen Bereichen der Technik die Bewertung durchzuführen. Insbesondere ermöglicht es die Erfindung, die Bewertung in der Klinik oder der Farm durchzuführen, in der die Probe entnommen wird, wodurch die Ergebnisse der Bewertung für den Benutzer im wesentlichen unmittelbar im Anschluß an das Sammeln des Probenmaterials erhältlich sind.

[0010] Die physikalische Dimension einer Gerätschaft auf der Basis der vorliegenden Erfindung ist ebenfalls dergestalt, daß die Gerätschaft gut für den Transport geeignet ist, was es Ärzten oder Veterinärärzten ermöglicht, die Gerätschaft zu einem Ort zu transportieren oder an diesem Ort zu transportieren, an dem die Analyse erforderlich ist. Das Prinzip der Messung nach der vorliegenden Erfindung liefert, verglichen mit den Verfahren, die bisher für diesen Zweck verwendet wurden, eine erhebliche Verbesserung in der Bewertung biologischer Partikel, wie DNA-enthaltender Partikel, z. B. somatischer Zellen oder Bakterien, oder roter Blutzellen, in einem flüssigem Analysematerial wie z. B. Milch, Blut oder Urin.

[0011] Diese Erfindung übersteigt die Möglichkeiten von Vorrichtungen und Verfahren nach dem Stand der Technik und ermöglicht eine einfachere und verlässlichere Bewertung biologischer Partikel in einem flüssigen Analysematerial. Die Eigenschaften, die bewertet werden können, sind die Anzahl von Partikeln in einem Volumen des analytischen Materials, jede morphologische Eigenschaft wie die Größe oder die Fläche der Partikel, oder die Identifizierung des Typs von Partikel, der analysiert wird. Insbesondere ist es möglich, mehr als eine dieser Eigenschaften gleichzeitig zu bewerten.

[0012] Gleichzeitig ermöglicht es diese Erfindung, daß diese Analysen unter Verwendung von beträchtlich kleineren Mengen an Chemikalien durchgeführt werden, als normalerweise benötigt werden. Diese Chemikalien sind oftmals gefährlich, entweder gegenüber Menschen und anderen lebenden Organismen oder gegenüber der Umwelt. Weiterhin liefert diese Erfindung eine Lösung, die die Freisetzung jeder gefährlichen Probe oder aller Chemikalien, die für die Analyse verwendet werden, minimiert, indem entweder die Analyse in einem geschlossenen Flußsystem durchgeführt wird, oder durch Verwendung eines versiegelten und entsorgbaren Probenbehältnisses, welches das komplette Probenmaterial und die Chemikalien enthält, die für die Bewertung verwendet werden, und das einen sicheren Transport der Probe und jeder beliebigen Chemikalie ermöglicht.

[0013] Die hohen Kosten sowie die mechanische Komplexität der Gerätschaften, die bisher für die Routinebewertung der Anzahl an Partikeln in einem flüssigen Analysematerial verwendet wurden, machte diese Gerätschaften unpraktisch für eine gewohnheitsmäßige Verwendung unter Bedingungen, die üblicherweise auf Milchfarmen, in Molkereien oder in humanmedizinischen oder Veterinärkliniken vorhanden sind. Solche Analysen sind von großem Interesse, beispielsweise kann ein Milchfarmer die Zählung somatischer Zellen oder Bakterien eines individuellen Tiers verfolgen, um den Verlauf klinischer oder subklinischer Mastitis oder einer Infektion zu verfolgen, und um die Zählung der Zellen in Milch zu kontrollieren, die an Molkereien geliefert wird, wodurch die Verwendung von Antibiotika minimiert wird und eine wirtschaftliche Strafe verhindert wird, die oftmals folgt, wenn die gezählten Zellen in Milch vorbestimmte Grenzen überschreitet.

[0014] Humanmedizinische Kliniken müssen oftmals den Zählstand bezüglich eines oder mehrerer Partikel in Blut, Urin oder anderen biologischen Flüssigkeiten feststellen, wie z. B. von somatischen Zellen oder Bakterien, aber weil eine solche Analyse normalerweise in einem Zentrallabor durchgeführt wird, verzögert dies oft die Reaktion auf eine solche Analyse wegen des Transports der Probe.

[0015] Es wurde herausgefunden, daß diese Erfindung die Analyse verschiedener Arten biologischer Partikel ermöglicht, wie DNA-enthaltender Partikel, roter Blutzellen, Blutplättchen, Hefezellen, Bakterienzellen, Lipidkügelchen, Proteinmizellen, Staubpartikel oder Polymerpartikel, wobei diese Partikel normalerweise in flüssigen biologischen analytischen Materialien gefunden werden, wie Milch, Blut, Urin, Kot, Speichel, einer Entzündung entweder menschlichen oder tierischen Ursprungs, oder in Proben, die aus der petrochemischen Industrie stammen, der pharmazeutischen Industrie, der Futterindustrie, der Nahrungsmittelindustrie oder dergleichen. In einer Ausführungsform umfassen die zu bewertenden biologischen Partikel Polymertropfen, die an biologische Partikel gebunden sind oder an Komponenten, die in Verbindung mit der Bewertung dieser biologischen Moleküle oder Komponenten stehen. Das Verfahren ist ebenso gut geeignet für die Detektierung jedes anderen biologischen Partikels oder Fragments hiervon, wobei ein solches Partikel ein Teil lebenden Gewebes ist und Eigenschaften zeigt, die durch die Detektion elektromagnetischer Strahlen detektiert werden können.

[0016] Diese Erfindung ist besonders geeignet für die Bewertung der Anzahl somatischer Zellen in Milch von Menschen, Kühen, Ziegen, Schafen, Büffeln oder anderen Tieren. Vor allem ist diese Erfindung geeignet für die Bewertung der Anzahl somatischer Zellen in Milch während des Melkens durch Integration des Systems in die Melkausstattung, entweder "in-line", wobei die Messung im wesentlichen vom Melksystem durchgeführt wird und durch eine Gerätschaft analysiert wird, die synchronisiert mit dem Melkvorgang betrieben wird, oder

"at-line", wobei die Probe vor, während oder nach dem Melkprozess entnommen wird und in einer Gerätschaft durch manuelle Betätigung gemessen wird. Insbesondere ist sie gut geeignet, um eine Schätzung der Anzahl somatischer Zellen zu erhalten, wenn es das Ziel der Analyse ist, die Anzahl somatischer Zellen in der Milch zu kontrollieren, die an die Molkerei geliefert wird, indem beispielsweise jede Milchprobe, die eine zu hohe Zellenanzahl aufweist, zu einem separaten Behälter oder Auslaß geleitet wird.

[0017] Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung sind geeignet für die "on-line"- oder "at-line"-Bewertung der Anzahl somatischer Zellen in Milch, wenn es das Ziel ist, die Information über den Gesundheitsstatus von Tieren wie Kühen, Ziegen, Schafen oder Büffeln, insbesondere in Verbindung mit klinischer oder subklinischer Mastitis, zu erhalten.

[0018] Das Verfahren nach der Erfindung ist geeignet für die Bewertung der Anzahl somatischer Zellen in Milch, wenn es Ziel der Analyse ist, Informationen zu erzeugen, die in einem Herdenverbesserungsschema verwendet werden, oder wenn es das Ziel der Analyse ist, einen Qualitätsparameter zu erhalten, der in einem Bezahlungsschema verwendet wird. Diese Analysen werden normalerweise in einem Zentrallabor unter Verwendung komplexer Instrumente durchgeführt.

[0019] Eine Anordnung von Detektorelementen kann in Kombination mit geeigneten elektronischen Komponenten verwendet werden, um die Bewertung biologischer Partikel in einem analytischen Material durchzuführen, indem ein Teil des analytischen Materials in einem Probenbehältnis plaziert wird, wobei das Probenbehältnis in vielen Ausführungsformen der Erfindung aus zwei Fenstern aus Glas oder einem anderen transparenten Material besteht, die durch ein Trennmittel mit Einlaß und Auslaß getrennt sind, was es möglich macht, daß die Probe zwischen zwei Messungen entfernt wird; in einer Ausführungsform ist das Probenbehältnis ein Schlauch, im wesentlichen kreisförmig oder im wesentlichen elliptisch im Profil. Die Anwesenheit eines Partikels wird normalerweise verursachen, daß das Signal eines Detektorelements von einem normalen Niveau, z. B. einem Grundniveau, abweicht, entweder in Richtung höherer Signalintensität oder in Richtung niedrigerer Signalintensität, aber zum Zwecke der Klarheit wird im Folgenden angenommen, daß eine solche Abweichung in Richtung höherer Signalintensität gerichtet ist.

[0020] Die vorliegende Erfindung basiert auf der Anordnung der Probe in einer solchen Weise, daß sie sich über ein "Fenster" eines wesentlichen Bereichs erstreckt und die Detektion von Signalen der Proben in Form einer "Abbildung" auf eine Anordnung von Detektorelementen stattfindet, wobei die Anordnung von Detektorelementen individuelle Elemente aufweist, von denen jedes fähig ist, Signale aus einem Teil des Probenfensterbereichs zu detektieren, wobei die Anordnung als Ganzes fähig ist, Signale aus im wesentlichen dem gesamten Probenfensterbereich zu detektieren, oder zumindest aus einem wohldefinierten Teil des Probenfensterbereichs.

[0021] Wie aus dem Folgenden klar wird, ermöglicht eine solche Anordnung der Probe und der Detektorelemente die Bestimmung der Anzahl von Partikeln pro Volumen auf eine viel einfachere und wirtschaftlichere Art, während eine hohe Genauigkeit der Bestimmung erhalten bleibt. Wie auch im Folgenden erläutert wird, ermöglicht es die Verwendung einer Anordnung von Detektorelementen, die einen exponierbaren Bereich der Probe "beobachten", relativ einfache Mittel zur Erzeugung von Signalen aus der Probe sowie relativ einfache und sensitive Detektormittel zu verwenden.

[0022] Die flüssige Probe, die das analytische Material repräsentiert, kann eine flüssige Probe sein, bestehend aus dem flüssigen Analytmaterial an sich (optional und oftmals bevorzugt mit beigefügten chemischen Substanzen, die die Bewertung vereinfachen, was im Folgenden erläutert wird), oder es kann eine Probe sein, die aus dem flüssigen Analysematerial durch Verdünnung, Konzentration, Extraktion oder eine andere Modifikation erhalten wurde. In diesem Zusammenhang ist es natürlich normalerweise wesentlich, daß eine unzweideutige Beziehung zwischen dem Volumen der flüssigen Probe, die das flüssige analytische Material repräsentiert, und dem Volumen des fraglichen flüssigen Analysematerials besteht, so daß die notwendige Korrelation zu einer Konzentration in dem flüssigen Analyten hergestellt werden kann. Wie oben erwähnt kann das flüssige Analysematerial selbst ein Derivat aus einem anderen Material sein, dessen Eigenschaften unter Verwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens analysiert werden sollen; somit kann z. B. der flüssige Analyt eine flüssige Anreicherungskultur sein, die aus einem Nahrungsprodukt, z. B. Geflügel, erhalten wurde.

[0023] Die Projektion der Abbildung auf die Anordnung von Detektorelementen wird normalerweise in Bezug stehen zum Bilden einer "Abbildung" des Volumens auf eine zweidimensionale Anordnung von Detektorelementen, aber es ist auch möglich, eine eindimensionale räumliche Abbildung zu verwenden, die durch geeignete optische Mittel erhalten wird, wobei in diesem Fall die Anordnung von Detektorelementen nicht mehr als eindimensional sein muß, etwa eine lineare Anordnung von Detektorelementen. In speziellen Ausführungsformen kann eine lineare Anordnung von Detektorelementen auch zum Empfangen einer zweidimensionalen Abbildung elektromagnetischer Strahlung verwendet werden, vorausgesetzt der Bereich jedes Elements ist ausreichend groß, um Signale aus einem ausreichenden Volumen zu empfangen, um die Qualitätsanforderungen an die Bestimmung zu erfüllen.

[0024] Die von der Anordnung von Detektorelementen detektierte Intensität kann eine Ladung sein, die sich aufgrund von elektromagnetischer Strahlung aufbaut, oder es kann auch beispielsweise die Intensität eines

Stroms sein, der als Ergebnis elektromagnetischer Strahlung durch das individuelle Element fließt.

[0025] Die Bedingungen der Projektion unter Berücksichtigung der verschiedenen involvierten Parameter, die detaillierter weiter unten beschrieben werden, sind so angepaßt, daß die Intensitäten, die von der Anordnung von Detektorelementen detektiert werden, unter Verwendung geeigneter Verarbeitungsmittel verarbeitet werden können, typischerweise unter Verwendung von bildverarbeitenden Mitteln und Verfahren, und zwar in einer solchen Weise, daß die Intensitäten, die als Abbildungen der elektromagnetischen Signale von den biologischen Partikeln detektiert wurden, als unterschiedlich von den Abbildungen der Hintergrundsignale identifiziert werden.

[0026] Das Volumen der flüssigen Probe, für die die Messung durchgeführt wird, oder von der die Partikel isoliert werden, sollte ausreichend groß sein, um die Bewertung des zumindest einen Quantitätsparameters oder des zumindest einen Qualitätsparameters zu ermöglichen, um eine vorbestimmte Anforderung an die statistische Qualität der Bewertung auf der Basis von im wesentlichen einer Projektion zu erfüllen. Wie im Folgenden erläutert wird, ist es ein charakteristisches Merkmal der vorliegenden Erfindung, daß sie das Sammeln von ausreichend Information in einer Projektion ermöglicht, um eine hohe statistische Qualität trotz der Tatsache zu gewährleisten, daß die Bewertung auf eine extrem einfache Art und Weise durchgeführt werden kann. Ein Grund hierfür ist, daß das Verfahren nach der Erfindung normalerweise unter Verwendung von viel geringeren Vergrößerungen der Abbildung, die auf die Anordnung von Detektorelementen projiziert wird, durchgeführt wird als bislang für möglich gehalten wurde, und daß in einigen Fällen sogar Verkleinerungen im Gegensatz zu Vergrößerungen möglich sind. Für eine Anzahl von Anwendungen liegt der Grad der Vergrößerung lediglich bei 1:1, im Gegensatz zu den meisten automatisierten Mikroskopieverfahren, die deutlich höhere Vergrößerungen und mehrere Beobachtungsdurchgänge verwenden.

[0027] Die Projektion einer Abbildung der Probe auf die Anordnung von Detektorelementen kann durchgeführt werden, indem die Anordnung von Detektorelementen in engem Kontakt oder im wesentlichen engem Kontakt mit dem Äußeren der exponierbaren Wand des Probenbehältnisses angeordnet wird, oder unter Verwendung eines bildgebenden Mittels wie einer Linse mit einem oder mehreren Elementen, die im Lichtweg zwischen der exponierbaren Wand des Probenbehältnisses und der Anordnung von Detektorelementen angeordnet sind.

[0028] Die Wand des Probenbehältnisses, die einen exponierbaren Bereich definiert, kann eine flache oder gekrümmte Wand sein.

[0029] Die Probe kann in das Probenbehältnis eingeführt werden durch ein System, das durch eine Pumpe oder ein unter Druck gesetztes Gas, bevorzugt Luft, angetrieben wird. In vielen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung wird das Füllen des Behältnisses durch ein oder mehrere Ventile gesteuert, die die Fließgeschwindigkeit der Probe einstellen können.

[0030] In vielen bevorzugten Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung ist die Wand des Probenbehältnisses eine ebene Wand, und die Anordnung von Detektorelementen ist eine Anordnung, die sich in einer Ebene parallel zur Ebene der Wand erstreckt. Abhängig von der Art und Weise, in der die Abbildung der Probe auf die Anordnung von Detektorelementen projiziert wird, kann die Konfiguration sowohl der exponierbaren Wand als auch der Anordnung jedoch in vielen verschiedenen Arten ausgestaltet sein, z. B. wenn sowohl die exponierbare Wand als auch die Anordnung als Abschnitte eines kreisförmigen Zylinders ausgestaltet sind, wenn die exponierbare Wand konvex und die Anordnung konkav ist, wobei beide im wesentlichen denselben Radius aufweisen, wobei diese leicht in Kontakt oder in annähernd in Kontakt miteinander gebracht werden können, oder wobei sowohl die exponierbare Wand als auch die Detektoranordnung konkav sind und eine Linse zur Projektion der Abbildung der Probe auf die Anordnung verwendet wird. Viele andere Konfigurationen sind natürlich möglich, beispielsweise wenn sowohl die exponierbare Wand als auch die Anordnung Abschnitte von Kugeln usw. sind.

[0031] Das Probenbehältnis kann eine Kammer sein, die leicht aus der Gerätschaft entfernt werden kann, wenn eine neue Probe oder neues Probenmaterial gemessen werden soll. Ein solches entfernbares Probenbehältnis wird bevorzugt für eine begrenzte Anzahl an Messungen, und besonders bevorzugt für nur eine Messung, verwendet. Neben der Gewährleistung einer einfacheren mechanischen Konstruktion eines Instruments ohne Flußsystem ist es ein Vorteil eines solchen entfernbaren Probenbehältnisses, daß es die Probe in einem geschlossenen Behälter vor, während und nach der Analyse enthält, wodurch ein sichererer Umgang mit gefährlichem Material gewährleistet ist. In vielen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung kann ein solches entfernbares Probenbehältnis vor der Einführung von Probenmaterial eine oder mehrere Komponenten oder Gerätschaften enthalten, die für eine chemische oder physikalische Modifizierung der Probe vor der Analyse verwendet werden.

[0032] Elektronische Geräte oder ein Computer mit geeigneter Software können verwendet werden, um ein Signal, das von einem beliebigen Detektorelement stammt, zu konditionieren, bevorzugt so, daß die Quantifizierung des Signals von einem beliebigen Detektorelement verlässlicher oder weniger zeitaufwendig durchgeführt wird, beispielsweise durch Umwandlung eines Signaltyps in ein anderes Signal, das für die Weiterverarbeitung geeignet ist, und/oder durch Liefern von Mitteln für die Verstärkung des Signals. Oftmals ist es bevor-

zugt, daß das Signal von einem beliebigen Detektorelement auf jede Fehlerabweichung eingestellt wird, und/oder auf jede Änderung in der Sensitivität, die in den Signalen vorhanden sein könnte, wobei diese Einstellung bevorzugt durchgeführt wird, indem Informationen von benachbarten Detektorelementen verwendet werden, oder unter Verwendung ähnlicher Informationen aus früheren Messungen. Eine weitere nützliche Eigenschaft einer solchen Signalkonditionierung ist die Umwandlung eines im wesentlichen analogen Signals in einen digitalisierten Wert, der besser für die Weiterverarbeitung in einem digitalen Datenverarbeitungssystem geeignet ist; eine solche Digitalisierung könnte eine grenzenähnliche Aktivierung von zwei oder mehr Ausgangslinien sein, und zwar so, daß das Eingangsniveau jedes Signals eine Veränderung im Status dieser Ausgangslinien hervorruft, bevorzugt derart, daß das Niveau des Eingangssignals geschätzt werden kann. Ein bevorzugtes Verfahren der Digitalisierung ermöglicht es, daß das Niveau des Eingangssignals in eine Zahl entsprechend dem binären Zahlensystem umgewandelt wird.

[0033] Es ist oftmals bevorzugt, daß die digitale Darstellung des Niveaus jedes Eingangssignals eine im wesentlichen lineare Funktion liefert, und in vielen bevorzugten Ausführungsformen dieser Erfindung ist es bevorzugt, daß die digitale Abbildung eine im wesentlichen nichtlineare Funktion liefert, beispielsweise eine logarithmische Funktion, wobei eine solche nicht-lineare Funktion dann bevorzugt wird, wenn der dynamische Bereich des Eingangsniveaus groß ist.

[0034] In solchen Implementierungen dieser Erfindung ist es bevorzugt, eine eindimensionale Anordnung von Detektorelementen, bevorzugt in einem Chip integriert, zu verwenden, wobei die Identifizierung eines Partikels in der Probe, die gemessen wird, durchgeführt wird, indem das Signalniveau jedes Detektorelements mit einem vordefinierten Niveau verglichen wird, oder bevorzugt mit einem Niveau, das auf der Basis der Signale von benachbarten Detektorelementen geschätzt wird, bevorzugt auf der Basis der Signale von früheren Messungen, und wenn herausgefunden wird, daß ein Signal oberhalb dieses Entscheidungsniveaus liegt, wird angenommen, daß ein Partikel anwesend war, und der Zählerstand wird entsprechend erhöht. Weiterhin ist es möglich, die Anwesenheit von zwei Partikeln zu detektieren, die gleichzeitig gemessen wurden, beispielsweise indem die Intensität eines Signals mit einer bekannten oder vorbestimmten Grenze verglichen wird, auf solche Weise, daß die Signale oberhalb dieser Grenze die Anwesenheit von zwei Partikeln anzeigen. Mehr als eine solche Grenze kann verwendet werden, um beliebige Situationen zu identifizieren, in denen drei, vier oder mehr Partikel anwesend sind, oder es kann eine empirische oder theoretische Verbindung zwischen der Gesamtzahl anwesender Partikel konstruiert werden, wobei die Möglichkeiten der Signale von zwei oder mehr Partikeln gleichzeitig durch ein Detektorelement detektiert werden.

[0035] Wie oben erwähnt ist es oft bevorzugt, daß ein optisches System verwendet wird, um jedes Signal von der Probe auf die Detektorelemente zu fokussieren, und in einigen Fällen ist es bevorzugt, daß eine solche Fokussierung eine Abbildung eines Partikels mit einer durchschnittlichen Größe liefert, die ungefähr so groß ist wie die verwendeten Detektorelemente, und in bestimmten Fällen vorzugsweise kleiner, so daß die Abbildung des gesamten Partikels im wesentlichen innerhalb der Grenzen des Detektorelements liegt.

[0036] In anderen Ausführungsformen dieser Erfindung, ähnlich zu der oben beschriebenen, die eine eindimensionale Anordnung von Detektorelementen oder eine zweidimensionale Anordnung von Detektorelementen verwendet, ist es bevorzugt, daß ein optisches System verwendet wird, um jedes Signal von der Probe auf die Detektorelemente derart zu fokussieren, daß eine Abbildung geliefert wird, die von derselben Größe wie die verwendeten Detektorelemente ist, oder in einigen Fällen vorzugsweise größer, wobei das Verfahren verwendet wird, um die Anwesenheit eines Partikels zu identifizieren, und zwar unter Berücksichtigung der Ausdehnung des Partikels in der Dimension entlang der Reihe von Detektorelementen, und auch die Höhe des gemessenen Signals jedes Detektorelements. Eine solche Ausführungsform dieser Erfindung ermöglicht die Einschätzung einiger morphologischer Eigenschaften der Partikel, die gemessen werden, z. B. der Größe. Unter diesen Bedingungen ist es auch möglich, die Anwesenheit von zwei oder mehr Partikeln zu detektieren, die auf im wesentlichen dieselben Detektorelemente fokussiert sind, beispielsweise durch Klassifizierung der Signalintensität.

[0037] Es wurde überraschenderweise herausgefunden, daß eine eindimensionale Anordnung von Detektorelementen, bei der die Breite der Anordnung der Detektorelemente beträchtlich größer war als die Höhe jedes Detektorelements, eine kommerziell erhältlich von Hamamatsu (S3902-128Q), exzellent verwendet werden könnte für die Bewertung der Anzahl von Partikeln und somit die Detektion von Signalen aus einem größeren Probenvolumen bei jedem Scannen der Detektorelemente ermöglicht. Weiterhin wurde entdeckt, daß selbst die Verwendung einer Fokussiervorrichtung, die die Dimensionen der Abbildung relativ zum Original verzerrt, und zwar derart, daß z. B. die Abbildung eines Kreises eine Form aufweist, die ähnlich zu der einer Ellipse ist, auch einen ähnlichen Vorteil wie die Verwendung von Detektorelementen mit großer Höhe lieferte, und weiterhin wurde herausgefunden, daß es mit einer Kombination der oben erwähnten Detektorelemente und einer verzerrenden Fokussiervorrichtung möglich war, eine nützliche Bewertung auf einem großen Detektorvolumen zu erhalten. Die Verwendung einer Reihe von eindimensionalen Anordnungen von Detektorelementen, bevorzugt auf einem einzigen Chip angeordnet, wurde oft als hilfreich bei der Bewertung von biologischen Partikeln in einer Probe angesehen. Eine kommerziell erhältliche CCD-Anordnung ist erhältlich von Sony (ICX 045 BL).

Eine weitere Anordnung von Detektorelementen, die für viele Ausführungsformen dieser Erfindung geeignet ist, ist ein Bildsensor auf der Basis von CMOS-Technologie, der eine Detektion unter Verwendung eines eingeschränkten elektrischen Effekts möglich macht und zudem eine Integration auf dem Chip mit anderen CMOS-basierenden Technologien wie Signalkonditionierung und Signalverarbeitung bietet. Eine solche wurde von Toshiba gezeigt und weist 1318×1030 Elemente auf, von denen jedes etwa $5.6 \mu\text{m} \times 5.6 \mu\text{m}$ groß ist, wobei lediglich 30 mW benötigt werden.

[0038] Die Bewertung biologischer Partikel in einer Probe kann durchgeführt werden, indem jede Reihe von derartigen zweidimensionalen Anordnungen von Detektorelementen im wesentlichen auf dieselbe Art wie eine Anordnung von eindimensionalen Detektorelementen behandelt wird.

[0039] Einige Ausführungsformen dieser Erfindung ermöglichen die Simulation von großen Detektorelementen durch elektronische oder rechnerische Hinzufügung von Informationen von zwei oder mehr Reihen von Detektorelementen in eine Anordnung von Informationen, die hierauf im wesentlichen auf dieselbe Art behandelt werden wie eine einzelne eindimensionale Anordnung von Detektorelementen, wodurch im wesentlichen eine einfachere und weniger zeitaufwendige Interpretation der gemessenen Informationen ermöglicht wird.

[0040] In einigen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung basiert die Bewertung der Anzahl von Partikeln in einer ersten Reihe von Detektorelementen auf beliebigen Ergebnissen, wie der Position und/oder den Intensitäten, die in einer zweiten Reihe von Detektorelementen bereits beobachtet und verarbeitet wurden, wodurch die Korrektur von Signalen gewährleistet wird, die sich über zwei oder mehr Reihen von Detektorelementen erstrecken.

[0041] Die Einbringung einer Fokussiervorrichtung zum Fokussieren eines Signals von der Probe auf die Detektorelemente in solcher Weise, daß der Sammelwinkel maximiert wird, wobei der Sammelwinkel definiert wird als der Winkel, innerhalb dessen ein Signal detektiert wird, lieferte in vielen Situationen verbesserte Bedingungen für eine Bewertung. Überraschenderweise wurde herausgefunden, daß ein solcher breiter Sammelwinkel bei der Bewertung der Anzahl von Partikeln verwendet werden könnte, sogar bis zu dem Ausmaß, daß das bei der Fokussierung verwendete Objektiv das Verhältnis der Abbildung jedes Partikels über die Ebene, in der die Detektorelemente platziert sind, unterschiedlich verzerrt, eine Veränderung der Fokussierung über die zu analysierende Probe liefert oder eine Verringerung der Fokussierqualität liefert.

[0042] Es ist möglich, die Bewertung biologischer Partikel einer Probe unter Verwendung eines Rechenmittels, bevorzugt eines digitalen Computers, durchzuführen, wobei einer kommerziell erhältlich ist von Analogue Devices (ADSP 2101), der mit einer Speicherkapazität ausgestattet ist, die lediglich Informationen in einer Menge speichern kann, die im wesentlichen gleich einem kleinen Bruchteil der Gesamtzahl an Detektorelementen ist, wobei die Bewertung der Anzahl von Objekten dann im wesentlichen auf der Echtzeitverarbeitung von Daten basiert, bevorzugt derart, daß die gemessene Information jedes Detektorelements oder einer Reihe von Detektorelementen oder zwei oder mehr Reihen von Detektorelementen für die Bewertung verwendet wird, im wesentlichen ohne Verzögerung, die andererseits durch eine Speicherung der gemessenen Informationen hervorgerufen würde.

[0043] Es wird jedoch oft bevorzugt, im wesentlichen alle gemessenen Informationen unter Verwendung eines ersten Rechenmittels, bevorzugt eines digitalen Computers, zu speichern, bevor die Informationen durch ein zweites Rechenmittel, bevorzugt einen digitalen Computer, verarbeitet werden, wodurch es ermöglicht wird, daß die gemessene Information im wesentlichen mit derselben Frequenz verarbeitet wird, wie sie erhalten wird, aber mit einer beträchtlichen Zeitverzögerung zwischen der Messung jeder Information und der Verarbeitung derselben; vorzugsweise wird dies zustande gebracht durch Verwendung lediglich eines Rechenmittels, vorzugsweise eines digitalen Computers, der mit genügend Mitteln ausgestattet ist, um diese Aufgabe zu erfüllen.

[0044] Wenn ein Probenbehältnis verwendet wird, das für die Analyse von mehr als einem Probenmaterial verwendet wird, z. B. wenn die Probe mittels eines Flußsystems eingeführt wird, stellt sich oft heraus, daß ein oder mehrere interessierende Partikel oder Teile dieser Partikel sich derart mit dem Probenbehältnis verbinden, daß die Fließgeschwindigkeit, die verwendet wird, um das Probenmaterial zu ersetzen, nicht in der Lage ist, diese verklebten Partikel zu entfernen. Wenn also solche klebenden Partikel an einem Ort angeordnet sind, der auf die Detektorvorrichtung projiziert wird, werden diese in zwei oder mehr Beobachtungen vorhanden sein, obwohl die Probe zwischen den Beobachtungsdurchgängen im wesentlichen entfernt wurde. In vielen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung kann der Einfluß dieser klebenden Partikel auf die Beobachtung im wesentlichen eliminiert werden durch Kombination von zwei Beobachtungen auf eine solche Weise, daß das Ergebnis einer ersten Beobachtung durch das Ergebnis einer zweiten Beobachtung abgeglichen wird, wobei die zweite Beobachtung eine von vielen Beobachtungen ist, die vor der ersten Beobachtung stattfand, oder durch Kombination von mehr als einer von vielen Beobachtungen, die vor der ersten Beobachtung stattfand, bevorzugt durch eine Beobachtung, die im wesentlichen unmittelbar vor der ersten Beobachtung stattfand, wobei die Abgleichung eine einfache Subtraktion der zweiten Beobachtung von der ersten Beobachtung ist. Das Ergebnis dieser Abgleichung enthält dann Informationen, wobei alle Objekte, die in der ersten Beobachtung anwesend waren, positive Intensität besitzen, und jedes Objekt, das in der zweiten Beobachtung an-

wesend war, negative Intensität aufweist, und jedes Objekt, das sowohl in der ersten als auch in der zweiten Beobachtung anwesend war, im wesentlichen eine Intensität von Null besitzt. Das Ziel jedes Verfahrens, das für die Bewertung der Anzahl an Objekten oder die Bestimmung einer morphologischen Eigenschaft eines Objekts verwendet wird, ist es dann, lediglich die Intensitäten zu behandeln, die im wesentlichen positive Werte aufweisen. In ähnlicher Weise ist es möglich, die Ergebnisse von zwei oder mehr Beobachtungen zu analysieren, die von unterschiedlichen Proben aus demselben Probenmaterial gemacht wurden, indem diese Beobachtungen wie oben beschrieben kombiniert und anschließend sowohl die positiven als auch die negativen Signale analysiert werden, beispielsweise durch Behandlung aller Signale, als wären sie positiv. So ist es möglich, 2, 4, 6, 8 oder mehr Beobachtungen gleichzeitig zu analysieren, z. B. in Situationen, bei denen der Aufwand der Analyse einer Beobachtung größer ist als der Aufwand, eine Beobachtung zu machen.

[0045] Für die Erfindung kann das Probenmaterial eine im wesentliche wässrige Lösung sein, oder eine im wesentlichen organische Lösung, oder eine Mischung von zwei oder mehr nicht mischbaren Phasen, von denen einige flüssig, einige fest sein können und von denen einige eine Suspension sein können, in die die interessierenden Partikel eingebracht sind. In vielen bevorzugten Ausführungsformen dieser Erfindung wurde das zu analysierende Probenmaterial oder seine chemischen oder physikalischen Eigenschaften modifiziert, verglichen mit dem Analytmaterial, und zwar entweder durch Befügung oder Entfernung von einer oder mehreren Komponenten, oder durch Einbringung der Probe in eine oder mehrere chemische, mechanische oder physikalische Behandlungen vor der Analyse. Vorzugsweise ist das Resultat einer solchen Veränderung oder Modifikation die Vergrößerung eines jeden meßbaren Signals, das für die Analyse verwendet wird, oder eine Unterdrückung eines störenden Phänomens, oder sie hat die Wirkung der Verlängerung der Lebenszeit der Probe.

[0046] Oftmals ist es bevorzugt, daß das Signal, welches detektiert wird, ein Photolumineszenzsignal ist, das von einem Molekül stammt, oder einem Teil eines Moleküls, mit fluorophoren Eigenschaften, welches auf natürliche Weise innerhalb oder an dem Partikel, welches gemessen wird, enthalten ist.

[0047] Die Partikel, die detektiert werden sollen, sind oftmals "gefärbt" mit einem oder mehreren Molekülen, die sich mit dem Partikel verbinden, die innerhalb des Partikels eingeschlossen sind oder auf andere Weise mit dem Partikel wechselwirken, wobei der Effekt dieses "Einfärbens" die Vergrößerung jedes Signals des Partikels ist, oder die direkte Quelle eines Signals, welches dann verwendet werden kann, um das Partikel zu detektieren.

[0048] In vielen Aspekten der Erfindung ist es die Auswirkung der "Einfärbung"; eine Abschwächung elektromagnetischer Strahlung, wie sichtbaren Lichts, zu verursachen oder zu verstärken, oder vorzugsweise die Emission elektromagnetischer Strahlung wie Chemilumineszenz oder Photolumineszenz, d.h. Fluoreszenz oder Phosphoreszenz, zu verursachen oder zu steigern, wenn sie mit Strahlung angeregt wird, die im wesentlichen eine höhere Energie aufweist als die emittierte Photolumineszenz. Eine Art solcher "Einfärbung" ist die Beifügung von Ethidiumbromid (EtBr) zu der Probe, wobei EtBr mit dem DNA-Material wechselwirkt, das in der Probe vorhanden ist, und die Fluoreszenz bei etwa 605 nm erhöht, wenn es mit einem Licht von etwa 518 nm angeregt wird (Handbuch von fluoreszenten Proben und Forschungsschemikalien, Seite 145). Dies macht es möglich, in Kombination mit dem geeigneten Satz optischer Filter, ein DNA-enhaltendes Partikel zu zählen, wobei EtBr mit der DNA wechselwirken kann, wobei solche Partikel z. B. Zellen sind, die DNA enthalten, insbesondere DNA-enhaltende somatische Zellen oder Bakterien, wie sie in Milch, Blut oder Urin vorhanden sind.

[0049] Überraschenderweise wurde herausgefunden, daß es möglich war, Konzentrationen von Fluorophoren zu verwenden, die wesentlich geringer waren, als sie normalerweise in Systemen verwendet wurden, oftmals weniger als 1/10 oder 1/100 oder sogar weniger als 1/1000 hiervon; vor allem ist dies vorteilhaft, wenn hinzugefügte Fluorophore im wesentlichen ähnliche Eigenschaften in freier Form wie in gebundener Form besitzen, unter Betrachtung von Intensität und Wellenlängencharakteristika. Wie erwartet reduziert eine solche Bedingung jedes Signal, das von einem gefärbten Partikel emittiert wird, aber überraschenderweise wurde herausgefunden, daß das Verhältnis der Signalintensität in gebundener Form im Vergleich zu freier Form zugunsten der gebundenen Signale verschoben ist. Vor allem wurde herausgefunden, daß ein Signalniveau eines Fluorophors in freier Form in der Probe vergleichbar und sogar noch geringer bezüglich der Intensität war als jedes zufällige elektronische Signal (Rauschen) und/oder vergleichbar bezüglich der Intensität mit jedem anderen störenden Signal, und sogar noch weniger als das.

[0050] Die Flüssigkeit, in der die Partikel, die gemessen werden sollen, enthalten sind, bewegt sich nicht, wobei die Nichtbewegung definiert wird als die Situation, in der die Abbildung eines Partikels sich nicht stärker bewegt als derart, daß, sie im wesentlichen innerhalb der Grenzen desselben Detektorelements während einer Meßperiode enthalten ist. Die Stillstandssituation ist vorzugsweise so, daß sich zumindest ein Teil der Abbildung eines Partikels nicht stärker bewegt als derart, daß sie im wesentlichen innerhalb der Grenze desselben Detektorelements während zumindest zwei Meßperioden enthalten ist, wodurch die Detektion jedes schwachen Signals ermöglicht wird, das die Anwesenheit eines Partikels anzeigen könnte.

[0051] Es ist möglich, mehr als eine Messung durchzuführen und somit eine genauere und/oder sensitivere Bewertung der Anzahl von Partikeln vorzunehmen, z. B. durch häufigere Messung desselben Abschnitts der

Probe und durch Kombination der Ergebnisse, um das Verhältnis zwischen Signal und Rauschen zu verbessern, und/oder indem man mehr als einen Abschnitt der Probe misst, um die Gesamtanzahl an Partikeln zu erhöhen, die gezählt werden, so daß der Fehler in der Bewertung reduziert wird, da der Fehler bei der Zählung der Partikel normalerweise Zählstatistiken folgen wird, bei denen sich der relative Fehler üblicherweise ähnlich verhält wie die Quadratwurzel der Anzahl an gezählten Partikeln. Es ist jedoch ein charakteristisches Merkmal der vorliegenden Erfindung, daß ihr allgemeiner Charakter der Detektion auf einem relativ großen Probenvolumen basiert, wobei eine große Menge an Informationen geliefert wird, die es möglich macht, vorbestimmte statistische Standards auf der Basis von im wesentlichen einer Projektion zu erfüllen.

[0052] In einigen Ausführungsformen dieser Erfindung ist die Anzahl an Messungen, die durchgeführt wird, definiert durch eine Echtzeiteinschätzung der Anzahl von Partikeln, die bereits gezählt wurden, wodurch relativ betrachtet weniger Messungen durchgeführt werden, wenn die Probe eine große Anzahl an Partikeln enthält, und relativ betrachtet mehr Messungen durchgeführt werden, wenn die Probe eine geringe Anzahl an Partikeln enthält, vorzugsweise durch Definition eines ungefähren Grenzlimits für die Gesamtzahl gezählter Partikel, und zwar derart, daß eine geeignete Genauigkeit in der Messung erzielt wird.

[0053] Es ist möglich, die biologischen Partikel in einer relativ kurzen Zeit zu bewerten, wodurch ermöglicht wird, daß eine große Anzahl an Proben pro Stunde analysiert wird, oftmals mehr als 400, und sogar mehr als 1000 oder mehr. In vielen bevorzugten Ausführungsformen dieser Erfindung ist eine sogar noch größere Anzahl an Analysen pro Stunde erzielt worden, indem mehr als eine Meßeinheit eingeführt wird, wobei die Meßeinheiten parallel in einem einzigen Gerät arbeiten.

[0054] In vielen Ausführungsformen dieser Erfindung sind die Signale, die detektiert werden, eine Abschwächung elektromagnetischer Strahlung, beispielsweise verursacht durch Absorption oder Streuung, und in vielen bevorzugten Ausführungsformen dieser Erfindung werden die Signale, die detektiert werden, von den Partikeln oder Proben emittiert, beispielsweise durch Emission von Photolumineszenz (d.h. Fluoreszenz und/oder Phosphoreszenz) oder Raman-Streuung, und in anderen Ausführungsformen dieser Erfindung werden die Signale, die detektiert werden, durch Streuung verursacht.

[0055] Oftmals wird mehr als eines der zuvor erwähnten Signale gleichzeitig detektiert, wodurch eine genauere oder sensitivere Bewertung der Anzahl von Partikeln oder die Bewertung einer morphologischen Eigenschaft ermöglicht wird oder die Klassifizierung eines Partikels, das in der Probe anwesend ist, vorzugsweise unter Verwendung von mehr als einer Reihe von Detektorelementen.

[0056] Eine monochromatische Vorrichtung kann verwendet werden, um elektromagnetische Strahlung in eine oder mehrere Wellenlängenkomponenten zu separieren, bevor eine oder mehrere dieser Wellenlängenkomponenten auf die Probe übertragen werden, und zwar jeweils eine zu einem Zeitpunkt oder mehr als eine zu einem Zeitpunkt. Vorzugsweise werden, wenn mehr als eine Wellenlängenkomponente gleichzeitig auf die Probe übertragen wird, die Wellenlängenkomponenten auf unterschiedliche Abschnitte der Probe übertragen, so daß die Möglichkeit gegeben ist, sowohl qualitative als auch quantitative Informationen über Partikel in der Probe zu erhalten. Dies ist vor allem von Interesse, wenn die Probe Partikel enthält, die unterschiedlich auf unterschiedliche Wellenlängenkomponenten reagieren.

[0057] Licht, das auf die Probe geleitet wird, kann durch ein Fokussiersystem, bestehend aus einer oder mehreren Linsen, fokussiert werden. Die Wirkung eines solchen Fokussiersystems ist es oftmals, die Effizienz der Lichtquelle zu erhöhen. Als Lichtquelle kann eine thermische Lichtquelle wie eine Halogenlampe verwendet werden, oder eine Gaslampe wie eine Xenonlampe, eine lichtemittierende Diode, ein Laser oder eine Laserdioden. Oft wird es bevorzugt, mehr als eine Lichtquelle zu verwenden, um die Intensität des auf die Probe gelangenden Lichts zu erhöhen, beispielsweise durch Verwendung von zwei oder mehreren lichtemittierenden Dioden. Es ist auch möglich, mehr als eine Lichtquelle zu verwenden, wobei einige der Lichtquellen unterschiedliche elektromagnetische Eigenschaften aufweisen.

[0058] Eine monochromatische Vorrichtung kann verwendet werden, um elektromagnetische Strahlung, die von der Probe emittiert wurde oder durch die Probe hindurchgetreten ist, in eine oder mehrere Wellenlängenkomponenten zu separieren, bevor eine solche elektromagnetische Strahlung durch ein Detektorelement detektiert wird, sei es derart, daß eine Wellenlänge zu einem Zeitpunkt gemessen wird, oder derart, daß mehr als eine Wellenlängenkomponente zu einem Zeitpunkt gemessen wird. Dies ist besonders von Interesse, wenn die Probe Partikel enthält, die unterschiedlich auf unterschiedliche Wellenlängenkomponenten reagieren, beispielsweise wenn ein Partikel fähig ist, Photolumineszenz mit unterschiedlichen Eigenschaften, abhängig von der Natur des Partikels, zu emittieren. Diese Wirkung kann auch erzeugt werden durch Verwendung von mehr als einer Art von Lichtquelle, die unterschiedliche Wellenlängencharakteristika aufweisen, vorzugsweise in Kombination mit einer monochromatischen Vorrichtung.

[0059] In vielen bevorzugten Ausführungsformen dieser Erfindung wird elektromagnetische Strahlung, wie UV-Licht oder sichtbares Licht, auf die Probe geleitet, um die Photolumineszenz zu erhöhen, in einem Aufbau, bei dem die Lichtquelle, das Probenbehältnis und die Detektorelemente alle annähernd auf derselben Achse angeordnet sind, vorzugsweise einem Aufbau, bei dem das Probenbehältnis zwischen der Lichtquelle und den Detektorelementen angeordnet ist. Überraschenderweise wurde herausgefunden, daß es unter diesen Bedin-

gungen möglich war, im wesentlichen das gesamte Erregungslicht, das durch die Probe hindurchging, durch Verwendung von Filtern zu entfernen, selbst in einer Situation, als große Mengen an Energie für die Stimulation verwendet wurden. Weiterhin wurde in vielen bevorzugten Ausführungsformen dieser Erfindung herausgefunden, daß es möglich ist, die Effizienz der elektromagnetischen Strahlung, die für die Erregung verwendet wird, zu erhöhen, indem eine reflektierende Vorrichtung zwischen dem Probenbehältnis und dem Detektor angeordnet wird, die zumindest einen Teil der Energie, die durch das Probenbehältnis hindurchgeht, wieder zurück in das Probenbehältnis reflektiert, wobei vorzugsweise zumindest eine der Oberflächen, die das Probenbehältnis definieren, reflektierend ausgebildet ist, wobei vorzugsweise diese reflektierende Vorrichtung derart ist, daß sie unterschiedliche Reflexionseigenschaften bei unterschiedlichen Wellenlängen aufweist, vorzugsweise so, daß sie im wesentlichen transparent für ein Photolumineszenzsignal ist. Eine solche Reflektiervorrichtung ist ein dichroitischer Spiegel.

[0060] Oftmals ist es bevorzugt, eine oder mehrere bildverarbeitende Techniken des Standes der Technik zu verwenden, wie die zweidimensionale Filterung oder Bildidentifikation, um die Anzahl an Partikeln oder eine morphologische Eigenschaft eines Partikels zu bewerten.

[0061] Wie oben erwähnt ist es ein spezielles Merkmal der Erfindung, daß im Verhältnis zu traditionellen Mikroskopiermethoden die Vergrößerung relativ klein bis sehr klein ist. Somit ist es oftmals bevorzugt, daß die räumliche Abbildung, die auf die Anordnung von Detektorelementen projiziert wird, einer solchen linearen Vergrößerung unterworfen wird, daß das Verhältnis der Abbildung einer linearen Ausdehnung auf der Anordnung der Detektorelemente im Verhältnis zur originalen linearen Ausdehnung im Volumen kleiner ist als 6:1 oder sogar kleiner als 4:1.

[0062] Die Vergrößerung ist in geeigneter Weise angepaßt an die Größe der Partikel, die bestimmt werden sollen. Wenn also die Partikel, deren Parameter bestimmt werden sollen, von einer Größe von zwischen $1/3\ \mu\text{m}$ bis $3\ \mu\text{m}$ sind, liegt das oben erwähnte Verhältnis vorzugsweise im Bereich zwischen 10:1 und 1:10. In den meisten Ausführungsformen, die in der Praxis exzellente Ergebnisse geliefert haben, liegt das Verhältnis im Bereich zwischen 6:1 und 2:1.

[0063] Wenn die Partikel, deren Parameter bewertet werden sollen, eine Größe von zwischen $3\ \mu\text{m}$ und $100\ \mu\text{m}$ aufweisen, liegt das oben erwähnte Verhältnis normalerweise im Bereich zwischen 3:1 und 1:100, vorzugsweise im Bereich zwischen 2:1 und 1:100. In vielen praktischen Ausführungsformen wird das Verhältnis im Bereich zwischen 2:1 und 1:2 liegen. Es kann interessant sein, insbesondere bei kleinen Hochpräzisionsdetektorelementen, mit sehr kleinen Verhältnissen zu arbeiten, die im Bereich zwischen 14:1 und 1:100, z. B. im Bereich zwischen 1:1 und 1:100 liegen.

[0064] Oftmals ist es bevorzugt, daß die individuellen Partikel, deren Parameter bewertet werden sollen, auf höchstens 25 Detektorelemente abgebildet werden, insbesondere auf höchstens 16 Detektorelemente und noch mehr bevorzugt auf höchstens 9 Detektorelemente. Es ist noch mehr bevorzugt, daß die individuellen Partikel, deren Parameter bewertet werden sollen, auf höchstens 5 Detektorelemente abgebildet werden, oder sogar auf höchstens 1 Detektorelement. Eine größere Anzahl von Elementen pro Partikel wird mehr Informationen über die individuellen Partikel liefern, während eine kleinere Anzahl an Elementen pro Partikel die Gesamtanzahl an Zählungen erhöht, die bei einer Projektion gemacht werden können.

[0065] Wie oben erwähnt ist es eines der charakteristischen Merkmale der vorliegenden Erfindung, daß ein relativ großes Probenvolumen auf die Detektoranordnung projiziert werden kann. Die Probe ist im Inneren des Probenbehältnisses beinhaltet, welches normalerweise eine durchschnittliche Dicke zwischen $20\ \mu\text{m}$ und $2000\ \mu\text{m}$ besitzt, üblicherweise zwischen $20\ \mu\text{m}$ und $1000\ \mu\text{m}$ und in vielen praktischen Ausführungsformen zwischen $20\ \mu\text{m}$ und $200\ \mu\text{m}$. Normalerweise weist das Probenbehältnis in einer Richtung, die im wesentlichen parallel zur Anordnung der Detektorelemente ist, Abmessungen im Bereich zwischen $1\ \text{mm}$ mal $1\ \text{mm}$ und $10\ \text{mm}$ mal $10\ \text{mm}$ auf, aber es ist klar, daß abhängig vom Design das Behältnis auch größer und in einigen Fällen kleiner sein kann.

[0066] Das Volumen der flüssigen Probe, von der die elektromagnetische Strahlung auf die Anordnung projiziert wird, liegt normalerweise im Bereich zwischen $0.01\ \mu\text{l}$ und $20\ \mu\text{l}$. Wenn die Partikel, deren Parameter bestimmt werden sollen, von einer Größe von zwischen $1/3\ \mu\text{m}$ bis $3\ \mu\text{m}$ sind, liegt das Volumen der flüssigen Probe, von dem elektromagnetische Strahlung auf die Anordnung projiziert wird, normalerweise im Bereich zwischen $0.01\ \mu\text{l}$ und $1\ \mu\text{l}$. Wenn die Partikel, deren Parameter bewertet werden sollen, von einer Größe von zwischen $3\ \mu\text{m}$ und $100\ \mu\text{m}$ sind, liegt das Volumen der flüssigen Probe, von dem die elektromagnetische Strahlung auf die Anordnung projiziert wird, normalerweise im Bereich zwischen $0.04\ \mu\text{l}$ und $4\ \mu\text{l}$.

[0067] Wenn zumindest ein großer Teil der elektromagnetischen Strahlung, die von der Probe während der Projektion emittiert wird, von elektromagnetischer Strahlung stammt oder durch diese verursacht wird, die der Probe von einer Lichtquelle zugeführt wird, ist es hochgradig bevorzugt, daß zumindest ein großer Teil der Strahlung von der Lichtquelle eine Richtung aufweist, die senkrecht zur Wand des Probenbehältnisses oder einer Ebene, die hierdurch definiert wird, orientiert ist, wie z. B. im wesentlichen senkrecht zur Ebene, die durch den Ursprungsbereich definiert wird (oder eine gekrümmte Ebene, wenn die Wand des Behältnisses gebogen ist), oder zwischen senkrecht und $10\ \text{Grad}$, bevorzugt zwischen senkrecht und $20\ \text{Grad}$, mehr bevorzugt zwi-

schen senkrecht und 30 Grad und noch mehr bevorzugt zwischen senkrecht und 45 Grad. Dies ist der Gegensatz zu dem Fall, bei dem die Strahlung von einer Kante parallel zur Ebene des Probenbehältnisses eintritt, was als hochgradig unvorteilhaft angesehen wird, da dies für viele Arten von Proben eine ausreichende Beleuchtung lediglich eines kleinen Randteils der Probe liefert.

[0068] Wie oben erwähnt ist die Größe des Volumens in geeigneter Weise angepaßt an die gewünschte statistische Qualität der Bestimmung. Wo also die Bestimmung eine Bestimmung der Anzahl von Partikeln in einem Volumen ist, oder eine Bestimmung der Größe und/oder der Form von Partikeln, wird die Größe des Volumens der flüssigen Probe bevorzugt ausreichend groß sein, um darin eine Identifizierung von zumindest zwei der biologischen Partikel zu ermöglichen. Mehr bevorzugt wird die Größe des Volumens der flüssigen Probe ausreichend groß sein, um darin eine Identifizierung von zumindest vier der biologischen Partikel zu ermöglichen. Dies wird in Beziehung stehen mit einem Wiederholungsfehler von etwa 50%. Noch mehr bevorzugt ist die Größe des Volumens der flüssigen Probe ausreichend groß, um darin eine Identifizierung von zumindest zehn der biologischen Partikel zu ermöglichen. Dies wird korrespondieren mit einem Wiederholungsfehler von etwa 33%. Noch mehr bevorzugt ist die Größe des Volumens der flüssigen Probe ausreichend groß, um darin eine Identifizierung von zumindest 50 der biologischen Partikel zu ermöglichen. Dies wird mit einem Wiederholungsfehler von etwa 14% korrespondieren. Offensichtlich ist es, wo immer möglich, bevorzugt, nach Bedingungen zu streben, bei denen die Größe des Volumens eine Identifizierung einer sogar noch größeren Anzahl ermöglicht. Wenn also die Größe des Volumens der flüssigen Probe ausreichend groß ist, um darin eine Identifizierung von zumindest 100 der biologischen Partikel zu ermöglichen, wird dies mit einem Wiederholungsfehler von etwa 10% korrespondieren, wenn die Größe des Volumens der flüssigen Probe ausreichend groß ist, um darin eine Identifizierung von zumindest 1000 der biologischen Partikel zu ermöglichen, wird dies mit einem Wiederholungsfehler von etwa geringen 3% korrespondieren.

[0069] Wie oben erwähnt stammt das Signal, das durch die Detektorelemente detektiert wird, von einer oder mehreren Arten von Molekülen, die zu den Arten gehören, welche sich mit biologischen Partikeln verbinden, in diesen eingeschlossen sind oder mit diesen Wechselwirken, wobei solche Moleküle der Probe oder den vor oder während der Projektion isolierten Partikeln beigelegt werden, wobei die Moleküle derart sind, daß sie eines oder mehrere der folgenden Phänomene verstärken: Abschwächung elektromagnetischer Strahlung, Photolumineszenz, wenn mit elektromagnetischer Strahlung beleuchtet, Streuung elektromagnetischer Strahlung, Raman-Streuung. In der derzeit am meisten bevorzugten Ausführungsform wird eine effektive Menge von einem oder mehreren Nukleinsäurefarbstoffen und/oder von einem oder mehreren potentiometrischen Membranfarbstoffen beigelegt.

[0070] Die Dauer der Belichtung liegt normalerweise im Bereich zwischen 100 ms und 5 s, vor allem im Bereich zwischen 0.5 bis 3 s. Die Belichtung/Projektion kann als eine Vielzahl an Belichtungen durchgeführt werden, bevor die Intensitäten, die durch die Detektorelemente detektiert werden, weiterverarbeitet werden, aber es ist normalerweise bevorzugt, daß die Projektion als eine Einzelprojektion durchgeführt wird.

[0071] Eine Anzahl von Ausführungsformen und Varianten der Erfindung wird aus den Figuren und Beispielen deutlich, die weiter unten folgen, und auch aus der folgenden detaillierten Beschreibung der Ausführungsformen.

[0072] Unter Betrachtung dieser und anderer Ziele, die einem Fachmann klar werden, wenn die Beschreibung fortschreitet, liegt die Erfindung in der neuartigen Konstruktion, Kombination und Anordnung von Teilen und einem Verfahren, wie sie im wesentlichen hiernach beschrieben und insbesondere durch die beigelegten Ansprüche definiert sind, wobei es klar ist, daß Veränderungen in den genauen Ausführungsformen der hier offenbarten Erfindung innerhalb des Schutzbereichs der Ansprüche liegen sollen.

[0073] Eine Ausführungsform der Erfindung betrifft ein Verfahren zur Kompression von Intensitätsinformationen, die unterschiedliche Objekte repräsentieren, die über einen Bereich verteilt sind, wobei ein Objekt durch eine Veränderung in der Intensitätsinformation repräsentiert wird.

[0074] Die Information existiert in Form von variierenden Niveaus meßbarer Intensitäten einer physikalischen Eigenschaft, die über einen bestimmten Bereich verteilt ist, der wiederum in Unterbereiche unterteilt ist, wobei jeder dieser Unterbereiche eine Kennzeichnung aufweist, die diesen Unterbereich eindeutig identifiziert. Gemäß der Erfindung liefert das Verfahren eine Bestimmung der Intensität der physikalischen Eigenschaft.

[0075] Ein solches Verfahren der Bestimmung der Intensität der physikalischen Eigenschaft könnte ein Auslesen des elektrischen Signals einer Anordnung von Detektorelementen, wie CCD-Elementen, sein, auf die elektromagnetische Strahlung projiziert wird, die von den über einen Bereich verstreuten Objekten ausgestrahlt wird. Ein weiteres solches Verfahren könnte eine Belichtung eines photographischen Films mit elektromagnetischer Strahlung sein, die von den über einen Bereich verstreuten Objekten ausgestrahlt wird, wodurch ein "Bild" der Intensität der physikalischen Eigenschaft erzeugt wird, welches dann in einer solchen Weise digitalisiert werden könnte, daß z. B. eine Zahl einem abgetrennten Intervall von Intensitäten zugeordnet wird, repräsentiert durch z. B. eine Grauskala im "Bild".

[0076] Wenn eine Bestimmung der Intensität durchgeführt wurde, könnte die Kompression folgendermaßen durchgeführt werden:

- a) Definieren eines Unterbereichs von Interesse, der angeordnet ist in einer Gruppe von mindestens 2×2 Unterbereichen, die angrenzend aneinander angeordnet sind,
- b) Berechnen von zumindest einer Richtungsableitung der meßbaren Intensität in dem Unterbereich von Interesse unter Berücksichtigung der vorbestimmten geometrischen Richtungen) in der Ebene des bestimmten Bereichs, wobei die Richtungsableitungen) basieren auf den meßbaren Intensitäten in den Unterbereichen, die an die Gruppe von Unterbereichen angrenzen oder in deren Nachbarschaft liegen,
- c) basierend auf der Berechnung der zumindest einen Richtungsableitung wird ein Attribut diesem Wert zugewiesen, der dem Unterbereich von Interesse zugeordnet ist; das Attribut repräsentiert eine abgegliche meßbare Intensität und/oder Informationen betreffend eine vorbestimmte Strategie zur Abgleichung der meßbaren Intensität in dem Unterbereich von Interesse oder in Unterbereichen, die an diesen Unterbereich angrenzen oder in seiner Nachbarschaft liegen.

[0077] Die Schritte a) – c) können für im wesentlichen alle Unterbereiche des abgegrenzten Bereichs durchgeführt werden.

[0078] Die Berechnung der Richtungsableitungen wird verwendet, um anzuzeigen, wo sich der Mittelpunkt des Objekts relativ zum abgegrenzten Bereich befindet, und um eine Messung zu liefern, welchem der Unterbereiche in dem abgegrenzten Bereich Informationen von benachbarten Unterbereichen zugeordnet werden sollen. Solche Informationen könnten Intensitätsinformationen sein.

[0079] Die Schritte a) – c) können nachfolgend für einige der Unterbereiche wiederholt werden, oder auch für alle Unterbereiche.

[0080] Die Verwendung des Attributs ermöglicht die Speicherung von Informationen über die Unterbereiche von Interesse, so daß ein elliptisches, hyperbolisches und/oder parabolisches Verfahren (in einem mathematischen Verständnis) als Strategie zur Verteilung von Intensitätsinformation von einigen Unterbereichen zu ausgewählten Unterbereichen in dem abgegrenzten Bereich verwendet werden kann, wobei die Anzahl ausgewählter Unterbereiche niedriger ist als die Anzahl der Unterbereiche, die in dem abgegrenzten Bereich enthalten sind.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0081] **Fig. 1** zeigt eine Ausführungsform dieser Erfindung, besonders geeignet für die Bewertung von Partikeln unter Verwendung von Fluoreszenz.

[0082] **Fig. 2** zeigt die Wirkung der Variation der anfänglichen Konzentration des Fluoreszenzfarbstoffs.

[0083] **Fig. 3** zeigt die mögliche Entfernung eines systematischen Fehlers durch Subtraktion gemessener Signale.

[0084] **Fig. 4** zeigt eine optische Anordnung, die ein Sammeln von Signalen mit einem Sammelwinkel von etwa 40 Grad ermöglicht.

[0085] **Fig. 5** zeigt eine optische Anordnung, die ein Sammeln von Signalen mit einem Sammelwinkel von etwa 70 Grad ermöglicht.

[0086] **Fig. 6** zeigt Komponenten, die für das Flußsystem verwendet werden.

[0087] **Fig. 7** zeigt eine entsorgbare Meß- und Probenentnahmezelle für die Bewertung der Anzahl somatischer Zellen in einem Milchvolumen.

[0088] **Fig. 8** zeigt eine Gerätschaft zur Bewertung der Anzahl somatischer Zellen in einem Milchvolumen.

[0089] **Fig. 9** ist ein Graph der Bewertung der Anzahl somatischer Zellen in 1 µl Milch, aufgetragen über die Ergebnisse, die durch ein FossoMatic Routine-Instrument erhalten werden.

[0090] **Fig. 10** ist ein Graph der Anzahl gezählter Objekte in einer Milchprobe, aufgetragen über die Konzentration des Fluorochroms.

[0091] **Fig. 11** zeigt den Effekt der Verarbeitung einer zweidimensionalen Abbildung.

[0092] **Fig. 12** zeigt die Darstellungen von Intensitäten in der Messung von Bakterien in einer wässrigen Probe.

Detaillierte Beschreibung der Ausführungsformen

[0093] Auch wenn eine Anzahl bevorzugter Ausführungsformen oben beschrieben wurde, kann die vorliegende Erfindung auf viele verschiedene Arten durchgeführt und verwendet werden. Im folgenden wird eine Anzahl von Maßnahmen und Details diskutiert, die für die Erfindung relevant sind, umfassend sowohl bevorzugte Ausführungsformen als auch Ausführungsformen, die Möglichkeiten zur Durchführung der Erfindung zeigen.

[0094] In der vorliegenden Beschreibung und den Ansprüchen bezeichnet der Begriff "biologisches Partikel" ein Partikel, das von lebender Materie stammt oder darin gefunden wird, wie somatischen Zellen, roten Blutzellen, Blutplättchen, Bakterien, Hefezellen, Fragmenten von Zellen, Lipidtropfen, Proteinmizellen, Plankton, Algen oder Teilen davon.

[0095] In der vorliegenden Beschreibung und den Ansprüchen bezeichnet der Begriff "biologisches Probenmaterial" ein flüssiges Probenmaterial von oftmals biologischem Ursprung, oder Material, in dem biologische Partikel gefunden werden können, wie: Proben menschlichen Ursprungs, Proben tierischen Ursprungs, Trinkwasser, Schmutzwasser, Verarbeitungswasser, Meerwasser, Seewasser, Flußwasser, Grundwasser, Nahrungsmittel, Futtermittel oder Komponenten von Nahrungsmitteln und Futtermitteln, Milch oder ein Milchprodukt, Blut oder ein Blutprodukt, Urin, Kot, Speichel, Proben einer Entzündung, Proben aus der petrochemischen Industrie, Proben aus der pharmazeutischen Industrie, Proben aus der Nahrungsmittel- oder Futtermittelindustrie, oder ein Produkt daraus.

[0096] Das Verfahren ermöglicht es, eine Probe aus dem Probenmaterial zu analysieren, wenn in der Probe praktisch alle Komponenten des Probenmaterials während der Messung, auf der die Bewertung basiert, vorhanden sind. Dies ist oftmals praktisch, wenn das flüssige Probenmaterial ein biologisches Probenmaterial ist, da es oft mit beträchtlichen Schwierigkeiten verbunden ist, selektiv eine, mehrere, oder im wesentlichen alle Komponenten von einer Probe eines Probenmaterials vor der Analyse zu entfernen.

Detektoranordnung

[0097] Die Anordnung von Detektorelementen kann derart angeordnet sein, daß die Elemente eine im wesentlichen gerade Reihe bilden. Bei Verwendung einer großen Anzahl an Detektorelementen können sie in zwei Richtungen derart angeordnet sein, daß die Detektorelemente eine Reihe von im wesentlichen parallelen geraden Reihen bilden, und oftmals ist die Anordnung von Detektorelementen in einer Ebene angeordnet. Diese Ebene der Detektorelemente ist oftmals parallel zu einer inneren Grenze des Probenbehältnisses angeordnet.

Signalkonditionierung – Hardware

[0098] Das Signal, das von den Detektorelementen detektiert wird, ist normalerweise eine elektromagnetische Strahlung, und es ist daher zu bevorzugen, Verfahren zu haben, die diese Signale in ein meßbares Signal wie Spannung oder elektrischen Strom umwandeln. Viele solcher Signale besitzen ein sich veränderndes Hintergrundsignal, oder einen systematischen Fehler, und es ist daher zu bevorzugen, Verfahren zu haben, die diese Effekte zumindest teilweise eliminieren können. Dies kann oft erreicht werden durch Verwendung eines Signals in einem oder mehreren benachbarten Detektorelementen als Referenz.

[0099] Eine weitere nützliche Methode ist eine, bei der jede variierende Intensität des Detektorelements abgeglichen wird, vorzugsweise unter Verwendung von Ergebnissen von einer oder mehreren früheren Messungen.

[0100] Anordnungen von Detektorelementen weisen oftmals eine große Anzahl an Detektorelementen auf, und es kann daher vorteilhaft sein, die Anzahl von gemessenen Signalen vor der Bewertung zu reduzieren, vorzugsweise ohne Verlust von jeglicher relevanter Information. Ein solches Verfahren ist es, die Signale von mehreren Detektorelementen zu einem Signal zu verbinden, beispielsweise durch Verbindung von 2, vielleicht mehr als 2 und sogar mehr als 8 oder 16 oder 32 oder noch mehr Signalen in einem Signal.

[0101] In einigen Situationen, d.h. bei einer Analog zu Digital-Wandlung, könnte es auch von Interesse sein, das Niveau von 2, vorzugsweise 3, mehr bevorzugt 4, mehr bevorzugt 5, mehr bevorzugt 6, mehr bevorzugt 7, mehr bevorzugt 8, mehr bevorzugt mehr als 8, getrennten Ausgangskanälen derart einzustellen, daß einer, vorzugsweise mehr als einer, der Ausgangskanäle ein im wesentlichen anderes Niveau als die anderen Ausgangskanäle aufweist, wobei die Identifizierung davon, welcher der Ausgangskanäle, oder welche Kombination von diesen, im wesentlichen ein unterschiedliches Ausgangsniveau aufweist, verbunden ist mit der Intensität des Signals.

[0102] Für die Analyse jedes gemessenen Signals ist es oft notwendig, das Signal zu digitalisieren, und zwar derart, daß eine vorgegebene Intensität jedes Signals in eine digitale Darstellung transformiert wird. Dies kann durchgeführt werden, indem man eine Reihe von Kanälen hat, wobei die Information darüber, welcher dieser Kanäle ein Signal aufweist, das sich von den anderen Kanälen unterscheidet, die Intensität bestimmt, oder indem man mehr als einen dieser Kanäle hat, die eine Kombination bilden, vorzugsweise ähnlich zu einer binären Darstellung.

Fokussierung – Linsen

[0103] Signale von zumindest einem Teil der Probe werden auf die Anordnung von Detektorelementen unter Verwendung eines Fokussiermittels fokussiert, vorzugsweise unter Verwendung einer Linse, mehr bevorzugt unter Verwendung von zwei Linsen, mehr bevorzugt unter Verwendung von mehr als zwei Linsen. Die Anzahl an Linsen, die für das Fokussiersystem verwendet wird, kann die Komplexität des Meßsystems beeinflussen. Ein System mit zwei oder mehr Linsen wird normalerweise bevorzugt, während ein System mit lediglich zwei

oder nur einer Linse andere Vorteile liefert.

Anpassungsfähige Fokussierung

[0104] Die Fokussierung eines Signals von der Probe auf einen beliebigen Detektor hängt ab von der Position der Probe relativ zum Detektor. Wenn die Konstruktion eines Meßsystems derart ist, daß die relative Position der Probe und jedes Detektors variieren kann, entsteht ein Vorteil darin, daß es möglich ist, die Fokussierung des Systems einzustellen. Dies kann oft erreicht werden, indem zuerst mindestens eine Messung jedes Signals von der Probe gemacht wird und anschließend auf dieser Basis die Fokussierung des Systems eingestellt wird. Dieses Verfahren kann einige Male wiederholt werden, um eine akzeptable Fokussierung zu erhalten. Auf dieselbe Weise wird die Fokussierung des Signals von der Probe oder dem Probenmaterial eingestellt, wobei das Ausmaß der Einstellung vorzugsweise durch zumindest eine Messung eines Signals von der Probe bestimmt wird.

Fokussierung – Vergrößerung

[0105] Um die Menge elektromagnetischer Strahlung, die durch ein Detektorelement detektiert wird, zu erhöhen, ist es oftmals bevorzugt, eine oder mehrere Linsen für die Fokussierung des Signals von der Probe auf die Anordnung von Detektorelementen zu verwenden. Die Vergrößerung einer solchen Fokussierung kann sich von 1:1 unterscheiden, abhängig vom Set-up der anderen Komponenten des Systems, oder von den Partikeln oder dem verwendeten Probenmaterial. Beispielsweise kann eine Vergrößerung praktisch sein, wenn morphologische Eigenschaften eines Partikels bewertet werden sollen.

[0106] In Situationen, bei denen die Partikel relativ klein sind, kann das Verhältnis zwischen der Größe eines biologischen Partikels und der Größe der Abbildung des biologischen Partikels auf der Anordnung der Detektorelemente weniger als 1:1 und höher als 1:4 sein, bevorzugt weniger als 1:1 und höher als 1:2.

Fokussierung – 1:1

[0107] Wenn die fraglichen Partikel Abmessungen aufweisen, die vergleichbar zur Größe eines Detektorelements sind, ist es oftmals bevorzugt, eine Vergrößerung von etwa 1:1 zu haben, wodurch die Abbildung jedes Partikels auf ein beliebiges oder lediglich wenige Detektorelemente fokussiert wird. Dies kann unter bestimmten Bedingungen eine bevorzugte Detektion jedes Signals liefern.

[0108] In diesen Situationen ist es bevorzugt, daß das Verhältnis zwischen der Größe eines biologischen Partikels und der Größe der Abbildung des biologischen Partikels auf der Anordnung von Detektorelementen im Intervall zwischen 5/10 und 20/10 liegt, vorzugsweise im Intervall zwischen 6/10 und 18/10, mehr bevorzugt im Intervall zwischen 7/10 und 16/10, mehr bevorzugt im Intervall zwischen 8/10 und 14/10, mehr bevorzugt im Intervall zwischen 9/10 und 12/10, mehr bevorzugt im wesentlichen gleich 10/10.

Fokussierung – Verkleinerung

[0109] Wenn man Partikel analysiert, die Abmessungen aufweisen, die vergleichbar mit oder größer als diejenigen der verwendeten Detektorelemente sind, ist es oftmals vorteilhaft, die Größe der Abbildung eines solchen Partikels zu verringern, und zwar bis zu einem Grad, bei dem die Größe der Abbildung vergleichbar ist mit der Größe eines Detektorelements.

Fokussierung – Längenverhältnis

[0110] Es wurde überraschenderweise herausgefunden, daß das Längenverhältnis (Verhältnis Bildbreite zu Bildhöhe) einer Abbildung auf der Anordnung von Detektorelementen beträchtlich verzerrt werden kann, ohne daß irgendein beträchtlicher negativer Effekt bei der Bewertung von Partikeln auftritt. In einer solchen Situation ist es bevorzugt, daß das Verhältnis der kürzeren zu der längeren der beiden Abmessungen der Abbildung eines biologischen Partikels auf der Anordnung von Detektorelementen im wesentlichen 1 oder geringer, vorzugsweise 1/2 oder geringer, mehr bevorzugt 1/4 oder geringer, mehr bevorzugt 1/10 oder geringer, mehr bevorzugt 1/50 oder geringer, mehr bevorzugt 1/100 oder geringer, mehr bevorzugt 1/200 oder geringer, relativ zum Verhältnis der entsprechenden Abmessungen des biologischen Partikels ist. In einer solchen Situation ist das Verhältnis der kürzeren zu der längeren der beiden Abmessungen der Abbildung eines biologischen Partikels auf der Anordnung von Detektorelementen bei bestimmten Rahmenbedingungen innerhalb der Fläche, die durch die Anordnung von Detektorelementen aufgespannt wird, im wesentlichen nicht identisch.

Fokussierung – Sammelwinkel

[0111] Der Sammelwinkel einer Fokussieranordnung kann Auswirkungen auf die Intensität jedes Signals haben, das auf der Anordnung von Detektorelementen gesammelt wird. Wenn eine hohe Sensitivität benötigt wird, ist es daher praktisch, den Sammelwinkel zu erhöhen. Die bevorzugte Größe des Sammelwinkels kann auch durch andere Anforderungen bestimmt werden, die von dem System vorgegeben werden, beispielsweise durch die Fokussiertiefe. In diesen Situationen beträgt der Sammelwinkel des Fokussiermittels **15 Grad** oder weniger, vorzugsweise mehr als 15 Grad, mehr bevorzugt mehr als 30 Grad, mehr bevorzugt mehr als 60 Grad, mehr bevorzugt mehr als 90 Grad, mehr bevorzugt mehr als 120 Grad, mehr bevorzugt mehr als 150 Grad.

Detektorelement – Größe.

[0112] Die Größe der Detektorelemente bestimmt zu einem gewissen Grad ihre Sensitivität. In einigen Anwendungen ist es daher von Interesse, Detektorelemente mit einer Größe von etwa $1 \mu\text{m}^2$ oder weniger zu haben. In bestimmten Situationen ist die Größe von Detektorelementen in der Anordnung der Detektorelemente kleiner als $20 \mu\text{m}^2$, vorzugsweise kleiner als $10 \mu\text{m}^2$, mehr bevorzugt kleiner als $5 \mu\text{m}^2$, mehr bevorzugt kleiner als $2 \mu\text{m}^2$, mehr bevorzugt kleiner oder gleich $1 \mu\text{m}^2$. In anderen Situationen ist die Größe der Detektorelemente in der Anordnung von Detektorelementen größer oder gleich $5000 \mu\text{m}^2$, vorzugsweise größer oder gleich $2000 \mu\text{m}^2$, mehr bevorzugt größer oder gleich $1000 \mu\text{m}^2$, mehr bevorzugt größer oder gleich $500 \mu\text{m}^2$, mehr bevorzugt größer oder gleich $200 \mu\text{m}^2$, mehr bevorzugt größer oder gleich 100 und kleiner als $200 \mu\text{m}^2$, mehr bevorzugt größer oder gleich 50 und kleiner als $100 \mu\text{m}^2$, mehr bevorzugt größer oder gleich 20 und kleiner als $50 \mu\text{m}^2$.

Detektorelement – Längenverhältnis

[0113] Das Längenverhältnis der Detektorelemente kann wichtig sein für das Sammeln von Signalen für die Bewertung von Partikeln. Ein Verhältnis von etwa 1/1 ist manchmal bevorzugt, aber unter bestimmten Bedingungen kann es bevorzugt sein, ein anderes Verhältnis als 1/1 zu verwenden, vor allem, wenn dies eine Detektion von Signalen von einem größeren Volumen einer beliebigen Probe ermöglicht, wodurch eine gleichzeitige Bewertung von mehreren Partikeln gewährleistet wird. Unter diesen Umständen ist das Verhältnis zwischen der kürzeren Höhe oder Breite zur längeren Höhe oder Breite der Detektorelemente in der Anordnung von Detektorelementen im wesentlichen gleich oder kleiner als 1, vorzugsweise kleiner als 1/2, mehr bevorzugt kleiner als 1/4, mehr bevorzugt kleiner als 1/10, mehr bevorzugt kleiner als 1/50, mehr bevorzugt kleiner als 1/100, mehr bevorzugt kleiner als 1/200.

Speicherkapazität

[0114] Speicherkapazität, z. B. verwendet für die Speicherung von Informationen über gemessene Signale der Detektorelemente, ist oft eine der Komponenten, die eine beträchtliche Auswirkung auf die Kosten der Herstellung besitzen. Es ist daher von Interesse, in der Lage zu sein, die Bewertung von Partikeln ohne beträchtlich hohe Verwendung einer solchen Speicherkapazität durchzuführen, so daß die Bewertung biologischer Partikel in einer Probe ohne die Verwendung einer beträchtlichen Speicherkapazitätsvorrichtung durchgeführt werden kann, die verwendet wird, um gemessene Signale von den Detektorelementen in der Anordnung von Detektorelementen zu speichern.

[0115] Andererseits ist es oft schwierig, eine Bewertung ohne Verwendung jeglicher Speicherkapazität durchzuführen, aber vorzugsweise sollte die Menge einer solchen Speicherkapazität nicht größer sein als wirklich notwendig, um die Informationen von allen gemessenen Detektorelementen zu speichern, wobei vorzugsweise lediglich ein Teil der Informationen gespeichert werden kann.

[0116] In einigen Situationen wird das von den Detektorelementen in der Anordnung von Detektorelementen gemessene Signal durch eine Speicherkapazität gespeichert, wobei die Speicherkapazität in der Lage ist, eine Anzahl von Messungen zu speichern, die der Anzahl an Detektorelementen entspricht oder kleiner als diese ist, vorzugsweise kleiner als 1/2 mal die Anzahl von Detektorelementen, mehr bevorzugt kleiner als 1/4, mehr bevorzugt kleiner als 1/8, mehr bevorzugt kleiner als 1/16, mehr bevorzugt kleiner als 1/32, mehr bevorzugt kleiner als 1/64, mehr bevorzugt kleiner als 1/128, mehr bevorzugt kleiner als 1/256, mehr bevorzugt kleiner als 1/512, mehr bevorzugt kleiner als 1/1024 mal die Anzahl an Detektorelementen in der Anordnung von Detektorelementen.

[0117] Unter bestimmten anderen Umständen ist es vorteilhaft, daß das gemessene Signal von den Detektorelementen in der Anordnung der Detektorelemente durch eine Speicherkapazität gespeichert wird, wobei diese in der Lage ist, eine Anzahl an Messungen zu speichern, die größer ist als die Anzahl an Detektorelementen, vorzugsweise gleich oder größer als 2 mal die Anzahl an Detektorelementen, mehr bevorzugt gleich

oder größer als 4 mal, mehr bevorzugt gleich oder größer als 8 mal, mehr bevorzugt gleich oder größer als 16 mal, mehr bevorzugt gleich oder größer als 32 mal, mehr bevorzugt gleich oder größer als 64 mal, mehr bevorzugt gleich oder größer als 128 mal, mehr bevorzugt gleich oder größer als 256 mal, mehr bevorzugt gleich oder größer als 512 mal, mehr bevorzugt gleich oder größer 1024 mal die Anzahl an Detektorelementen in der Anordnung von Detektorelementen.

[0118] Andere, kompliziertere Aspekte bei der Bewertung von Partikeln können die Verwendung einer beträchtlichen Menge an Speicherkapazität erfordern. In diesem Zusammenhang kann es daher notwendig sein, eine Speicherkapazität zu besitzen, die mehr Informationen speichern kann, als in einer Messung von den Detektorelementen gesammelt werden.

Probenbehältnis

[0119] Ein Probenbehältnis, das die zu analysierende Probe enthält, nimmt vorzugsweise so viel Probenvolumen wie möglich auf, und zwar auf eine Weise, so daß dieses auf die Anordnung von Detektorelementen projiziert wird, wodurch die Analyse von vielen Partikeln gleichzeitig gewährleistet wird. Ein Verfahren hierfür ist, die Dicke des Probenbehältnisses in einer Richtung zu definieren, die nicht parallel zur Ebene der Detektorelemente ist, wodurch das effektive Volumen pro Bereich des Probenbehältnisses erhöht wird, das auf die Detektorelemente projiziert wird. Die optimale Dicke wird oft durch eine beliebige effektive Fokussiertiefe eines Fokussiersystems bestimmt.

[0120] In solchen Fällen begrenzt das Probenbehältnis die Abmessungen der Probe in der Richtung, die im wesentlichen nicht parallel zur Ebene der Anordnung von Detektorelementen ist, und zwar auf eine Dicke von 20 µm oder weniger, vorzugsweise mehr als 20 µm, mehr bevorzugt mehr als 40 µm, mehr bevorzugt mehr als 60 µm, mehr bevorzugt mehr als 80 µm, mehr bevorzugt mehr als 100 µm, mehr bevorzugt mehr als 140 µm, mehr bevorzugt mehr als 180 µm, mehr bevorzugt mehr als 250 µm, mehr bevorzugt mehr als 500 µm, mehr bevorzugt mehr als 1000 µm.

[0121] Auf ähnliche Weise ist es vorteilhaft, das Fenster des Probenbehältnisses in einer Richtung parallel zur Anordnung von Detektorelementen auszudehnen, wodurch der effektive Bereich der Probe, der auf die Anordnung von Detektorelementen projiziert wird, erhöht wird.

[0122] Für einige dieser Anwendungen ist die Länge der Abmessung 1 mm oder mehr, vorzugsweise 2 mm oder mehr, mehr bevorzugt 4 mm oder mehr, mehr bevorzugt 10 mm oder mehr, mehr bevorzugt 20 mm oder mehr, mehr bevorzugt 40 mm oder mehr, mehr bevorzugt 100 mm oder mehr, mehr bevorzugt 200 mm oder mehr, mehr bevorzugt 400 mm oder mehr.

[0123] Für einige Anwendungen wird ein schlauchförmiges Probenbehältnis verwendet, wobei es auch möglich ist, die Anzahl an Partikeln, die gleichzeitig analysiert werden, zu erhöhen, indem der Radius eines solchen schlauchförmigen Probenbehältnisses erhöht wird. Der ideale Radius eines solchen Probenbehältnisses wird oft bestimmt durch die Anordnung der verschiedenen Komponenten des Systems, etwa durch die Fokussiertiefe. Der Schlauch kann unter diesen Umständen einen inneren Radius von mehr als 0.01 mm, vorzugsweise 0.02 mm oder mehr, mehr bevorzugt 0.04 mm oder mehr, mehr bevorzugt 0.1 mm oder mehr, mehr bevorzugt 0.2 mm oder mehr, mehr bevorzugt 0.4 mm oder mehr, mehr bevorzugt 1 mm oder mehr, mehr bevorzugt 2 mm oder mehr, mehr bevorzugt 4 mm oder mehr, mehr bevorzugt 10 mm oder mehr haben.

[0124] Wie oben erwähnt ist die Fokussiertiefe des Systems oft wichtig für die Bestimmung der optimalen Abmessungen des Probenbehältnisses. Es wurde überraschenderweise herausgefunden, daß es möglich war, eine Abmessung zu verwenden, die über die Fokussiertiefe eines Fokussiersystems hinausging, sogar bis zu einem Maß, wo die Abmessung größer als 1 mal und kleiner als 15 mal die Fokussiertiefe war, mehr bevorzugt gleich oder größer als 1.5 mal und kleiner als 2 mal, mehr bevorzugt gleich oder größer als 2 mal und kleiner als 3 mal, mehr bevorzugt gleich oder größer als 3 mal und kleiner als 4 mal, mehr bevorzugt gleich oder größer als 4 mal und kleiner als 6 mal, mehr bevorzugt gleich oder größer als 6 mal die Fokussiertiefe.

[0125] In der vorliegenden Beschreibung und den Ansprüchen bezeichnet der Begriff "Fokussiertiefe" die Entfernung, die ein Objekt entlang der Achse des Fokussiersystems bewegt werden kann, ohne daß seine Abbildung verzerrt wird, wobei eine solche Verzerrung dadurch definiert wird, daß eine Abbildung, die fokussiert ein einzelnes Detektorelement beleuchtet, einen Bereich bestrahlt, der sich über zwei Detektorelemente in einer oder zwei Richtungen erstreckt, wenn sie verzerrt wird. Wenn zwei oder mehr Detektorelemente vor der Analyse kombiniert werden, sollten die kombinierten Detektorelemente bei der Definition der Fokussiertiefe berücksichtigt werden.

[0126] Das Längenverhältnis eines Fensterbereichs des Probenbehältnisses kann variieren zwischen etwa 1/1, vorzugsweise weniger als 1/2, mehr bevorzugt weniger als 1/4, mehr bevorzugt weniger als 1/10, mehr bevorzugt weniger als 1/20, mehr bevorzugt weniger als 1/33, mehr bevorzugt weniger als 1/50, mehr bevorzugt weniger als 1/100, mehr bevorzugt weniger als 1/200, mehr bevorzugt weniger als 1/500, mehr bevorzugt weniger als 1/1000, mehr bevorzugt weniger als 1/2000, mehr bevorzugt weniger als 1/4000, mehr bevorzugt weniger als 1/10000, abhängig von der Fokussiermethode oder anderen von anderen Komponenten des Sys-

tems abhängigen Aspekten.

[0127] Der Bereich des exponierbaren Fensters kann lediglich 0.01 mm² oder größer sein, vorzugsweise mit einem Bereich von 0.1 mm² oder mehr, mehr bevorzugt 1 mm² oder mehr, vorzugsweise 2 mm² oder mehr, vorzugsweise 4 mm² oder mehr, vorzugsweise 10 mm² oder mehr, vorzugsweise 20 mm² oder mehr, vorzugsweise 40 mm² oder mehr, mehr bevorzugt 100 mm² oder mehr, vorzugsweise 200 mm² oder mehr, vorzugsweise 400 mm² oder mehr; vorzugsweise 1000 mm² oder mehr, vorzugsweise 2000 mm² oder mehr, vorzugsweise 4000 mm² oder mehr, vorzugsweise 10000 mm² oder mehr. Der optimale Bereich des Fensters wird oftmals durch eine oder mehrere Aspekte dieser Erfindung definiert.

[0128] Im allgemeinen sollte das Volumen der zu analysierenden Probe so groß wie möglich sein. Dies ermöglicht die gleichzeitige Bewertung einer größeren Anzahl an Partikeln, aber das optimale Volumen wird oft durch eine oder mehrere Aspekte dieser Erfindung definiert. Für einige Anwendungen gemäß der Erfindung begrenzt das Probenbehältnis die Grenze der Probe in drei Richtungen, und zwar derart, daß das Volumen der Probe 0.01 µl oder mehr beträgt, vorzugsweise 0.02 µl oder mehr, mehr bevorzugt 0.04 µl oder mehr, mehr bevorzugt 0.1 µl oder mehr, mehr bevorzugt 0.2 µl oder mehr, mehr bevorzugt 0.4 µl oder mehr, mehr bevorzugt 1 µl oder mehr, mehr bevorzugt 2 µl oder mehr, mehr bevorzugt 4 µl oder mehr, mehr bevorzugt 10 µl oder mehr.

[0129] Um das effektive Volumen einer zu messenden Probe zu erhöhen, kann es möglich sein, Mittel im Probenbehältnis zu beinhalten, welche die Partikel, die in der Probe vorhanden sind, ganz oder teilweise zurückhalten können. So ist es möglich, ein Volumen zu analysieren, das wesentlich größer ist als das physikalische Volumen des Probenbehältnisses, indem die Probe vor der Analyse durch das Probenbehältnis geschickt wird und Partikel des Probenvolumens innerhalb des Probenbehältnisses zurückgehalten werden. Ein solches Mittel zum Zurückhalten von Partikeln können chemisch aktive Mittel sein, ein elektronisches oder magnetisches Feld oder Filter. Unter diesen Umständen ist es bevorzugt, daß wenigstens eine der Grenzen, die das Probenbehältnis begrenzen, oder eine im wesentlichen flache Oberfläche, die im wesentlichen innerhalb der Grenzen des Probenbehältnisses enthalten ist, ein Mittel ist, welches die Partikel, die bewertet werden, zurückhalten kann, vorzugsweise ein chemisches Bindungsmittel, das Partikel binden kann, mehr bevorzugt ein Mittel mit einem elektronischen oder magnetischen Feld, das Partikel festhalten kann, mehr bevorzugt ein Filtermittel, das die passierende flüssige Probe oder das Probenmaterial hindurchtreten läßt und Partikel zurückhält.

[0130] In vielen bevorzugten Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung könnte zumindest eine Abmessung des Probenbehältnisses so klein sein, daß es schwierig für die Probe ist, in das Probenbehältnis hineinzufließen. Unter Verwendung eines Aspekts der vorliegenden Erfindung ist es möglich, zumindest eine der Abmessungen, die das Probenbehältnis definieren, derart zu variieren, daß die Abmessung wesentlich größer ist, während die Probe in das Probenbehältnis hineinfließt, als während der Messung eines Signals von der Probe. Eine Auswirkung einer solchen Variation von zumindest einer Abmessung des Probenbehältnisses kann es sein, die Probe im Probenbehältnis zwischen der Messung jedes Signals von der Probe teilweise oder im wesentlichen vollständig zu ersetzen. Solche Ausführungsformen könnten auftreten, wo zumindest eine der Abmessungen, die die Grenzen definieren, welche das Probenbehältnis vor oder während der Einführung der Probe in das Probenbehältnis begrenzen, sich wesentlich von der Abmessung während der Messung eines Signals von der Probe unterscheidet, vorzugsweise wo die Abmessung wesentlich größer vor oder während der Einführung der Probe in das Probenbehältnis ist als während der Messung eines Signals von der Probe, vorzugsweise wo die Abmessung, die variiert wird, im wesentlichen nicht parallel zur Ebene der Anordnung von Detektorelementen ist, vorzugsweise wo die Auswirkung des Unterschieds in der Abmessung derart ist, daß zumindest ein Teil der Probe im Probenbehältnis zwischen der Messung jedes Signals von der Probe durch einen anderen Teil ersetzt wird, bevorzugt wo die Auswirkung des Unterschieds in der Abmessung derart ist, daß das Hineinfließen der Probe in das Probenbehältnis verbessert wird.

Vorbehandlung der Proben

[0131] Oft ist es bevorzugt, eine Probe aus einem Probenmaterial zu analysieren, ohne im wesentlichen jede Modifikation der Probe als Ganzes oder von Teilen hiervon. Andere Bedingungen werden bevorzugt, indem eine oder mehrere Modifikationen der Probe vor der Messung durchgeführt werden, z. B. durch Entfernen von störenden Komponenten oder Phänomenen, oder durch die Ermöglichung einer Modifikation eines Partikels oder eines Teils eines Partikels vor der Messung.

[0132] Unter anderen Umständen wird der Probe oder Teilen dieser Probe, die analysiert wird, eine chemische, mechanische oder physikalische Behandlung vor der Analyse zuteil. Diese Behandlung könnte eine oder mehrere aus den Folgenden sein: der Schwerkraft und/oder einer Zentrifugierung aussetzen, Filterung, Erhitzung, Kühlung, Vermischung, Sedimentation, Solvation, Verdünnung, Homogenisierung, Beschallung, Kristallisation, Chromatographie, Ionenaustausch, elektrisches Feld, magnetisches Feld, elektromagnetische Strahlung. Die Auswirkung der Behandlung ist normalerweise eine Verstärkung jedes Signals, das von der Probe beobachtet wird und bei der Bewertung von biologischen Partikeln in der Probe verwendet wird, und/oder

eine Unterdrückung eines störenden Signals.

[0133] In einigen Ausführungsformen der Erfindung kann die Temperatur der Probe kontrolliert werden, sei es durch Beifügung oder Entfernung von Wärme gegenüber der Probe, und die Temperatur der Probe während der Messung der Probe, die biologische Partikel enthält, liegt zwischen 0°C und 90°C, mehr bevorzugt zwischen 5°C und 90°C, mehr bevorzugt zwischen 10°C und 90°C, mehr bevorzugt zwischen 20°C und 90°C, mehr bevorzugt zwischen 25°C und 90°C, mehr bevorzugt zwischen 30°C und 90°C, mehr bevorzugt zwischen 35°C und 90°C, mehr bevorzugt zwischen 40°C und 90°C.

[0134] In einer Situation der Bewertung wird die Temperatur der Probe durch die Umgebungstemperatur gesteuert, und die Temperatur der Probe während der Messung der Probe, die biologische Partikel enthält, liegt zwischen 0°C und 90°C, mehr bevorzugt zwischen 5°C und 90°C, mehr bevorzugt zwischen 10°C und 90°C, mehr bevorzugt zwischen 20°C und 90°C, mehr bevorzugt zwischen 25°C und 90°C, mehr bevorzugt zwischen 30°C und 90°C, mehr bevorzugt zwischen 35°C und 90°C, mehr bevorzugt zwischen 40°C und 90°C.

Einfärben von Objekten

[0135] Oft zeigen die fraglichen Partikel Eigenschaften, die die Detektierung eines Signals erleichtern, das für die Bewertung verwendet werden kann, aber manchmal ist es bevorzugt, eine oder mehrere Arten von Molekülen beizufügen, um jede Detektierung eines Signals zu verstärken oder zu ermöglichen. Die Anzahl unterschiedlicher Arten von Molekülen, die beigefügt werden, hängt von der Komplexität der Bewertung und von der Natur der Partikel und des zu analysierenden Probenmaterials ab. Es ist beispielsweise oftmals vorteilhaft, zwei oder mehrere, z. B. drei oder sogar vier, Arten von Molekülen zu verwenden, wenn die Bewertung die Identifizierung von zwei oder mehr Arten von Partikeln betrifft, wobei die unterschiedlichen Partikel unterschiedlich mit den verschiedenen Molekülen wechselwirken, z. B. durch Erhöhung eines fluoreszenten Signals bei verschiedenen Wellenlängen. Oftmals wird die Beifügung von zwei oder mehr solcher Arten von Molekülen gleichzeitig durchgeführt, aber unter bestimmten Bedingungen ist es bevorzugt, die Moleküle zu verschiedenen Zeitpunkten beizufügen, vorzugsweise derart, daß eine oder mehrere Messungen zwischen der Beifügung der Moleküle durchgeführt werden. Die beigefügten Moleküle können mit den Partikeln wechselwirken, beispielsweise indem sie in diesen eingeschlossen werden, mit diesen wechselwirken oder von diesen zurückgestoßen werden. Die Moleküle werden der Probe absichtlich vor oder während der Messung beigefügt, vorzugsweise eine Molekülart zu einem Zeitpunkt, mehr bevorzugt mehr als eine Art zu einem Zeitpunkt.

[0136] Es ist bevorzugt, daß wenigstens eine dieser Molekülarten einer ersten Probe eines Probenmaterials beigefügt wird, und wenigstens eine weitere der Molekülarten einer zweiten Probe des Probenmaterials beigefügt wird, wobei vorzugsweise die Anzahl an Proben gleich oder geringer als die Anzahl unterschiedlicher Arten von Molekülen ist, und wobei wenigstens eine Messung von jeder Probe gemacht wird.

[0137] In Situationen, in denen eine ursprüngliche Messung bevorzugt wird, ist die anfängliche Messung eine, die mit beliebigen, absichtlich beigefügten Molekülen durchgeführt wird. Eine Messung einer Probe wird durchgeführt, bevor wenigstens eines der besagten Moleküle der Probe beigefügt wird, und wenigstens eine Messung der Probe wird gemacht, nachdem alle besagten Arten von Molekülen beigefügt wurden.

[0138] Die absichtlich beigefügten Moleküle können eines oder mehrere der folgenden Phänomene erhöhen, die bei der Bewertung von biologischen Partikeln unterstützend wirken: Abschwächung elektromagnetischer Strahlung, Photolumineszenz, wenn beleuchtet mit elektromagnetischer Strahlung, Streuung elektromagnetischer Strahlung, Raman-Streuung.

[0139] Die Bewertung biologischer Partikel kann auf der Verwendung eines Nukleinsäurefarbstoffs als absichtlich beigefügtes Molekül beruhen, in einer Menge von mehr als 30 µg pro ml der Probe, mehr bevorzugt in einer Menge von weniger als 30 µg pro ml Probe, mehr bevorzugt weniger als 20 µg pro ml Probe, mehr bevorzugt weniger als 10 µg pro ml Probe, mehr bevorzugt weniger als 5 µg pro ml Probe, mehr bevorzugt weniger als 2 µg pro ml Probe, mehr bevorzugt weniger als 1 µg pro ml Probe, mehr bevorzugt weniger als 0.3 µg pro ml Probe, mehr bevorzugt weniger als 0.03 µg pro ml Probe, mehr bevorzugt weniger als 0.003 µg pro ml Probe, mehr bevorzugt weniger als 0.0003 µg pro ml Probe, wobei der Nukleinsäurefarbstoff einer oder mehrere aus den folgenden ist, wobei diese Aufzählung nicht beschränkend ist: Phenanthridin (z. B. Ethidiumbromid CAS-1239-45-8, Propidiumjodid CAS-25535-16-4), Akridinfarbstoffe (z. B. Akridinorange CAS-65-61-2/CAS-10127-02-3), Zyaninfarbstoffe (z. B. TOTOTM-1 Jodid CAS#: 143 413-84-7-Molekularprobe, YO-PROTM-1 Jodid CAS#: 152 068-09-2-Molekularproben), Indole und Imidazole (z. B. Hoechst 33258 CAS#: 023 491-45-4, Hoechst 33342 CAS#: 023 491-52-3, DAPI CAS#: 28718-90-3, DIPI (4',6-(Diimidazolin-2-yl)-2-Phenylindol)).

[0140] Die Bewertung biologischer Partikel kann basieren auf der Verwendung eines potentiometrischen Membranfarbstoffs als absichtlich zugeführtes Molekül in einer Menge von entweder mehr als 30 µg pro ml Probe, oder mehr bevorzugt in einer Menge von höchstens 30 µg pro ml Probe, mehr bevorzugt weniger als 20 µg pro ml Probe, mehr bevorzugt weniger als 10 µg pro ml Probe, mehr bevorzugt weniger als 5 µg pro ml Probe, mehr bevorzugt weniger als 2 µg pro ml Probe, mehr bevorzugt weniger als 1 µg pro ml Probe, mehr

bevorzugt weniger als 0.3 µg pro ml Probe, mehr bevorzugt weniger als 0.03 µg pro ml Probe, mehr bevorzugt weniger als 0.003 µg pro ml Probe, mehr bevorzugt weniger als 0.0003 µg pro ml Probe, wobei der Farbstoff einer oder mehrerer aus der Liste der folgenden ist, wobei die Aufzählung nicht beschränkend ist: Rhodamin-123, Oxonol V.

[0141] Um eine schnelle Bewertung einer Probe sicherzustellen, ist es von Interesse, in der Lage zu sein, die Analyse kurz nach der Vermischung von chemischen Komponenten mit der Probe durchzuführen. Diese Zeit sollte daher weniger als 60 Sekunden betragen, vorzugsweise weniger als 30 Sekunden oder sogar weniger als 15 Sekunden, und in anderen bevorzugten Situationen lediglich 10 Sekunden, und vorzugsweise lediglich 2 Sekunden oder weniger, und sogar weniger als 1 Sekunde.

[0142] Ein nützliches Verfahren für die Beifügung chemischer Komponenten in die Probe ist es, eine oder mehrere chemische Komponenten in einem Behälter zu plazieren und den Behälter dann an ein Flußsystem anzuschließen, in dem die Probe fließt, so daß zumindest ein Teil der Probe durch den chemischen Behälter fließt und somit die Vermischung der chemischen Komponenten mit der Probe ermöglicht. Um die Verwendung chemischer Komponenten zu steuern, ist es von Interesse, die Menge chemischer Komponenten auf im wesentlichen den Betrag zu begrenzen, der für die Analyse benötigt wird. Die chemischen Komponenten könnten in der Form einer flüssigen Lösung oder Suspension als Flüssigkeit oder Feststoff vorliegen. Von besonderem Interesse würde es sein, die chemischen Komponenten in einer Form zu haben, die ein schnelles Vermischen mit der Probe erlauben würde, beispielsweise durch Verwendung gefriergetrockneten Materials. Die Möglichkeit, den chemischen Behälter zwischen Analysen durch einen anderen chemischen Behälter zu ersetzen, ist von Interesse, um eine reproduzierbare Beifügung chemischer Komponenten bei der Messung für jede Probe sicherzustellen.

Variation bei der Beifügung

[0143] Wenn eine quantitative Bewertung von Partikeln durchgeführt wird, ist es normalerweise notwendig, die Beifügung jeder Komponente in die Probe zu steuern, um nicht das Ergebnis der Bewertung zu beeinflussen. Die vorliegende Erfindung liefert Ausführungsformen, bei denen solche Anforderungen weniger wichtig sind als in konventionellen Situationen. Dies kann erreicht werden, indem die Komponenten in einer Form beigefügt werden, die lediglich eine begrenzte Auswirkung auf die Bewertung hat, beispielsweise durch Beifügung jeder Komponente als festes Material, wodurch das Volumen jeder zu analysierenden Probe im wesentlichen nicht verändert wird, auch wenn die endgültige Konzentration jeder zugeführten Komponente eine beträchtliche Veränderung zeigt. Weiterhin ist es möglich, daß die Veränderung in der Konzentration einer oder mehrerer absichtlich zugeführter Komponenten oder eines oder mehrerer absichtlich zugeführter Moleküle in einer Probe kleiner oder gleich 1% der Durchschnittskonzentration dieser Komponente ist, vorzugsweise mehr als 1%, mehr bevorzugt mehr als 2%, mehr bevorzugt mehr als 5%, mehr bevorzugt mehr als 10%, mehr bevorzugt mehr als 25%, mehr bevorzugt mehr als 50%, mit 1 als Standardabweichung.

[0144] Bei der Erfindung ist die zu bewertende flüssige Probe während der Messung im Stillstand, wodurch die optimale Verwendung der Meßzeit ermöglicht wird, um jede Bedingung hinsichtlich des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses zu verbessern. Diese Anordnung eliminiert auch jeden Fehler, der bei der Bewertung von Partikeln aufgrund einer Variation in den Flußbedingungen auftreten könnte, insbesondere wenn eine Bewertung einer Eigenschaft volumenbezogen ist, wie das Zählen von Partikeln in einem Volumen der Probe.

Füllsystem für das Probenbehältnis

[0145] Wenn ein Probenbehältnis im wesentlichen mechanisch in einem Meßsystem fixiert ist, ist es ein Vorteil, ein System zu verwenden, das in der Lage ist, die Probe und/oder jede andere Flüssigkeit oder Komponente in das Probenbehältnis durch einen Einlaß fließen zu lassen, die Probe während der Projektion stationär zu halten und sie nach der Projektion wieder durch einen Auslaß aus dem Probenbehältnis fließen zu lassen, wobei möglicherweise der Einlaß auch als Auslaß verwendet wird und dadurch die Komplexität des Flußsystems reduziert wird. Jeder solche Fluß wird durch Verwendung eines oder mehrerer Ventile gesteuert, die den Fluß der Probe oder jeder anderen Komponente kontrollieren können. Vorzugsweise, wenn der Flüssigkeitsstrom in das Probenbehältnis durch eine Pumpe hervorgerufen wird, kann diese Pumpe entweder stromaufwärts vom Probenbehältnis oder stromabwärts vom Probenbehältnis angeordnet sein, wobei die Pumpe eine oder mehrere aus den Folgenden ist: peristaltische Pumpe, Kolbenpumpe, Membranpumpe, Zentrifugalpumpe, hypodermische Spritze. Andere Arten von Pumpen können natürlich für diese spezielle Anforderung verwendet werden, aber die oben Aufgelisteten sind diejenigen, die normalerweise verwendet werden.

[0146] In anderen bevorzugten Situationen kann der Flüssigkeitsstrom in das Probenbehältnis durch ein Vakuum erzeugt werden, wobei das Vakuum aus einem Bereich zugeführt wird, der vor der Analyse einen geringen Druck aufweist. Das Vakuum kann durch mechanische oder physikalische Maßnahmen erzeugt werden, wobei das Vakuum im wesentlichen gleichzeitig mit der Einführung der Probe erzeugt wird. Diese mechani-

schen oder physikalischen Maßnahmen können sein: eine peristaltische Pumpe, eine Kolbenpumpe, eine Membranpumpe, eine Zentrifugalpumpe und eine hypodermische Spritze.

[0147] Aufgrund der Tatsache, daß eine Strömung in lediglich eine Richtung bevorzugt wird, ist es von besonderem Interesse, Ventile zu verwenden, die im wesentlichen nur einen Fluß in eine Richtung erlauben. Solche Ventile können stromaufwärts und/oder stromabwärts vom Probenbehältnis angeordnet sein. Eine Auswirkung der Verwendung solcher Ventile könnte es sein, wenigstens einen Teil der Probe in einem Flußsystem einzusperren.

[0148] Wenn der Probe andere Komponenten beigelegt werden, kann dies unter Verwendung eines Systems stattfinden, welches zwei oder mehrere Ströme von Flüssigkeiten vermischen kann.

[0149] In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ermöglicht dieses System die Vermischung des Probenmaterials mit einem festen Material, welches vorzugsweise eine Mischung aus zwei oder mehr chemischen Komponenten ist. Das feste Material ist vorzugsweise ein gefriergetrocknetes Material.

[0150] Nach jeder durchgeführten Messung ist es bevorzugt, daß jede Probe oder eine andere verwendete Komponente in einen Abfallbehälter geleitet wird, der im wesentlichen geschlossen ist, um ein Auslaufen aus dem Behälter zu verhindern, wobei gemäß der Erfindung ein im wesentlichen geschlossenes Flußsystem geliefert wird.

[0151] Der Auslaß aus dem Probenbehältnis findet statt über ein Flußsteuermittel, etwa ein Ventil, das lediglich ein Fluid in der Gasphase hindurchtreten läßt. Eine solche Art von Ventil, die oftmals bevorzugt ist, ist eine, die Gas und Luft hindurchläßt, aber schließen kann, wenn das Ventil in Kontakt mit der flüssigen Probe kommt.

Entsorgbares Probenbehältnis

[0152] Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung, der insbesondere von Interesse ist, wenn die Probe oder jede Komponente, die der Probe beigelegt wurde, als gefährlich oder schwierig in der Handhabung einzustufen ist, ist die Verwendung eines entfernbaren Probenbehältnisses. Ein solches Probenbehältnis wird leicht aus dem Meßsystem entfernt, wobei gleichzeitig die Möglichkeit besteht, daß ein weiteres Probenbehältnis dessen Platz einnimmt. Vorzugsweise können solche Probenbehältnisse wiederverwendet oder wiederhergestellt werden, vielleicht nach dem Ausspülen.

[0153] Ein interessanter Aspekt eines ersetzbaren Probenbehältnisses ist die Möglichkeit eines Verfahrens, um das Probenbehältnis im wesentlichen irreversibel nach der Beifügung einer Probe oder einer beliebigen Komponente zu verschließen, wodurch jedes ungewollte Lecken aus dem Probenbehältnis während der Speicherung oder des Transports verhindert wird.

[0154] Ein solches entfernbare Probenbehältnis hat während der Analyse vorzugsweise im wesentlichen keine Verbindung zum Flußsystem, und das Probenbehältnis kann vorzugsweise aus dem Beobachtungsbereich zwischen den Beobachtungen zum Zweck des Ersetzens der Probe innerhalb des Probenbehältnisses und/oder vorzugsweise zum Zweck des Ersetzens des Probenbehältnisses durch ein anderes Probenbehältnis, welches vorzugsweise eine andere Probe enthält, entfernt werden.

[0155] Das Probenbehältnis kann in manchen Situationen für die Analyse einer begrenzten Anzahl von Proben oder Probenmaterialien verwendet werden, vorzugsweise von weniger als 10, mehr bevorzugt weniger als 5, mehr bevorzugt weniger als 2, mehr bevorzugt lediglich 1, bevor das entfernbare Probenbehältnis geleert und/oder ausgespült wird und/oder vor der Beifügung einer oder mehrerer Komponenten.

[0156] In Situationen, bei denen kein Auslaufen bevorzugt ist und/oder bei denen das entfernbare Probenbehältnis lediglich für die Messung von einer Probe oder einem Probenmaterial vorgesehen ist, ist es bevorzugt, daß jeder Zugang zu dem entfernbaren Probenbehältnis im wesentlichen irreversibel vor, während oder nach der Analyse geschlossen wird, vorzugsweise derart, daß jeder Teil des Probenmaterials oder jeder Komponente, die dem Probenmaterial beigelegt wurde, nicht aus dem entfernbaren Probenbehältnis entfernt werden kann, nachdem es hierin eingeführt wurde.

[0157] Wenn es beabsichtigt ist, daß das Behältnis nach seiner Verwendung zerstört oder wiederverwendet wird, ist es bevorzugt, daß das Behältnis aus einem Material besteht, das eine Zerstörung mittels Verbrennen oder Bestrahlen mit elektromagnetischer Strahlung ermöglicht. In Situationen, bei denen die Zerstörung eine Wiederverwendung des Materials, aus dem das Behältnis hergestellt wurde, umfaßt, ist ein Prozeß zur Regeneration des Materials bevorzugt, der einen oder mehrere der folgenden Schritte aufweist: Entleeren des Probenbehältnisses von jedem Probenmaterial oder jeder anderen Komponente, Ausspülen oder Waschen, Entfernen einer oder mehrerer physikalischer Komponenten aus dem Probenbehältnis, Ersetzen einer oder mehrerer physikalischer Komponenten des Probenbehältnisses oder Hinzufügung von einer oder mehreren chemischen Komponenten.

[0158] Wenn eine Chemikalie einer Probe im Probenbehältnis zugeführt wird, ist es bevorzugt, daß das Probenbehältnis eine oder mehrere Abteilungen aufweisen kann, in denen chemische oder physikalische Komponenten derart gespeichert werden können, daß die chemischen oder physikalischen Komponenten jeder Probe, die sich im Probenbehältnis befindet, zugeführt werden können, und zwar eine zu einem Zeitpunkt oder

mehrere zu einem Zeitpunkt. Auf diese Weise kann das Probenbehältnis derart ausgebildet sein, daß es mehrere Behältnisse umfaßt, in denen ein Teil desselben Probenmaterials oder Teile von verschiedenem Probenmaterial oder ein Teil anderer Komponenten plaziert werden können. Dies ist auch von Interesse, wenn z. B. die Bewertung eine kontrollierte Vermischung von Flüssigkeiten beansprucht oder ermöglicht.

[0159] Ein Probenbehältnis mit mehr als einer Abteilung könnte also die Analyse von mehr als einem Teil desselben Probenmaterials ermöglichen, oder die Analyse von mehr als einem Probenmaterial, indem die unterschiedlichen Abteilungen auf die Anordnung von Detektorelementen abgebildet werden.

[0160] Ein Aspekt eines solchen entfernbaren Probenbehältnisses ist, daß der Analyse mehr als ein Teil desselben Probenmaterials durch Projektion auf die Anordnung von Detektorelementen unterzogen werden kann. Dies kann geschehen, indem das Probenbehältnis bewegt wird, wodurch ein anderer Abschnitt des Probenbehältnisses bestrahlt wird, oder indem es der Probe ermöglicht wird, innerhalb des Probenbehältnisses zu fließen und dadurch im wesentlichen jedes Probenvolumen durch ein unterschiedliches Probenvolumen zu ersetzen.

[0161] Diese Erfindung liefert auch Verfahren zur Bewertung von Partikeln in einem entfernbaren Probenbehältnis, bei denen mehrere Probenbehältnisse mit einer Probe gefüllt werden und in einer Transportvorrichtung angeordnet werden, die die unterschiedlichen Probenbehältnisse in eine Position bewegt, die eine Projektion von Signalen auf die Anordnung von Detektorelementen ermöglicht. Dies ermöglicht im wesentlichen eine Automatisierung der Bewertung von Partikeln, da mehr als eine Probe gleichzeitig behandelt werden kann.

[0162] Eine bevorzugte Implementierung des Verfahrens ist eine, die eine im wesentlichen gleichzeitige Bewertung von mehr als einer Probe erlaubt. Dies kann durchgeführt werden, indem zwei oder mehr, sogar vier oder mehr vorzugsweise unabhängige Meßsysteme in einer entsorgbaren Probeneinheit angeordnet werden, wobei jedes System wenigstens ein Probenbehältnis aufweist. Die Signale von den zwei oder mehr Probenbehältnissen können jeweils zu einem Zeitpunkt einzeln oder zwei oder mehrere gleichzeitig gemessen werden.

Lichtquellen

[0163] Die Transmission elektromagnetischer Strahlung auf die Probe kann durch Verwendung eines Beleuchtungsmittels durchgeführt werden, wobei das Beleuchtungsmittel 2 oder mehr, vorzugsweise 3 oder mehr, mehr bevorzugt 4 oder mehr, mehr bevorzugt 6 oder mehr, mehr bevorzugt 8 oder mehr, mehr bevorzugt 10 oder mehr lichtemittierende Dioden sind, die vorzugsweise elektromagnetische Strahlung aus im wesentlichen demselben Wellenlängenband emittieren.

[0164] Die elektromagnetische Strahlung, die auf die Probe transmittiert wird, wird durch ein Fokussiermittel fokussiert, welches die Auswirkung hat, im wesentlichen die Intensität der elektromagnetischen Strahlung in oder bei der Probe zu erhöhen.

[0165] Die elektromagnetische Strahlung, die auf die Probe transmittiert wird, wird durch zwei oder mehr Beleuchtungsmittel erzeugt, wobei mindestens zwei der Beleuchtungsmittel im wesentlichen unterschiedliche Strahlungseigenschaften in zumindest einem Wellenband besitzen, und wobei die Beleuchtungsmittel derart betrieben werden, daß alle von ihnen im wesentlichen gleichzeitig Licht aussenden, vorzugsweise zumindest eines der Beleuchtungsmittel Licht aussendet, während zumindest ein anderes der Beleuchtungsmittel kein Licht aussendet, mehr bevorzugt, wobei nur eines der Beleuchtungsmittel zu einem Zeitpunkt Licht aussendet.

[0166] Die Beleuchtungsmittel können eines oder mehrere aus den Folgenden sein, wobei die Aufzählung nicht beschränkend ist: lichtemittierende Dioden, Laser, Laserdioden, thermische Lichtquellen, Gasentladungslampen.

[0167] In einer Ausführungsform wird zumindest ein Teil der elektromagnetischen Strahlung, die durch eine Probe geschickt wird, durch Verwendung eines Reflektiermittels wieder zurück auf die Probe oder durch diese hindurch reflektiert, wobei das Reflektiermittel vorzugsweise auch elektromagnetische Strahlung reflektieren kann, die von den Grenzen des Probenbehältnisses oder der Probe selbst gestreut oder reflektiert wird, wobei mehr bevorzugt das Reflektiermittel im wesentlichen in der Vorrichtung beinhaltet ist, die die Grenzen des Probenbehältnisses definiert, wobei bevorzugt das Reflektiermittel ein oder mehrere dichroitische Spiegel sind.

Detektorarten

[0168] Die Anordnung von Detektorelementen kann eine oder mehrere der folgenden Arten sein: Full frame-CCD, Frame transfer-CCD, Zwischenzeilen-Transfer-CCD, Zeilenscan-CCD.

[0169] Die Anordnung von Detektorelementen kann ein CMOS-Bildsensor sein, vorzugsweise ein CMOS-Bildsensor mit auf dem Chip integrierter Signalkonditionierung und/oder Signalverarbeitung, mehr bevorzugt ein CMOS-Bildsensor mit auf dem Chip integrierter Rechenvorrichtung, die Bildbearbeitung durchführen kann.

[0170] In einer Ausführungsform wird die Bewertung im wesentlichen gleichzeitig mit dem Melkprozeß durch-

geführt, vorzugsweise indem das System "at-line" beinhaltet ist, mehr bevorzugt indem das System "in-live" in einem Melksystem beinhaltet ist.

[0171] In einer Ausführungsform wird im wesentlichen das gesamte Probenmaterial, welches für die Bewertung verwendet wurde, gemeinsam mit allen Komponenten, die dem Probenmaterial oder einem Teil des Probenmaterials absichtlich beigefügt wurden, nach der Vollendung der Bewertung in ein Glasfläschchen zurückgefüllt. Das Glasfläschchen ist vorzugsweise im wesentlichen geschlossen, um ein Auslaufen oder Verdampfen jedes darin enthaltenen Materials zu verhindern, wobei das Glasfläschchen vor der Beifügung jedes Probenmaterials mehr bevorzugt eine oder mehrere chemische Komponenten enthält, deren Funktion eine oder mehrere der Folgenden ist, wobei die Aufzählung nicht beschränkend ist: Verhinderung des Wachstums von Bakterien, Verhinderung des Wachstums von Pilzen.

[0172] Auch wenn das Probenmaterial, das gemessen wird, im wesentlichen in einem geschlossenen Behälter beinhaltet ist, vorzugsweise in einem Behälter, oder zumindest einem Teil eines Behälters, der als Probenbehältnis verwendet werden kann, wird im wesentlichen das gesamte Probenmaterial, das für die Bewertung verwendet wird, gemeinsam mit allen Komponenten, die dem Probenmaterial oder einem Teil des Probenmaterials absichtlich beigefügt wurden, im Behälter nach Vollendung der Messung zurückbehalten.

[0173] In einer Ausführungsform erhöht die Beifügung einer oder mehrerer Komponenten das Signal, das von den Objekten in einer Probe detektiert wurde, da diese Beifügung von einer oder mehrerer Komponenten ein oder mehrere Signale aus der Probe, die gemessen wird, unterdrückt, wobei das Signal ein Signal ist, welches das von dem biologischen Partikel in einer Probe detektierte Signal stört.

[0174] In einer anderen Ausführungsform, bei der eine der absichtlich beigefügten chemischen Komponenten die Wirkung hat, den pH-Wert der Probe vor oder während der Bewertung einzustellen, ist die chemische Komponente eine oder mehrere aus den Folgenden, wobei die Aufzählung nicht einschränkend ist: Citronensäure, Citrat, Azidsäure, Azetat, Phosphorsäure, Phosphat, Carbonat, Bicarbonat, Borsäure, Borat, wobei die chemische Komponente beispielsweise eine Mischung aus Citronensäure und Citrat ist.

[0175] In einer anderen Ausführungsform hat eine der absichtlich beigefügten chemischen Komponenten die Wirkung eines oberflächenaktiven Stoffes, wobei die chemische Komponente eine oder mehrere aus den folgenden Gruppen von oberflächenaktiven Stoffen ist, wobei die Aufzählung nicht beschränkend ist: anionischer oberflächenaktiver Stoff, kationischer oberflächenaktiver Stoff, amphoterer oberflächenaktiver Stoff, nichtionischer oberflächenaktiver Stoff, wobei beispielsweise eine absichtlich beigefügte chemische Komponente t-Octylphenoxypolyethoxyethanol (Triton X-100) ist, oder wobei beispielsweise eine der absichtlich beigefügten chemischen Komponenten die Wirkung aufweist, mit einem oder mehreren der in der Probe vorhandenen Metallionen eine Bindung einzugehen, wobei die chemische Komponente vorzugsweise derart ist, daß sie einen Metallionenkomplex mit dem Metallion bildet.

[0176] In einer Ausführungsform ist die absichtlich beigefügte chemische Komponente eine oder mehrere aus den Folgenden, wobei die Aufzählung nicht beschränkend ist: EDTA, Oxalsäure, Oxalat, Ethylen-Glycol-bis(β -Aminoethylether)N,N,N',N'-Tetraessigsäure (EGTA).

Objektgröße

[0177] In einer Ausführungsform beträgt die Durchschnittsgröße der zu bewertenden biologischen Partikel weniger als 0.01 μm , vorzugsweise weniger als 0.1 μm , mehr bevorzugt weniger als 1 μm , mehr bevorzugt weniger als 2 μm , mehr bevorzugt weniger als 3 μm , mehr bevorzugt weniger als 4 μm , mehr bevorzugt weniger als 6 μm , mehr bevorzugt weniger als 10 μm , mehr bevorzugt weniger als 20 μm , mehr bevorzugt weniger als 50 μm , mehr bevorzugt weniger als 100 μm .

Mehrfache Bestrahlung

[0178] Um eine optimale Bewertung von Partikeln zu ermöglichen, ist es möglich, eine solche Bewertung auf eine Anzahl von Messungen zu stützen, die von einer Probe gemacht werden. Ein Vorteil besteht darin, eine wiederholte Messung desselben Abschnitts der Probe durchzuführen, wodurch das Signal-zu-Rausch-Verhältnis aufgrund der Fehlerfortpflanzung verbessert wird. Ein weiterer Gesichtspunkt ist es, das Gesamtvolumen der Probe, die analysiert wird, zu erhöhen, indem mehr als eine Messung von unterschiedlichen Teilen der Probe genommen wird.

[0179] Unter manchen Umständen kann es vorteilhaft sein, die Meßzeit einzustellen, z. B. wenn die Intensität von Signalen variiert, möglicherweise in Abhängigkeit von der Art der Partikel, die analysiert werden.

Detektionsfehler

[0180] Die vorliegende Erfindung liefert Verfahren zur Bewertung der Anzahl biologischer Partikel in einer Probe mit einem Gesamtfehler, ausgedrückt als relativer vorausgesagter Fehler in Prozent der Durchschnitts-

anzahl von Partikeln in einem Volumen, der vorzugsweise geringer als 30% ist und oft nur 10% oder sogar 1% oder geringer. Dies kann z. B. erreicht werden, indem das Volumen der Probe, die analysiert wird, kontrolliert wird.

Probendurchsatz

[0181] Das Verfahren der vorliegenden Erfindung ermöglicht die Bewertung von biologischen Partikeln mit einer Rate, die vorzugsweise 10 oder mehr Bewertungen pro Stunde beträgt, sogar 100 oder mehr Bewertungen pro Stunde, und sogar 1000 oder mehr Bewertungen pro Stunde.

[0182] Es ist auch möglich, mehrere mehr oder weniger identische Analysesysteme zu kombinieren, und zwar derart, daß sie parallel arbeiten und dabei ein Verfahren liefern, das sogar eine noch höhere Anzahl an Proben pro Stunde bewerten kann.

Detektionsgrenzen

[0183] Die enorme Flexibilität des Verfahrens der vorliegenden Erfindung macht es möglich, Volumen zu analysieren, die eine Bewertung von Partikeln in Proben ermöglichen, bei denen die Gesamtzahl an solchen Partikeln pro Volumen zwischen mehr als 1×10^8 Partikel pro ml Probe bis hin zu weniger als 1 Partikel pro ml Probe liegt. Einer der wichtigsten Aspekte ist, für diesen Zweck das Gesamtvolumen, das analysiert werden soll.

Signalquelle

[0184] Die Signale, die als Basis für die Bewertung von Partikeln dienen, sind im wesentlichen jede Art elektromagnetischer Strahlung, und insbesondere, wenn die Quelle solcher elektromagnetischer Strahlung oder der Mechanismus, der hierauf Einfluß hat, Photolumineszenz mit einer Lebenszeit des angeregten Zustands von weniger oder gleich 10^{-6} Sekunden ist, Photolumineszenz mit einer Lebenszeit des angeregten Zustands von mehr als 10^{-6} Sekunden, Chemilumineszenz, Rayleigh-Streuung, Raman-Streuung, Abschwächung elektromagnetischer Strahlung, Absorption elektromagnetischer Strahlung, Streuung elektromagnetischer Strahlung.

Wellenlängensensitivität

[0185] Wenn das Signal, das detektiert wird, elektromagnetische Strahlung ist, ist es bevorzugt, ein Detektorelement zu verwenden, das für eine solche Strahlung sensibel ist. Bevorzugte Ausführungsformen verwenden Anordnungen von Detektorelementen, die empfindlich sind für elektromagnetische Strahlung einer Wellenlänge in einem oder mehreren der folgenden Bereiche: 100 nm bis 200 nm, 200 nm bis 600 nm, 300 nm bis 700 nm, 400 nm bis 800 nm, 600 nm bis 1 μ m, 800 nm bis 2 μ m, 2 μ m bis 10 μ m, 5 μ m bis 10 μ m, 10 μ m bis 20 μ m, 20 μ m bis 40 μ m.

Wellenlängentrennung

[0186] Es ist oftmals von Interesse, elektromagnetische Strahlung in verschiedene Wellenlängen oder Wellenbänder zu trennen, vor allem wenn die Quelle solcher Strahlung Energie über ein breites Spektrum von Wellenlängen emittiert. Bei Verfahren der Bewertung von Partikeln, die auf der Abschwächung von Energie basieren, auf der Detektion von emittierter oder gestreuter Energie oder dergleichen, ist die Möglichkeit der Trennung von Energie in verschiedene Wellenlängen oder Wellenbänder wichtig. Dies trifft auch für elektromagnetische Strahlung zu, die von innerhalb der Probe stammt, beispielsweise durch Photolumineszenz oder Chemilumineszenz. In einigen Verfahren dieser Erfindung ist es möglich, die erhaltenen Informationen zu verwenden, wenn zwei oder mehr verschiedene Wellenlängen oder Wellenbänder verwendet werden, beispielsweise um zwischen zwei oder mehreren Arten von Partikeln auf der Basis ihrer Reaktion auf verschiedene Energien zu unterscheiden.

[0187] Ein Verfahren zur Durchführung einer solchen Wellenlängentrennung ist es, einen Teil einer Probe mit mehr als einer Wellenlänge oder einem Wellenband gleichzeitig zu bestrahlen, vorzugsweise derart, daß unterschiedliche Teile der Probe mit unterschiedlichen Wellenlängen oder Wellenbändern von Energie bestrahlt werden. Dies ist besonders von Interesse, wenn die Bewertung von Partikeln die Identifizierung einer oder mehrerer Arten von Partikeln betrifft, da Partikel abhängig von ihrer Position innerhalb des Probenbehältnisses unterschiedlichen Wellenlängenenergien ausgesetzt werden.

[0188] Eine andere Methode zur Durchführung einer solchen Wellenlängentrennung ist es, jede magnetische Strahlung, die von der Probe emittiert wird, zu trennen, wobei vorzugsweise mehr als zwei Detektorelemente

Signale von im wesentlichen dem gleichen Teil der Probe beobachten, wobei aufgrund der Wellenlängentrennung diese Detektorelemente unterschiedliche Wellenlängen oder Wellenbänder an Energie detektieren. Dabei ist es möglich, spektrale Charakteristika jedes Partikels zu entnehmen, die für dessen Bewertung verwendet werden können.

[0189] Ein Verfahren ist die Intensitätsmodulation elektromagnetischer Strahlung. Wenn eine solche Modulation kontrolliert wird, ist es möglich, sie zur Verbesserung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses einzusetzen, beispielsweise durch Beobachtung jedes Hintergrundsignals in einem Zeitraum, in dem die Intensität gering oder sogar Null ist, und anschließende Korrektur jedes gemessenen Signals, wenn die Intensität hoch ist, und zwar aufgrund der Hintergrundinformationen.

[0190] Es ist auch möglich, elektromagnetische Strahlung unter Verwendung eines optisch aktiven Kristalls oder eines Interferometers hinsichtlich der Frequenz zu modulieren. Die Wirkung einer solchen Modulation könnte sein, spektrale Informationen über jedes in der Probe vorhandene Partikel zu erhalten.

Lichtquellen

[0191] In Verfahren, die auf der Abschwächung elektromagnetischer Strahlung oder der Bestrahlung der Probe basieren, ist es bevorzugt, eine Strahlungsquelle wie lichtemittierende Dioden, Laser, Laserdioden, thermische Lichtquellen oder Gasentladungslampen zu verwenden. Wenn die Intensität der Bestrahlungsenergie von Interesse ist, ist es möglich, mehr als eine Energiequelle zu verwenden, auch wenn die unterschiedlichen Lichtquellen unterschiedliche Energiespektren aufweisen, z. B. wenn zwei unterschiedliche lichtemittierende Dioden verwendet werden, die Energie in unterschiedlichen Wellenbändern emittieren.

[0192] Um die Effizienz einer solchen Lichtquelle bei der Bestrahlung der Probe zu verbessern, ist es oft erwünscht, ein Fokussiersystem zur Fokussierung von Energie auf die Probe zu verwenden.

Reflexion

[0193] Wenn die elektromagnetische Strahlung verwendet wird, um eine Probe zum Zweck des Erzeugens von Photolumineszenz oder dergleichen zu bestrahlen, ist es von Interesse, die Effizienz einer solchen Strahlungsquelle zu erhöhen, um in der Lage zu sein, jede Energie, die durch die Probe hindurchgeht, wieder zurück auf die Probe zu reflektieren, vorzugsweise unter Verwendung einer Reflektierteileinrichtung, beispielsweise eines dichroitischen Spiegels, der Energie bestimmter Wellenlängen reflektiert, während er den Durchtritt von Energie bei anderen Wellenlängen ermöglicht.

Einfallswinkel

[0194] In einem Verfahren dieser Erfindung unter Verwendung von Photolumineszenz als Quelle des detektierten Signals ist es möglich, die Lichtquelle relativ zur Achse des Probenbehältnisses anzuordnen, vor allem relativ zu einer Achse, die durch die Anordnung von Detektorelementen und das Probenbehältnis gebildet wird, und zwar derart, daß der Winkel zwischen der Achse und der Lichtquelle zwischen 0 und 180 Grad beträgt.

Detektorarten

[0195] Als Detektorelemente können eine oder mehrere kommerziell erhältliche Anordnungen von Detektorelementen verwendet werden, wie eine Anordnung von CCD-Elementen oder eine Anordnung von lichtempfindlichen Dioden (CMOS-Bildsensor). Solche Anordnungen von Detektorelementen können eine auf dem Chip integrierte Signalkonditionierung und/oder signalverarbeitende Fähigkeiten aufweisen.

Signalkonditionierung – Software

[0196] Wenigstens eine Ausführungsform verwendet ein Rechenmittel, wie einen digitalen Computer, der wenigstens für die Korrektur jedes gemessenen Signals aufgrund von systematischen oder veränderlichen Fehlern verwendet werden kann, z. B. unter Verwendung einer oder mehrere vorbestimmter Variablen, um das gemessene Signal abzugleichen. Die Bestimmung der vorbestimmten Variablen kann auf der Basis von Werten gemessener Signale von einem oder mehreren Referenzelementen erfolgen, die nahe an dem zu berichtenden Element liegen, oder sie kann erfolgen auf der Basis von Werten einer oder mehrerer beliebiger anderer Messungen.

[0197] Vor allem ist es von Interesse, eines der anderen gemessenen Signale, oftmals eines der früher gemessenen Signale, vom gemessenen Signal zu subtrahieren, wodurch jeder Fehler entfernt wird, der auch in der anderen Messung vorhanden war. Die andere Messung kann eine andere Messung eines unterschiedlichen Teils derselben Probe oder eine Messung einer unterschiedlichen Probe sein.

[0198] Ein solches Rechenmittel kann auch verwendet werden, um ein gemessenes Signal hinsichtlich der Veränderung in der Sensitivität zu korrigieren, unter Verwendung einer oder mehrerer vorbestimmter Variablen. Die Bestimmung der vorbestimmten Variablen kann auf der Basis von Werten der gemessenen Signale eines oder mehrerer Referenzelemente erfolgen, die nahe an dem zu berichtenden Element liegen, oder sie kann auf der Basis der Werten von einer oder mehreren der früheren Messungen erfolgen.

[0199] Ein geeignetes Verfahren zur Berichtigung gemessener Signale ist es, ein Ergebnis von einer Anordnung von Detektorelementen von einem anderen Ergebnis zu subtrahieren, das von einem anderen Teil derselben Probe oder von einer anderen Probe erhalten wird. Eine solche Subtraktion hat die Wirkung, jede systematische Veränderung in Grundniveaus der Signale von der Anordnung von Detektorelementen zu reduzieren oder zu entfernen, die durch Dunkelströme oder vielleicht auch durch Partikel verursacht werden, welche unbeweglich im Inneren des Probenbehältnisses vorhanden sind, wobei jede Bewertung im wesentlichen lediglich die positiven Ergebnisse einer solchen Subtraktion verwendet. Wenn die beiden Messungen von unterschiedlichen Teilen derselben Probe stammen, ist es auch möglich, eine Bewertung auf der Basis des Ergebnisses der Subtraktion durchzuführen, indem jedes negative Ergebnis der Subtraktion als positive Zahl behandelt wird, womit effektiv eine Bewertung von mehr als einer Messung mit demselben Aufwand durchgeführt wird, als wenn eine einzelne Messung verwendet wird. Auf diese Weise ist es möglich, das Ergebnis von mehreren Subtraktionen zu kombinieren, vorzugsweise von so vielen, wie der tatsächliche Rauschpegel erlaubt, beispielsweise indem das Rauschen in den kombinierten Ergebnissen geringer ist als ein vorgegebener Bruchteil des kleinsten Signals, das für die Bewertung von Partikeln verwendet wird.

Bildverarbeitung

[0200] Die vorliegende Erfindung ist gut geeignet, aus dem Stand der Technik vorbekannte Bildverarbeitung bei der Bewertung von Partikeln zu verwenden, beispielsweise wenn die Bewertung die Identifizierung einer oder mehrerer Arten von Partikeln ist.

Stromversorgung

[0201] Jede Gerätschaft, die gemäß der vorliegenden Erfindung aufgebaut ist, kann mit elektrischem Strom betrieben werden, beispielsweise mit 110 oder 220 V Wechselspannung, unter Verwendung eines geeigneten Transformatorsystems. Eine Batterie oder ein Akkumulator kann ebenfalls als Stromquelle verwendet werden, und dies ist besonders von Interesse, wenn die Gerätschaft für eine Anwendung vorgesehen ist, bei der ein Transport der Gerätschaft notwendig ist. Eine solche Batterie oder ein solcher Akkumulator können auch wiederaufladbar sein, wodurch es möglich ist, sie zu erneuern und wieder zu verwenden.

Beispiel 1

Detektion von Fluoreszenzsignalen von Ethidiumbromid (EtBr), das in somatischen Zellen in Milch an DNA gebunden ist, bei verschiedenen Anfangskonzentrationsniveaus von Ethidiumbromid

[0202] Das Probenmaterial war Kuhmilch. Jedem von drei Teilen desselben Probenmaterials, das für die unten beschriebenen Experimente A, B und C verwendet wurde, wurde ein Puffer im Verhältnis zwei Volumenteile Pufferlösung zu einem Teil Milchvolumen beigelegt. Die Pufferlösungen waren identisch, außer daß sie unterschiedliche Mengen an EtBr enthielten. Die Pufferlösungen wurden entsprechend den Richtlinien des internationalen IDF-Standards 148A:1995 – "Verfahren C betreffend ein fluoro-optoelektronisches Verfahren" (Experiment A, EtBr-Konzentration 33 µg/ml) präpariert; für Experiment B war die Konzentration von EtBr 10% der Menge, und für Experiment C war sie 1 %.

[0203] Die entstehenden Probenmaterialien wurden in einem Aufbau gemessen, der wie folgt war (vgl. **Fig. 1**): Eine Halogenlampe **101** des Typs OSRAM (41890 SP 12 V, 20 W, 10 ° Reflektor) wurde als Lichtquelle verwendet, die elektromagnetische Strahlung auf die Probe emittierte, die in einem Probenbehältnis **104** enthalten war, und zwar durch eine Sammellinse **102** und durch einen optischen Filter **103**, die selektiv Licht in einem Wellenband zwischen 400 und 500 nm übermittelten (Ferroperm SWP **550**). Jedes Fluoreszenzsignal, das von der Probe stammte, wurde durch eine Linse **105** mit einem Sammelwinkel von etwa 10 Grad fokussiert, wodurch eine Abbildung entstand, die etwa viermal größer auf einer zweidimensionalen Anordnung von Detektorelementen **107** war als die Quelle selbst, wobei die Anordnung dargestellt wurde durch CCD-Elemente des Typs Loral Fairchild (CCD **222**). Ein optischer Filter **106**, der selektiv Licht in einem Wellenband zwischen 600 und 700 nm transmittiert (Schott OG590 und KG5, Dicke 3 mm) wurde zwischen das Probenbehältnis und die Anordnung eingefügt.

[0204] Die Endkonzentration von EtBr in jedem Experiment und die Betätigung der Lichtquelle und der Detektorelemente war folgendermaßen:

Experiment	EtBr ($\mu\text{g/ml}$)	Lampe (Volt)	CCD- Integrationszeit (ms)
A	33	12	800
B	3.3	12	800
C	0.33	13	1600

Die Daten von der zweidimensionalen Anordnung von Detektorelementen wurden digitalisiert und auf einem Rechner (nicht gezeigt) für eine spätere Analyse gesammelt.

Ergebnisse

[0205] Daten von der zweidimensionalen Anordnung von Detektorelementen wurden verwendet, um Abbildungen zu schaffen, in denen die durch jedes Element detektierte Intensität als Höhe über eine graphische Darstellung der Anordnung dargestellt ist. Eine Darstellung dieser Art von typischen Signalen aus jedem Experiment ist in **Fig. 2** gezeigt, wobei **Fig. 2A** eine Darstellung von Intensitäten ist, wie sie bei Experiment A beobachtet wurden, **Fig. 2B** eine Darstellung von Intensitäten ist, wie sie bei Experiment B beobachtet wurden, und **Fig. 2C** eine Darstellung von Intensitäten ist, wie sie in Experiment C beobachtet wurden. Peakähnliche Strukturen in den Figuren; die sich von Darstellungen elektromagnetischer Signale des Probenhintergrunds unterscheiden, sind Darstellungen von EtBr, das in somatischen Zellen, die in Milchproben. enthalten sind, an DNA gebunden ist.

[0206] In allen Fällen sind die Figuren das zahlenmäßig positive Ergebnis der Subtraktion einer Messung der Probe von einer anderen Messung eines anderen Teils der Probe, unter Verwendung der Formel: $\text{Signal}(ij) = \text{ABS}(\text{Messung } 1_{(ij)} - \text{Messung } 2_{(ij)})$, wobei sich i und j auf die Zeile und die Spalte des CCD-Elements beziehen, wodurch jeder systematische Fehler des Meßsystems unterdrückt wird.

[0207] In Experiment A, gezeigt in **Fig. 2A**, war die Signalintensität derart, daß eine Mehrzahl von Zellen Signale zeigte, die Ladungsüberfüllung auf dem CCD-Element hervorriefen, was zunächst in einem Abschneiden des Signals aufgrund der Tatsache resultierte, daß sich das Signal außerhalb des Bereichs der Detektorelemente befand, und zweitens darin resultierte, daß die Signalspitze wegen Ladungstransfer von überladenen Detektorelementen zu benachbarten Detektorelementen verbreitert wurde. Außerdem ist es offensichtlich, daß die Variation in den Signalen des Hintergrunds hoch ist, wahrscheinlich aufgrund der Wechselwirkung zwischen freiem EtBr und der Probenmatrix (z. B. Fetttröpfchen und Proteinmizellen).

[0208] **Fig. 2B** zeigt typische Signale, wie sie in Experiment B beobachtet wurden. Die Experimente A und B waren identisch abgesehen von der Konzentration von EtBr, und der gewinnbringende Effekt des Verringerns der EtBr-Konzentration auf die Signalintensität und die Signalverbreiterung ist deutlich erkennbar. Zusätzlich ist die Zufallsabweichung im Hintergrund etwa 1/2 der Abweichung, die in Experiment A beobachtet wurde.

[0209] **Fig. 2C** zeigt typische Ergebnisse von Experiment C. In diesem Experiment wurde die Intensität des Erregerlichts wie auch die Integrationszeit der Detektorelemente erhöht. Das Ergebnis aus Experiment C ist, daß die Signale beträchtlich schwächer sind als in Experiment B, bei einem Hintergrundsignal ähnlicher Größe.

Folgerung

[0210] Die obigen Ergebnisse zeigen, daß es möglich ist, Signale von somatischen Zellen unter Verwendung von Konzentrationen von EtBr zu detektieren, die beträchtlich kleiner sind als Konzentrationen, die normalerweise für die Fluoreszenzdetektion von DNA-enthaltenden Partikeln verwendet werden.

[0211] Eine bevorzugte Ausführungsform dieser Erfindung basiert auf einem optischen System, das einen Sammelwinkel von zwischen 40 und 70 Grad aufweist, verglichen mit den 10 Grad, die im vorliegenden Beispiel verwendet werden; dies resultiert in der Sammlung von etwa 10 bis 300 mal so viel Energie, wodurch es möglich wird, die Konzentration des Reagens noch weiter zu reduzieren.

Beispiel 2

Entfernung eines Signalfehlers durch Kombination von Messungen von einer linearen Anordnung von Detektorelementen.

[0212] Die Beseitigung eines systematischen Signalfehlers kann bei der Verarbeitung von gemessenen Signalen von Interesse sein. Im vorliegenden Beispiel wurde eine lineare Anordnung von Detektorelementen des Typs Hamamatsu (S3902-128Q) in einer Anordnung verwendet, die ähnlich zu der in **Fig. 1** dargestellten ist.

Unter den verwendeten Bedingungen lieferte die Anordnung von Detektorelementen ein Ergebnis, das einen systematischen Fehler zwischen Detektorelementen mit geradem Index und Detektorelementen mit ungeradem Index lieferte. Eine Serie von zwei Messungen wurde durchgeführt, wobei Wasser als Probenmaterial verwendet wurde.

Ergebnisse

[0213] **Fig. 3** zeigt die Ergebnisse der Messungen von Wasser. **Fig. 3A** zeigt das Ergebnis der ersten Messung, nachdem die Messung an den mittleren Fehler angeglichen war. Aus **Fig. 3A** wird deutlich, daß es einen deutlichen Unterschied in der Signalintensität bei ungeraden und geraden Detektorelementen gibt, dergestalt, daß Elemente mit einem ungeraden Index allgemein ein kleineres Signal aufweisen. **Fig. 3B** zeigt das Ergebnis des Scans **1**, nachdem die Ergebnisse von Scan **2** subtrahiert wurden. Offensichtlich ist, daß der systematische Effekt ungerader und gerader Detektorelemente im wesentlichen beseitigt wurde, was zu einem Signal mit einer Grundlinie führte, die erwartungsgemäß Variationen aufweist, die mehr Zufallscharakter besitzen; es kann erwartet werden, daß die Amplitude dieses Rauschens eine Amplitude von etwa 1.41 der Amplitude jedes zufälligen Rauschens besitzt, das in der Messung vorhanden ist.

Folgerung

[0214] Die Folgerung aus dem obigen Ergebnis ist, daß es möglich ist, einen systematischen Fehler durch Subtraktion einer Messung von einer anderen zu beseitigen. Zusätzlich zu Veränderungen im Detektorsystem kann ein systematischer Fehler durch viele andere Faktoren verursacht werden, z. B. durch Partikel, die an einer Wand kleben bleiben, Veränderungen in der Intensität des Erregerlichts einer Lichtquelle, die aus einer Menge von Elementen wie lichtemittierenden Dioden besteht usw. Ein Ausgleich für einen systematischen Fehler, wie z. B. im vorliegenden Beispiel und in Beispiel 1 gezeigt, erhöht den Unterschied zwischen Darstellungen elektromagnetischer Signale von biologischen Partikeln und Darstellungen elektromagnetischer Signale vom Probenhintergrund. Für viele Anwendungen wird jedoch die von sich aus vorhandene Unterscheidung bei Verwendung des Verfahrens nach der vorliegenden Erfindung ausreichend oder mehr als ausreichend sein, selbst ohne einen Ausgleich für systematische Fehler. Die Verwendung eines entsorgbaren Probenbehältnisses, das lediglich einmal verwendet wird, wird alle Probleme beseitigen, die auf klebende Partikel zurückzuführen sind.

Beispiel 3

Optische Konfiguration für eine Weitwinkelsammlung eines Signals einer Probe

[0215] Es kann gezeigt werden, daß die Intensität jedes Signals, das von einer Probe gesammelt wird, vom Quadrat des Sammelwinkels abhängt. In der konventionellen automatisierten Mikroskopie beträgt der Sammelwinkel höchstens 20 Grad und normalerweise beträchtlich darunter, beispielsweise 1 bis 5 Grad. Wegen der geringen Vergrößerung (oder keiner Vergrößerung), die gemäß der vorliegenden Erfindung verwendet werden kann, und der robusten Verarbeitung, die dadurch möglich ist, kann ein deutlich größerer Sammelwinkel verwendet werden. Im vorliegenden Beispiel werden zwei unterschiedliche optische Anordnungen verwendet, um einen Sammelwinkel von etwa 40 bzw. etwa 70 Grad zu erhalten.

[0216] **Fig. 4** zeigt eine optische Anordnung, die einen Sammelwinkel von etwa 40 Grad produziert, wenn sie ein Signal aus einem Probenbehältnis **401** sammelt und auf die Detektorelemente **404** projiziert, unter Verwendung von zwei achromatischen Linsen, eine **402** des Typs Melles Griot 01 (LAO 014: F = 21 mm, D = 14 mm) und eine andere **403** des Typs Melles Griot 01 (LAO 111: F = 80 mm, D = 18 mm).

[0217] **Fig. 5** zeigt eine optische Anordnung, die einen Sammelwinkel von etwa 70 Grad produziert, wenn ein Signal von einem Probenbehältnis **501** gesammelt wird und auf die Detektorelemente **506** projiziert wird, unter Verwendung einer Immersionslinse **502** mit einem Radius von etwa 5 mm und einer Breite von etwa 8.3 mm, und einer aplanatischen Linse **503** mit einem Radius von etwa 12.5 mm und einem Radius von etwa 10.5 mm und zwei identischen achromatischen Linsen **504** und **505** des Typs Melles Griot 01 (LAO 028: F = 31 mm; D = 17.5 mm).

Beispiel 4

Komponenten einer entsorgbaren Meß- und Testeinheit

[0218] Die Komponenten eines Systems, das für die Bewertung von biologischen Partikeln gemäß den Prinzipien der vorliegenden Erfindung verwendet werden kann, sind in **Fig. 6** dargestellt. Die Komponenten in

Fig. 6 sind folgendermaßen: Ein Einlaß **601**, durch den die Probe in das System eingeführt wird, eine Pumpe **602**, die stromaufwärts vom Probenbehältnis angeordnet ist, ein Ventil **603**, das die Einführung der Probe steuert, Mittel **604**, die die Einführung einer oder mehrerer absichtlich beigefügter chemischer Komponenten ermöglicht, Mittel **605**, die das Vermischen der Probe mit einer oder mehrerer chemischer Komponenten und/oder jede andere mechanische oder physikalische Betätigung, wie z. B. Zurückhalten von Partikeln, ermöglichen, ein Probenbehältnis **606**, ein Ventil **607**, das den Fluß aus dem Probenbehältnis kontrolliert, eine Pumpe **608**, die stromabwärts vom Probenbehältnis angeordnet ist, ein Auslaß **609** aus dem System und eine Einheit **610**, die eine oder mehrere Komponenten des Systems umgibt.

[0219] Abhängig von der Natur der Probe, die analysiert werden soll, und anderen Faktoren, die mit dem Testen und Messen in Verbindung stehen, würde das bevorzugte System nicht immer alle Komponenten umfassen, wie sie in **Fig. 6** angeordnet sind, oder es könnte lediglich eine oder mehrere dieser Komponenten in einer Komponente integriert sein. Das vorliegende Beispiel diskutiert mehrere mögliche Konstruktionen.

A – System, das in einer entsorgbaren Einheit enthalten ist

[0220] Mehrere Anwendungen der vorliegenden Erfindung können auf einem System basieren, das in einer entfernbaren und entsorgbaren Einheit enthalten ist, oder in einer Einheit, die erneuert werden kann. Ein solches System besitzt eine Anzahl an Vorteilen, einschließlich der Folgenden: Eliminierung eines stationären Systems, das Wartung wie z. B. Reinigung benötigt, die Möglichkeit, Stichproben entnehmen und messen zu können, ohne jede weitere Handhabung einer Probe, was die Handhabung von gefährlichem Material sicherer macht.

[0221] Eine derartige Systemeinheit **610** basiert auf folgenden Komponenten: Ein Einlaß **601**, durch den die Probe in die Systemeinheit eingeführt werden kann, vorzugsweise ein Ventil **603**, das nahe dem Einlaß angeordnet ist oder in den Einlaß integriert ist und es der flüssigen Probe erlaubt, lediglich in eine Richtung zu fließen, vorzugsweise ein chemischer Behälter **604** für jede Beifügung chemischer Komponenten, vorzugsweise eine Mischkammer oder ein Verteiler **605**, der es ermöglicht, die Probe und jede beliebige chemische Komponente zu vermischen, ein Probenbehältnis **606**, in dem eine Messung jedes Signals von der Probe durchgeführt wird, ein Ventil **607**, das den Fluß der Probe durch das Probenbehältnis kontrolliert, vorzugsweise ein Ventil, das Gas oder Luft frei hindurchtreten läßt, aber im wesentlichen irreversibel abschließt, wenn es in Kontakt mit der Probe kommt, und schließlich eine Pumpe **608**, die in der Lage ist, die Probe vom Einlaß zur Pumpe **607** oder jenseits von diese zu bewegen.

[0222] Wenn es beabsichtigt ist, daß jede Probe, die in den Einlaß eintritt, nach Vollendung der Analyse innerhalb der Systemeinheit zurückgehalten werden kann, wird üblicherweise kein Auslaß aus der Systemeinheit vorgesehen, durch den die Probe das System verlassen könnte. Nach Vollendung der Analyse kann eine solche Systemeinheit sicher entsorgt oder neu aufbereitet werden, unabhängig von der Natur der Probe oder jeder chemischen Komponente, die der Probe beigefügt wurde.

B – System, das in einer entsorgbaren Einheit enthalten ist, zur Probenentnahme großer Volumina, die durch mehrere Messungen analysiert werden

[0223] Für einige Zwecke kann es interessant sein, relativ große Volumina an Probenmaterial durch verschiedene Messungen einer Anzahl individueller Proben, die aus einem größeren Volumen entnommen werden, messen zu können. Dies kann z. B. eintreffen, wenn die mögliche Anwesenheit und, falls vorhanden, die Konzentration von Bakterien bewertet werden, die zu einem Ausschluß des Produkts führen, selbst wenn sie lediglich in sehr geringer Anzahl vorhanden sind, beispielsweise Salmonellen. In einem solchen Fall kann es von Interesse sein, eine kleine oder große Serie von Messungen mit Proben von "normalem Volumen" durchzuführen, die aus einem größeren, aber wohldefinierten Volumen an Probenmaterial entnommen wurden, und anschließend optional die Ergebnisse von der kleinen oder größeren Serie mit normalem Volumen auf das wohldefinierte größere Volumen zu übertragen. Gemäß der vorliegenden Erfindung kann dies durchgeführt werden unter Verwendung eines Systems, das in einer entfernbaren und entsorgbaren Einheit enthalten ist, oder in einer Einheit, die zur Wiederverwendung erneuert werden kann. Es gibt mehrere Vorteile eines solchen Systems, einschließlich: Verbesserte Sensitivität und Präzision aufgrund von mehreren Messungen und dadurch Messung eines größeren Gesamtvolumens, Eliminierung eines stationären Flußsystems, das Wartung wie z. B. Reinigung benötigt, die Möglichkeit, in der Lage zu sein, einmal eine Probe zu entnehmen und dann mehrere Male zu messen, ohne weitere Handhabung der Probe, was die Handhabung von gefährlichem Material sicherer macht.

[0224] Eine derartige Systemeinheit **610** kann auf folgenden Komponenten basieren: Ein Einlaß **601**, durch den die Probe in die Systemeinheit eingeführt werden kann, vorzugsweise ein Ventil **603**, das nahe zum Einlaß angeordnet ist oder in den Einlaß integriert ist und es der flüssigen Probe ermöglicht, lediglich in eine Richtung zu fließen, vorzugsweise ein chemischer Behälter **604** zur Beifügung von chemischen Komponenten, vorzugs-

weise eine Mischkammer oder ein Verteiler **605**, der es ermöglicht, daß die Probe und jede beliebige chemische Komponente vermischt werden, und der ein Volumen aufweist, das wenigstens dem Volumen der großen Probe mit beigefügten chemischen Komponenten entspricht, ein Probenbehältnis **606** von "normalem Volumen", in dem die Messung jedes Signals von der Probe aufeinanderfolgend in einer Reihe von Proben durchgeführt wird, die der großen Probe entnommen wurden, ein Ventil **607**, das den Fluß der individuellen Probe durch das Probenbehältnis steuert, und schließlich eine Pumpe **608**, die in Verbindung mit den individuellen Messungen in der Lage ist, zumindest einen Teil der Probe, die in der Mischkammer enthalten ist, für die Messung zum Probenbehältnis durchzulassen, wobei die Pumpe vorzugsweise die Kapazität besitzt, zumindest das Volumen der Probe, das durch den Einlaß hindurchtritt, in einem Modus des Eintritts einer großen Probe zurückzuhalten.

[0225] Das System würde die Steuerung zumindest eines Ventils und/oder einer Pumpe benötigen, die es ermöglichen, daß unterschiedliche Teile der Probe gleichzeitig analysiert werden.

C – System, das in einer entsorgbaren Einheit enthalten ist, zur Probenentnahme großer Volumina, die durch eine einzelne Messung analysiert werden

[0226] Es ist oftmals von Interesse, ein großes Volumen einer Probe messen zu können. Dies kann auch durchgeführt werden unter Verwendung eines Systems, das in einer entfernbaren und entsorgbaren Einheit enthalten ist, oder einer Einheit, die erneuert werden kann. Der Vorteil eines solchen Systems würde beinhalten: Verbesserte Sensitivität und Präzision aufgrund der Messung eines großen Volumens, Eliminierung eines stationären Flußsystems, das Wartung wie Reinigung benötigen würde, die Möglichkeit, Proben entnehmen und messen zu können, ohne weitere Handhabung einer Probe, was die Handhabung von gefährlichem Material sicherer macht.

[0227] Eine derartige Systemeinheit **610** könnte auf den folgenden Komponenten basieren: Ein Einlaß **601**, durch den die Probe in die Systemeinheit eingeführt wird, vorzugsweise eine Pumpe **602** oder ein Ventil **603**, angeordnet nahe zum Einlaß oder in den Einlaß integriert, wodurch die flüssige Probe lediglich in einer Richtung fließen kann und die Probe zu einer Vorrichtung **605** geleitet wird, die ein Partikel zurückhalten kann, vorzugsweise eine Behältervorrichtung, die zumindest das Volumen der Probe, die durch den Einlaß hindurchtritt, beinhalten kann, oder verbunden mit einem Auslaß **609** es der Probe ermöglicht, die Systemeinheit zu verlassen, vorzugsweise ein chemischer Behälter **604** für jede Beifügung chemischer Komponenten, die mit der Vorrichtung zum Zurückhalten von Partikeln verbunden ist, vorzugsweise eine Mischkammer oder ein Verteiler **605**, der es ermöglicht, die Probe und jede chemikalische Komponente zu vermischen, ein Probenbehältnis **606**, in dem eine Messung jedes Signals von der Probe durchgeführt wird, ein Ventil **607**, das den Fluß der Probe durch das Probenbehältnis steuert, vorzugsweise ein Ventil, das Gas oder Luft frei hindurchtreten läßt, aber im wesentlichen irreversibel schließt, wenn es in Kontakt mit der Probe kommt, und schließlich eine Pumpe **608**, die in der Lage ist, zumindest einen Teil der Probe, die in der Vorrichtung zum Zurückhalten von Partikeln enthalten ist, durch den Behälter für chemische Komponenten zur Messung in das Probenbehältnis durchzulassen.

[0228] Mit einer geringen Veränderung in der Anordnung der Komponenten wäre es möglich, das Signal der Partikel in der Probe zu messen, während sie auf oder in der Vorrichtung zum Zurückhalten von Partikeln zurückgehalten werden. Eine mögliche Anordnung könnte es sein, die Vorrichtung zum Zurückhalten von Partikeln in der Probeneinheit aufzunehmen, und die Probe durch die Probeneinheit hindurchtreten zu lassen. Dann würde vorzugsweise jede chemische Komponente durch oder in das Probenbehältnis eintreten, wodurch die Vermischung mit jedem zurückgehaltenen Partikel ermöglicht wird, und schließlich würde die Messung durchgeführt.

D – Stationäres System zur Messung mehrerer Proben

[0229] In vielen Anwendungen wäre es von Interesse, mehr als eine Probe ohne die Ersetzung eines Teils des Flußsystems zwischen den Analysen messen zu können. Ein solches System wäre normalerweise ein stationärer Teil eines analytischen Instruments.

[0230] Ein derartiges System könnte wie folgt aufgebaut sein: Ein Einlaß **601**, durch den die Probe in das System eintritt und eine Pumpe **602** zur Erzeugung des Flusses für die Probe, vorzugsweise ein Ventil **603** zum Steuern des Flusses, vorzugsweise ein Behälter für chemische Komponenten **604**, der vorzugsweise chemische Komponenten für die Messung von mehr als einer Probe enthalten kann, vorzugsweise eine Mischkammer **605** zum Vermischen der Probe und jeder chemischen Komponente, ein Probenbehältnis **606** zur Messung eines Signals der Probe, vorzugsweise ein Ventil **607**, das den Fluß der Probe durch das Probenbehältnis steuert, und einen Auslaß **609**, durch den die Probe das System verläßt.

Beispiel 5

Entsorgbare Meß- und Probenentnahmeeinheit für die Bewertung der Anzahl somatischer Zellen in einem Milchvolumen

[0231] Die Komponenten eines Systems, das für die Bewertung somatischer Zellen in Milch verwendet werden kann, sind in **Fig. 7** gezeigt:

[0232] Ein Einlaß **701**, durch den die Probe in das System gelangt, ein Behälter **702**, der vor der Analyse Reagenzien enthält, ein Behälter **703**, der eine im wesentlichen homogene Vermischung der Milch mit den Reagenzien ermöglicht, ein Probenbehältnis **704**, ein Ventil **705**, das den Fluß vom Probenbehältnis steuert, eine Kolbenpumpe, die Vakuum produziert, bestehend aus einer Kammer **706** mit einer Verbindung zum System und der Außenumgebung, und einem Kolben **707**, der derartige Dimensionen aufweist, daß er eng in die Kammer paßt, wodurch ein geringer Druck auf die Seite des Flußsystems der Pumpenkammer ausgeübt wird, wenn der Kolben in die Kammer hineinbewegt wird.

[0233] Vor der Analyse wird der Probeneinlaß in die zu analysierende Milchprobe eingetaucht. Während der Probeneinlaß in die Milchprobe eingetaucht wird, wird die Probe in das System der entsorgbaren Meß- und Probenentnahmeeinheit eingespeist, indem der Kolben zumindest teilweise in die Pumpenkammer hineinbewegt wird. Das produzierte Vakuum sollte so groß sein, daß die Milchprobe durch den Behälter mit den Reagenzien fließt, wodurch zumindest ein Teil der im Behälter vorhandenen Reagenzien aufgelöst oder in Suspension gebracht wird, woraufhin die Milchprobe in den Mischbehälter fließt.

[0234] Vorzugsweise weist der Mischbehälter ein ausreichend großes Volumen auf, um sicherzustellen, daß er lediglich teilweise mit der Milch und allen Reagenzien, die aufgelöst oder in Suspension gebracht werden, gefüllt wird, wodurch es ermöglicht wird, daß der Inhalt der Mischbehälterkammer frei in die Kammer fließt und somit effektiv vermischt werden kann.

[0235] Nachdem der Mischvorgang abgeschlossen ist, wird der Kolben weiter in die Pumpenkammer hineinbewegt, wodurch ein Vakuum produziert wird, das in der Lage ist, die Milchprobe in das Probenbehältnis eintreten zu lassen, und noch weiter in das Ventil hinein, das aufgrund des Kontakts mit der Probe schließt, wodurch im wesentlichen der Fluß der Probe durch das Probenbehältnis angehalten wird.

[0236] Die Abmessung des Reagenzienbehälters sollte adäquat sein, um die Speicherung der verwendeten Reagenzien zu erlauben, beispielsweise 2 mg Triton X 100 (t-Octylphenoxypolyethoxyethanol) und 5 µg Propidiumjodid (CAS-25535-16-4). Die Form des leeren Raums innerhalb des Reagenzienbehälters sollte vorzugsweise derart sein, daß die Auflösung oder Suspension der Reagenzien, die vor der Analyse in dem Behälter enthalten sind, verstärkt wird.

[0237] Der Mischbehälter hat ein Volumen von etwa 200 µl, abhängig von der Gesamtmenge an Milch, die für die Analyse verwendet wird. Die Form des leeren Raums des Mischbehälters sollte derart sein, daß es jeder Flüssigkeit erlaubt wird, von einer Begrenzung zur anderen zu fließen, wodurch eine gute Vermischung gewährleistet wird.

[0238] Das Probenbehältnis besteht aus zwei im wesentlichen parallelen Ebenen, die einen leeren Raum mit etwa den Abmessungen 10 × 10 × 0.07 mm (Höhe, Breite, Tiefe) bilden. Abhängig von dem Verfahren, das für die Produktion der Einheit verwendet wird, ist dann entweder die durchschnittliche Tiefe des Probenbehältnisses im wesentlichen identisch für alle individuellen entsorgbaren Meß- und Probenentnahmeeinheiten, wodurch reproduzierbare Volumina von Milch während der Analyse im Probenbehältnis vorhanden sind, oder es ist möglich, jede individuelle entsorgbare Meß- und Probenentnahmeeinheit zu kennzeichnen, wobei das Kennzeichen die ungefähre Tiefe des Probenbehältnisses identifiziert, so daß es möglich ist, daß die Gerätschaft die Bewertung somatischer Zellen in Milch für variierende Tiefen des Probenbehältnisses ausgleicht.

[0239] Das Ventil, welches in der entsorgbaren Meß- und Probenentnahmeeinheit verwendet wird, ist dergestalt, daß es in der Lage ist, Luft hindurchzulassen, bis es in Kontakt mit einer Flüssigkeit kommt. Wenn eine Flüssigkeit in Kontakt mit dem Ventil kommt, wird es im wesentlichen irreversibel geschlossen, so daß weder Flüssigkeit noch Luft hindurchtreten können. Ein solches Ventil kann unter Verwendung von Fasermaterial der Porex Technologies GmbH, Deutschland (XM-1378, EDP#NS-7002) konstruiert werden.

Beispiel 6

Instrument für die Bewertung der Anzahl somatischer Zellen in einem Milchvolumen

[0240] **Fig. 8** zeigt ein Instrument, das für die Bewertung der Anzahl somatischer Zellen in einem Volumen einer Milchprobe verwendet werden kann. Das Instrument wird entweder durch eine externe Stromquelle **801** betrieben, oder durch eine interne Stromquelle wie einen wiederaufladbaren Bleiakкумулятор **803** (12V, 2.2 Ah), hergestellt durch Wetronic Inc. (WE12-2.2).

[0241] Die Stromversorgung/Batterie 802 versorgt die unterschiedlichen Einheiten des Instruments. Die

Stromversorgung kann Strom aus einer externen oder internen Stromquelle beziehen, und kann während der Betätigung zwischen zwei Quellen hin- und herschalten. Es ist möglich, den Stromverbrauch zu verringern, wenn das Instrument in Bereitschaft ist.

[0242] Die Bewertung der Anzahl somatischer Zellen wird durchgeführt, indem ein Fluoreszenzsignal detektiert wird, das von einem Fluorochrom stammt, welches in somatischen Zellen, die in dem Probenbehältnis **807** vorhanden sind, gebunden ist. Das Probenbehältnis wird durch zwei im wesentlichen parallele Ebenen eines durchlässigen Materials gebildet, so daß ein Behältnis mit Dimensionen von etwa $10 \times 10 \times 0.7$ mm (Höhe, Breite, Tiefe) geformt wird.

[0243] Die Fluoreszenz wird erzeugt, indem Licht hoher Energie (Erregerlicht einer Wellenlänge von 550 nm oder weniger) durch das Probenbehältnis geschickt wird, mit einer Richtung auf das Detektormodul **811** zu. Die Quelle **804** des Erregerlichts kann entweder eine Halogenlampe des Typs OSRAM-64255 (8V, 20W photooptische Lampe) oder eine Anzahl lichtemittierender Dioden sein, beispielsweise vier oder mehr, des Typs NSPG-500S oder NSPE-590S (Nichia Chemical Industries Ltd., Japan).

[0244] Um im wesentlichen jede Komponente aus dem Erregerlicht mit einer Wellenlänge von über 550 nm zu entfernen, damit sie nicht das Probenbehältnis erreicht, wird ein optischer Filter **805** in den Lichtweg eingefügt. Dieser Filter ist vom Typ Ferroperm SWP550, ein doppelseitiger Interferenzfilter auf einem 2 mm Substrat (Hoya, CM-500), der Infrarotstrahlung absorbiert.

[0245] Um weiter zu verhindern, daß Infrarotstrahlung das Probenbehältnis erreicht, wird ein wärmeabsorbierender Filter **806** in den Lichtweg eingefügt. Dieser Filter ist vom Typ Schott KG5 oder KG3 (3 mm dick). Dieser Filter kann weggelassen werden, wenn lichtemittierende Dioden als Lichtquelle verwendet werden.

[0246] Das Licht, das vom Probenbehältnis emittiert wird, wird unter Verwendung von zumindest einer Linse **808** auf die Sensoren des Detektormoduls fokussiert. Diese Linse ist ein Standardviertachmikroskopobjektiv mit einer numerischen Apertur von 0.10 (vertrieben durch G. J. Carl Hansens Eff., Dänemark). Die Linse ist derart angeordnet, daß sie eine Abbildung eines Objekts im Probenbehältnis auf den Sensoren des Detektormoduls liefert, die im wesentlichen dieselbe Größe hat wie das Originalobjekt (Vergrößerung etwa einfach).

[0247] Um zu verhindern, daß im wesentlichen jedes Licht mit einer Wellenlänge von unter 575 nm das Detektormodul vom Probenbehältnis aus erreicht, wird ein optischer Filter **809** in den Lichtweg eingeführt. Dieser Filter ist vom Typ Schott OG590 (3 mm dick).

[0248] Um weiterhin zu verhindern, daß Infrarotstrahlung das Detektorsystem erreicht, wird ein wärmeabsorbierender Filter **810** im Lichtweg angeordnet. Der Filter ist vom Typ Schott KG5 oder KG3 (3 mm dick). Dieser Filter kann weggelassen werden wenn lichtemittierende Dioden als Lichtquelle verwendet werden.

[0249] Das gefilterte Licht aus dem Probenbehältnis wird durch ein CCD-Element **811** des Typs GCA325KBL (vertrieben von L&G Semicon) detektiert. Das CCD-Element ist ausgestattet mit 510×492 Detektorelementen.

[0250] Die elektrische Information vom CCD-Element wird verstärkt und von einem Analog/Digitalwandlermodul **812** (ADC) gemessen.

[0251] Die Betätigung des Instruments wird durch eine Computereinheit **813** gesteuert. Der Computer ist ein Motorola DSP56824 16 Bit Digitalsignalprozessor, ausgestattet mit einer nichtflüchtigen Speicherkapazität für eine Langzeitspeicherung (EEPROM) und einer flüchtigen Speicherkapazität (RAM). Der Computer sammelt Informationen über die gemessene Lichtintensität jedes Detektorelements der CCD-Anordnung vom ADC-Modul und verwendet diese zur Bewertung der Anzahl somatischer Zellen in der Milchprobe, die im Probenbehältnis vorhanden ist. Das Computermodul ist mit einer Echtzeituhr ausgestattet.

[0252] Das Ergebnis der Bewertung der Anzahl somatischer Zellen in der Milchprobe wird auf einem Display **815** des Typs MDLS16166-3V (vertrieben von Varitronix) angezeigt.

[0253] Das Ergebnis der Bewertung der Anzahl somatischer Zellen in der Milchprobe kann auch unter Verwendung des Ausgangsports **816** an einen externen Computer (nicht gezeigt) übermittelt werden.

[0254] Der Benutzer des Instruments kann dessen Betätigung steuern und relevante Informationen durch eine Ansammlung von Tasten, die ein Tastenpad **814** bilden, eingeben. Das Tastenpad ist ein Modul mit 16 Tasten vom Typ ECO 16250 06 SP.

Beispiel 7

Instrument zur Bewertung der Anzahl von Bakterien in einem Volumen einer wässrigen Probe

[0255] **Fig. 8** zeigt ein Instrument, das für die Bewertung der Anzahl von Bakterien in einem Volumen einer wässrigen Probe verwendet werden kann. Das Instrument wird entweder durch eine externe Stromquelle **801** oder eine interne Stromquelle wie einen aufladbaren Bleiakkumulator **803** (12 V, 2.2 Ah) betrieben, hergestellt durch Wetronic Inc. (WE21-2.2).

[0256] Die Stromversorgung/Batterie **802** versorgt die verschiedenen Einheiten des Instruments. Die Stromversorgung kann Strom entweder von einer externen oder der internen Stromquelle beziehen, und sie kann zwischen den zwei Quellen während der Betätigung hin- und herschalten. Es ist möglich, den Stromverbrauch

zu verringern, wenn das Instrument in Bereitschaft ist.

[0257] Die Bewertung der Anzahl an Bakterien wird durchgeführt, indem ein Fluoreszenzsignal, das von einem Fluorochrom stammt, welches an DNA gebunden ist, die sich im Probenbehältnis **807** befindet, detektiert wird. Das Probenbehältnis wird definiert durch zwei im wesentlichen parallele Ebenen von durchlässigem Material, wodurch ein Behältnis mit Dimensionen von etwa $10 \times 10 \times 0.7$ mm (Höhe, Breite, Tiefe) geformt wird.

[0258] Die Fluoreszenz wird erzeugt, indem Licht hoher Energie (Erregerlicht mit einer Wellenlänge von 550 nm oder weniger) durch das Probenbehältnis geleitet wird, mit einer Richtung hin zum Detektormodul **811**. Die Quelle **804** des Erregerlichts kann entweder eine Halogenlampe des Typs OSRAM-64255 (8V, 20W photooptische Lampe) oder eine Anzahl lichtemittierender Dioden sein, beispielsweise vier oder mehr, des Typs NSPG-500S oder NSPE-590S (Nichia Chemical Industries Ltd., Japan).

[0259] Um im wesentlichen jede Komponente aus dem Erregerlicht mit einer Wellenlänge von über 550 nm zu entfernen, damit sie nicht das Probenbehältnis erreicht, wird ein optischer Filter **805** in den Lichtweg eingeführt. Dieser Filter ist vom Typ Ferroperm SWP550, ein doppelseitiger Interferenzfilter auf einem 2 mm Substrat (Hoya, CM-500), der Infrarotstrahlung absorbiert.

[0260] Um weiterhin zu verhindern, daß Infrarotstrahlung das Probenbehältnis erreicht, wird ein wärmeabsorbierender Filter **806** im Lichtweg angeordnet. Dieser Filter ist vom Typ Schott KG5 oder KG3 (3 mm dick). Dieser Filter kann weggelassen werden, wenn lichtemittierende Dioden als Lichtquelle verwendet werden.

[0261] Das Licht, das vom Probenbehältnis emittiert wird, wird auf die Sensoren des Detektormoduls unter Verwendung einer Linse **808** fokussiert. Diese Linse kann ein Standardvierfachmikroskopobjektiv mit einer numerischen Apertur von 0.10 sein (vertrieben von G. J. Carl Hansens Eff., Dänemark), oder ein Standardzehnfachmikroskopobjektiv. Die Linse ist derart angeordnet, daß sie eine Abbildung eines Objekts im Probenbehältnis auf die Sensoren des Detektormoduls liefert, die im wesentlichen vier bis sechsmal so groß ist wie das Originalobjekt (Vergrößerung etwa zwischen vierfach und sechsfach).

[0262] Um zu verhindern, daß vom Probenbehältnis emittiertes Licht mit einer Wellenlänge von unter 575 nm das Detektormodul erreicht, wird ein optischer Filter **809** in den Lichtweg eingeführt. Dieser Filter ist vom Typ Schott OG590 (3 mm dick).

[0263] Um weiterhin zu verhindern, daß Infrarotstrahlung das Detektorsystem erreicht, wird ein wärmeabsorbierender Filter **810** im Lichtweg angeordnet. Dieser Filter ist vom Typ Schott KG5 oder KG3 (3 mm dick). Dieser Filter kann weggelassen werden, wenn lichtemittierende Dioden als Lichtquelle verwendet werden.

[0264] Das gefilterte Licht aus dem Probenbehältnis wird durch eine CCD-Anordnung **811** des Typs GCA325KBL (vertrieben von L & G Semicom) detektiert. Die CCD-Anordnung ist mit 510×492 Detektorelementen ausgestattet.

[0265] Die elektrische Information von der CCD-Anordnung wird verstärkt und von einem Analog/Digitalwandler **812** (ADC) gemessen.

[0266] Die Betätigung des Instruments wird durch eine Computereinheit **813** gesteuert. Der Computer ist ein Motorola DSP56824 16 Bit Digitalsignalprozessor, ausgestattet mit einer nichtflüchtigen Speicherkapazität zur Langzeitspeicherung (EEPROM) und einer flüchtigen Speicherkapazität (RAM). Der Computer sammelt Informationen über die gemessene Lichtintensität jedes Detektorelements von der CCD-Anordnung vom ADC-Modul und verwendet diese zur Bewertung der Anzahl von Bakterien in einem Volumen der wässrigen Probe, die im Probenbehältnis vorhanden ist. Das Computermodule ist mit einer Echtzeituhr ausgestattet.

[0267] Das Ergebnis der Bewertung der Anzahl von Bakterien in einem Volumen der wässrigen Probe wird auf einem Display **815** des Typs MDLS16166-3 V (vertrieben von Varitronix) angezeigt.

[0268] Das Ergebnis der Bewertung der Anzahl von Bakterien in einem Volumen einer wässrigen Probe kann auch unter Verwendung des Ausgangsports **816** an einen externen Computer (nicht gezeigt) übermittelt werden.

[0269] Der Benutzer des Instruments kann dessen Betätigung steuern und kann relevante Informationen durch eine Ansammlung von Tasten, die ein Tastenpad **814** bilden, eingeben. Das Tastenpad ist ein aus 16 Tasten bestehendes Modul des Typs ECO 16250 06 SP.

Beispiel 8

Bewertung der Anzahl somatischer Zellen in einem Milchvolumen gemäß der vorliegenden Erfindung verglichen mit den Ergebnissen eines Routine-Instruments

[0270] Das Ergebnis der Bewertung der Anzahl somatischer Zellen in einem Milchvolumen gemäß der vorliegenden Erfindung wurde mit den Ergebnissen verglichen, die von einem Fosso-Matic **400** Routine-Instrument (Foss Electric, Dänemark) erhalten wurden.

[0271] 191 Milchproben von individuellen Kühen wurden auf dem FossoMatic-Instrument nach den Anweisungen gemessen, die durch die Hersteller vorgegeben wurden (Foss Electric, Dänemark).

[0272] Nach Vollendung der Messung auf dem FossoMatic-Gerät wurde ein 1 ml ($\pm 2\%$)-Teil der verbleiben-

den Probe genommen und mit 1 ml ($\pm 1\%$) einer wässrigen Reagenslösung vermischt, was zu einer Milchlösung mit einem Gehalt von 0.25% (w/v) Triton X-100 (t-Octylphenoxypolyethoxyethanol) und 25µg/ml Propidiumjodid (CAS-25535-16-4) führte.

[0273] Die Bewertung der Anzahl somatischer Zellen in einem Milchvolumen wurde auf einem Instrument gemäß der vorliegenden Erfindung durchgeführt, das mit einem Erregermodul ausgestattet war, welches eine Halogenlichtquelle aufwies, OSRAM – 64255 (8 V, 20 W photooptische Lampe), einen optischen Filter, Ferroperm SWP550 (doppelseitiger Interferenzfilter auf einem 2 mm Substrat (Hoye, BG-39), der Infrarotstrahlung absorbiert) und einen wärmeabsorbierenden Filter (Schott KGS, 3 mm dick), und ein Detektormodul mit einer Fokussierlinse, ein Standardvierfachmikroskopobjektiv mit einer numerischen Apertur von 0.10, derart angeordnet, daß eine Vergrößerung von etwa einfach auf den Sensorelementen geliefert wird, einen optischen Filter (Schott OG590, 3 mm dick), und einen wärmeabsorbierenden Filter, Schott KG5 (3 mm dick), sowie einen CCD-Detektor, SONY-CX 045 BL.

[0274] Ein Teil der Milchlösung wurde zwischen zwei im wesentlichen parallelen Glasplatten plaziert, die etwa in der Fokussierebene des Detektormoduls angeordnet waren, und durch Erregerlicht, das von einem Erregermodul emittiert wurde, bestrahlt. Die Entfernung zwischen den beiden parallelen Glasplatten betrug etwa 100 µm. Das Volumen, das durch das Detektormodul detektiert wurde, definiert durch die Größe der CCD-Anordnung, der verwendeten Vergrößerung und der Entfernung zwischen den parallelen Glasplatten, war etwa 1 µl und enthielt somit etwa 0.5 µl Milch.

[0275] Das Probenbehältnis war eine Zelle stationären Flusses. Die Milchlösung wurde unter Verwendung einer peristaltischen Pumpe, die stromabwärts vom Probenbehältnis angeordnet war, in das Probenbehältnis eingeführt. Um die Bewegung der Probe innerhalb des Probenbehältnisses zu reduzieren, wurde unmittelbar angrenzend zum Probenbehältnis ein Ventil in das Flußsystem eingeführt.

[0276] Jede Beobachtung basierte auf der Messung von zwei Teilen der Milchlösung. Die beiden Messungen wurden derart behandelt, daß die zweite Messung numerisch von der ersten Messung subtrahiert wurde, wobei alle Werte beseitigt wurden, die ein negatives Ergebnis lieferten, indem sie auf Null gesetzt wurden. Die Anzahl somatischer Zellen, die in jeder Beobachtung dargestellt wurde, wurde bestimmt durch Identifizierung und Zählen der Anzahl von "Ausschlägen" in der resultierenden Beobachtung.

[0277] Die Bewertung der Anzahl somatischer Zellen in einem Milchvolumen wurde geliefert als die Anzahl der gezählten Ausschläge in zwei Beobachtungen von derselben Probenlösung, und somit dargestellt als die Anzahl somatischer Zellen pro 1 µl Milch.

[0278] Die Ergebnisse, die durch die zwei Methoden erhalten wurden, sind in **Fig. 9** als Graph der Bewertung gemäß der vorliegenden Erfindung (gekennzeichnet mit "Zellenzähler") über die Ergebnisse, die durch das FossoMatic-Instrument erhalten wurden, aufgetragen. **Fig. 9A** zeigt den Graphen des Ergebnisses der 191 Proben. **Fig. 9B** zeigt das Ergebnis, das erhalten wird, wenn diejenigen Proben berücksichtigt werden, die eine geschätzte Anzahl somatischer Zellen von weniger als 400 Zellen/µl aufweisen.

Folgerung

[0279] Die Folgerung aus dem oben beschriebenen Test ist, wie in **Fig. 9** gezeigt, daß die Bewertung der Anzahl somatischer Zellen in Milch nach der vorliegenden Erfindung im allgemeinen in guter Übereinstimmung mit den durch das FossoMatic-Instrument erhaltenen Ergebnissen steht.

Beispiel 9

Auswirkung der Konzentration von Fluorochrom auf die Bewertung biologischer Partikel in einem streuenden biologischen Probenmaterial gemäß der vorliegenden Erfindung

[0280] Wenn die Bewertung biologischer Partikel in einem biologischen Probenmaterial gemäß der vorliegenden Erfindung durchgeführt wird, ist es oftmals von Interesse, das Volumen der Probenlösung, die analysiert wird, zu maximieren. Dies kann beispielsweise erzielt werden durch Erhöhung der Tiefe der zu analysierenden Probe.

[0281] Von der Begrenzung durch eine effektive Fokussiertiefe abgesehen kann eine streuende oder abschwächende Eigenschaft der zu analysierenden Probe die effektive Tiefe der Probe begrenzen.

[0282] Wenn die Analyseproben eine große Anzahl an Partikeln oder anderer Konstituenten enthalten, die in der Lage sind, Streuung oder eine andere Abschwächung eines zu messenden Signals hervorzurufen, kann dies die effektive Tiefe der Probe begrenzen. Der Grund hierfür kann sein, daß jedes Signal, das von einem Partikel stammt, welches relativ tief in der Probe angeordnet ist, abgeschwächt wird, während es in Richtung der Grenzen der Probe fortschreitet.

[0283] Ein solches Probenmaterial ist Milch. Milch enthält sowohl eine große Anzahl an Fetttropfchen als auch an Proteinmizellen. Als ein Ergebnis hiervon ist Milch ein hochgradig streuendes Medium.

[0284] Bei der Bewertung der Anzahl somatischer Zellen in einem Milchvolumen unter Verwendung eines Verfahrens auf der Basis der Messung eines Fluoreszenzsignals der Probe können die streuenden Eigenschaften von Milch die effektive Tiefe der zu analysierenden Probe einschränken. Dies erfolgt teilweise wegen der Abschwächung jedes Signals, das von Zellen stammt, die tief in der Probe angeordnet sind, aber auch aufgrund der Tatsache, daß die Veränderungen im Hintergrundsignal, verursacht durch jedes beliebige Fluorochrommolekül in freier Form, ansteigen, wodurch es schwieriger wird, die Signale zu identifizieren, die von den somatischen Zellen stammen.

[0285] Das vorliegende Beispiel illustriert die Auswirkung der Konzentration von Fluorochrom auf die Anzahl somatischer Zellen, die in einer Milchprobe identifiziert werden können. Die Probe stammte von einer einzigen Kuh und war mit Bronopol konserviert. Die geschätzte Anzahl somatischer Zellen in der Probe ließ vermuten, daß zwischen 1150 und 1200 Objekten unter den vorliegenden Bedingungen gezählt werden sollten.

[0286] Die Probe wurde in einer Meßzelle gemessen, die aus zwei im wesentlichen parallelen Glasplatten bestand, getrennt durch eine Entfernung von etwa 1100 µm, was die Tiefe der Probe repräsentiert. Zwei Messungen von unterschiedlichen Teilen der Probe wurden gemacht, und die resultierende Abbildung wurde hergestellt, indem die spätere Messung von der ersten Messung subtrahiert wurde und anschließend diejenigen Ergebnisse, die negativ waren, mit dem Wert -1 multipliziert wurden, um eine Endabbildung zu produzieren, die komplett aus Werten bestand, die größer oder gleich Null waren.

[0287] Reagenzien wurden der Milchprobe beigelegt, in einer Menge von etwa 5% des Volumens der zu analysierenden Probe (was zu einer effektiven Dicke der Milch äquivalent zu etwa 95 µm führte). Die Reagenzien enthielten Triton X100 (t-Octylphenoxypolyethoxyethanol), was zu einer letztendlichen Konzentration von 0.24% (w/v) führte, und Propidiumjodid (CAS-25535-16-4) als Fluorochrom, was zu einer letztendlichen Konzentration im Bereich zwischen 89 und 2.4 µg/ml führte. Um das reduzierte Signal hinsichtlich der Verringerung der Konzentration von Propidiumjodid auszugleichen, wurde die elektronische Verstärkung des Detektorsystems entsprechend angepaßt.

[0288] Das Ergebnis des Experiments ist in **Fig. 10** dargestellt, die einen Graphen der Anzahl von Objekten, die gezählt wurden, über die Konzentration von Propidiumjodid zeigt.

Folgerung

[0289] Die Folgerung aus der oben beschriebenen Untersuchung ist, daß es möglich sein kann, die Tiefe der zu analysierenden Probe durch Reduktion der Konzentration des Fluorochroms zu erhöhen, wenn die Meßproben streuende Eigenschaften aufweisen.

Beispiel 10

Verarbeitung einer zweidimensionalen Abbildung

[0290] Das Ergebnis der Messung von Signalen von Partikeln durch eine Anordnung von Detektorelementen, wie CCD-Elementen, z. B. SONY-CX 045 BL, gemäß der vorliegenden Erfindung, kann als zweidimensionale Abbildung visualisiert werden, wobei die Intensität jedes Detektorelements durch eine Dichte oder eine Farbe repräsentiert werden kann.

[0291] **Fig. 11A** liefert eine Darstellung eines Segments einer Abbildung von einer Messung somatischer Zellen in Milch. Die Intensitäten, auf denen **Fig. 11A** basiert, sind in Tabelle 1 unten angegeben. In **Fig. 11** wird die Intensität durch graue Schatten dargestellt, so daß eine geringe Intensität einen leichteren Schatten und eine hohe Intensität einen dunkleren Schatten zeigt.

[0292] Unter der Annahme, daß jede somatische Zelle eine Abbildung erzeugt, die eine Größe von etwa 2 × 2 Detektorelementen besitzt, können wir die Anzahl somatischer Zellen, die in **Fig. 11A** dargestellt werden, auf etwa 10 schätzen.

[0293] Das Ziel, einen Computer zu besitzen, der die Anzahl von Partikeln, die in einer Messung repräsentiert werden, bestimmt, beinhaltet die Konstruktion eines Satzes von Regeln oder Instruktionen für den Computer, bei deren Anwendung auf das Ergebnis einer Messung eine Einschätzung der Anzahl an Objekten abgegeben werden kann.

[0294] Eine einfache derartige Regel könnte es sein, die Anzahl von Detektorelementen zu identifizieren, die eine Intensität oberhalb eines vorgegebenen Grenzwerts aufweisen. Unter der Annahme, daß jedes Objekt im Durchschnitt durch eine Intensität in einer vorgegebenen Anzahl von Detektorelementen repräsentiert wird, kann die Anzahl von identifizierten Detektorelementen eingestellt werden, um eine Schätzung der Anzahl von Objekten abzugeben. Ein solches Verfahren hängt davon ab, daß eine annähernd korrekte Schätzung der Größe der Abbildung eines Objekts erhältlich ist.

[0295] Im Folgenden wird eine Vorbearbeitung der Abbildung dargestellt, die die zuvor dargestellte Methode der Bewertung weniger abhängig macht von der Größe einer Abbildung eines Objekts. Die Auswirkung der Be-

arbeitung ist es, die Intensitätsinformationen in einer vorgegebenen Region der Abbildung auf eine im wesentlichen einzige Anzahl zu konzentrieren.

a) Der erste Schritt der Bearbeitung ist es, einen Bereich zu definieren, der eine Größe besitzt, die zumindest ebenso groß ist wie die Größe der Abbildung eines Objekts, das detektiert werden soll. Im vorliegenden Beispiel ist dieser Bereich von der Größe 5×5 Detektorelemente, aber Bereiche unterschiedlicher Größe können abhängig von der Natur der Abbildung des zu analysierenden Objekts verwendet werden. Dieser Bereich ist in dem zweidimensionalen Koordinatensystem angeordnet, das durch die Detektorelemente definiert wird. In diesem Beispiel liegt der Bereich anfänglich in der oberen linken Ecke des Koordinatensystems. Für jeden solchen Bereich wird ein Datenwert definiert, der den Wert beinhaltet, welcher den Bereich repräsentiert.

Der nächste Schritt ist, den Wert des Datenelements einzustellen, der den Bereich repräsentiert. Dies wird getan, indem zunächst der Intensitätsgradient um das Zentrum des Bereichs in Betracht gezogen wird, und anschließend die Intensitäten der Detektorelemente, die angrenzend an den Mittelpunkt des Bereichs angeordnet sind, in Betracht gezogen werden. Es ist möglich, die Reihenfolge dieser Schritte zu verändern. Dies liefert unterschiedliche Ergebnisse, abhängig von der gewählten Reihenfolge.

b) Die Untersuchung des Gradienten um den Mittelpunkt des Bereichs basiert auf der Untersuchung der Intensitätswerte von zumindest zwei Detektorelementen. Im vorliegenden Beispiel schätzen wir die Intensitätswerte von drei Detektorelementen einschließlich des Detektorelements, das im Mittelpunkt des Bereichs angeordnet ist. Eine Gesamtzahl von acht Gradienten wird am Mittelpunkt des Bereichs und mit einer horizontalen, vertikalen oder diagonalen Richtung relativ zum Mittelpunkt des Bereichs entstehen.

[0296] Angenommen wird eine identifizierung der Detektorelemente wie folgt, wobei der Mittelpunkt des Bereichs als A identifiziert ist:

	1	2	3	4	5
1	I	-	B	-	C
2	-	I ₀	B ₀	C ₀	-
3	H	H ₀	A	D ₀	D
4	-	G ₀	F ₀	E ₀	-
5	G	-	F	-	E

[0297] Die acht verschiedenen Gradienten werden durch die folgenden Detektorelemente definiert:

[A, B₀, B], [A, C₀, C], [A, D₀, D], [A, E₀, E], [A, F₀, F], [A, G₀, G], [A, H₀, H], [A, I₀, I].

[0298] Der Wert, der den Bereich repräsentiert, kann abhängig von dem Ergebnis des Gradiententests auf unterschiedliche Weise eingestellt werden. Im vorliegenden Beispiel wird der Wert auf Null gesetzt, wenn einer der folgenden Gradiententests erfüllt ist:

[0299] Der Wert des Bereichs ist Null, wenn

(A < B UND A < B₀) ODER (A < C UND A < C₀) ODER (A < D UND A < D₀) ODER
(A < E UND A < E₀) ODER (A < F UND A < F₀) ODER (A < G UND A < G₀) ODER
(A < H UND A < H₀) ODER (A < I UND A < I₀)

[0300] Der Wert des Bereichs kann entweder getrennt für den Bereich gespeichert werden, oder er kann verwendet werden, um den Wert des Detektorelements, das mit A identifiziert ist, zu ersetzen. Im vorliegenden Beispiel wird der Wert des Bereichs verwendet, um den Wert von A zu ersetzen, und wird als der Intensitätswert des Detektorelements in der folgenden Analyse verwendet.

[0301] Wenn der vorherige Schritt vervollständigt ist, wird ein neuer Bereich gemäß a) definiert.

[0302] Der neue Bereich ist in einer unterschiedlichen Position der Abbildung angeordnet. Im vorliegenden Beispiel wird die Position des neuen Bereichs definiert, indem der Bereich in einer Spalte um zwei Zeilen nach unten verschoben wird. Wenn das Ende der Spalte erreicht wurde, wird der nächste Bereich angeordnet, indem zurück zur ersten Zeile und zwei Spalten nach rechts gegangen wird. Der Bereich wird auf diese Weise bewegt, bis im wesentlichen die gesamte Abbildung untersucht wurde.

c) Wenn im wesentlichen die gesamte Abbildung gemäß b) untersucht wurde, beinhaltet der zweite Schritt bei der Definition eines Werts, der den Bereich repräsentiert, eine Einstellung des Werts jedes Bereichs auf der

Basis der Detektorelemente, die unmittelbar angrenzend an den Mittelpunktswert der Region angeordnet sind. Im vorliegenden Beispiel wird dies getan, indem das Ergebnis der folgenden Ausdrücke auf den Wert jedes Bereichs übertragen wird:

$A = \text{wenn } (A \geq B \ \& \ A \geq H \ \text{UND} \ A > I \ \& \ A \geq C \ \& \ A \geq D) \text{ dann } \max(A, B_0) \text{ sonst } A$

$A = \text{wenn } (A \geq B \ \& \ A \geq C \ \& \ A \geq D) \text{ dann } \max(A, C_0) \text{ sonst } A$

$A = \text{wenn } (A \geq D \ \& \ A \geq B \ \& \ A \geq C \ \& \ A \geq E \ \& \ A \geq F) \text{ dann } \max(A, D_0) \text{ sonst } A$

$A = \text{wenn } (A > D \ \& \ A > E \ \& \ A > F) \text{ dann } \max(A, E_0) \text{ sonst } A$

$A = \text{wenn } (A \geq F \ \& \ A > D \ \& \ A > E \ \& \ A > G \ \& \ A < H) \text{ dann } \max(A, F_0) \text{ sonst } A$

$A = \text{wenn } (A > F \ \& \ A > G \ \& \ A > H) \text{ dann } \max(A, G_0) \text{ sonst } A$

$A = \text{wenn } (A \geq H \ \& \ A > F \ \& \ A > G \ \& \ A > I \ \& \ A > B) \text{ dann } \max(A, H_0) \text{ sonst } A$

$A = \text{wenn } (A > H \ \& \ A > I \ \& \ A > G) \text{ dann } \max(A, I_0) \text{ sonst } A$

Wert = A

("&" repräsentiert die logische Operation UND)

[0303] Wenn der vorherige Schritt vervollständigt ist, wird ein neuer Bereich definiert, vorzugsweise auf dieselbe Weise wie zuvor.

[0304] Die Ergebnisse der Bearbeitung der Daten aus Tabelle 1 und **Fig. 11A** nach dem oben skizzierten Verfahren sind unten in Tabelle 2 und in **Fig. 11 B** dargestellt.

[0305] Wenn sowohl Schritt b) und c) für im wesentlichen den gesamten Bereich von Detektorelementen vervollständigt wurden, kann die Einschätzung der Anzahl von Objekten, die in der Abbildung repräsentiert sind, auf der Basis der Werte durchgeführt werden, die für jeden Bereich geschätzt wurden.

[0306] Die Abbildung jedes Objekts, dessen Signal in einem Bereich von Detektorelementen repräsentiert ist, der von vergleichbarer Größe ist wie die Bereiche, die für die Bearbeitung verwendet werden, oder kleiner, wird im wesentlichen in lediglich einem Wert resultieren, wenn beide Schritte b) und c) für im wesentlichen den kompletten Bereich von Detektorelementen vervollständigt wurden. Dies ermöglicht es, die Gesamtzahl von Objekten zu schätzen, die in einer Abbildung dargestellt sind, indem der Wert von jedem der Bereiche verglichen wird, um einen Grenzwert zu liefern, da jedes Objekt im wesentlichen nur in einem Wert repräsentiert ist.

Tabelle 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
3	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
4	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
7	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
8	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
9	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
11	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
13	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
14	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
15	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
16	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
17	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
18	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
19	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
20	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
21	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19

Tabelle 2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
3	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
4	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
7	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
8	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
9	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
11	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
13	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
14	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
15	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
16	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
17	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
18	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
19	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
20	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
21	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19

Bewertung der Anzahl von Bakterien in einer wässrigen Probe

[0307] Unter Verwendung des Instruments, das in Beispiel 7 beschrieben ist, wurde die Anzahl an Bakterien in einer wässrigen Probe gemäß der folgenden Erfindung bewertet. Das Experiment wurde wie folgt durchgeführt:

Glukose, in einer Menge von 0.3 g, wurde einem Teil von 30 ml gepuffertem Peptonwasser (LAB03627, Bie & Berntsen, Dänemark) beigefügt. Diese Lösung wurde geimpft mit 100 µl einer Rohmilchprobe, die eine natürliche bakterielle Mikroflora enthielt. Nach der Impfung wurde die Lösung für 24 Stunden bei etwa 30°C gereift. [0308] Nach der Reifung war die Lösung stark trübe. Empirisch enthält eine solche Kultur zwischen 1×10^9 und 2×10^9 koloniebildenden Einheiten pro ml.

[0309] Ein Teil von 25 µl der gereiften Lösung wurde in 1 ml einer wässrigen Reagenslösung eingebracht, die 0.13% Triton X-100 enthielt, 13 µg/ml Propidiumjodid und 0.5% Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, Sigma E 4884).

[0310] Nach Vermischung wurde ein Teil der Reagenslösung zwischen zwei im wesentlichen parallelen Glasplatten, die etwa in der Fokussierebene des Detektormoduls plaziert waren, angeordnet und durch ein Erregerlicht bestrahlt, das von dem Erregermodul emittiert wurde.

[0311] Die Entfernung zwischen den zwei parallelen Glasplatten betrug etwa 100 µm. Das Volumen, das durch das Detektormodul detektiert wurde, definiert durch die Größe der CCD-Anordnung, der verwendeten Vergrößerung und der Entfernung zwischen den parallelen Glasplatten, war äquivalent zu etwa 0.04 µl, und enthielt somit etwa 0.001 µl der gereiften Lösung.

[0312] Zwei Messungen von unterschiedlichen Teilen der Probe wurden genommen. Das Ergebnis der zweiten Messung wurde von dem der ersten Messung subtrahiert, wobei diejenigen Werte, die unter Null lagen, durch folgende Formel auf Null umgewandelt wurden: $\text{Signal}_{(ij)} = \text{MAX} ((\text{Messung } 1_{(ij)} - \text{Messung } 2_{(ij)}, 0)$.

Ergebnisse

[0313] Das Ergebnis der Subtraktion der Intensitäten aus den zwei Messungen, wie oben beschrieben, wird in **Fig. 12** dargestellt. Das Ergebnis der Subtraktion der Intensitäten wird dargestellt, indem der resultierende Wert für jedes Detektorelement in einen grauen Schatten umgewandelt wird, wobei die leichten Schatten geringe Intensitäten und die dunklen Schatten hohe Intensitäten repräsentieren.

[0314] Die Anzahl von Objekten, die in der Messung repräsentiert wurde, wurde gemäß einem Verfahren der vorliegenden Erfindung gezählt, wie es in Beispiel 10 beschrieben wurde, und führte zu der Bewertung, daß die Anzahl von Bakterien in dem Probenvolumen **1601** betrug.

[0315] Die Anzahl an Zählungen in einer Beobachtung sollte erwartungsgemäß im Bereich zwischen 1000 und 2000 liegen. Somit ist es vernünftig zu folgern, daß das Instrument, welches in Beispiel 7 beschrieben wurde, in der Lage ist, die Anzahl von Bakterien in einer wässrigen Probe zu bewerten.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Bewertung zumindest eines Quantitätsparameters und/oder zumindest eines Qualitätsparameters von biologischen Partikeln in einem flüssigen Analysematerial, das folgende Schritte umfasst:

Bereitstellen eines Volumens von zwischen 0.01 µl und 20 µl einer flüssigen Probe aus flüssigem Analysematerial,

Projizieren einer zumindest eindimensionalen räumlichen Abbildung des besagten Volumens auf eine Anordnung aktiver Detektorelemente, wobei die Abbildung dergestalt ist, dass sie als eine Intensität von einzelnen aktiven Detektorelementen detektierbar ist, unter Bedingungen, die eine Weiterverarbeitung der durch die Anordnung von Detektorelementen während der Projektion detektierten Intensitäten erlauben, und zwar in solcher Weise, dass die Abbildungen elektromagnetischer Signale von den biologischen Partikeln als abweichend von den Abbildungen elektromagnetischer Signale von Hintergrundsignalen identifiziert werden, und wobei die räumliche Abbildung, die auf die Anordnung aktiver Detektorelemente projiziert wird, eine solche lineare Vergrößerung erfährt, dass das Verhältnis der Abbildung in linearer Ausdehnung auf der Anordnung der Detektorelemente zur ursprünglichen linearen Ausdehnung im exponierbaren Ursprungsbereich kleiner als 10:1 ist, wobei die Probe während der Projektion ruht,

Verarbeiten der durch die Detektorelemente detektierten Intensitäten in solch einer Weise, dass Signale von den biologischen Partikeln als abweichend von Hintergrundsignalen identifiziert werden,

und den Schritt, die Ergebnisse der Verarbeitung mit dem wenigstens einen Quantitätsparameter und/oder dem wenigstens einen Qualitätsparameter des flüssigen Analysematerials in Beziehung zu setzen.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Volumen in einem Probenbehältnis vorgesehen ist, das einen Wandabschnitt aufweist, der einen exponierbaren Bereich aufweist, wobei der Wandabschnitt elektromagnetische Signale von der Probe im Behältnis durch die Wand hindurchtreten lässt und es ermöglicht, dass diese an die Umgebung abgegeben werden.

3. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei zumindest ein größerer Teil der elektromagnetischen Strahlung, die während der Projektion von der Probe emittiert wird, von elektromagnetischer Strahlung stammt oder durch diese hervorgerufen wird, die von einer Lichtquelle auf die Probe abgegeben wird, wobei zumindest ein größerer Teil der Strahlung der Lichtquelle eine Richtung aufweist, die quer zur Wand des Probenbehältnisses oder einer Ebene ist, die durch den Ursprungsbereich definiert ist.

4. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die räumliche Abbildung des Volumens eine zweidimensionale Abbildung ist.

5. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Anordnung von Detektorelementen so angeordnet ist, dass eine Serie von Detektorelementen eine im wesentlichen gerade Linie bildet.

6. Verfahren nach Anspruch 5, wobei die Anordnung von Detektorelementen in zwei Richtungen so angeordnet ist, dass die Detektorelemente eine Serie von im wesentlichen parallelen, geraden Linien bilden, wobei die Serie ein Rechteck bildet.

7. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Projektion der räumlichen Abbildung des Volumens auf die Anordnung von Detektorelementen durchgeführt wird, indem eine Abbildung von elektromagnetischen Signalen von zumindest einem Teil des exponierbaren Ursprungsbereichs durch eine Fokussiervorrichtung auf die Anordnung von Detektorelementen fokussiert wird.

8. Verfahren nach Anspruch 7, wobei die Fokussiervorrichtung eine Linse ist, die aus einem oder mehreren Elementen besteht.

9. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei das Verhältnis höchstens 6:1 ist.

10. Verfahren nach Anspruch 9, wobei das Verhältnis kleiner als 4:1 ist.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei das Verhältnis im Bereich zwischen 10:1 und 1:10 liegt.

12. Verfahren nach Anspruch 11, wobei das Verhältnis im Bereich zwischen 6:1 und 2:1 liegt.

13. Verfahren nach Anspruch 9, wobei die Partikel, von denen ein oder mehrere Parameter ausgewertet werden soll(en), eine Größe zwischen 3 μm und 100 μm aufweisen, und das Verhältnis im Bereich zwischen 3:1 und 1:100 liegt.

14. Verfahren nach Anspruch 13, wobei das Verhältnis im Bereich zwischen 2:1 und 1:100 liegt.

15. Verfahren nach Anspruch 14, wobei das Verhältnis im Bereich zwischen 2:1 und 1:2 liegt.

16. Verfahren nach Anspruch 15, wobei das Verhältnis im Bereich zwischen 14:1 und 1:100 liegt.

17. Verfahren nach Anspruch 16, wobei das Verhältnis im Bereich zwischen 1:1 und 1:100 liegt.

18. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die einzelnen Partikel, von denen ein oder mehrere Parameter ausgewertet werden soll(en), auf höchstens 25 Detektorelemente abgebildet werden.

19. Verfahren nach Anspruch 18, wobei die einzelnen Partikel, von denen ein oder mehrere Parameter ausgewertet werden soll(en), auf höchstens neun Detektorelemente abgebildet werden.

20. Verfahren nach Anspruch 19, wobei die einzelnen Partikel, von denen ein oder mehrere Parameter ausgewertet werden soll(en), auf höchstens fünf Detektorelemente abgebildet werden.

21. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei das Innere des Probenbehältnisses eine

durchschnittliche Dicke von zwischen 20 µm und 2000 µm aufweist.

22. Verfahren nach Anspruch 21, wobei das Innere des Probenbehältnisses eine durchschnittliche Dicke von zwischen 20 µm und 1000 µm aufweist.

23. Verfahren nach Anspruch 22, wobei das Innere des Probenbehältnisses eine durchschnittliche Dicke von zwischen 20 µm und 200 µm aufweist.

24. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei das Probenbehältnis in einer Richtung, die im wesentlichen parallel zur Anordnung von Detektorelementen ist, Abmessungen im Bereich zwischen 1 × 1 mm und 10 × 10 mm aufweist.

25. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Partikel, von denen ein oder mehrere Parameter ausgewertet werden soll(en), eine Größe von zwischen 1/3 µm und 3 µm aufweisen, und das Volumen der flüssigen Probe, von der elektromagnetische Strahlung auf die Anordnung projiziert wird, im Bereich zwischen 0.01 µl und 1 µl liegt.

26. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche 1 bis 24, wobei die Partikel, von denen ein oder mehrere Parameter ausgewertet werden soll(en), eine Größe von zwischen 3 µm und 100 µm aufweisen, und das Volumen der flüssigen Probe, von der elektromagnetische Strahlung auf die Anordnung projiziert wird, im Bereich zwischen 0.04 µl und 4 µl liegt.

27. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei der Parameter, der ausgewertet werden soll, die Anzahl biologischer Partikel pro Volumen des flüssigen Analysematerials ist.

28. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 27, wobei der/die Parameter, der/die ausgewertet werden soll(en), die Größe und/oder die Form der biologischen Partikel im flüssigen Analysematerial ist.

29. Verfahren nach Anspruch 27 oder 28, wobei die Größe des Volumens der flüssigen Probe ausreichend groß ist, um eine Identifikation von zumindest zwei der biologischen Partikel zu ermöglichen.

30. Verfahren nach Anspruch 29, wobei die Größe des Volumens der flüssigen Probe ausreichend groß ist, um eine Identifikation von zumindest vier der biologischen Partikel zu ermöglichen.

31. Verfahren nach Anspruch 30, wobei die Größe des Volumens der flüssigen Probe ausreichend groß ist, um eine Identifikation von zumindest zehn der biologischen Partikel zu ermöglichen.

32. Verfahren nach Anspruch 31, wobei die Größe des Volumens der flüssigen Probe ausreichend groß ist, um eine Identifikation von zumindest 50 der biologischen Partikel zu ermöglichen.

33. Verfahren nach Anspruch 32, wobei die Größe des Volumens der flüssigen Probe ausreichend groß ist, um eine Identifikation von zumindest 100 der biologischen Partikel zu ermöglichen.

34. Verfahren nach Anspruch 33, wobei die Größe des Volumens der flüssigen Probe ausreichend groß ist, um eine Identifikation von zumindest 1000 der biologischen Partikel zu ermöglichen.

35. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei der Parameter, der ausgewertet werden soll, die Anwesenheit oder Nicht-Anwesenheit einer besonderen Art von Partikeln im flüssigen Analysematerial ist.

36. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei das Signal, das von den Detektorelementen detektiert wird, von einer Art oder mehreren Arten von Molekülen stammt, die Bindungen mit den biologischen Partikeln eingehen, in diesen zurückgehalten werden oder mit diesen Wechselwirken, wobei solche Moleküle der Probe oder den isolierten Partikeln vor oder während der Projektion zugeführt werden, und wobei die Moleküle dergestalt sind, dass sie eines oder mehrere der folgenden Phänomene verstärken: Abschwächung elektromagnetischer Strahlung, Photolumineszenz bei Beleuchtung mit elektromagnetischer Strahlung, Streuung von elektromagnetischer Strahlung, Raman-Streuung.

37. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei das Signal, das von den Detektorelementen detektiert wird, von einer Art oder mehreren Arten von Molekülen stammt, die Bindungen mit biologischen

Partikeln eingehen, in diesen zurückbehalten werden oder mit diesen Wechselwirken, wobei solche Moleküle der Probe oder den isolierten Partikeln zugeführt werden, die die Emission elektromagnetischer Strahlung wie Chemilumineszenz oder Photolumineszenz, Fluoreszenz oder Phosphoreszenz hervorrufen oder verstärken, wenn sie mit Strahlung erregt werden, die im wesentlichen eine größere Energie besitzt als die emittierte Photolumineszenz.

38. Verfahren nach Anspruch 36 oder 37, wobei eine wirksame Menge eines oder mehrerer Nukleinsäure-Farbstoffe und/oder eines oder mehrerer potentiometrischer Membranfarbstoffe hinzugefügt wird.

39. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Dauer der Projektion im Bereich zwischen 100 ms und 5 s liegt.

40. Verfahren nach Anspruch 39, wobei die Dauer der Projektion im Bereich zwischen 0.5 s und 3 s liegt.

41. Verfahren nach Anspruch 39 oder 40, wobei die Projektion als einmalige Projektion durchgeführt wird.

42. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei eine Komprimierung der Information über die Intensität erfolgt, die verschiedene über einen Bereich gestreute Objekte repräsentiert, wobei ein Objekt durch eine Veränderung in der Intensitätsinformation repräsentiert wird und diese Information in der Form sich ändernder Höhe messbarer Intensitäten einer physikalischen Eigenschaft vorliegt, die über einen begrenzten Bereich verteilt ist, der wiederum in Unterbereiche unterteilt ist, wobei jedem der Unterbereiche ein Index zugeordnet ist, der den Unterbereich einwandfrei identifiziert, wobei das Verfahren folgende Schritte aufweist: Bestimmung der Intensität der physikalischen Eigenschaft,

a) Definieren eines Unterbereichs von Interesse, der in einer Gruppe von Unterbereichen angeordnet ist, die jeweils mindestens 2×2 aneinander angrenzende Unterbereiche umfasst,

b) Berechnen zumindest einer richtungsmäßigen Ableitung der messbaren Intensität in dem Unterbereich von Interesse unter Berücksichtigung vorherbestimmter geometrischer Richtungen) in der Ebene des begrenzten Bereichs, wobei die richtungsmäßige(n) Ableitung(en) auf messbaren Intensitäten in Unterbereichen basiert/basieren, die an die Gruppe von Unterbereichen angrenzen oder in deren Nachbarschaft angeordnet sind.

c) Auf der Basis der Berechnung der zumindest einen richtungsmäßigen Ableitung wird dem Wert, der dem Unterbereich von Interesse zugeordnet ist, ein Attribut zugeordnet; das Attribut repräsentiert eine eingestellte messbare Intensität und/oder Informationen) mit Bezug zu einer vorbestimmten Strategie zur Einstellung der messbaren Intensitäten im Unterbereich von Interesse oder in Unterbereichen, die angrenzend an den Unterbereich von Interesse oder in dessen Nachbarschaft angeordnet sind,

d) Wiederholen des Schritts a) – c) für im wesentlichen alle Unterbereiche der begrenzten Fläche.

43. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Korrelation folgende Schritte umfasst:

– Identifizieren und Zählen im wesentlichen aller Detektorelemente mit Intensitäten, die sich von Hintergrundsignalen unterscheiden,

– Einstellen des Ergebnisses der Zählung durch einen vorbestimmten Skalierungswert,

– wobei der Skalierungswert direkt im Bezug steht zur Anzahl von Detektorelementen, die ein Signal von einem biologischen Partikel repräsentieren,

– und wobei das Ergebnis der Skalierung korreliert ist zur Anzahl der Partikel, die repräsentiert werden.

44. Verfahren nach Anspruch 43, wobei die gemessenen Intensitäten der Detektorelemente vor dem Zählen eingestellt werden, wobei die Einstellung folgende Schritte umfasst:

a) Definieren eines Bereichs einer vorbestimmten Größe in einem Koordinatensystem, das die Intensitätswerte der Detektorelemente repräsentiert, wobei die Größe des Bereichs so bestimmt wird, dass er größer ist als die Abbildung eines biologischen Partikels mit durchschnittlicher Ausdehnung,

b) Auswahl eines ersten Detektorelements, bei dem die Intensität einer Einstellung unterzogen wird,

c) Positionieren des Bereichs in einer Weise, dass das Detektorelement, dessen Intensität eingestellt werden soll, im wesentlichen in der Mitte des Bereichs liegt,

d) Einstellen der Intensität des Detektorelements in der Mitte des Bereichs auf der Basis des Ergebnisses einer Untersuchung zumindest eines Gradienten, der die Veränderung der Signalintensitäten innerhalb des Bereichs und um die Mitte des Bereichs beschreibt, indem Intensitäten von Detektorelementen in Betracht gezogen werden, die den Gradienten beschreiben, und Wiederholen des Schritts b) bis c), bis eine vorbestimmte Anzahl von Detektorelementen vorbestimmt oft eingestellt wurde.

45. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei das Probenbehältnis ein entfernbares

Probenbehältnis ist, das leicht aus dem Messsystem entfernt werden kann.

46. Verfahren nach Anspruch 45, wobei das Probenbehältnis ein Behältnis oder mehrere Behältnisse aufweist, worin chemische oder physikalische Komponenten so gelagert werden können, dass die chemischen oder physikalischen Komponenten jeder Probe zugeführt werden können, die im Probenbehältnis vorhanden ist, und zwar zum gleichen Zeitpunkt eine oder mehr als eine Komponente.

47. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Identifikation eines Partikels in der Probe durchgeführt wird, indem der Signalpegel jedes Detektorelements mit einem vorbestimmten Pegel verglichen wird, oder mit einem Pegel, der auf der Basis benachbarter Detektorelemente geschätzt wird.

48. System für die Bewertung zumindest eines Quantitätsparameters und/oder zumindest eines Qualitätsparameters von biologischen Partikeln in einem flüssigen Analysematerial, das umfasst:
 ein Probenbehältnis (**104, 401, 501, 601, 704, 807**), das ein Volumen von zwischen 0.01 µl und 20 µl einer flüssigen Probe definiert,
 eine Anordnung aktiver Detektorelemente (**107, 404, 506, 811**), auf die eine zumindest eindimensionale räumliche Abbildung des besagten Volumens projiziert wird, wobei die Abbildung dergestalt ist, dass sie als Intensität von den einzelnen aktiven Detektorelementen detektierbar ist, unter Bedingungen, die eine Verarbeitung der während der Projektion durch die Anordnung von Detektorelementen (**107, 404, 506, 811**) detektierten Intensitäten erlauben, und zwar in solch einer Weise, dass die Abbildungen elektromagnetischer Signale von den biologischen Partikeln als abweichend von Abbildungen elektromagnetischer Signale von Hintergrundsignalen identifiziert werden,
 eine Linse aus einem oder mehreren Elementen (**105, 402, 403, 502, 503, 504, 505, 808**) zum Fokussieren einer Abbildung elektromagnetischer Signale von zumindest einem Teil des exponierbaren Ursprungsbereichs auf die Anordnung von Detektorelementen (**107, 404, 506, 811**), so dass das Verhältnis der Abbildung in linearer Ausdehnung auf der Anordnung von Detektorelementen (**107, 404, 506, 811**) zur ursprünglichen linearen Ausdehnung im exponierbaren Ursprungsbereich kleiner als 10:1 ist, wobei das System daran angepasst ist, die Probe im Probenbehältnis (**104, 401, 501, 606, 704, 807**) während der Projektion in Ruheposition zu halten,
 eine Computereinheit (**813**) zur Verarbeitung der Intensitäten, die durch die Detektorelemente detektiert werden, und zwar in solch einer Weise, dass Signale von den biologischen Partikeln als abweichend von Hintergrundsignalen identifiziert werden, und dazu, die Ergebnisse der Verarbeitung mit dem wenigstens einen Quantitätsparameter und/oder dem wenigstens einen Qualitätsparameter des flüssigen Analysematerials in Beziehung zu setzen.

49. System nach Anspruch 48, wobei zumindest ein größerer Teil der elektromagnetischen Strahlung, die von der Probe während der Projektion emittiert wird, von elektromagnetischer Strahlung stammt oder durch diese hervorgerufen wird, die der Probe von einer Lichtquelle (**101, 804**) zugeführt wird, wobei zumindest ein größerer Teil der Strahlung der Lichtquelle eine Richtung aufweist, die quer zur Wand des Probenbehältnisses (**104, 807**) oder einer Ebene ist, die durch den Ursprungsbereich definiert ist.

50. System nach einem der Ansprüche 48 bis 49, umfassend ein oder mehrere Ventile (**603, 607, 705**), die den Fluss der Probe oder jeder anderen Komponente steuern.

51. System nach einem der Ansprüche 48 bis 50, wobei die Anordnung der Detektorelemente (**107, 404, 506, 811**) so angeordnet ist, dass eine Serie von Detektorelementen eine im wesentlichen gerade Linie bildet.

52. System nach Anspruch 51, wobei die Anordnung von Detektorelementen (**107, 404, 506, 811**) in zwei Richtungen so angeordnet ist, dass die Detektorelemente eine Serie von im wesentlichen parallelen geraden Linien bilden, wobei die Serie ein Rechteck bildet.

53. System nach einem der vorangehenden Ansprüche 48 bis 52, wobei das Verhältnis höchstens 6:1 ist.

54. System nach Anspruch 53, wobei das Verhältnis kleiner als 4:1 ist.

55. System nach einem der Ansprüche 48 bis 52, wobei das Verhältnis im Bereich zwischen 10:1 und 1:10 liegt.

56. System nach Anspruch 55, wobei das Verhältnis im Bereich zwischen 6:1 und 2:1 liegt.

57. System nach Anspruch 48 bis 52, wobei das Verhältnis im Bereich zwischen 3:1 und 1:100 liegt.
58. System nach Anspruch 57, wobei das Verhältnis im Bereich zwischen 2:1 und 1:100 liegt.
59. System nach Anspruch 58, wobei das Verhältnis im Bereich zwischen 2:1 und 1:2 liegt.
60. System nach Anspruch 58, wobei das Verhältnis im Bereich zwischen 1.4:1 und 1:100 liegt.
61. System nach Anspruch 60, wobei das Verhältnis im Bereich zwischen 1:1 und 1:100 liegt.
62. System nach einem der vorangehenden Ansprüche 48 bis 61, wobei das Innere des Probenbehältnisses (**104, 401, 501, 606, 704, 807**) eine durchschnittliche Dicke von zwischen 20 µm und 2000 µm aufweist.
63. System nach Anspruch 62, wobei das Innere des Probenbehältnisses (**104, 401, 501, 606, 704, 807**) eine durchschnittliche Dicke von zwischen 20 µm und 1000 µm aufweist.
64. System nach Anspruch 63, wobei das Innere des Probenbehältnisses (**104, 401, 501, 606, 704, 807**) eine durchschnittliche Dicke von zwischen 20 µm und 200 µm aufweist.
65. System nach einem der vorangehenden Ansprüche 48 bis 64, wobei das Probenbehältnis (**104, 401, 501, 606, 704, 807**) in einer Richtung im wesentlichen parallel zur Anordnung der Detektorelemente eine Ausdehnung im Bereich zwischen 1 × 1 mm und 10 × 10 mm aufweist.
66. System nach einem der vorangehenden Ansprüche 48 bis 65, wobei das Volumen der flüssigen Probe, von der elektromagnetische Strahlung auf die Anordnung (**107, 404, 506, 811**) projiziert wird, im Bereich zwischen 0.01 µl und 1 µl liegt.
67. System nach einem der vorangehenden Ansprüche 48 bis 66, wobei das Volumen der flüssigen Probe, von der elektromagnetische Strahlung auf die Anordnung (**107, 404, 506, 811**) projiziert wird, im Bereich zwischen 0.04 µl und 4 µl liegt.
68. System nach Anspruch 48 mit einer Pumpe, wobei die Pumpe entweder oberhalb des Probenbehältnisses (**104, 401, 501, 606, 704, 807**) oder unterhalb des Probenbehältnisses (**104, 401, 501, 606, 704, 807**) angeordnet ist.
69. System nach Anspruch 68, wobei die Pumpe eine oder mehrere der folgenden Pumpen ist: Schlauchpumpe, Kolbenpumpe, Membranpumpe, Kreislumpumpe, hypodermische Spritze.
70. System nach einem der vorangehenden Ansprüche 48 bis 69 mit einer Vorrichtung zur Bewertung der Anzahl von biologischen Partikeln pro Volumen des flüssigen Analysematerials.
71. System nach einem der Ansprüche 48 bis 70, mit einer Vorrichtung zur Bewertung der Größe und/oder Form der biologischen Partikel im flüssigen Analysematerial.
72. System nach einem der vorangehenden Ansprüche 48 bis 71, wobei der Parameter, der bewertet werden soll, die Anwesenheit oder Nicht-Anwesenheit einer besonderen Art von Partikeln im flüssigen Analysematerial ist.
73. System nach einem der vorangehenden Ansprüche 48 bis 72, wobei die Dauer der Projektion im Bereich von 100 ms bis 5 s liegt.
74. System nach Anspruch 73, wobei die Dauer der Projektion im Bereich von 0.5 s bis 3 s liegt.
75. System nach Anspruch 73 oder 74, wobei die Projektion als eine einmalige Projektion durchgeführt wird.
76. System nach einem der vorangehenden Ansprüche 48 bis 75, wobei die Anordnung von Detektorelementen eine oder mehrere aus den folgenden Arten ist: Full-Frame-CCD, Frame-Transfer-CCD, Interline-CCD, Zeilen-CCD.

77. System nach einem der vorangehenden Ansprüche 48 bis 76, wobei die Anordnung von Detektorelementen ein CMOS-Bildsensor ist, bevorzugt ein CMOS-Bildsensor mit auf dem Chip integrierter Signalkonditionierung und/oder Signalverarbeitung, noch mehr bevorzugt ein CMOS-Bildsensor mit auf dem Chip integrierter Computervorrichtung, die dazu geeignet ist, Bildverarbeitung durchzuführen.

78. System nach einem der vorangehenden Ansprüche 48 bis 77, wobei die Transmission elektromagnetischer Strahlung auf die Probe durch Verwendung einer Beleuchtungsvorrichtung erreicht wird.

79. System nach Anspruch 78, wobei die Beleuchtungsvorrichtung zwei oder mehr, bevorzugt drei oder mehr, noch mehr bevorzugt vier oder mehr, noch mehr bevorzugt sechs oder mehr, noch mehr bevorzugt acht oder mehr, noch mehr bevorzugt zehn oder mehr, lichtemittierende Dioden aufweist, die bevorzugt elektromagnetische Strahlung von im wesentlichen gleichem Wellenlängenbereich emittieren.

80. System nach Anspruch 78 oder 79, wobei die elektromagnetische Strahlung, die auf die Probe gerichtet wird, durch eine Fokussiereinrichtung (**102**) fokussiert wird, wobei die Fokussiereinrichtung (**102**) im wesentlichen den Effekt besitzt, die Intensität der elektromagnetischen Strahlung in oder am Ort besagter Probe zu erhöhen.

81. System nach einem der Ansprüche 78 bis 80, wobei die elektromagnetische Strahlung, die auf die Probe gerichtet wird, durch zwei oder mehr Beleuchtungsvorrichtungen erzeugt wird, wobei zumindest zwei der Beleuchtungsvorrichtungen im wesentlichen unterschiedliche Strahlungseigenschaften in zumindest einem Wellenband aufweisen, und wobei die Beleuchtungsvorrichtungen so betätigt werden, dass alle im wesentlichen gleichzeitig abstrahlen, bevorzugt zumindest eine der Beleuchtungsvorrichtungen strahlt, während zumindest eine andere der Beleuchtungsvorrichtungen nicht strahlt, noch mehr bevorzugt nur eine der Beleuchtungsvorrichtungen zu einer bestimmten Zeit strahlt.

82. System nach einem der Ansprüche 76 bis 81, wobei die Beleuchtungsvorrichtungen eine oder mehrere der folgenden sind, darauf aber nicht begrenzt sind: lichtemittierende Dioden, Laser, Laserdioden, thermische Lichtquellen, Gasentladungslampen.

83. System nach einem der vorangehenden Ansprüche 48 bis 82, wobei die Identifikation eines in der Probe vorhandenen Partikels dadurch erfolgt, dass der Signalpegel jedes Detektorelements mit einem vordefinierten Pegel verglichen wird, oder dadurch, dass er mit einem Pegel verglichen wird, der auf der Basis der Signale von benachbarten Detektorelementen geschätzt wird.

84. System nach einem der vorangehenden Ansprüche 48 bis 83, des weiteren mit einem Behälter für eine oder mehrere chemische Komponenten, wobei der Behälter an ein Flusssystem angeschlossen ist, in dem die Probe fließt, wobei zumindest ein Teil der Probe durch den chemischen Behälter fließt und somit das Vermischen der chemischen Komponenten mit der Probe ermöglicht.

85. System nach einem der vorangehenden Ansprüche 48 bis 84, des weiteren mit einer Quelle von Erregerlicht (**101**, **804**) und einem geeigneten Satz optischer Filter (**103**, **106**, **805**, **806**, **809**, **810**).

Es folgen 17 Blatt Zeichnungen

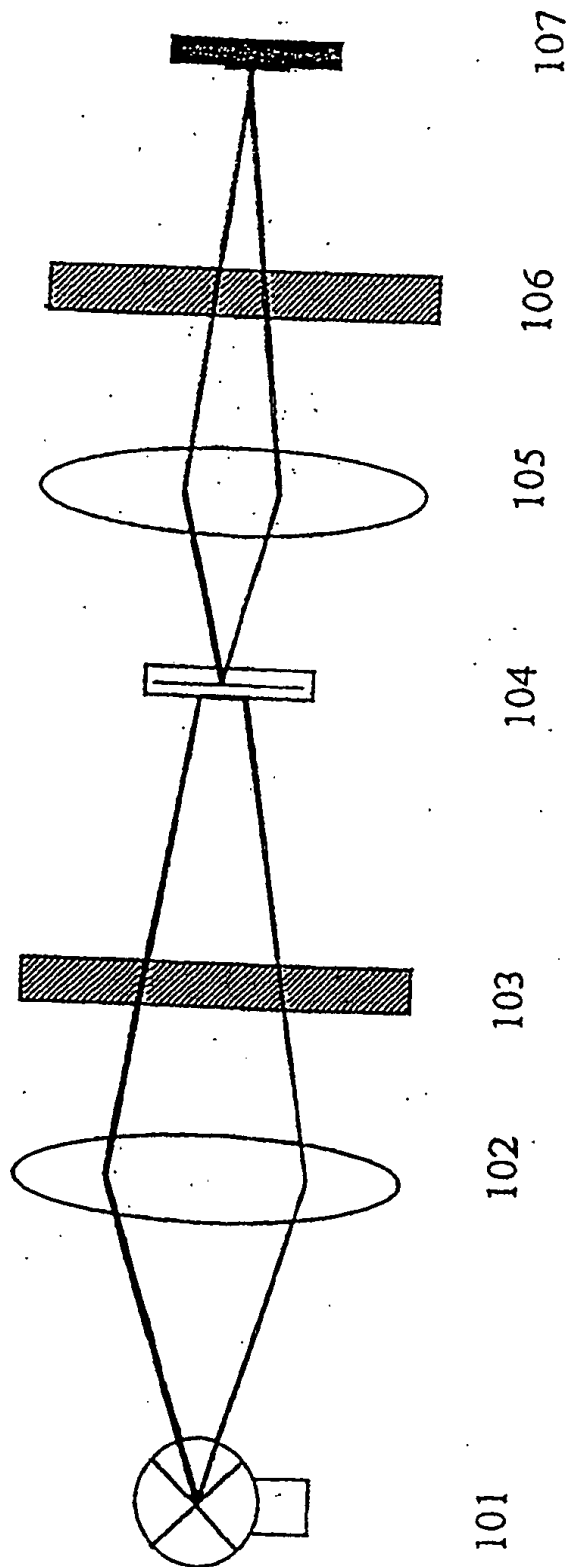


Fig. 1

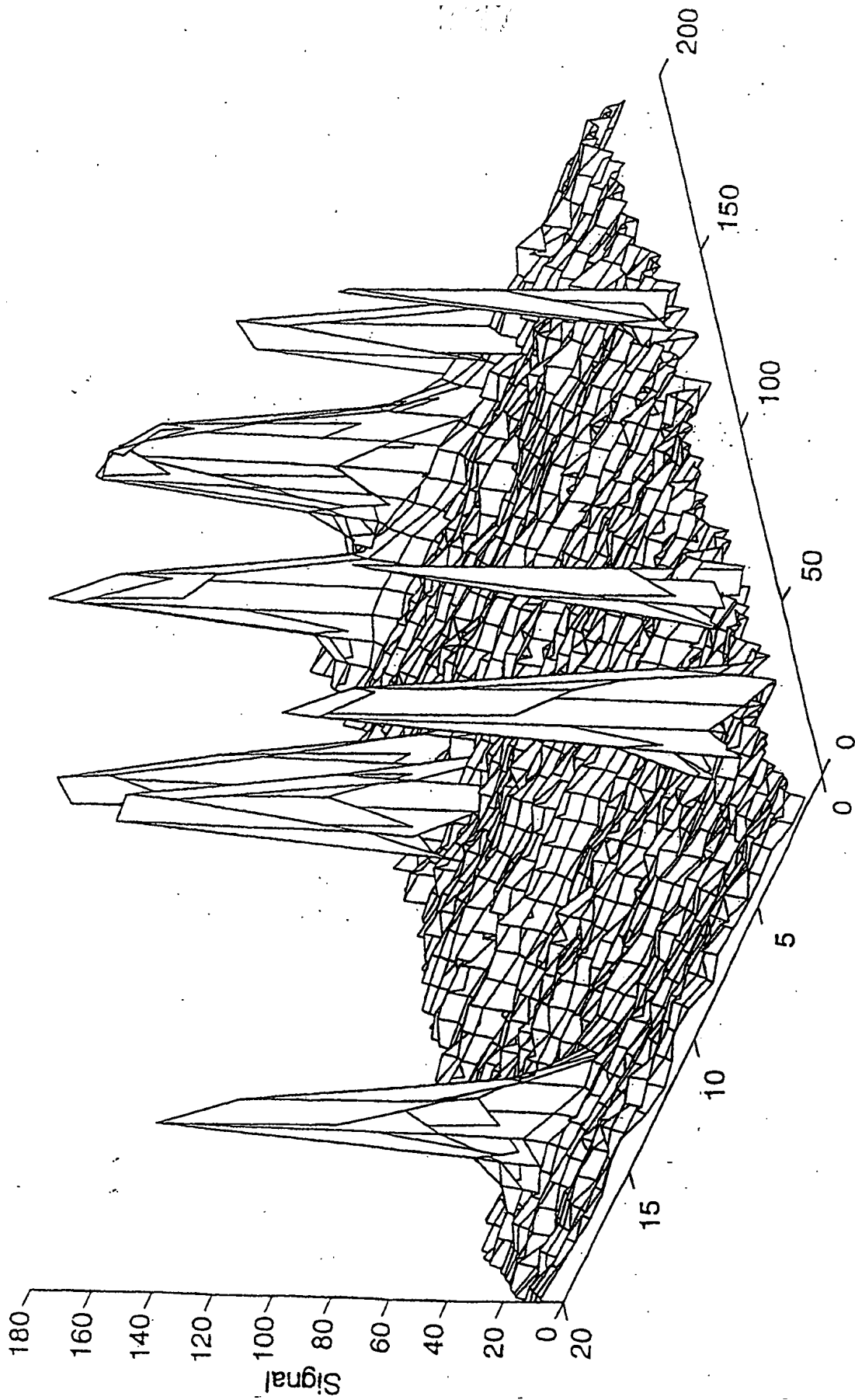


Fig. 2 A

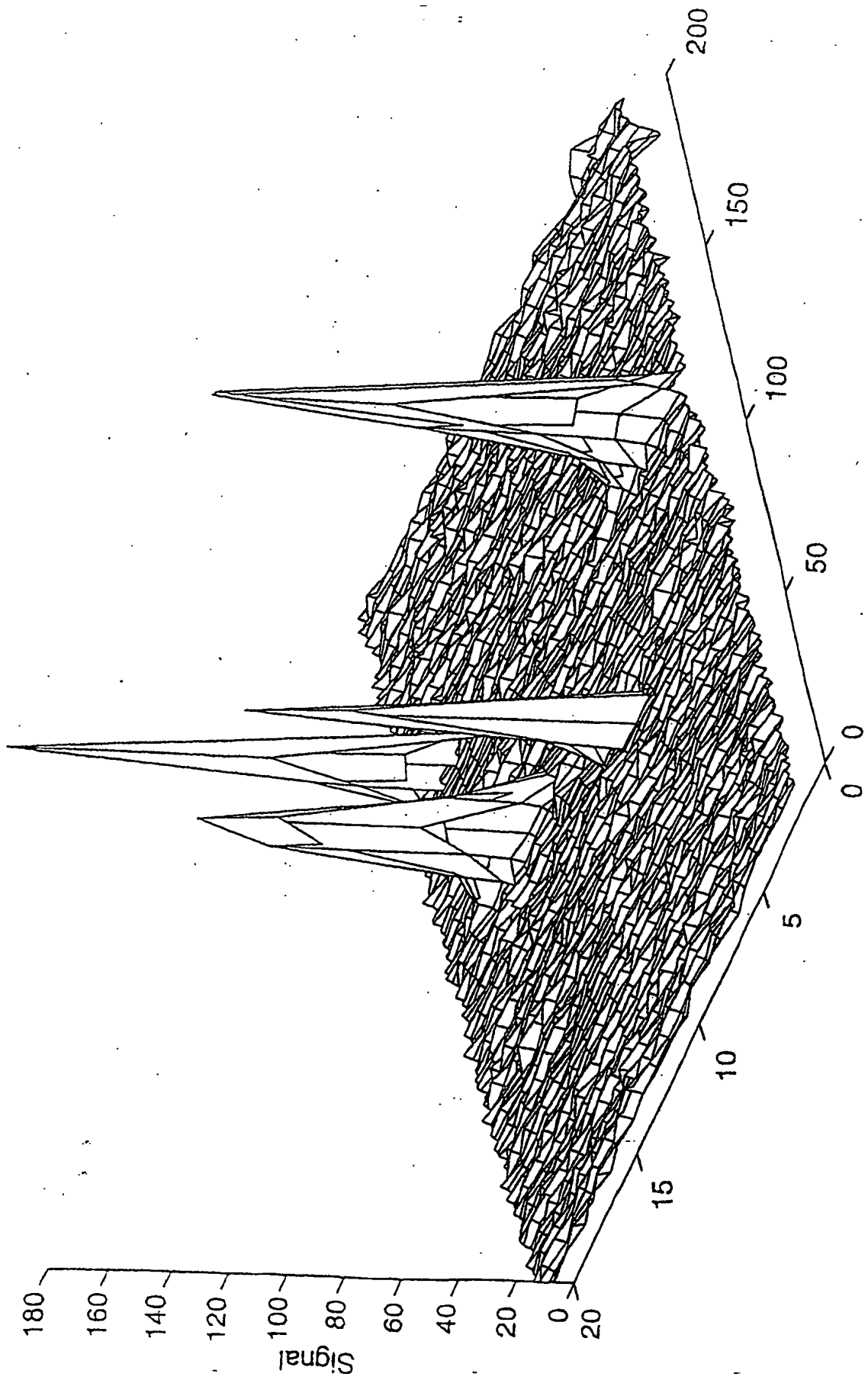


Fig. 2 B

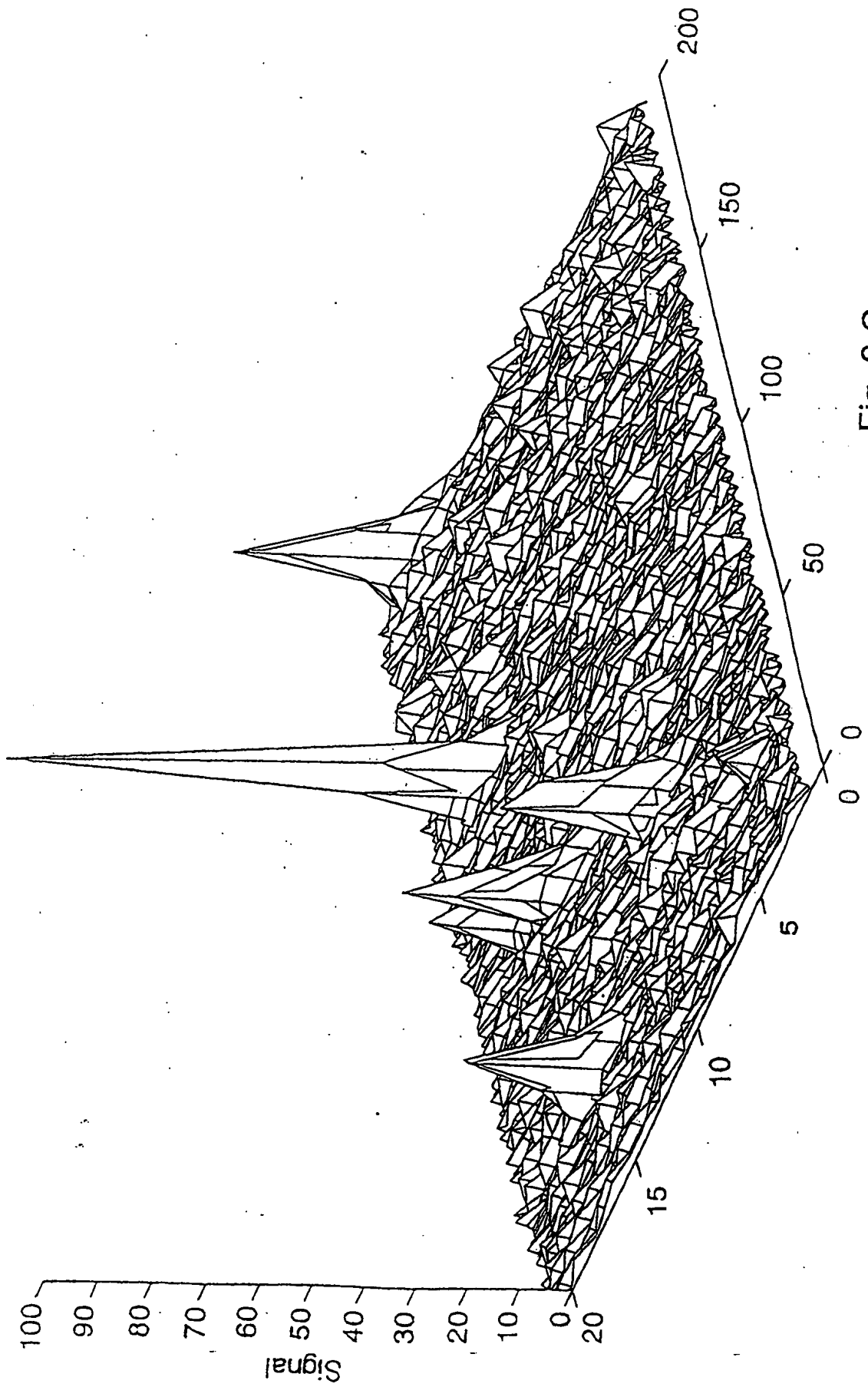


Fig. 2 C

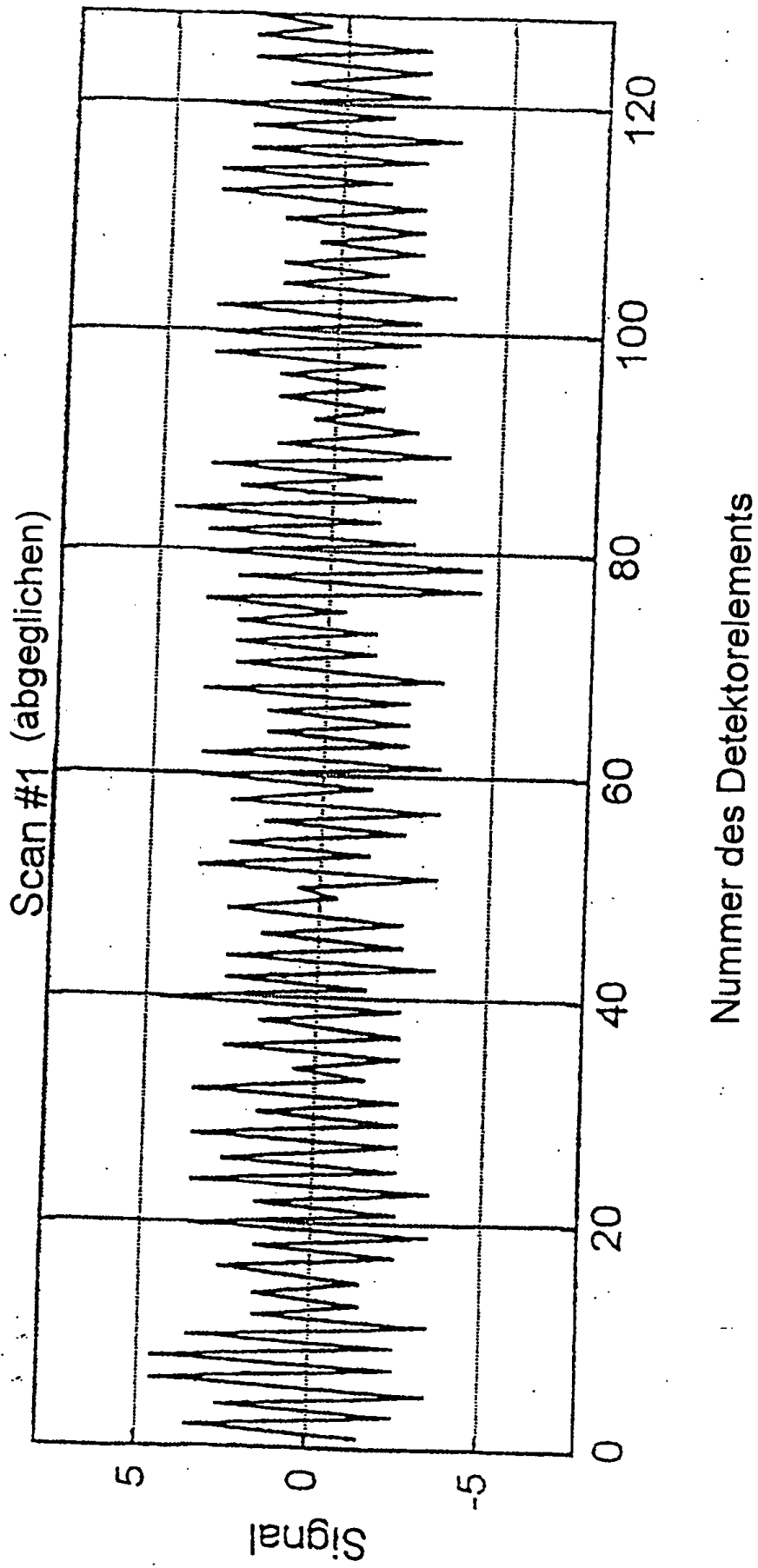


Fig. 3 A

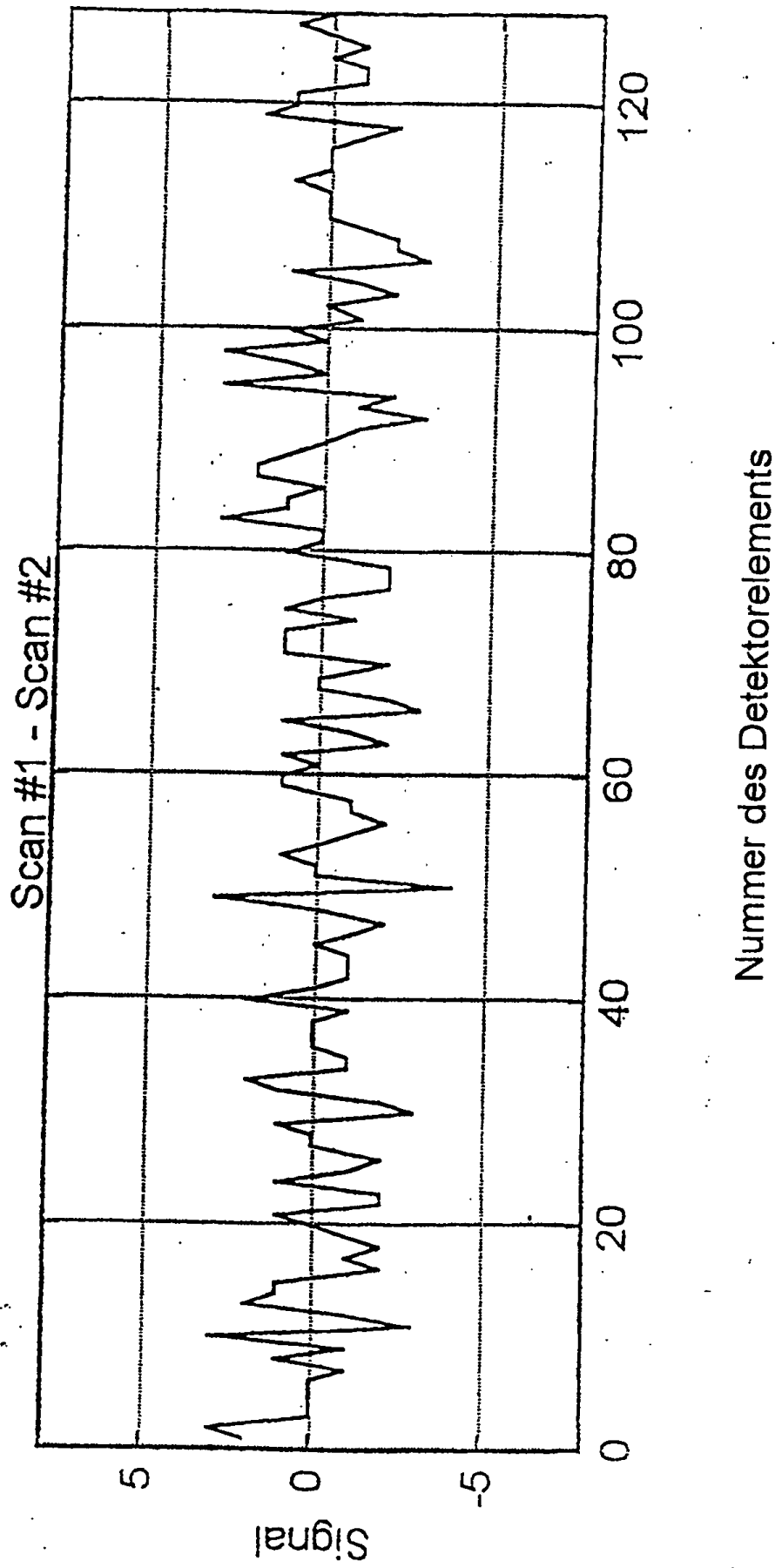


Fig. 3 B

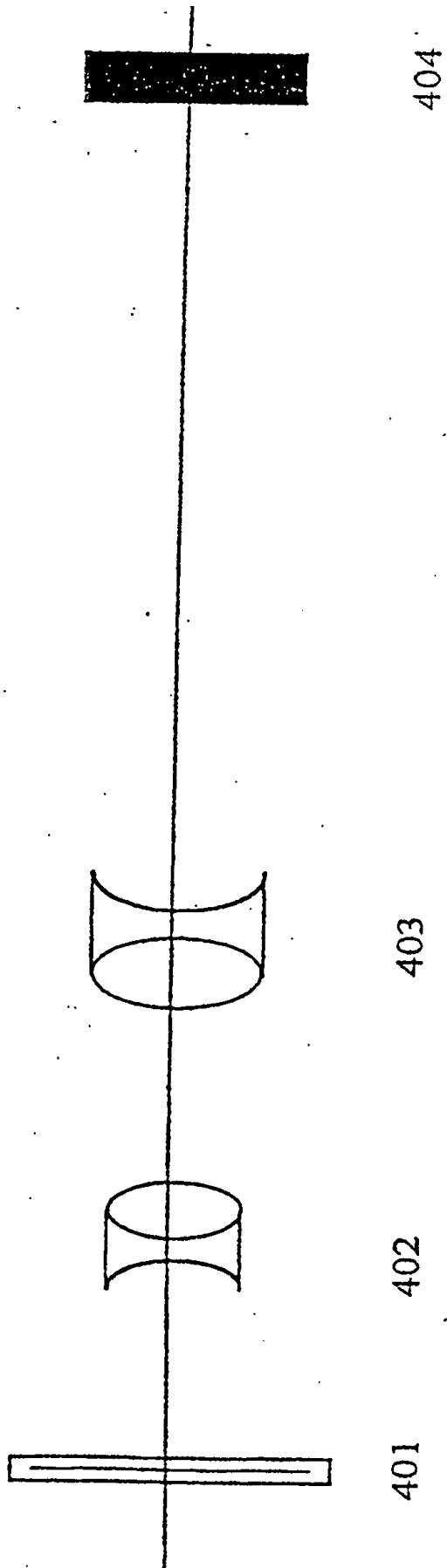


Fig. 4

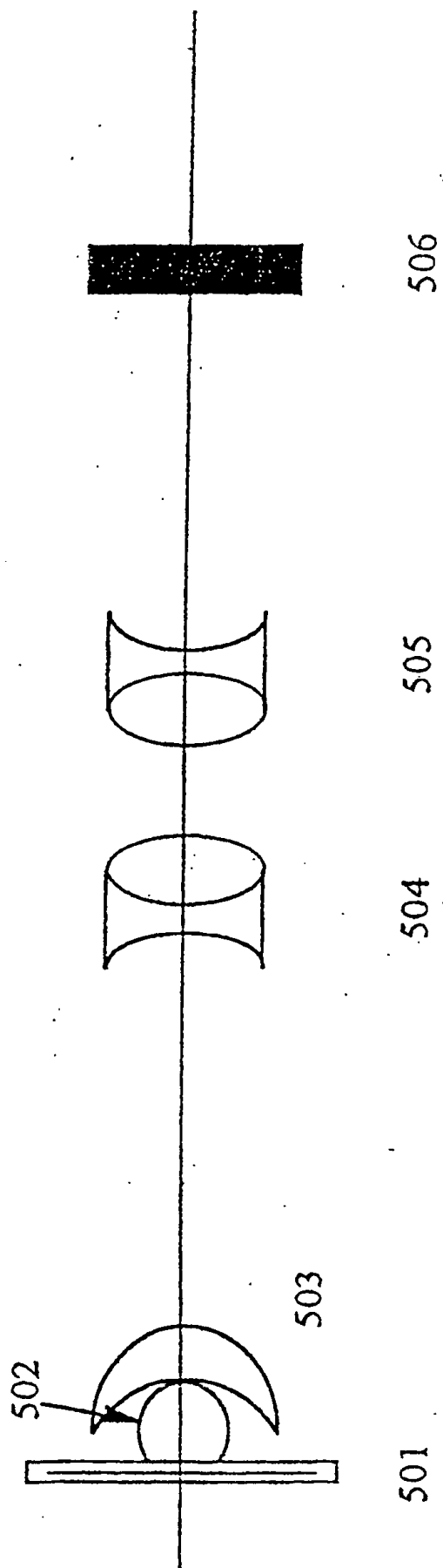


Fig. 5

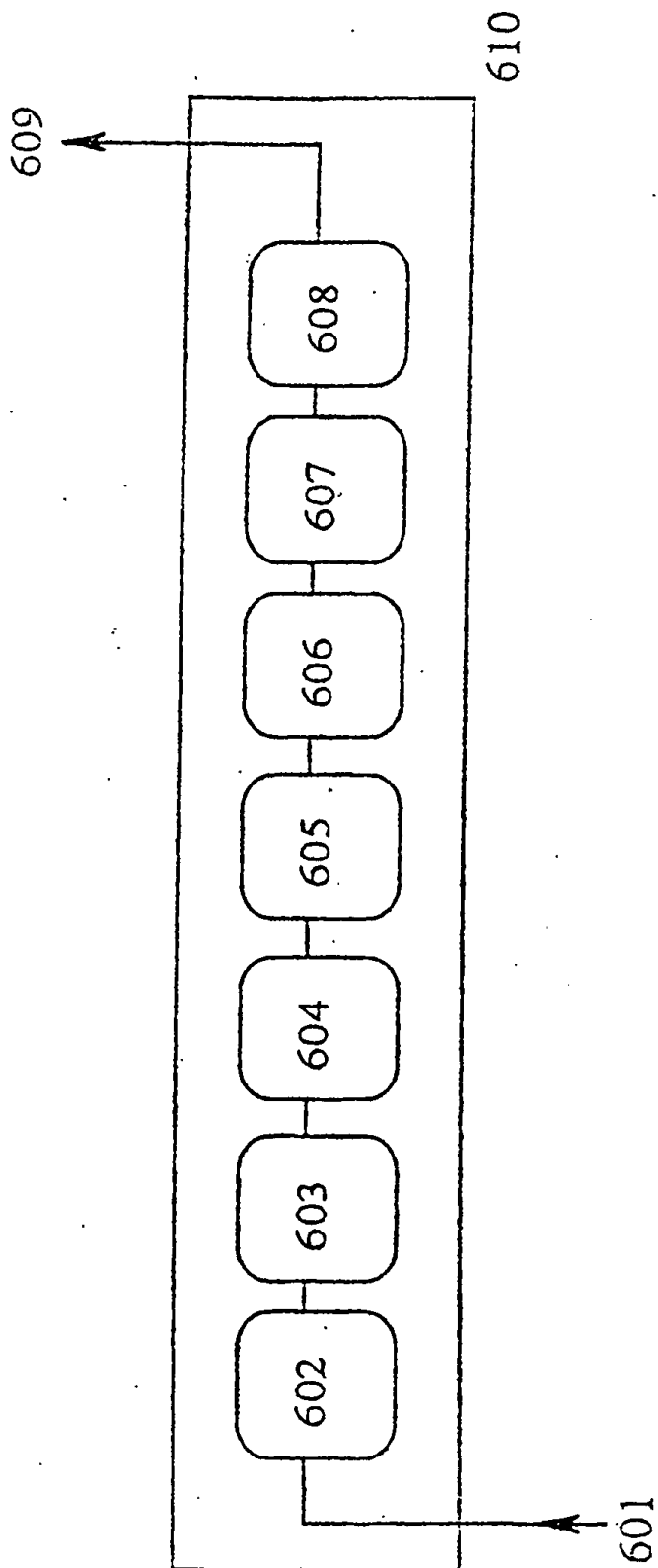


Fig. 6

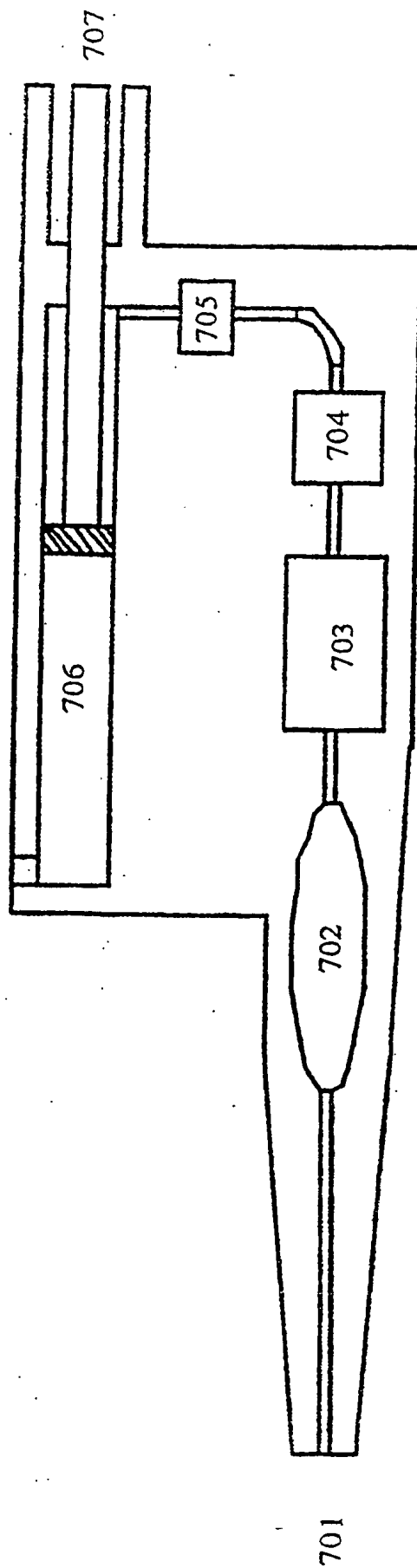


Fig. 7

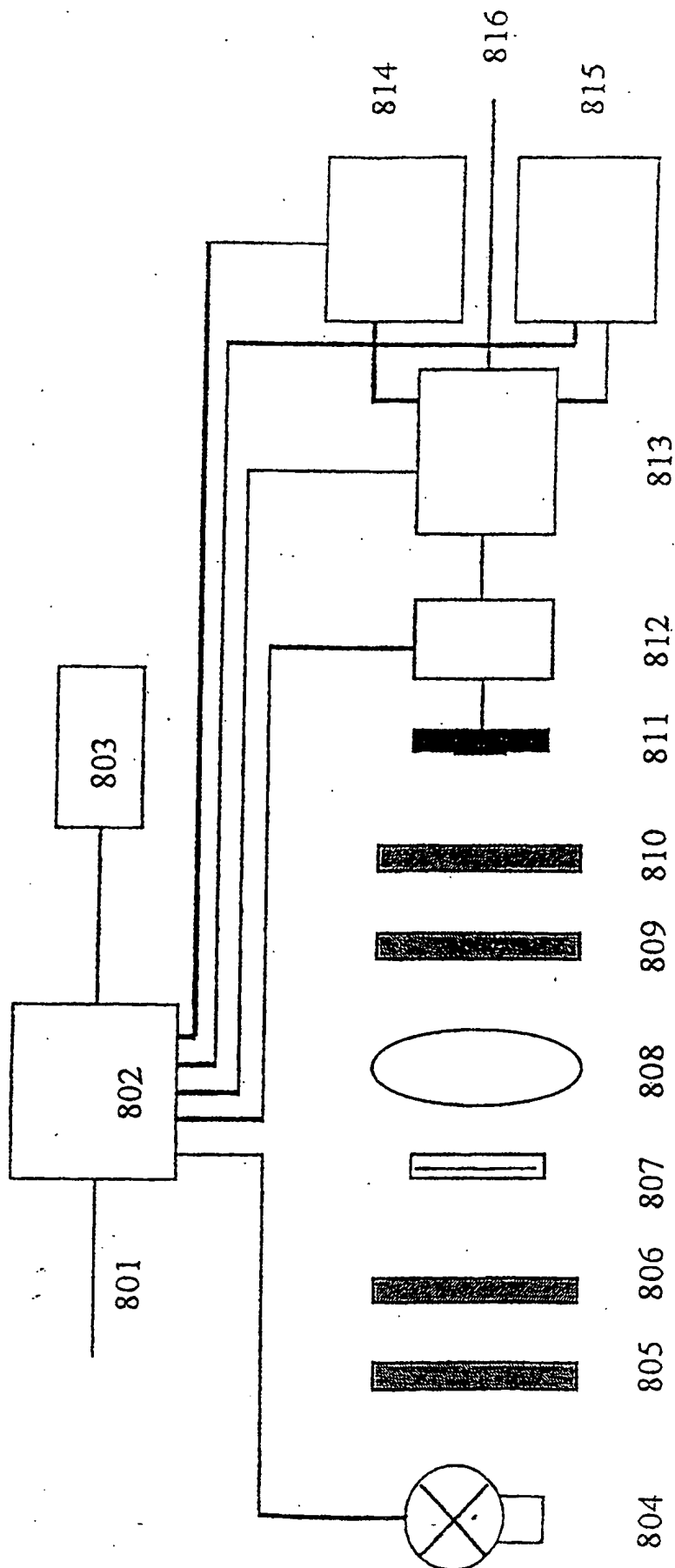


Fig. 8

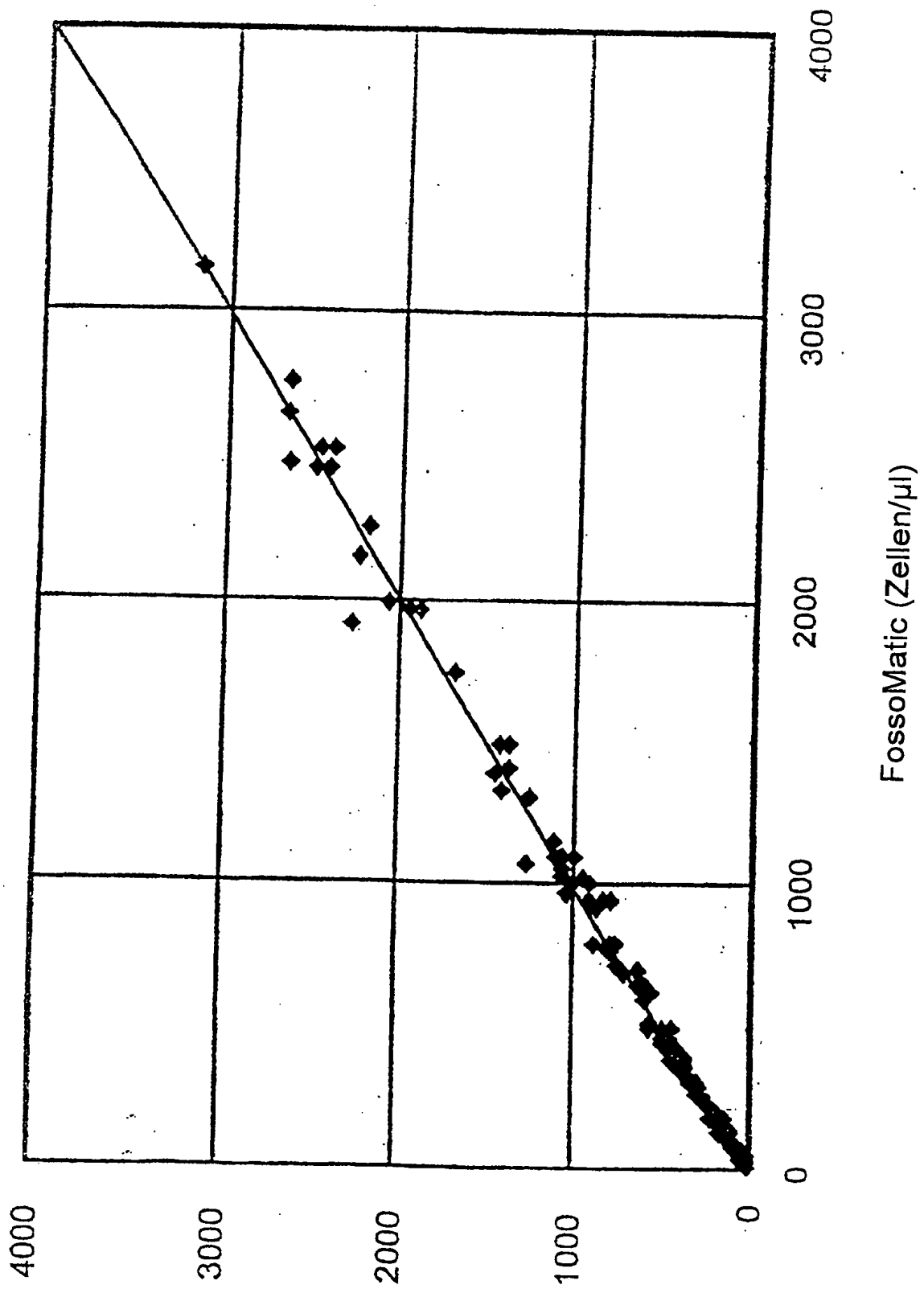


Fig. 9 A

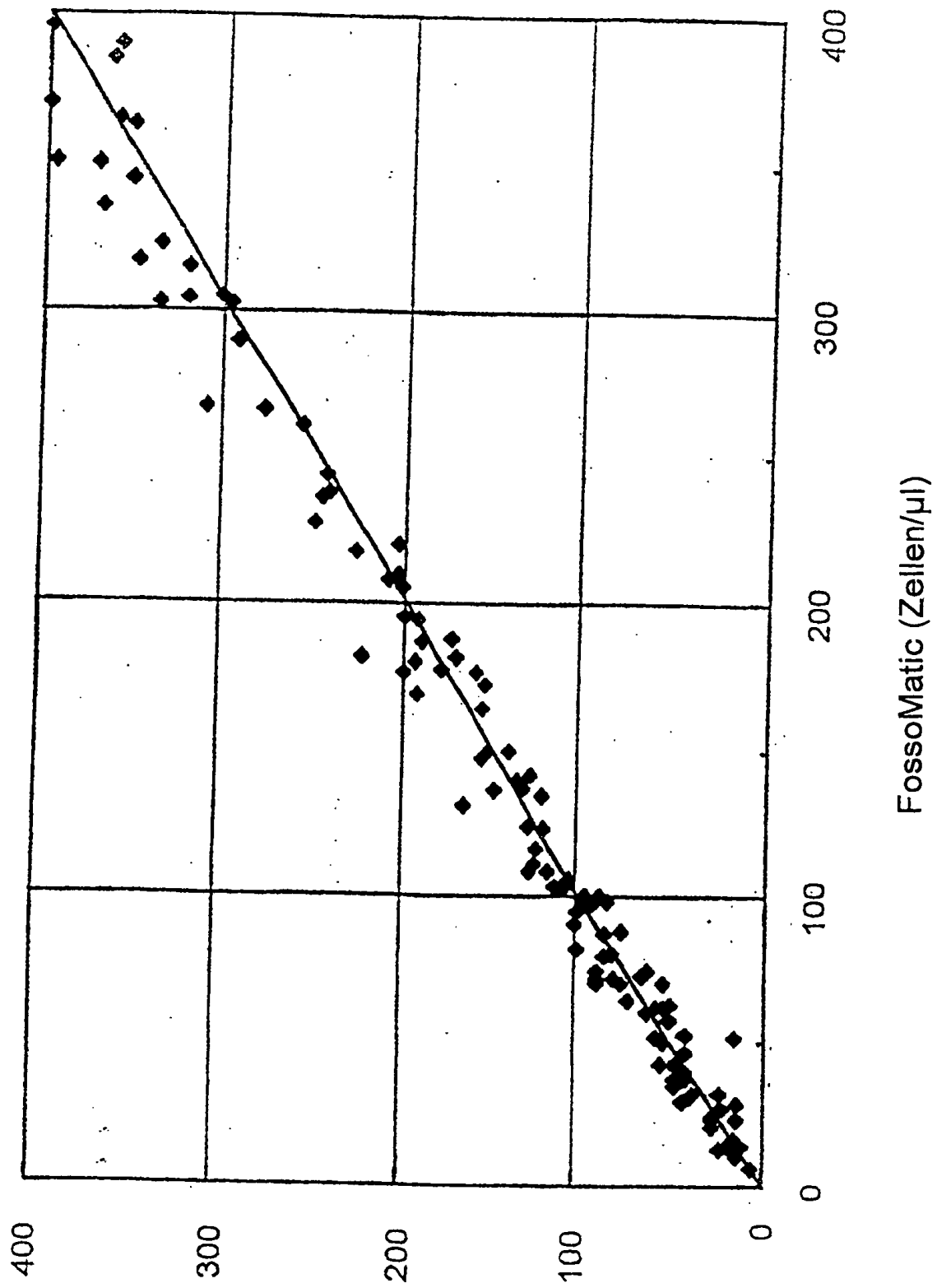


Fig. 9 B

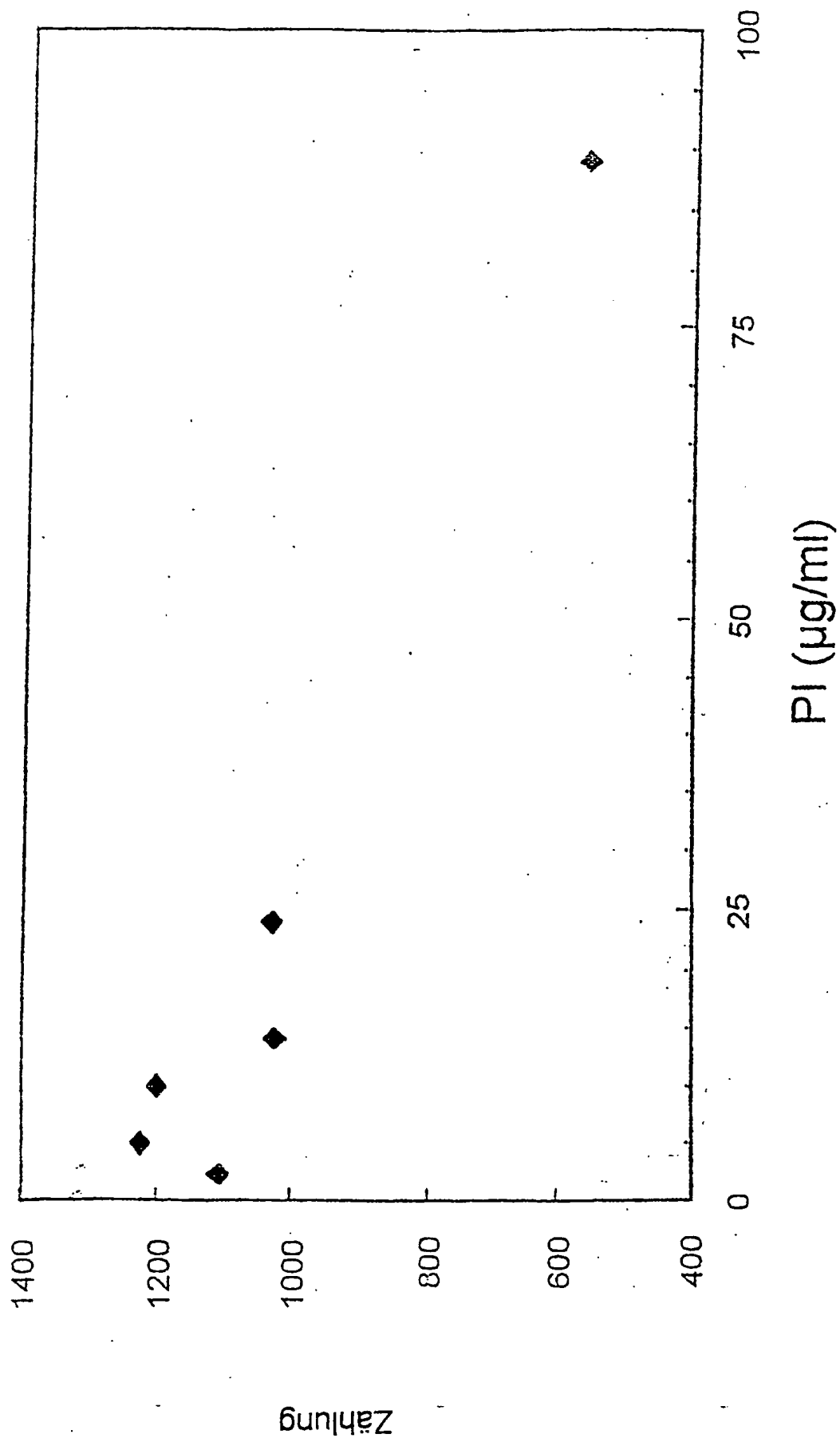


Fig. 10

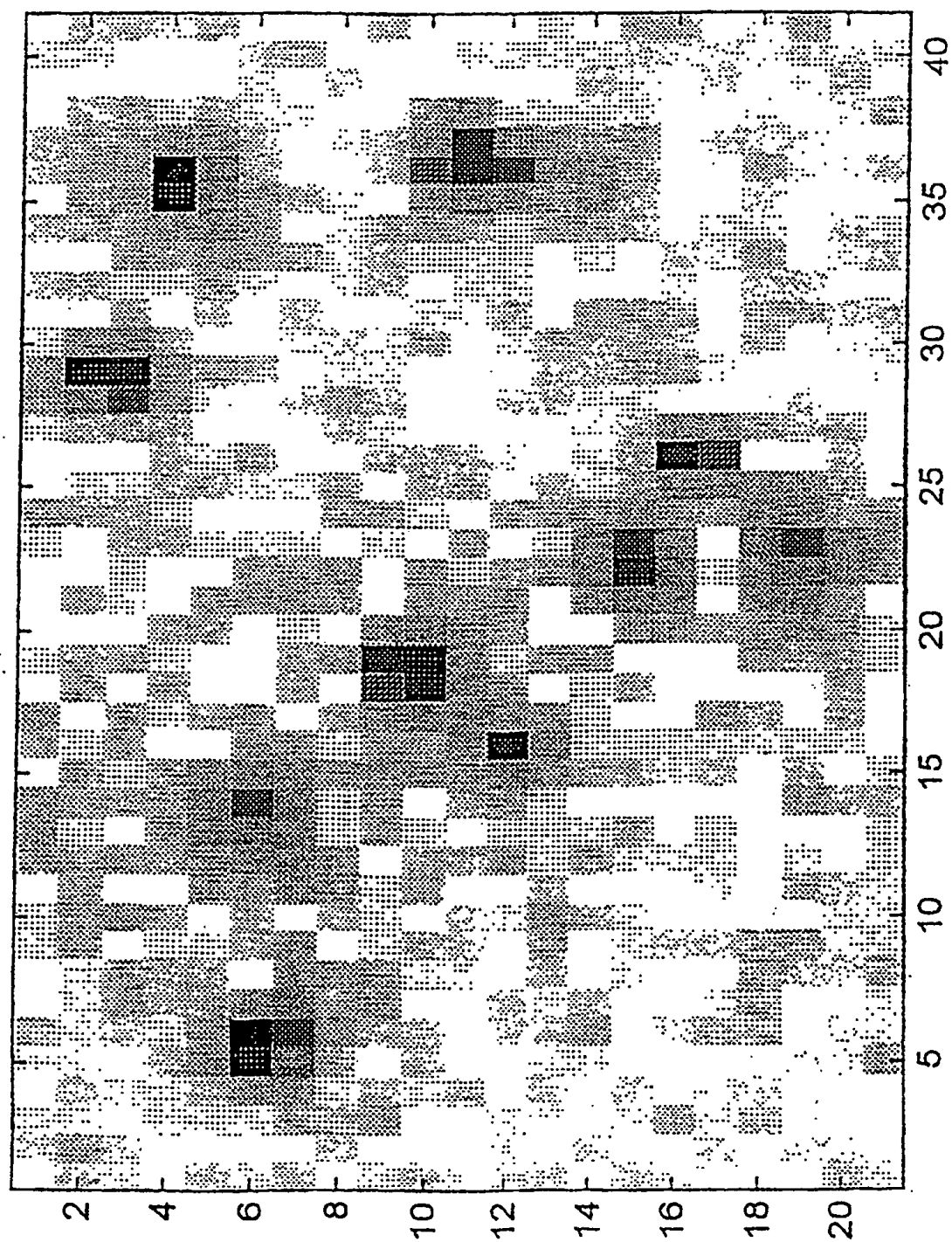


Fig. 11 A

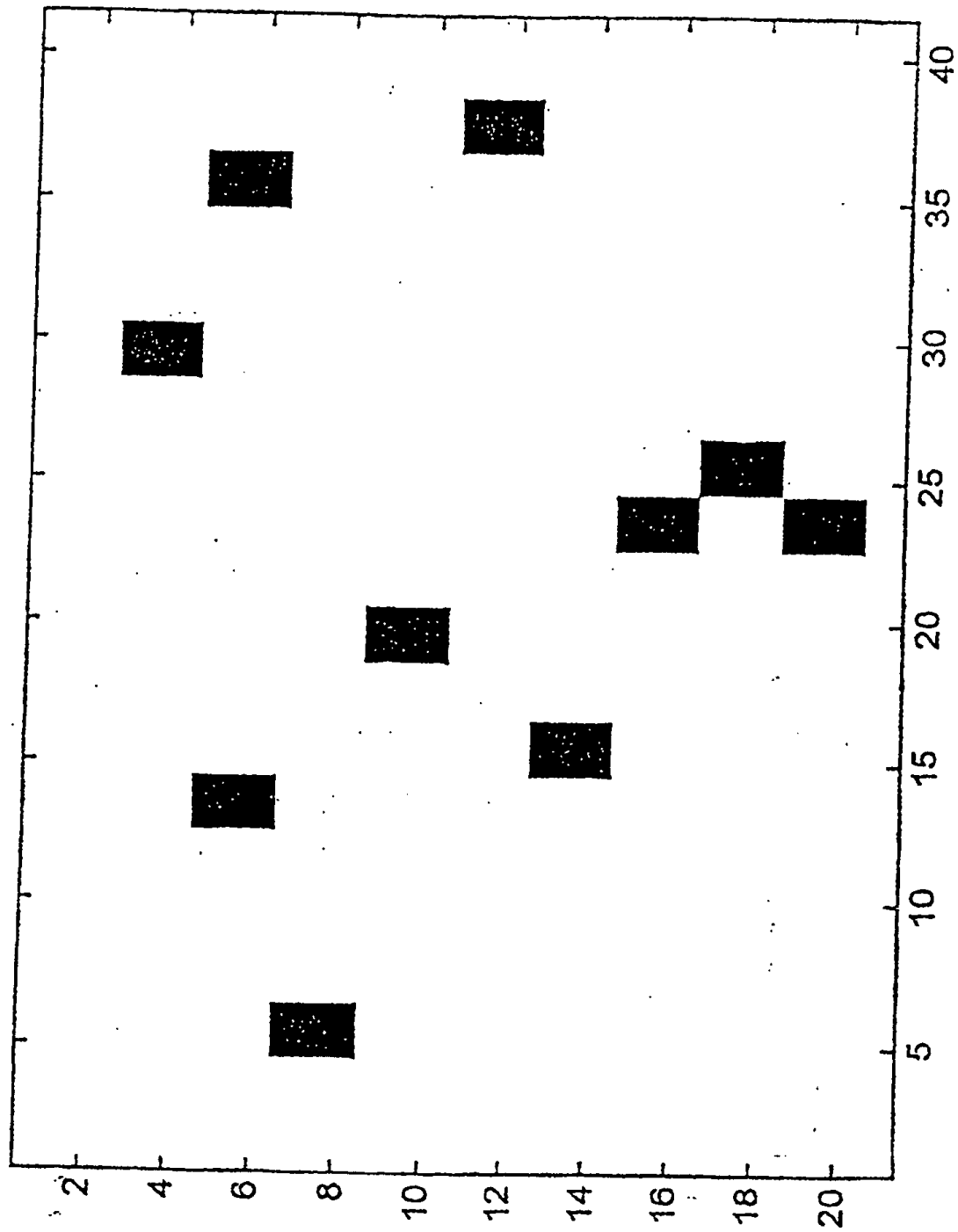


Fig. 11 B

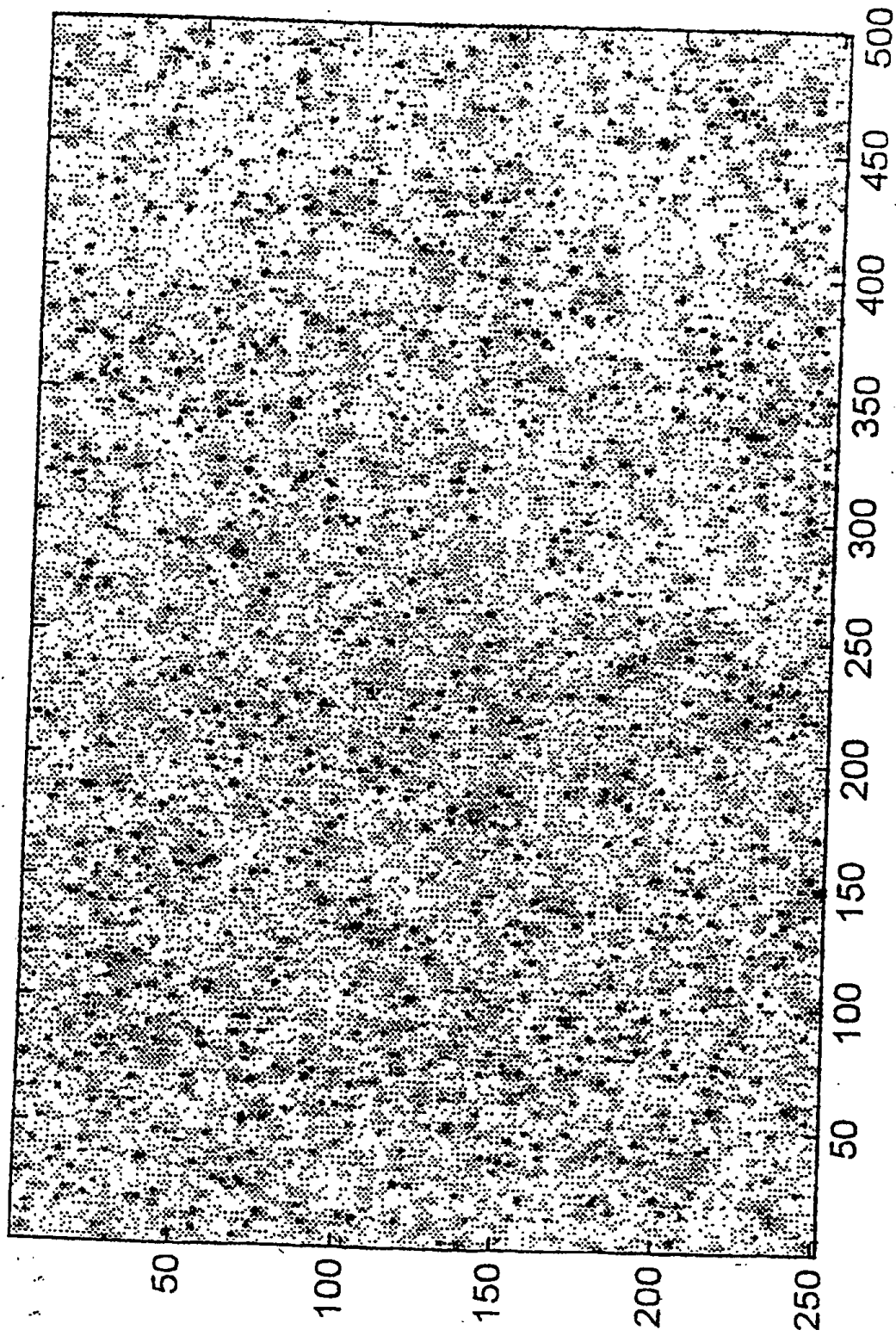


Fig. 12