(19) **Bundesrepublik Deutschland**
**Deutsches Patent- und Markenamt**

(10) **DE 695 30 855 T2** 2004.02.26

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 788 604 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **695 30 855.6**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US95/12305**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **95 935 134.7**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 96/012963**
(86) PCT-Anmeldetag: **22.09.1995**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **02.05.1996**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **13.08.1997**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **21.05.2003**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **26.02.2004**

(51) Int Cl.[7]: **G01N 33/556**

(30) Unionspriorität:
**328241** **24.10.1994** **US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
**AT, BE, CH, DE, DK, FR, GB, IE, IT, LI, NL, SE**

(73) Patentinhaber:
**BD Biosciences, Systems and Reagents, Inc., San Jose, Calif., US**

(72) Erfinder:
**DUBROW, S., Robert, San Carlos, US; MANIAN, S., Bala, Los Altos Hills, US**

(74) Vertreter:
**Kahler, Käck & Mollekopf, 86899 Landsberg**

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG EINER PROBE IN EINER SCAN-KAPILLARE FÜR IMMUNOFLUORESZENZUNTERSUCHUNG**

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

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft im Allgemeinen das Gebiet von chemischen und mikrobiologischen Testverfahren und insbesondere ein neues und verbessertes Verfahren zum Präparieren einer Blutprobe zur Zellenklassifikation und -zählung.

[0002] Seit dem Beginn der immunologischen Forschung wollten Forscher in der Lage sein, spezifische Teilchen in biologischen Fluiden zu zählen, zu identifizieren und zu analysieren. Insbesondere werden Körperflüssigkeiten von Säugerpatienten häufig analysiert, um Zielzellenkomponenten zu zählen. Blut kann beispielsweise analysiert werden, um die absolute Anzahl von T-Lymphozyten pro Volumeneinheit von ganzem Blut zu ermitteln, welche die CD4- oder CD8-Oberflächenantigene positiv exprimieren. Ein CD4/CD8-Bluttest ist wichtig, um den Fortschritt des menschlichen Immunschwächevirus (HIV) über die ganzen verschiedenen Entwicklungsstufen und insbesondere für die Diagnose der akuten Entwicklung der Virusinfektion mit dem erworbenen Immunschwächesyndrom (AIDS) zu ermitteln. Das Ausmaß an Testen, das zur Diagnose des AIDS-Virus allein erforderlich ist, treibt den Bedarf für vereinfachte, effiziente Verfahren zur Zellenzählung an.

[0003] Um diese Aufgabe zu erfüllen, haben Forscher Verfahren entwickelt, um spezifische Zellen mit Fluoreszenzmarkern zu markieren, die sich mit einer Zelle gemäß spezifischen Zellenzügen oder -eigenschaften kombinieren. Frühe Immunologen verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe, um den Kern von weißen Blutkörperchen zu färben. Die Fluoreszenz von dem Farbstoff oder Färbemittel machte es leichter, weiße Blutkörperchen zu zählen und zu identifizieren. Der Durchbruch der Technologie monoklonaler Antikörper ermöglichte bald die Konjugation eines monoklonalen Antikörpers mit einem Fluoreszenzfarbstoff. Dies erweiterte die Fähigkeit des Immunologen, Zellen gemäß ihren Oberflächenantigenen zu zählen und zu klassifizieren.

[0004] Mit der Entwicklung von Lichterfassungsvorrichtungen, die in der Lage sind, sehr genaue quantitative Messungen der Fluoreszenzintensität durchzuführen, kam ein neues Potential für automatische Zellenzählungsvorrichtungen auf. Durchflusszytometer wurden mit Fluoreszenzsensoren zum Erfassen der Fluoreszenzemission entwickelt. Abtastvorrichtungen wurden entwickelt, um Objektträger abzutasten und automatisch Zielblutzellen zu identifizieren und zu zählen.

[0005] Die Entwicklung von solchen neuen Instrumenten für die automatische Fluoreszenzanalyse hat zu einem Bedarf für neue und verbesserte Probenpräparations- und -präsentationsverfahren geführt, die die Zellenzählung erheblich vereinfachen, ohne die Genauigkeit zu gefährden. Der allgemeine Zweck von solchen Verfahren besteht darin, die Analysefähigkeiten zu erweitern, die Zuverlässigkeit zu verbessern, die Präparation zu vereinfachen, die Behandlung von Proben zu minimieren und das Risiko für Krankheitsübertragung während der Probenbehandlung zu verringern.

[0006] Durchflusszytometer weisen den Vorteil auf, dass sie eine schnelle und genaue Zellenzählung von verschiedenen Zellen in einer Probe durchführen, führen jedoch keine direkte genaue Zählung von Zellen pro Volumen von ganzem Blut durch. Durchflusszytometer präsentieren eine Probe von Zellen oder Teilchen vor einer Lichtquelle in einem geradlinigen Strömungsweg, um die Wechselwirkung des Lasers mit jeder Zelle oder jedem Teilchen zu messen. Der Strömungsweg besteht aus einem nach unten fließenden Strom von Flüssigkeit, in den die Zellen einzeln in die Mitte des Strömungsweges freigesetzt werden.

[0007] Der Laserstrahl trifft auf jede Zelle auf, was bewirkt, dass das Laserlicht in verschiedenen Richtungen streut. Lichtdetektoren sind räumlich orientiert, um eine derartige Streuung zu erfassen. Fluoreszenzdetektoren können auch verwendet werden, um die Fluoreszenzemission von einer Zelle zu messen. Eine statistische Analyse der von den Detektoren gesammelten Daten kann verwendet werden, um die Zellen zu charakterisieren und zu zählen. Die Nachteile der Durchflusszytometrie umfassen unerwünschte Konsequenzen, die sowohl damit in Zusammenhang stehen, wie eine Probe präpariert ist, als auch, wie die Probe präsentiert wird. Zuerst erfordert das Durchflusszytometrieinstrument eine Folge von Probenpräparationsschritten, um rote Blut- und Plasmakomponenten und Fluoreszenzmarker zu entfernen. Die Schritte beschädigen häufig die Zellen, insbesondere ungesunde Zellen, die häufig brüchig sind. Die Fehlertoleranz des gesamten Probenpräparationsverfahrens wird durch jeden Behandlungsschritt oder das statistische Zählverfahren zusammengesetzt. Überdies können viele Schritte, wie z. B. Zentrifugation, Filtration, Lysieren, Zellenwaschen etc., nicht durchgeführt werden, ohne die Fähigkeit, Teilchen als Funktion des absoluten Volumens absolut zu zählen, in einem großen Ausmaß zu vereiteln.

[0008] Ein übliches Verfahren zum Präparieren einer Blutprobe zur Zählung und Klassifizierung der weißen Blutkörperchen in der Probe umfasst beispielsweise die Schritte des Lysierens von roten Blutkörperchen und des Zentrifugierens der Probe, um den überschüssigen Abfall von roten Blutkörperchen von dem Plasma zu entfernen. Die Lysierung zerstört Idealerweise alle roten Blutkörperchen und keine der weißen Blutkörperchen. Das Ideal ist jedoch schwierig zu erreichen und die Wirksamkeit der Lysierung variiert von Patient zu Patient. Einige Patienten haben beispielsweise zerbrechliche weiße Blutkörperchen. Die Lysierungsmittel können die zerbrechlichen weißen Blutkörperchen beschädigen. Andere Patienten, insbesondere Patienten mit AIDS, erzeugen rote Blutkörperchen mit einer erhöhten Beständigkeit gegen Lysierungsmittel. Solche Proben erfordern mehrere Anwendungen von Lysierungsmitteln,

wirksamere Lysierungsmittel, die eine stärkere Gefährdung für eine Beschädigung der weißen Blutkörperchen verursachen, welche der Gegenstand oder das Ziel des Zellenzähltests sind.

[0009] Zentrifugations- oder Gravitationstrennung ist ebenso ein unvollkommenes Trennverfahren. Wenn Zentrifugation mit Lysierung verwendet wird, werden die weißen Blutkörperchen mit dem Fluid vermischt, während der lysierte Zellenabfall zum Boden des Zentrifugationsgefäfles zentrifugiert wird. Dann werden die weißen Blutkörperchen vom Abfall abgegossen. Leider ist die Zentrifugaltrennung nicht perfekt und einige der unlysierten Teilchen bleiben mit dem Zellenabfall vermischt. Sobald Trennverfahren wie z. B. Zentrifugation und Abgießen beteiligt sind, kann die genaue Menge an Zielzelle pro Volumeneinheit aufgrund des durch die Trennverfahren eingeführten Fehlers nicht genau gemessen werden. Wenn beispielsweise ein bekanntes Blutvolumen nach dem Lysieren der roten Blutkörperchen zentrifugiert wird, setzt sich der Abfall aus den lysierten roten Blutkörperchen zu einer Sedimentschicht ab. Dann wird das weiße Blutkörperchen enthaltende Plasma vom Abfall abgegossen. Ungeachtet der angewendeten Sorgfalt bleiben einige der weißen Blutkörperchen in der Küvette mit dem Abfall von den lysierten roten Blutkörperchen. Folglich wäre ein nachfolgender Zählwert der weißen Blutkörperchen, die vom Abfall getrennt wurden, kein genauer Zählwert der Anzahl von weißen Blutkörperchen, die in der ursprünglichen Probe enthalten waren.

[0010] Rote Blutkörperchen werden lysiert, da die Anwesenheit von roten Blutkörperchen eine optische Störung erzeugt, wenn Fluoreszenz verwendet wird, um eine Zielunterklasse von Zellen zu erfassen und zu zählen. Zwei Arten von Störung machen rote Blutkörperchen lästig. Erstens absorbieren rote Blutkörperchen Licht mit einer Wellenlänge im Bereich von 200 nm bis 500 nm. Wenn Laserlicht einer Fluoreszenzentladung in diesem Bereich auftritt, dann werden das Licht, das den Fluoreszenzmarker anregt, und die Fluoreszenzentladung vom Marker stark abgeschwächt. Zweitens sind rote Blutkörperchen und anderes Plasmaprotein selbstfluoreszierend. Diese Komponenten von Blut enthalten natürlicherweise Fluorophore oder Moleküle, die Fluoreszenz abgeben, wenn sie durch Licht angeregt werden. Fluoreszenzmarker müssen so gewählt werden, dass sie eine Aktivierungsenergie und eine Energie von abgegebenem Fluoreszenzlicht aufweisen, die ebenso eine Selbstfluoreszenz von roten Blutkörperchen vermeiden. Ein weiterer Nachteil für Durchflusszytometrieverfahren besteht darin, dass die Probe aus der Düse in Form von zerstäubten Tröpfchen ähnlich einem feinen Nebel, der durch die Luft getragen werden kann, abgegeben wird. Techniker, die ein Durchflusszytometer verwenden, können die zerstäubten Teilchen einatmen oder anderweitig diesen ausgesetzt werden. Sollte die Probe mit einer Krankheit infiziertes Blut oder ein anderes biologisch gefährliches Material sein, dann wird der Techniker einem Infektionsrisiko ausgesetzt. Somit besteht ein Bedarf für Probenpräparationsverfahren, um das Risiko einer Infektion, das durch die Freisetzung von diesen zerstäubten Teilchen erzeugt wird, zu beseitigen.

[0011] Die Probenpräparation für Durchflusszytometer kann die Verwendung von Fixativen oder Fixiermitteln beinhalten, die Bakterien und Viren abtöten, ohne die physikalische Struktur von Blutkörperchen zu zerstören. Formaldehyd ist ein übliches Fixativ, das zur Probe zugegeben werden kann, um das Infektionsmaterial zu zerstören. Es gibt mindestens zwei Nachteile bei der Verwendung von Fixativen. Erstens "töten" die Fixiermittel "die Zelle" ab, ohne eine wesentliche Beschädigung der physikalischen Struktur zu verursachen. Einige morphologischen Änderungen in der Zelle werden jedoch durch das Fixativ verursacht. Folglich weichen Daten von den fixierten Proben von Daten ab, die ansonsten von unbehandeltem Blut erhalten werden würden. Zweitens fügt die Zugabe von Fixativen einen Verdünnungsschritt hinzu. Jedes Mal, wenn eine Probe vermischt, behandelt, verdünnt oder zentrifugiert wird, wird ein Verarbeitungsschritt zur Gesamtprozedur hinzugefügt. Der Fehler von einem Schritt kann allein nicht signifikant sein; wenn jedoch der Fehler mit dem Fehler von jedem Messschritt zusammengesetzt wird, kann der gesamte Prozess eine gesamte unerwünschte Fehlertoleranz aufweisen. Folglich ist das einfachste mögliche Testverfahren mit der geringsten Anzahl von Behandlungsschritten für die Forscher und Anwender, die Fluoreszenzmessvorrichtungen verwenden, vorteilhaft, da sie Volumenbestimmungen genauer machen.

[0012] Da die Volumenzählung (d. h. Messungen von Zellen pro Volumeneinheit) für Diagnosezwecke so wichtig ist, wurden mehrere Versuche zum Durchführen einer Volumenbestimmung unter Verwendung eines Durchflusszytometers vorher vorgeschlagen. Ein übliches Verfahren besteht darin, alle Zellen mit einer Vorrichtung wie z. B. einem Zellsortierer zu zählen, um die Gesamtzahl einer bestimmten Teilmenge von Zellen in einem festen Probenvolumen zu zählen. Dann wird eine weitere Probe präpariert, die die Anzahl von Zielzellen als Verhältnis der Zellenart, die als Standard wirkt, zählt. Das Multiplizieren des Verhältnisses von Zielzellen zu Standardzellen mit der Anzahl von Standardzellen pro Volumeneinheit ergibt eine Volumenabschätzung der Anzahl von Zielzellen in einem festen Volumen. Die Fehlertoleranz von jeder Zellenzählung wird jedoch zusammengesetzt. Die Genauigkeit von Volumen-Zellenzählvorrichtungen kann erheblich erhöht werden, wenn die Volumenzählung in einer Messung durchgeführt werden könnte.

[0013] Ein weiterer Versuch, um die Genauigkeit der Volumenzellenzählung für Durchflusszytometrieinstrumente zu verbessern, war mit dem Vermischen einer festen Anzahl von Fluoreszenzmikroteilchen (z. B. Kügelchen) mit einem festen Probenvolumen vor

den Präparationsverfahren verbunden. Typischerweise werden die Mikroteilchen mit demselben Fluoreszenzmarker markiert wie die Zellen, die das Ziel für die Zählung sind. Die Konzentration von Markern an den Mikroteilchen ist jedoch typischerweise 5–10-mal die Intensität der Konzentration der markierten Teilchen an den Mikroteilchen. Ein auf der Größe der Fluoreszenzemission basierendes Tor kann festgelegt werden, um die Mikroteilchen von den Zielzellen zu unterscheiden. In dieses Verfahren wird ein Fehler eingeführt, wenn Zielzellen eine ungewöhnlich hohe Antikörperkonzentration aufweisen oder wenn einige der Mikroteilchen eine verringerte Fluoreszenzkonzentratiön aufweisen. Selbst wenn das Torsteuerverfahren sicherstellen würde, dass keine Mikroteilchen mit Zielteilchen verwechselt werden würden, erfordert das Verfahren. zwei Messungen, um ein Volumenergebnis zu erhalten. Der Fehler der zwei Messungen wird zusammengesetzt, wobei das Mikroteilchenverfahren weniger genau belassen wird als ein direkteres Verfahren, das die Anzahl von Zellen pro Volumeneinheit in einer Messung misst.

[0014] Nachdem die vorbestimmte Anzahl von Mikroteilchen mit dem festen Blutvolumen vermischt ist, wird die Probe verarbeitet. Während des Verarbeitungsschritts können einige der Mikroteilchen verloren gehen, da die Mikroteilchen, die typischerweise aus Polystyrol bestehen, eine andere Dichte als jene der Zielzellen aufweisen. Folglich besteht für die Probe weiterhin der Bedarf zum Vermischen, um sicherzustellen, dass sich die Mikroteilchen nicht disproportional absetzen.

[0015] Ein weiteres bekanntes System zur Zellenzählung ist die Fluoreszenzmikroskopie, die Fluoreszenzmarkierung mit der Mikroskopietechnologie kombiniert. Solche Systeme umfassen automatische Abtastmikroskope, um Unterklassen von Zellen zu identifizieren und zu zählen. Die Probenpräparation umfasst das Bestreichen eines Objektträgers mit einer Probe, die fluoreszenzgefärbte oder -markierte Blutkörperchen (Zielzellen) enthält. Eine Lichtquelle wird verwendet, um die Zellen gegen ein Gitter im Hintergrund der Mikroskopoptik zu beleuchten. Die Anzahl von Zellen pro Gitter wird gezählt und gemittelt, um die fluoreszenzgefärbten Zellen zu quantifizieren. Obwohl dieses Verfahren Verhältnisse von einer Zellenart zu einer anderen Zellenart feststellen kann, kann die Mikroskopzählung von bestrichenen Objektträgern die Anzahl von Zellen pro Volumeneinheit nicht direkt ermitteln.

[0016] Wenn manuelle Zellenzählung verwendet wird, besteht ferner eine große Gelegenheit für einen menschlichen Fehler und Schwankungen in der Genauigkeit von Techniker zu Techniker. Automatische Verfahren zum Zählen von Zellen, die auf einen Objektträger gestrichen sind, verbessern die Fähigkeit, die Zellen pro Flächeneinheit über den Objektträger genauer zu zählen, aber die Verfahren zur Zellenpräparation, die mit der automatischen Fluoreszenzmikroskopie kompatibel sind, können nicht direkt die Anzahl von Zielzellen pro Volumeneinheit ermitteln.

[0017] Kügelchen können ebenso mit Objektträgern verwendet werden, um eine Volumenzählung von ganzem Blut auf einem Objektträger durchzuführen. Ein Verfahren vermischt im Wesentlichen unkomprimierbare Mikroteilchen (z. B. Kügelchen) mit einem festen Volumen einer flüssigen Probe, bevor die Probe verarbeitet und auf einen Objektträger gestrichen wird. Das Verhältnis von Zielzellen zu Mikroteilchen mal die Anzahl von Mikroteilchen pro Volumeneinheit kann verwendet werden, um die Anzahl von Zielzellen pro Volumeneinheit abzuschätzen. Dieses Verfahren vermeidet jedoch nicht den Schritt des Lysierens. Alle dieselben Probleme der Verwendung von Mikroteilchen bei der Durchflusszytometrie gelten gleichermaßen für die Verwendung von Mikroteilchen bei der Fluoreszenzmikroskopie.

[0018] Folglich ist ein Bedarf für ein neues und verbessertes Probenpräparations- und Testverfahren entstanden, das die Genauigkeit und Effizienz der Volumenzellenzählung verbessert und gleichzeitig die Präparation der Probe vereinfacht. Ein solches Verfahren wäre ferner erwünscht, wenn es die Trennungs- und Behandlungsschritte wie z. B. Zentrifugation, Abgießen, Zellenlysieren und Zellenwaschen beseitigen würde. Der Test wäre besonders vorteilhaft, wenn das Volumen der Probe ohne Bedarf für Mikroteilchenadditive oder Fixative bewahrt und genau analysiert werden könnte. Die Fähigkeit, ganzes Blut zu analysieren, um eine genaue Volumenzellenidentifikation und -zählung von entweder der gesamten Probe oder einem Teil der Probe durchzuführen, würde klinische und diagnostische Anwendungen von solchen Testverfahren erheblich erweitern und verbessern.

[0019] Die frühere Anmeldung EP 0 681 178 A1 offenbart ein Verfahren zum Präparieren und Analysieren einer Probe durch Fluoreszenzmarkierung unter Verwendung eines Bindemittels. Vor einer Analyse wird die Probe verdünnt, um die Konzentration an markiertem Probematerial durch Verteilen desselben zu senken. Die Probe wird verdünnt, um die Überlappung des Probenmaterials in der Richtung des Analyseweges zu verhindern. Durch Verdünnen wird jedoch das aggregierte Probematerial nicht gelöst und es überlappt weiterhin, was die Messung ungenau machen würde.

[0020] US-A-4 125 828 stellt ein Verfahren zum Analysieren von gefärbtem Probematerial in einer Probe bereit. Das gefärbte Probenmaterial wird beleuchtet und das Fluoreszenzlicht wird zum Zählen des Probenmaterials pro Einheitsfläche gemessen. Zum Markieren wird ein Färbemittel-Verdünnungsmittel-Stabilisator verwendet, der gleichzeitig die Viskosität der Probe verbessert. Die höhere Viskosität der Probe wird verwendet, um eine gleichmäßige Verteilung des Probenmaterials während des Schleuderns auf ein Glas zu garantieren. Durch das Schleudern wird eine einlagige Schicht aus Probenmaterial gebildet, die das exakte Zählen des Probenmaterials

ermöglicht. Das auf dem Glas verbleibende Probenvolumen und das Probenvolumen, das durch das Schleudern weggeschleudert wird, wird jedoch nicht gesteuert. Dadurch ist keine absolute Zählung des Probenmaterials in bezug auf die ursprüngliche Probe möglich.

[0021] Gemäß dem Verfahren von US-A-5 264 369 wird eine erste wässerige Lösung zu einer Probe zugegeben. Die erste Lösung senkt den osmotischen Druck, so dass die Membranen eines ausgewählten Blutprobenmaterials beschädigt werden. Anschließend wird eine zweite Lösung zur Probe zugegeben, die die saure Wirkung der ersten Lösung neutralisiert. Erst dann werden in einem nächsten Schritt mindestens vier Farbstoffe zugegeben, wodurch eine Vielfalt von verschiedenem Probenmaterial in der Probe gefärbt wird. Dieses Verfahren umfasst das Lysieren von roten Körperchen, gefolgt von einer Berechnung von weißen Körperchen. Durch Zugeben der ersten Lösung wird die ursprüngliche Zusammensetzung der Probe modifiziert und das Ausmaß der Modifikation hängt stark von der korrekten Zugabe der zweiten Lösung ab, die verhindert, dass die erste Lösung die Probe weiter modifiziert.

[0022] US-A-5 284 771 offenbart ein Verfahren zum Präparieren einer Blutprobe und zum Analysieren eines spezifischen Probenmaterials in der Blutprobe. Einiges Blutprobenmaterial wird unter Verwendung eines Farbstoffs markiert. Ein HeNe-Laserstrahl wird durch die stark verdünnte Probe (bis zu 1 : 1000) gerichtet, die in einem Durchflusszytometer strömt. Die Absorption und die Streuung des Strahls bei der Laserstrahlwellenlänge werden erfasst. Die relativen Signalpegel werden mit Kalibrierungsdiagrammen verglichen, um absolute Konzentrationsdaten für ausgewähltes Probenmaterial in einem Einheitsvolumen zu gewinnen.

[0023] Das Verfahren zur Probenpräparation in "Acousto-Optic Laser-Scanning Cytometer" Cytometry, Band 9, 1998, S. 101-110, umfasst zuerst das Färben von Probenmaterial und dann das Zugeben eines Reagens zum Lysieren. Durch das Lysierungsreagens wird die Probenzusammensetzung verändert. Ferner wird die Konzentration der Probenmaterialdichte durch Verdünnen der Probe verringert. Dies soll das Zusammentreffen von Probenmaterial verringern.

[0024] Es ist eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren bereitzustellen, das die Zählung von Zielkomponenten in einer Blutprobe verbessert.

[0025] Diese Aufgabe wird durch die Merkmale der Ansprüche 1 bzw. 14 gelöst.

[0026] Kurz und in allgemeinen Worten umfasst die vorliegende Erfindung einen neuen und verbesserten Test für das Zählen von fluoreszenzgefärbten Zielkomponenten einer ganzen Blutprobe durch ein Abbildungsinstrument. Ebenso umfasst die Erfindung eine aus ganzem Blut hergestellte Probenpräparation. Die ganze Blutprobe wird dem Abbildungsinstrument in einem statischen Zustand innerhalb einer Kammer präsentiert, so dass die Blutzellen und andere Teilchenkomponenten des Bluts, z. B. Hämatokrit, in der gesamten Kammer, wie z. B. einer Abtastkapillare, gleichmäßig verteilt werden. Das Probenpräparationsverfahren stellt sicher, dass die Menge an Zielkomponenten pro Volumeneinheit des ganzen Bluts bewahrt wird, indem nicht-quantitative Präparationsschritte beseitigt werden. Überdies werden Verfahren, die eine gleichmäßige Hämatokritschicht erzeugen, für eine optimale Präsentation der Zielkomponenten für das Abbildungsinstrument bereitgestellt. Typische Zielkomponenten umfassen weiße Blutkörperchen, die bestimmte Oberflächenantigene exprimieren, wie z. B. CD-4- und CD-8-Proteine.

[0027] Ein unerwartetes Problem entsteht, wenn versucht wird, eine statische ganze Blutprobe in einer Kammer mit festem Volumen, wie z. B. einer Abtastkapillare, abzubilden. Die statische Präsentation der Probe induziert eine Aggregation von roten Blutkörperchen oder den sogenannten "Rouleaux-Effekt". Der Rouleaux-Effekt verursacht eine Bahn von aggregierten roten Blutkörperchen in der gesamten Probe, was eine ungleichmäßige Verteilung der Hämatokritschicht verursacht. Dieser Effekt tritt in statischem Blut schnell auf, ist jedoch durch Rühren reversibel. Normalerweise tritt der Rouleaux-Effekt unter einer rheologischen Bedingung nicht auf. Die letztliche Konsequenz des Rouleaux-Effekts besteht darin, dass die Zellenerfassung durch das Abbildungsinstrument schwieriger, wenn nicht unmöglich, ist.

[0028] Ein Vorteil des Tests der vorliegenden Erfindung besteht darin, dass er den Rouleaux-Effekt beseitigt. Um die Aggregation der roten Blutkörperchen zu verhindern, wird ein Reagens zur ganzen Blutprobe zugegeben, das die Form der roten Blutkörperchen modifiziert, die Oberflächeneigenschaften der roten Blutkörperchen verändert oder die Umgebung, z. B. Plasma, in dem sich die roten Blutkörperchen befinden, modifiziert. Bevorzugte Reagenzien weisen keine Fluoreszenzeigenschaften auf, lysieren die roten Blutkörperchen nicht, stören die Antigen-Antikörper-Wechselwirkung nicht und können zu einem Feststoff reduziert werden, ohne eine chemische Zersetzung zu verursachen, während die Zellenaggregation wirksam verhindert wird.

[0029] Wirksame Reagenzien umfassen Waschmittel, die entweder die Geometrie der roten Körperchen verändern oder die Oberflächenchemie der Oberflächenproteine der Zellen verändern. Kurzkettige zwitterionische Alkylverbindungen wurden beispielsweise als wirksam befunden. Ebenso kann das Reagens eine mild hypotonische Salzlösung sein, die die Form der roten Blutkörperchen geometrisch verändert. Außerdem kann der pH-Wert der Probe verändert werden, um ebenso die roten Blutkörperchen zu beeinflussen. Alternativ kann eine quantitative Menge eines Probenverdünnungsmittels wie z. B. eine isotonische Salzlösung zur Probe zugegeben werden, welches scheinbar das Hämatokrit abtrennt und die Proteinkonzentration im Plasma ausreichend verringert,

um die Aggregation der Zellen zu verhindern.

[0030] Die durch das Verfahren. der vorliegenden Erfindung präparierte Blutprobe weist eine Hämatokritschicht auf, die im Wesentlichen gleichmäßig über die gesamte Abtastkapillare verteilt ist. Die gleichmäßige Verteilung von weißen und roten Blutkörperchen weist mehrere Vorteile auf. Der Vorteil, eine gleichmäßige Hämatokritschicht zu haben, besteht darin, dass sich ein gleichmäßigerer Pegel an Hintergrundrauschen von ungebundenen Fluoreszenzverbindungen ergibt. Da der Fluoreszenzfarbstoff die roten Blutkörperchen nicht durchdringt, ist eine gleichmäßige Hämatokritschicht wesentlich, um eine gleichmäßige Hämatokritschicht zu haben. Wenn eine gleichmäßige Hämatokritschicht vorliegt, wird sichergestellt, dass das Volumen des Plasmas, das ungebundene Fluoreszenzverbindung enthält, durch die gesamte Abtastkapillare gleichmäßig verschoben wird. Dies stellt sicher, dass die Menge an ungebundener Fluoreszenzverbindung in der gesamten Abtastkapillare im Wesentlichen konstant bleibt, was einen relativ gleichmäßigen Pegel an Hintergrundfluoreszenz aufrechterhält.

[0031] Der erste Schritt der Präparation besteht darin, eine aliquote Menge von ganzem Blut zu erhalten. Die aliquote Menge von ganzem Blut wird mit einer vorgewählten Menge eines Fluoreszenzfarbstoff- und Ligandenkomplexes, der die Zielteilchen markiert, vermischt. Der Komplex zur Verwendung beim Erfassen von Lymphozyten, die das CD-4-Antigen exprimieren, ist vorzugsweise ein monoklonaler Antikörper mit einer hohen Affinität für das CD-4-Antigen, das mit einem reaktiven Cyaninfarbstoff gekoppelt ist. Der Fluoreszenzfarbstoff wird derart gewählt, dass die Absorption, Selbstfluoreszenz und Beugung des Anregungslichts und emittierten Fluoreszenzlichts durch rote Blutkörperchen minimiert wird.

[0032] Die vorgewählte Menge an Fluoreszenzkomplex wird so gewählt, dass ausreichend Ligand oder Antikörper vorhanden ist, um angemessen an die Zielkomponenten zu binden oder sich and diesen zu sammeln. Überschüssiger Farbstoff und Ligand müssen eine ausreichende Markierung der Zielteilchen in einer vernünftigen Menge an Zeit sicherstellen. Die Konzentration an überschüssigem Fluoreszenzfarbstoff in der Probe wird jedoch so ausgewählt, dass sie ausreichend niedrig ist, so dass die Fluoreszenz von Zielkomponenten eine Intensitätsreaktion erzeugt, die ausreicht, um in Gegenwart der vom ungebundenen Fluoreszenzfarbstoff erzeugten Fluoreszenz erfasst zu werden. Ebenso dürfen die Probe und der Fluoreszenzkomplex eine ausreichende Menge an Zeit inkubieren, um genügend des Fluoreszenzkomplexes an die Zielkomponenten zu binden, um ein Fluoreszenzsignal von den Zielkomponenten bereitzustellen, das vom Fluoreszenzsignal vom ungebundenen Fluoreszenzkomplex in der Probe unterscheidbar ist. Der Inkubationszeitraum ist vorzugsweise ausreichend, um die Sättigung des Fluoreszenzkomplexes an den Zielkomponenten zu ermöglichen; eine Sättigung ist jedoch nicht erforderlich. Das resultierende Gemisch ermöglicht, dass das Abbildungsinstrument Spitzenintensitäten der Fluoreszenz von den Zielkomponenten erfasst, wodurch ermöglicht wird, dass die Zielkomponenten mit einem verbesserten Niveau an Genauigkeit und Effizienz volumetrisch gezählt werden.

[0033] Im bevorzugten Ausführungsbeispiel wird eine quantitative Menge an Reagenz zum Verhindern der Aggregation von roten Blutkörperchen zur aliquoten Menge der ganzen Blutprobe und des Fluoreszenzfarbstoff-Liganden-Komplexgemisches zugegeben. Alternativ kann das Reagenz zur ganzen Blutprobe vor dem Zugeben des Fluoreszenzkomplexes zugegeben werden. Ebenso kann das Reagens mit dem Fluoreszenzkomplex vermischt und beide zur ganzen Blutprobe gemeinsam zugegeben werden. Das Gemisch aus Blutprobe, Fluoreszenzkomplex und Reagens wird in eine Kammer zur Abfrage durch das Abbildungsinstrument geliefert. Das Gemisch kann nach der Inkubation des Fluoreszenzkomplexes in die Kammer gegeben werden oder das Gemisch kann in der Kammer inkubieren.

[0034] Die bevorzugte Kammer zur Abfrage durch das Abbildungsinstrument ist eine Abtastkapillare, die typischerweise aus Glas oder Kunststoff besteht. Die Länge und Breite der Abtastkapillare legt eine im Allgemeinen horizontale Abtastebene fest, über die das Abbildungsinstrument die Probe auf einer pixelweisen Basis abfragt. Das Abbildungsinstrument verwendet eine Laserlichtquelle, die auf die Abtastkapillare fokussiert wird, um einen zylindrischen Bereich senkrecht zur Abtastebene mit einem Querschnittsdurchmesser, der einen Abtastpunkt festlegt, zu beleuchten. Das Abbildungsinstrument regt den Fluoreszenzkomplex an und erfasst die Fluoreszenzemission des ungebundenen Komplexes und des an die Zielkomponenten gebundenen. Das Volumen der analysierten Probe ist gleich der Querschnittsfläche der Weite der Kapillare mal der Länge der Kapillare, die durch das Abbildungsinstrument abgetastet wird.

[0035] Die Verwendung eines solchen Abbildungsinstruments in Verbindung mit der Abtastkapillare weist den weiteren Vorteil auf, dass die Blutprobe, die mit Infektionsviren oder -bakterien verunreinigt sein kann, niemals mit den permanenten Teilen des Abbildungsinstruments in Kontakt kommt. Da die Blutprobe innerhalb der Abtastkapillare enthalten ist, sind keine zerstäubten Teilchen vorhanden, die in die Luft weggetragen werden können. Folglich sind keine Fixative erforderlich. Somit sorgt das Verfahren der vorliegenden Erfindung für die sichere, wirksame Analyse von ganzem Blut.

[0036] Zusammengefasst umfasst das Verfahren der vorliegenden Erfindung die Schritte des Mischens einer ausgewählten Menge von Fluoreszenzkomplex mit ganzem Blut, des Inkubierens des Gemisches für einen Zeitraum, des Zugebens eines Reagens, um die Aggregation zu verhindern, und des Abziehens einer aliquoten Menge des Gemisches in

eine Abtastkapillare. Die Folge der Schritte ist für das erwünschte Ergebnis nicht entscheidend. Die Weite der Abtastkapillare wird durch ein Abbildungsinstrument abgefragt, das einen Säulenbereich entlang eines Abtastweges beleuchtet und die Fluoreszenzreaktion von der Säule periodisch misst. Das Verfahren verbessert ferner die Zellenzählungsgenauigkeit durch Vereinfachen der Probenpräparationsverfahren durch Vermeiden eines durch mehrere Verarbeitungsschritte, wie z. B. Lysieren, Auswaschen von überschüssigem Antikörper und Zentrifugation der Probe, verursachten Fehlers. Ferner ist die präparierte Probe in einer Abtastkapillare enthalten und berührt niemals die Arbeitsteile des Abbildungsinstruments. Folglich müssen Tests mit ganzem Blut nicht mit einem Fixativ behandelt werden, um Infektionsbakterien und -viren in der Probe abzutöten. Diese und weitere Merkmale und Vorteile der vorliegenden Erfindung werden aus der folgenden ausführlicheren Beschreibung in Verbindung mit den zugehörigen Zeichnungen ersichtlich, welche beispielhaft die Prinzipien der vorliegenden Erfindung darstellen.

## KURZBESCHREIBUNG DER ZEICHNUNG

[0037] **Fig.** 1 ist eine teilweise aufgeschnittene, perspektivische Ansicht einer Abtastkapillare, die eine Probe von ganzem Blut enthält.

[0038] **Fig.** 1A ist eine vergrößerte bruchstückhafte Ansicht von **Fig.** 1 in dem durch 1A in **Fig.** 1 definierten Bereich.

[0039] **Fig.** 2 ist eine schematische Darstellung eines Bruchteils der Abtastkapillare von **Fig.** 1, die von einem Laserlichtstrahl geschnitten wird, um eine beleuchtete Säule innerhalb der Kapillare festzulegen.

[0040] **Fig.** 3A–E sind Vorderseitenansichten von verschiedenen beleuchteten Pixeln über einer Balkendiagrammdarstellung von entsprechenden Fluoreszenzreaktionen.

[0041] **Fig.** 4A ist eine graphische Darstellung der entlang einer einzelnen Abtastlinie über eine Probe mit einer gleichmäßigen Hämatokritschicht erfassten Fluoreszenz.

[0042] **Fig.** 4B ist eine graphische Darstellung der entlang einer einzelnen Abtastlinie über eine Probe mit einer gleichmäßigen Hämatokritschicht erfassten Fluoreszenz.

[0043] **Fig.** 5 ist eine vergrößerte Darstellung einer Vielzahl von roten Blutkörperchen, die durch den Rouleaux-Effekt zusammengehäuft sind.

[0044] **Fig.** 6A ist eine Querschnittsansicht der Abtastkapillare von **Fig.** 1 mit drei Zielzellen mit einem ungleichmäßigen Hämatokrit.

[0045] **Fig.** 6B ist eine graphische Darstellung des von einer Querabtastlinie über der Probe von **Fig.** 6A erzeugten Fluoreszenzsignals.

[0046] **Fig.** 7 ist eine Darstellung von Lichtwellen, die ein rotes Blutkörperchen berühren.

[0047] **Fig.** 8 ist das Absorptionsspektrum von roten Blutkörperchen im Bereich von Licht mit einer Wellenlänge von 250 bis 900 nm.

[0048] **Fig.** 9 ist eine graphische Darstellung der Intensität der Selbstfluoreszenz von roten Blutkörperchen für verschiedenen Anregungslichtwellenlängen.

[0049] **Fig.** 10 ist ein kinetisches Diagramm, das die Bindungskinetik für schnelle und langsame Antikörper/Antigen-Bindungsreaktionen darstellt.

[0050] **Fig.** 11 ist ein Histogramm, das die mittlere Spitzenhöhe von Zellen, die mit "CY5"-konjugiertem CD4 markiert sind, nach festgelegten Inkubationszeiten darstellt.

[0051] **Fig.** 12–14 sind Streudiagramme von Proben, die jeweils durch die in Beispielen **1** bis **3** umrissenen Schritte präpariert wurden.

[0052] **Fig.** 15–18 sind Histogramme, die die Anzahl von Zellen, die Fluoreszenzintensitäten bei verschiedenen Spitzenpegeln aufweisen, vergleichen.

[0053] **Fig.** 19 vergleicht eine Anzahl von Zellenzählwerten von mehreren Patienten, um die Wirksamkeit von durch die vorliegende Erfindung präparierten und durch ein Abbildungsinstrument abgefragten Proben und Proben, die für ein Durchflusszytometer präpariert und von diesem abgefragt wurden, zu vergleichen.

## BESCHREIBUNG DER BEVORZUGTEN AUSFÜHRUNGSBEISPIELE

[0054] Der Test der vorliegenden Erfindung präpariert und präsentiert eine Probe von biologischem Fluid, wie z. B. menschliches ganzes Blut, in einer Abtastkapillare. Das biologische Fluid weist eine flüssige Phase wie z. B. Plasma und eine feste Phase mit Teilchenmaterial wie Blutzellen und Blutplättchen von verschiedenen Arten und Unterklassen auf. **Fig.** 1 ist eine perspektivische Ansicht einer Abtastkapillare **10** mit einer Weite und mit einem Boden. Die Kapillare enthält ein festes Volumen der Probe **12**. Die Probe besteht aus Fluid **14** und Teilchenmaterial **16**. Die Probe in einer Abtastkapillare wird zur Abfrage durch ein Abbildungsinstrument präsentiert, das einen Planaren Bereich, der Abtastebene genannt wird, parallel zum Weitenboden der Kapillare abtastet.

[0055] Mit Bezug auf **Fig.** 1A werden die markierten Teilchen **22** und **24** jeweils in der Teilchenschicht oder der Fluidschicht suspendiert. Die Zielkomponenten **22** und **24** sind eine Unterklasse von Teilchen, die mit Fluoreszenzmarkern markiert sind. Eine Unterklasse von Blutzellen kann beispielsweise weiße Blutkörperchen, Blutplättchen oder verschiedene Teilmengen von weißen Blutkörperchen wie z. B. Lymphozyten oder auch Unterklassen von verschiedenen Lymphozyten sein. Zielkomponenten von anderen biologischen Fluiden können ein Bakterium, ein Virus, ein Protozoa oder Parasiten sein. Die Fluoreszenzmarker werden gewählt, um spezifisch an Zellen gemäß einem Zellenzug, beispielsweise der Exprimierung einer Population von spezifischen Oberflächenantigenen, zu binden. Ein Fluoreszenzmarker, der beim Binden an eine spezifische Art von Oberflächenanti-

gen wirksam ist, kann durch Konjugieren eines monoklonalen Antikörpers, der spezifisch an eine Art Oberflächenantigen bindet, mit einem Fluoreszenzfarbstoff hergestellt werden. Fluoreszenzmarker in der Probe können in der ganzen Blutprobe ungebunden sein oder an oder innerhalb einer Zielzelle angesammelt sein.

[0056] Das Verfahren des bevorzugten Ausführungsbeispiels eignet sich zur Verwendung mit einem Abbildungsinstrumentabtaster. Obwohl das Abbildungsinstrument mit dem betreffenden Verfahren der vorliegenden Erfindung kompatibel ist, wird auf das Instrument beispielhaft und nicht zur Begrenzung Bezug genommen. Ein solches Abbildungsinstrument schmälert einen Laserlichtstrahl in Form einer gaußschen Einschnürung, die die Abtastkapillare, wie in **Fig.** 2 gezeigt, schneidet. Die gaußsche Einschnürung beleuchtet einen Säulenbereich in der Abtastkapillare, der gleich dem Durchmesser der gaußschen Einschnürung mal der Tiefe der Weite der Säule ist. Wenn der beleuchtete Säulenbereich durch die Kapillare hindurchtritt, regt er Fluoreszenzstoff auf seinem Weg an. Die Fluoreszenz vom Säulenbereich kann durch einen Lichtdetektor erfasst werden, um ein Fluoreszenzsignal zu erzeugen, das periodisch durch einen digitalen Abtaster in eine Reihe von digitalen Datenabtastwerten abgetastet wird.

[0057] Jeder digitale Datenabtastwert entspricht der Menge an Fluoreszenz, die von der beleuchteten Säule emittiert wird, zum Zeitpunkt der Abtastung. Die Fläche, die die Stelle der beleuchteten Säule zum Zeitpunkt der Abtastung darstellt, wird Pixelbereich genannt. Jeder Pixelbereich ist eine Momentaufnahme der beleuchteten Säule entsprechend jedem digitalen Datenabtastwert. Die Geschwindigkeit der Abtastung wird mit der Geschwindigkeit koordiniert, mit der sich der Laser über die Probe bewegt, so dass der von jedem Datenpunkt dargestellte Pixelbereich mit Pixelbereichen entsprechend vorherigen und nachfolgenden Datenpunkten überlappt.

[0058] Wenn eine Zielzelle innerhalb eines Pixelbereichs aufgefunden wird, reflektiert der entsprechende Datenpunkt einen erhöhten Fluoreszenzmesswert. Die erhöhten Fluoreszenzmesswerte können mathematisch als Spitzen erfasst werden. Die Spitzen können gezählt werden, um die Anzahl von Zielzellen in der Kapillare mit festem Volumen zu ermitteln. Folglich muss die Probe präpariert werden, um die genaue Erfassung von Zielteilchen innerhalb eines biologischen Fluids zu erleichtern.

[0059] Das Verfahren der vorliegenden Erfindung zum Präparieren und Präsentieren einer Probe kann mit Bezug auf die Präparation einer ganzen Blutprobe zum Zählen von Unterklassen von weißen Blutkörperchen, die spezielle Oberflächenantigene exprimieren, dargestellt werden. Die spezielle Klasse von Blutkörperchen, die das Ziel der Zellenzählung ist, wird als Zielzelle bezeichnet und das spezielle Oberflächenantigen, das die Zielzelle, identifiziert, wird als Zielantigen bezeichnet.

[0060] Das Verfahren eines bevorzugten Ausführungsbeispiels beginnt mit dem Schritt der Auswahl eines Fluoreszenzmarkers durch wählen einer Fluoreszenzverbindung wie z. B. eines Farbstoffs oder eines anderen Fluorophors, welche an einen monoklonalen Antikörper oder einen ähnlichen Liganden konjugiert werden kann und welche eine Anregungswellenlänge und eine Emissionswellenlänge aufweist, die eine optische Störung wie z. B. Lichtabsorption, Selbstfluoreszenz und Streuung von den roten Blutkörperchen in der Probe minimiert. Der Vorteil der Wahl eines solchen Farbstoffs ermöglicht, dass die Probe präpariert wird, ohne die roten Blutkörperchen lysieren zu müssen, was wiederum eine genauere Volumenzählung von Teilchen ermöglicht.

[0061] Ein weiterer Schritt eines bevorzugten Ausführungsbeispiels besteht darin, die Menge an in dem Test verwendetem Fluoreszenzmarker sorgfältig zu wählen. Da der Zweck des Tests darin besteht, das Volumen des ganzen Bluts während der gesamten Schritte der Präparation einer Probe zu bewahren und das ganze Blut so wenig wie möglich zu behandeln, können die überschüssigen ungebundenen Marker nicht aus den Zellen gewaschen werden. Folglich muss die Menge an ausgewähltem Fluoreszenzmarker groß genug sein, dass die Fluoreszenzmarker an Zielzellen in ausreichenden Mengen binden können, die die Zellen erfassbar machen. Andererseits muss die Konzentration niedrig genug sein, dass die Fluoreszenz und das Signal, die durch die ungebundene Fluoreszenzverbindung verursacht werden, das Fluoreszenzsignal von der Zelle nicht übertönen. Die Konzentration der Fluoreszenzverbindung in der Lösung, multipliziert mit der Volumenverdrängung der Zelle, muss signifikant niedriger sein als die Anzahl von an die Zelle gebundenen Fluoreszenzmarkern.

[0062] Die vorbestimmte Menge an Fluoreszenzmarker, der einen Fluoreszenzfarbstoff, der an monoklonale Antikörper konjugiert ist, umfasst, kann mit einem Volumen von ganzem Blut vermischt werden. In einem bevorzugten Ausführungsbeispiel können die Fluoreszenzmarker in einem festen Volumen von Flüssigkeit zu einem bekannten Volumen von Blut zugegeben werden, um die Fähigkeit zu bewahren, eine Volumenbestimmung von Zielzellen im Blut durchzuführen. Eine alternative Weise zum Zugeben der Fluoreszenzmarker zum Blut beinhaltet das Verdampfen der Fluoreszenzmarker zu einer Schicht in einem Mischgefäß, bevor das ganze Blut zugegeben wird. Die Verwendung eines getrockneten Fluoreszenzmarkers ermöglicht, dass das Blut im Wesentlichen dasselbe Volumen beibehält, wenn es mit den Fluoreszenzmarkern vermischt wird. Wenn die Fluoreszenzmarker mit Blut in einer getrockneten Form kombiniert werden, ist es erwünscht, eine gleiche Menge an Zucker zur flüssigen Lösung von Fluoreszenzmarkern vor der Verdampfung zuzugeben. Wenn sie verdampft sind, bilden der Farbstoff-Antikörper-Komplex und der Zucker eine Matrix, die sich

durch Blutplasma leichter auflösen lässt.

[0063] Nachdem die Probe mit dem Fluoreszenzmarker kombiniert ist, muss sie für einen Zeitraum vor dem Abtasten der Abtastkapillare durch das Abbildungsinstrument inkubiert werden. Die Inkubation geschieht in einem Ausführungsbeispiel der Erfindung, bevor die Probe in die. Abtastkapillare gegeben wird, kann jedoch alternativ insgesamt oder teilweise stattfinden, während sich die Probe in der Abtastkapillare befindet. Wenn die Blutprobe in eine Kapillare abgezogen wird, werden die Blutkörperchen gleichmäßig über die gesamte Länge der Kapillare gezogen, wobei eine Verdampfung oder ein Meniskuseffekt während des -Füllens auftreten kann. Das vordere Ende ist das Ende der Kapillare, in dessen Richtung die Probe gezogen wird. Ein Verfahren des bevorzugten Ausführungsbeispiels kompensiert diese Veränderung durch Abtasten der gesamten Länge dieser Säule, abgesehen vom vorderen Ende der Abtastkapillare. Es kann auch eine gewisse ungleichmäßige Verteilung der Zellen entlang der Kanten der Kapillare vorliegen.

[0064] Die Quantifizierung von Zellenteilmengen kann in verschiedenen Weisen durchgeführt werden. Eine Weise besteht darin, eine Kammer mit bekanntem Volumen oder bekannter Querschnittsfläche zu verwenden und Blut einzuführen, das gefärbt, aber nicht signifikant verdünnt wurde. Die gesamte oder ein Teil der Kammer kann dann abgefragt werden. Die Anzahl von gezählten Fluoreszenzereignissen kann, durch das Volumen der abgefragten Kammer dividiert werden, um die Ereignisse pro Einheitsvolumen von Blut zu erlangen. Wenn eine quantitative Verdünnung an dem Blut durchgeführt wird und eine Kammer mit bekanntem Volumen verwendet wird, dann werden die Ereignisse pro Einheitsvolumen durch den Verdünnungsfaktor dividiert, um die Ereignisse pro Einheitsvolumen von Blut abzuleiten. Wenn das Volumen der Kammer oder die Länge der Abtastung nicht bekannt ist, dann können indirekte Verfahren wie z. B. Zugeben einer bekannten Anzahl von Mikroteilchen, wie z. B. Kügelchen, zur Probe oder Quantifizieren des Pegels der Hintergrundfluoreszenz verwendet werden, um das abgetastete Volumen zu ermitteln. Diese Verfahren sind weniger erwünscht, können jedoch wirksam durchgeführt werden, wenn bei diesem Testverfahren Sorgfalt angewendet wird. Wenn nur das Verhältnis von zwei oder mehreren Zellenereignissen und nicht der absolute Zählwert erforderlich ist, dann kann das Quantifizieren der Verdünnung oder die Kenntnis des genauen Volumens der Abtastkapillare nicht wichtig sein. In diesem Fall bestehen die Vorteile dieses Tests hauptsächlich darin, die Probenbehandlung und die potentielle Verunreinigung zu verringern, den Bedarf für das Lysieren zu beseitigen und die Erfassung durch Glätten der Hämatokritschicht zu verbessern. Andere Schemen zum Erhalten einer Zellenereignisinfoxmation unter Verwendung dieses Tests durch Fachleute sollen nur Beispiele für verschiedene Verfahren sein.

[0065] Der Test der vorliegenden Erfindung umfasst auch die Zugabe eines Reagens oder anderen Additivs, um die Aggregation von roten Blutkörperchen zu verhindern und eine glatte Hämatokritschicht über den Boden der Abtastkapillare zu erzeugen. Eine Art Reagens ist ein Verdünnungsmittel, wie z. B. eine isotonische Salzlösung, die zum Überwinden der Haftkraft dient, die zur Zellenaggregation beiträgt. Andere Behandlungen wegen der Zellenaggregation beinhalten das Verändern des pH-Werts von physiologischen Bedingungen, das Zugeben einer hypotonischen Lösung, das Zugeben eines Waschmittels, das die Form der Zelle verändert oder die Oberflächenchemie der Zelle verändert. Der Zweck des Schritts der Zugabe eines Reagens besteht darin, eine gleichmäßige Hämatokritschicht über die gesamte Kapillare zu erzeugen.

[0066] Der Bedarf für eine gleichmäßige Hämatokritschicht in der Probe entsteht aus der Beziehung zwischen der Hämatokritschicht und dem Hintergrundrauschen. Um diese Beziehung genauer zu verstehen, nehme man bitte auf **Fig.** 3 Bezug, die fünf Pixel oder Abtastsäulen mit einem festen Durchmesser und einer festen Tiefe darstellt. Jedes Pixel enthält gewisses Plasma mit ungebundenen Fluoreszenzmarkern. Jeder dargestellte Pixelbereich enthält verschiedene Mengen an markierten (Ziel-) und unmarkierten Zellen. Jede Abtastsäule erzeugt verschiedene Pegel an Fluoreszenzintensität.

[0067] Pixel A von **Fig.** 3 enthält kein Zellenmaterial, sondern enthält nur Plasma **82** mit einer festen Menge an gelösten Fluoreszenzmarkern **84**. Die gemessene Fluoreszenzreaktion von dem Licht ist durch den Balken **90** im obigen Balkendiagramm dargestellt. Pixel B enthält unmarkierte Zellen **86**, die die Hälfte des Plasmas im Pixel verdrängen. Wenn sie durch die Laserlichtquelle angeregt werden, ist die Fluoreszenzreaktion vom Pixel B ungefähr eine Hälfte der Fluoreszenzreaktion vom Pixel A. Die entsprechende Reaktion vom Pixel B ist durch den Balken **92** im Balkendiagramm unterhalb des Pixels B dargestellt. Ein Vergleich von Pixel A und Pixel B zeigt, dass die Verdrängung von Plasma, das Fluoreszenzmarker enthält, durch rote Blutkörperchen eine verhältnismäßige Verringerung in der Menge an Fluoreszenz beinhaltet.

[0068] Pixel C stellt eine Säule dar, die mit roten Blutkörperchen **86** gepackt ist, so dass im Wesentlichen alle der roten Blutkörperchen die ungebundenen Fluoreszenzmarker **84**, die im Plasma **82** gelöst sind, verdrängen. Folglich wird im Pixel C nur eine kleine Menge an Fluoreszenzemission erfasst. Eine entsprechende Fluoreszenzreaktion ist durch den entsprechenden Balken **94** im Balkendiagramm unterhalb Pixel C dargestellt. Somit stellt das Prinzip der Verdrängung die Wirkung auf eine Hintergrundfluoreszenz aufgrund von ungleichmäßigen Pegeln an Hämatokrit dar. Die Hintergrundfluoreszenz nimmt zu, wenn weniger unmarkierte Zellen in dem Pixel vorliegen, und nimmt ab, wenn mehr urmarkierte Zel-

len in dem Pixel vorliegen.

[0069] Pixel D enthält urmarkierte Zellen **86**, die etwa eine Hälfte des Plasmas **82** verdrängen. Ferner enthält das Pixel eine Zielzelle **88**, die mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern markiert ist. Das Ausmaß an Fluoreszenzreaktion, die durch die ungebundenen Fluoreszenzmarker verursacht wird, ist durch den unteren Teil **96** des entsprechenden Balkens **100** im Balkendiagramm unterhalb Pixel D dargestellt. Der untere Teil **96**, der der Hintergrundfluoreszenzreaktion von den ungebundenen Antikörpern entspricht, ist etwa gleich dem Balken **92**, der die Hintergrundfluoreszenz von im Wesentlichen derselben Menge an ungebundenen Antikörpern im Pixel B darstellt. Der Teil der Fluoreszenzreaktion, die durch die mit Fluoreszenzmarkern markierte Zielzelle verursacht wird, ist durch den oberen Teil **98** des entsprechenden Balkens **100** dargestellt. Wie gezeigt, und was für einen Lymphozyten, der das CD4-Antigen exprimiert, typisch wäre, ist die Hintergrundfluoreszenz etwa dieselbe wie jene für die Zielzelle. Die Gesamtfluoreszenz, die sich aus der Zelle und den ungebundenen Antikörpern ergibt, ist additiv.

[0070] Pixel E enthält gepackte Zellen **86** ähnlich dem Pixel C. Das Pixel E enthält jedoch eine Zielzelle **88**, die mit Fluoreszenzmarkern markiert ist und sich an der Unterseite des Pixels befindet. Die Menge an Fluoreszenzmarkern, die an die Zielzelle gebunden sind, ist gleich der Menge an Fluoreszenzmarkern, die an die im Pixel D enthaltene Zielzelle gebunden sind. Die Fluoreszenzreaktion von den ungebundenen Markern ist durch den unteren Teil **102** des Balkens **106** dargestellt. Die Größe des unteren Teils **102** des Balkens **106** ist ähnlich der Größe des Balkens **94**, der dem Pixel D entspricht. Die Fluoreszenzreaktion von der Zielzelle ist durch den oberen Teil **104** des Balkens **106** dargestellt und ist etwas kleiner als der obere Teil **98** des Balkens **100**, der die Fluoreszenzreaktion von der Zielzelle im Pixel D darstellt, aufgrund einer gewissen Streuung und Absorption durch die zusätzlichen ungebundenen Zellen **86**.

[0071] Wie in **Fig.** 3 gezeigt, ist die Fluoreszenzreaktion, die von einem speziellen Pixelbereich verursacht wird, für die Menge an Fluoreszenzmarker, die im Pixelbereich enthalten ist, additiv. Diese Prinzip basiert auf der Annahme, dass das gesamte Pixel oder die Abtastsäule mit Licht angeregt wird. Die gesamte gemessene Fluoreszenzreaktion kann aufgrund von Absorption oder Beugung der angeregten Fluoreszenzmarker durch die roten Blutkörperchen in dem Pixel etwas vermindert werden. Die obige Erläuterung lehrt die Bedeutung einer gleichmäßigen Verteilung von Hämatokrit zum Erhalten einer gleichmäßigen Grundlinie. Typischerweise verdrängt die Hämatokritschicht fünfzig Prozent des Volumens des ganzen Bluts. Daher weist eine Schwankung der Verteilung von Hämatokrit entlang der Länge der Kapillare um fünfzig Prozent eine entsprechende Änderung der Schwankung der Hintergrundfluoreszenz von Pixel zu Pixel auf. Wenn sich die Hintergrundfluoreszenz wesentlich ändert, können kleine Spitzen von Zielzellen mit niedriger Antigendichte nicht-nachweisbar gemacht werden.

[0072] Es wird auf **Fig.** 4A, eine graphische Darstellung der digitalen Datenwerte in einer einzelnen Abtastlinie, die gemäß dem Verfahren des nachstehenden Beispiels 1 präpariert ist, Bezug genommen. Eine Abtastlinie ist durch die Datenpunkte dargestellt, die als beleuchtete Säule erzeugt wird, die eine Durchquerung der Breite der Abtastkapillare durchführt. Die Grundlinie **110** wird durch eine Probe erzeugt, die eine gleichmäßige Hämatokritschicht aufweist. Eine Spitze **108** erscheint, die eine Höhe über der Grundlinie gleich ungefähr einer Hälfte des Hintergrundsignals aufweist. Eine solche Signalhöhe ist für eine Spitze, die aus bestimmten Lymphozyten wie z. B. einer sogenannten B-Zelle erfasst wird, typisch. Die Höhe der Spitze über dem Hintergrund ist nur ein Bruchteil der Intensität des Hintergrunds, da die Spitzenhöhe mehr als fünfmal die maximale Schwankung der Grundlinie **110** ist. Die maximale Schwankung ist als höchster Wert entlang einer Abtastlinie, der nicht als Spitze erkannt wird, minus dem niedrigsten Wert der Grundlinie definiert.

[0073] **Fig.** 4B stellt die Datenpunkte entsprechend Pixeln entlang einer Abtastlinie dar. Die Probe wird gemäß den in Beispiel 2 hierin umrissenen Schritten präpariert. Es wurde kein Schritt unternommen, um die Zellenaggregation zu beseitigen: Folglich ist die Abtastlinie ungleichmäßig. Theoretisch wäre jede Spitze, die in der Größe zur Spitze **108** ähnlich ist, von der Grundlinie ununterscheidbar. Der Datenpunkt **112** auf der Abtastlinie **113** in **Fig.** 4B weist beispielsweise ungefähr dieselbe Größe auf wie die Spitze **108**. Somit wäre es schwierig, wenn nicht unmöglich, für ein Abbildungsinstrument, festzustellen, ob der Datenpunkt ein Spitzenwert von einer Zielkomponente oder eine Schwankung in der Hintergrundfluoreszenz ist.

[0074] Ein ungleichmäßiges Hintergrundsignal ist besonders lästig, wenn eine Zellenaggregation auftritt. Die Zellenaggregation ist eine physikalische Eigenschaft von Blutkörperchen und verursacht eine ungleichmäßige Verteilung der Blutkörperchen über die gesamte Hämatokritschicht. Die roten Blutkörperchen weisen äußere Membranen oder Oberflächen auf, die aus Oberflächenmolekülen bestehen, die gewöhnlich an anderen Oberflächenmolekülen an anderen roten Blutkörperchen haften. Die Tendenz der Zellen zu aggregieren wird durch die bikonkave Form der Scheibe erleichtert. **Fig.** 5 stellt die Beziehung zwischen der Form eines roten Blutkörperchens und der Zellenaggregation oder dem Rouleaux-Effekt dar. Rote Blutkörperchen weisen die Form von bikonkaven Scheiben auf. Wenn die roten Blutkörperchen in einer Weise Ende an Ende ähnlich einem Reifenstapel orientiert sind, tritt ein relativ großes Ausmaß an Zeilenoberflächenkontakt zwischen den Zellen auf. Die Kombination der Haftanziehungskraft zwischen den roten Blutkörperchen und der einzigartigen bi-

konkaven Form ist das, was den Rouleaux-Effekt verursacht. Die Stapelung von roten Blutkörperchen Ende an Ende ist durch die Reihe **150** von roten Blutkörperchen dargestellt. Die Zellenstapelung tritt nicht ausschließlich in einer Weise Ende an Ende auf. Manchmal klebt der konkave Teil der Scheibe am Umfang von einer oder mehreren benachbarten Zellen, die zusammengestapelt sind. Die Zelle **152** ist an den Zellen **153**, **154** und **155** befestigt.

[0075] Die verschiedenen Weisen, in denen sich rote Blutkörperchen gemäß dem Rouleaux-Effekt orientieren, erzeugen eine Bahn von gehäuften Zellen durch eine gesamte statische Blutprobe. Eine statische Bedingung der Probe begünstigt die Zellenaggregation. Die kinetische Energie von in Bewegung befindlichen Zellen reicht häufig aus, um die Haftkräfte, die den Rouleaux-Effekt verursachen, relativ leicht zu überwinden. Folglich ist der Rouleaux-Effekt bei rheologischen Verfahren der Zellanalyse wie z. B. der Durchflusszytometrie keine Erwägung, ist jedoch bei einem morphologischen Verfahren, das für die vorliegende Erfindung charakteristisch ist, eine signifikante Erwägung. Der Rouleaux-Effekt ist nicht derselbe wie die Blutkoagulation oder -gerinnung. Die Bindungskraft wird nicht durch kovalente Bindung von Zellenstoff verursacht und ist durch Probenmischen reversibel.

[0076] Der Rouleaux-Effekt vereitelt das Ziel einer im Wesentlichen konstanten Hintergrundfluoreszenz, was sich wiederum nachteilig auf die Fähigkeit des Abbildungsinstruments, Zellen zu erfassen, auswirkt. Die Zellen sind erfassbar, da die Konzentration von Fluoreszenzmarkern, die an die Zelle gebunden sind, eine erhöhte Fluoreszenzemission gegenüber der Grundlinie verursacht. Rote Blutkörperchen verdrängen die Menge an Fluoreszenzstoff in der Kapillare. Wenn die Verdrängung ungleichmäßig ist und von Pixel zu Pixel stark schwankt, ergibt sich eine unregelmäßige und ungleichmäßige Grundlinie. Das Präsentieren einer Probe in einer Weise, in der die Hämatokritschicht gleichmäßig. über die gesamte Probe verteilt ist, minimiert im Gegenteil die Schwankungen in der Grundlinie. Folglich sind mehr Spitzen erfassbar.

[0077] **Fig.** 6B zeigt eine graphische Darstellung der Fluoreszenzreaktion von einer Abtastlinie, die über eine Abtastkapillare **10** abtastet, die ungleichmäßig verteilte Zellen **118** enthält. **Fig.** 6A zeigt eine entsprechende Probe, bei der die Anzahl von roten Blutkörperchen aufgrund des Rouleaux-Effekts nicht gleichmäßig verteilt sind. Die Probe ist entlang der Abtastlinie unterteilt, um darzustellen, was das Muster in der Kurve in **Fig.** 6A verursacht. Die Abtastsäule erfasst drei markierte Zellen **120**, **122** und **124** entlang der Abtastlinie **131**. Wenn der Laserstrahl über die Probe abtastet, fällt das Hintergrundsignal ab, wenn der Laserstrahl auf eine Reihe oder einen Klumpen von roten Blutkörperchen trifft. Dies wird hauptsächlich durch die Tatsache verursacht, dass der Klumpen von gehäuften Zellen eine große Menge an Plasma verdrängt. Folglich sind weniger ungebundene Fluoreszenzmarker in diesem speziellen Pixel vorhanden.

[0078] Andere Stellen entlang der Abtastlinie **131** weisen weniger rote Blutkörperchen auf. An solchen Stellen wird weniger Plasma verdrängt, was bewirkt, dass eine größere Anzahl von Antikörpern innerhalb der Zelle enthalten ist, und ein höheres Hintergrundsignal bewirkt. Da der Rouleaux-Effekt ein Muster von gehäuften Zellen, gefolgt von Bereichen ohne Zellen verursacht, ist das Grundliniensignal einer Probe mit dem Rouleaux-Effekt unregelmäßig oder rauschbehaftet. Wenn mit einer konzentrierten Menge an Fluoreszenzmarkern markierte Zellen in einer Probe vorhanden sind, sind sie häufig im Hintergrundrauschen verborgen. Die Zelle **120** liegt beispielsweise in einem Bereich, in dem keine roten Blutkörperchen vorhanden sind. Folglich wird die Zellenspitze **126** durch die relativ hohe Anzahl an Fluoreszenzmarkern in Lösung erhöht. Eine Zielzelle **122**, die innerhalb eines Klumpens von gehäuften Zellen gefunden wird, erzeugt eine Spitze **128** mit gleicher Höhe. Da die Zelle **122** von gepackten Zellen umgeben ist, ist die Spitze schwierig zu erfassen. Wenn sich eine Zelle **124** zwischen einem Bereich von gehäuften Zellen und einem Bereich ohne Zellen befindet, ist die entsprechende Spitze **130** ebenso äußerst schwierig zu erfassen.

[0079] Der Rouleaux-Effekt kann durch Verändern der Hafteigenschaft der Oberflächenmoleküle oder durch Verändern der scheibenartigen Form der roten Blutkörperchen behandelt werden. Eine Weise zum Verringern der Haftkräfte zwischen jeweiligen Oberflächen der roten Blutkörperchen besteht darin, ein Verdünnungsmittel wie z. B. eine isotonische Salzlösung zuzugeben. Es wird angenommen, dass die Zusammensetzung des Blutplasmas zu den Haftkräften zwischen den Molekülen beiträgt. Durch Schwächen des Blutplasmas mit einem Verdünnungsmittel werden die Hafteigenschaften der Zellen verringert und eine gleichmäßigere Hämatokritschicht wird erhalten. In einem bevorzugten Ausführungsbeispiel werden einhundert Mikroliter Blut mit einhundertfünfundsiebzig Mikroliter Blut verdünnt und als den Rouleaux-Effekts wirksam verringernd befunden. Es wurde gezeigt, dass ein Verdünnungsverhältnis von 1 : 1 von ganzem Blut zu Plasma wirksam ist. Es wurde gezeigt, dass ein Verdünnungsverhältnis von 4 : 1 von ganzem Blut zu Verdünnungsmittel die Wirkung der Beseitigung der Zellenaggregation hat.

[0080] Der Rouleaux-Effekt ist zumindest teilweise das Ergebnis der scheibenartigen Form der Zellen. Folglich dient ein beliebiges Reagens oder Additiv, wie z. B. ein Waschmittel, das die Form der Zelle verändert, zum Beseitigen des Rouleaux-Effekts. Ein mögliches Verfahren besteht darin, eine Pufferlösung zuzugeben, die den pH-Wert gegenüber den physiologischen Bedingungen in einer Richtung ändert. Eine kleine Änderung des pH-Werts verändert wirksam die Form der Zelle, ohne eine signifikante Lysierung der roten Blutkörperchen zu verursachen. Wenn

die Lösung jedoch für einen verlängerten Zeitraum inkubiert wird, platzen die Zellen schließlich. Eine ideale Weise zum Ändern des pHwerts der Lösung besteht darin, eine milde Lösung von HCl oder NaOH zuzugeben. Eine mild hypotonische Lösung hat auch die Wirkung, die Form von roten Blutkörperchen durch Ändern des osmotischen Drucks der roten Blutkörperchen in Lösung zu ändern. Wie Pufferbehandlungen für den Rouleaux-Effekt bewirkt die Verwendung von hypotonischen Lösungen schließlich eine gewisse Lysierung der roten Blutkörperchen.

[0081] Einige Waschmittel wurden entdeckt, die den Rouleaux-Effekt wirksam verhindern. Die Verwendung von Waschmitteln weist Vorteile gegenüber der Verwendung von hypotonischen Lösungen, isotonischen Verdünnungsmitteln und gepufferten Lösungen auf. Waschmittel können verdampft werden, um einen Feststoff zu bilden, und mit der Probe vermischt werden. Getrocknete Additive verdünnen das ganze Blut nicht und verbessern die Volumenzählung von roten Blutkörperchen. Ein beliebiges Waschmitteladditiv, das die Haftwirkung verringert, die von der Iteration von Oberflächenmolekülen von roten Blutkörperchen verursacht wird, oder die Form der roten Blutkörperchen verändert, ist annehmbar, wenn die Verbindung 1) die Antikörper/Antigen-Reaktion an weißen Blutkörperchen nicht verändert, 2) kein signifikantes Ausmaß an Lysierung von roten Blutkörperchen verursacht, 3) nicht selbstfluoresziert und 4) in eine trockene Form verdampft werden kann.

[0082] Zwitterionische Waschmittel und insbesondere kurzkettige zwitterionische Waschmittel sind beim Behandeln des Rouleaux-Effekts wirksam. Als Beispiel wurde n-Octyl-N,N-dimethyl-3-amino-1-propansulfonat, das unter der Handelsmarke "ZWITTERGENT 3–08" von CALIBIOCHEM, Inc., Kalifornien, vermarktet wird, als wirksam beim Behandeln des Rouleaux-Effekts befunden und hatte eine minimale Wirkung des Lysierens von roten Blutkörperchen. Andere längerkettige zwitterionische Alkylverbindungen behandelten den Rouleaux-Effekt wirksam, verursachten jedoch gewöhnlich mehr Lysierung der roten Blutkörperchen. Langkettige zwitterionische Verbindungen umfassen n-Decyl-N,N-dimethyl-3-amonio-1-propansulfonat, das unter der Handelsmarke "ZWITTERGENT 3–10" vermarktet wird; n-Dodecyl-N,N-dimethyl-3-amonio-1-propansulfonat, das unter der Handelsmarke "ZWITTERGENT 3–12" vermarktet wird; und n-Tetradecyl-N,Ndimethyl-3-amonio-1-propansulfonat, das unter der Handelsmarke "ZWITTERGENT 3–14" vermarktet wird.

[0083] Die "Zwittergent"-Verbindungen können zu den Fluoreszenzmarkern vor der Verdampfung zugegeben werden. Sie können in fester Form zugegeben werden, bevor oder nachdem die Fluoreszenzmarker mit ganzem Blut vermischt werden, in Abhängigkeit von dem Zweck und den Anforderungen des Probenpräparationsverfahrens. Ausreichend Waschmittel sollte zu dem ganzen Blut zugegeben werden, um eine zehn bis einhundert millimolare Lösung von Waschmittel in ganzem Blut herzustellen. Ein bevorzugtes Ausführungsbeispiel fügt ausreichend Waschmittel hinzu, um eine dreißig millimolare Lösung von Waschmittel in ganzem Blut herzustellen. Andere übliche Waschmittel können verwendet werden. Als Beispiel umfassen einige Waschmittel, die als annehmbar befunden wurden, Polysorbat 20; Polyoxyethylen(20)sorbitanmonolaurat, das unter der Handelsmarke "TWEEN" von Pierce Chemical, Rockford, Illinois, erworben werden kann. Ein nicht-ionisches Waschmittel, das als wirksam bei der Behandlung des Rouleaux-Effekts befunden wird, ist Polyethylenglycol-pisooctylphenylether; Octylphenoxypolyethoxyethanol, das unter der Handelsmarke "TRITON X-100" von Pierce, Chemical, Rockford, Illinois, erworben werden kann.

[0084] Das Ziel der Volumenzählung von Blut wird wesentlich erweitert, wenn Verarbeitungsschritte, die das Verhältnis von Teilchenmaterial zu Volumen zerstören, aus dem Probenpräparationsverfahren beseitigt werden. Wenn eine Probe beispielsweise zentrifugiert wird, um Teilchenmaterial von Flüssigkeit zu trennen, kann das Verfahren nicht immer sicherstellen, dass das Teilchenmaterial, das von der Flüssigkeit abgetrennt wird, die gesamte Menge an Teilchenmaterial darstellt, das in dem ursprünglichen Volumen vorhanden war. Folglich ist die Volumenanalyse schwierig, wenn Trennschritte oder eine unnötige Behandlung der Probe erforderlich ist.

[0085] Eines der schwierigsten Probleme beim Bewahren eines festen Volumens in Tests, die fluoreszenzmarkierte Teilchen analysieren, ist die optische Störung, die durch die roten Blutkörperchen in Form einer Signalabsorption, Signalstreuung oder -beugung und Selbstfluoreszenz verursacht wird. **Fig.** 7 ist eine Darstellung von Licht, das ein rotes Blutkörperchen **142** schneidet. Obwohl das meiste der Lichtwellen **140** durch das rote Blutkörperchen hindurchtritt, werden Wellen **144** absorbiert und Wellen **146** werden gestreut. Die Welle **148** stellt Licht dar, das durch die Selbstfluoreszenz des roten Blutkörperchens erzeugt wird.

[0086] Rote Blutkörperchen absorbieren eine signifikante Menge an Licht, wenn sie weißem Licht ausgesetzt werden. **Fig.** 8 stellt die Menge an von roten Blutkörperchen absorbiertem Licht bei verschiedenen Wellenlängen dar. Die vertikale Achse stellt die Intensität der Absorption dar. Die horizontale Achse stellt die verschiedenen Wellenlängen von Licht dar. Wie die Kurve angibt, wird das meiste Licht zwischen den Wellenlängen von zweihundert und fünfhundert Nanometern durch die roten Blutkörperchen absorbiert. Für den Zweck des Abtastens einer Probe von ganzem Blut ohne Entfernen der roten Blutkörperchen sollte Laserlicht mit einer Wellenlänge oberhalb fünfhundertfünfzig Nanometern verwendet werden. Somit ist Anregungslicht mit einer Wellenlänge über fünfhundertfünfzig Nanometern, das den roten Helium-Neon-(HeNe) Laser mit sechshundertdreiunddreiflig Nanometern beinhaltet, eine bevorzugte

Lichtquelle. Diodenlaser wären ebenso annehmbar, insbesondere jene, die Licht mit einer Wellenlänge von ungefähr siebenhundert Nanometern (nm) emittieren.

[0087] Rote Blutkörperchen erzeugen auch Selbstfluoreszenz. **Fig.** 9 ist eine graphische Darstellung der Selbstfluoreszenz von roten Blutkörperchen bei verschiedenen Anregungswellenlängen. Die Selbstfluoreszenz liegt auf einer Spitze bei Wellenlängen von 310 nm, 500 nm und 630 nm. Das Ausmaß an Selbstfluoreszenz oberhalb 500 nm im Vergleich zur Intensität der Hintergrundfluoreszenz und der Fluoreszenz von einer markierten Zielkomponente ist jedoch klein genug, dass sie keine signifikante Barriere für die Erfassung von Zielkomponenten durch das Abbildungsinstrument ist.

[0088] Eine weitere Art von optischer Störung ist die Beugung oder Streuung. Wenn Licht auf ein Objekt auftrifft, wird vielmehr eine gewisse Menge an Licht an der Oberfläche der Zelle gebeugt als es durch die Zelle durchtritt. Folglich schwächen rote Blutkörperchen die Intensität der Laserlichtquelle oder die Fluoreszenzentladung von den Fluoreszenzmarkern. Im Gegensatz zur Absorption und Selbstfluoreszenz ist die Beugung nicht signifikant von der Wellenlänge des Lichts, das gebeugt wird, abhängig.

[0089] Entsprechend Versuchen zum Minimieren der Menge an optischer Störung in einem Test können Fluoreszenzfarbstoffe ausgewählt werden, um durch eine Lichtquelle mit einer Wellenlänge oberhalb 550 Nanometern aktiviert zu werden. Ein roter HeNe-Laser erzeugt eine Spitzenwellenlänge von etwa 633 Nanometern und es wurde festgestellt, dass er eine ganze Blutprobe ohne schwächende Niveaus an optischer Störung wirksam anregt. Ebenso müssen Farbstoffe ausgewählt werden, um von rotem HeNe-Licht aktiviert zu werden, und erzeugen Spitzenfluoreszenzwellenlängen vorzugsweise oberhalb 550 Nanometern. Es wurde festgestellt, dass Farbstoffe aus der Cyaninfamilie diese Kriterien erfüllen. "CY5" und "CY5.5" sind Farbstoffe aus der Cyaninfamilie und sind zur Verwendung mit einem roten Hehe-Laser wirksam. Sie sind beide unter diesen Markennamen von Biological Detection Systems, Inc., in Pittsburgh, Pennsylvania, erhältlich. "CY5" weist eine Spitzenemission bei einer Wellenlänge von 667 Nanometern und ein Emissionsspektrum im Bereich von etwa 630 Nanometern bis 800 Nanometern auf. "CY5.5" weist eine Spitzenemission bei einer Wellenlänge von 695 Nanometern und ein Emissionsspektrum im Bereich von etwa 650 Nanometern bis 780 Nanometern auf. Da die Mehrheit der Fluoreszenzemission von dem Farbstoff oberhalb 550 nm liegt, wird das vom Fluoreszenzkomplex emittierte Licht durch die roten Blutkörperchen nicht signifikant absorbiert.

[0090] Die Wahl einer Laserlichtquelle und eines Farbstofftyps ist für das Gesamtziel des Erstellens eines Verfahrens zum Präparieren einer Probe zur Volumenbestimmung wichtig. Die Beseitigung der optischen Störung wie z. B. Absorption bedeutet, dass die roten Blutkörperchen nicht lysiert werden müssen. Die Beseitigung des Lysierens entfernt einen problematischen Schritt, der die Volumenzählung einer Probe behindert.

[0091] Mit Bezug auf **Fig.** 2 ist die beleuchtete Säule **56** durch den Durchmesser **58** der gaußschen Einschnürung festgelegt. Die Tiefe **60** der Säule entspricht den inneren Abmessungen der Abtastkapillare, die vorzugsweise eine Weite **62** mit einem rechteckigen Querschnitt aufweist, der entlang der Länge der Kapillare konstant ist. Die Tiefe der Abtastkapillarenweite, gemessen in einem zur Abtastebene senkrechten Winkel, legt die Säulentiefe fest.

[0092] Die bevorzugte Tiefe der Abtastkapillarenweite **62** hängt vom speziellen Test ab. Die minimale Tiefe der Kapillare entspricht der Größe der Zielzellen oder von anderem Teilchenmaterial in einer -Probe. Dies soll sicherstellen, dass der Einlass der Abtastkapillare nicht durch die Zellen in einer Probe verstopft wird. Eine solche Verstopfung tritt wahrscheinlich in einer Kapillare auf, die eine Weitentiefe mit relativ derselben Größe wie dem Durchmesser eines Blutkörperchens aufweist. Die Verstopfung der Kapillare verursacht ein ungleichmäßiges Hämatokrit, das den Zweck der Volumenanalyse vereitelt. Folglich sind Kapillaren mit einer Weitentiefe von mehr als zehn Mikrometern zur Verwendung mit ganzem Blut bevorzugt.

[0093] Die obere Grenze der Tiefe einer Abtastkapillare ist durch das verminderte Signal aufgrund der optischen Störung oder die Fähigkeit des Lasers **12**, die Probe zu durchdringen, und die Fähigkeit der Fluoreszenz, durch die Blutkörperchen durchgelassen zu werden, festgelegt. Die Experimentierung hat gezeigt, dass die ideale Tiefe der Kapillare von der Tiefe der Hämatokritschicht abhängt. Je dünner die Hämatokritschicht ist, eine desto geringere optische Störung ergibt sich durch die roten Blutkörperchen. Je dicker die Hämatokritschicht ist, desto größer ist jedoch dann das Blutvolumen, das in einer Probe abgetastet werden kann. Wenn die Probe verdünnt wird, kann die ideale Kapillarenbreite daher proportional vergrößert werden.

[0094] Versuchsdaten haben gezeigt, dass eine Hämatokritschicht von oberhalb einhundert Mikrometern für einen roten HeNe-Laser mit einer Wellenlänge von 633 Nanometern im Wesentlichen undurchdringbar ist. Eine Hämatokritschicht zwischen fünfzehn und dreißig Mikrometern kann mit wenig Schwierigkeit abgefragt werden. Ein Hämatokrit von weniger als fünfzehn Mikrometern verursacht geringste Niveaus an optischer Störung. Da die Hämatokritschicht typischerweise etwa eine Hälfte des Volumens von ganzem Blut belegt, ist eine bevorzugte Abtastkapillarentiefe fürganzes Blut etwa dreißig bis sechzig Mikrometer. Wenn eben diese Erwägungen auf Blut angewendet werden, das um einen Faktor von ungefähr 1 : 3 von Blut zu Verdünnungsmittel verdünnt ist, ist eine Abtastkapillare mit einer Tiefe von

einhundert bis zweihundert Mikrometern annehmbar.

[0095] Die ideale Tiefe der Abtastkapillare kann von der Blutprobenkonzentration des ungebundenen Farbstoffs und/oder der Fluoreszenzmarker wie z. B. Antikörper-Farbstoff-Konjugaten abhängen. Die Kapillarentiefe und die Konzentration an ungebundenen Fluoreszenzmarkern müssen ins Gleichgewicht gebracht werden, so dass die Fluoreszenz von den markierten Zielzellen gegenüber der Hintergrundfluoreszenz, die durch ungebundene Fluoreszenzmarker in der Probe verursacht wird, erfasst werden kann. Die Hintergrundfluoreszenz ist die Fluoreszenzemission von ungebundenen Fluoreszenzmarkern. Die Fluoreszenzmarker bleiben in der Lösung ungebunden und werden durch den Laserstrahl angeregt, um eine Fluoreszenzemission zu erzeugen. Die Anwesenheit einer übermäßigen Menge an ungebundenen Markern kann die Zellenzählung stören. Die Entfernung der ungebundenen Antikörper aus dem Zellenmaterial kann nur durch Trennverfahren durchgeführt werden., die eine Gravitationstrennung oder Zellenwaschen beinhalten können. Solche Trennschritte können auch Zielkomponenten entfernen und die Genauigkeit der Volumenzellenzählung verringern.

[0096] Es ist daher erwünscht, ein Zellenzählverfahren bereitzustellen, das das ursprüngliche Volumen bewahrt, indem Trennverfahren beseitigt werden, die die ungebundenen Antikörper aus den Zellen entfernen. Dadurch kann eine genauere Zählung von Zellen in einem gegebenen Volumen von ganzem Blut durchgeführt werden. Der Kompromiss besteht darin, dass ungebundene Antikörper in der Lösung bleiben müssen. Folglich ist es wichtig, eine Antikörperkonzentration zu wählen, die ermöglicht, dass die Zellen gegenüber dem Hintergrundrauschen erfassbar sind.

[0097] Die genaue Menge an Antikörper zum Erzeugen von optimalen Ergebnissen muss empirisch-praktisch ermittelt werden. In den meisten Fällen kombiniert sich eine Antikörpermasse im Bereich zwischen 0,1 und 25,0 Mikrogramm mit einem Milliliter Blut, um die Zielzellen wirksam zu markieren, ohne eine übermäßige Störung zu verursachen. In einem bevorzugten Ausführungsbeispiel sind irgendwo zwischen 0,5 und 5,0 Mikrogramm Anti-CD3-, Anti-CD4- oder Anti-CD8-Antikörper, die mit dem Farbstoff "CY5" oder "CY5.5" markiert sind, eine wirksame Menge an Fluoreszenzmarker, um eine Blutprobe von einem Milliliter zu markieren, ohne das Signal von den fluoreszenzmarkierten Zellen zu übertönen.

[0098] Die Konzentration an Fluoreszenzmarker, die ein optimales Ergebnis erzeugt, hängt hauptsächlich von zwei Faktoren ab, der Säulentiefe und der Konzentration von Markern an den Zielzellen. Je größer die Tiefe der Säule ist, desto weniger Fluoreszenzmarker sollten verwendet werden. Wenn eine Zelle eine hohe Konzentration an Fluoreszenzmarkern pro Einheit von verdrängtem Zellenvolumen aufweist, kann eine höhere Konzentration an Fluoreszenzmarkern toleriert werden.

[0099] **Fig.** 3 stellt dar, wie eine Zelle gegenüber der Hintergrundfluoreszenz erfasst wird. Das Pixel D, wie dargestellt, enthält ungefähr 50 Volumenprozent Plasma und ein weißes Zielblutkörperchen. Die Fluoreszenzreaktion vom Hintergrund im Pixel D ist dieselbe wie im Pixel B, das ungefähr 50 Volumenprozent Plasma enthält, jedoch kein weißes Zielblutkörperchen enthält. Der Unterschied der Größe der gesamten Fluoreszenzemission vom Pixel D und der gesamten Fluoreszenzemission vom Pixel B kann der Konzentration an Fluoreszenzmarkern an oder in einer Zielzelle zugeschrieben werden. Diese Konzentration kann hinsichtlich der Anzahl von Antikörpern, die an eine Zielzelle gebunden sind, dividiert durch die Verdrängung oder das Volumen der Zelle, ausgedrückt werden. Die Marker können an die Zellen in verschiedenen Weisen binden, einschließlich der Bindung von fluoreszenzmarkierten Antikörpern an Oberflächenantigene einer Zelle. Andere Fluoreszenzmarker können durch die Zellenmembran transportiert werden und sich an den Desoxyribonukleinsäure-(DNA) und Ribonukleinsäure-(RNA) Strängen sammeln.

[0100] Die Konzentration an Fluoreszenzmarkern, die an eine Zelle binden, hängt von verschiedenen Faktoren ab, einschließlich der Anzahl von Stellen, an die ein Fluoreszenzmarker binden kann. Ein CD4-positiver Helfer-T-Lymphozyt weist beispielsweise ungefähr 50000 Antigene auf seiner Oberfläche auf, an die fluoreszenzmarkierte monoklonale Anti-CD4-Antikörper möglicherweise binden können. Andererseits kann die Menge an DNA in einer Zelle potentiell in der Größenordnung von einer Milliarde Bindungsstellen für bestimmte Farbstoffmoleküle vorsehen.

[0101] Um die Anzahl von Bindungsstellen für fluoreszenzkonjugierte monoklonale Antikörper zu verstehen, muss verstanden werden, dass monoklonale Antikörper an spezifische Antigene an der Oberfläche einer Zielzelle binden, die als Zielantigene definiert werden können. Die Anzahl von Zielantigenen ist nicht dieselbe wie die Gesamtzahl von Antigenen an einer Zelle. Eine Zelle kann Hunderte von verschiedenen Arten von Antigenen an der Oberfläche aufweisen und nur die Population von Zielantigenen beeinflusst die Anzahl von fluoreszenzmarkiertem monoklonalen Antikörper an der Oberfläche einer Zelle.

[0102] Die Konzentration von fluoreszenzkonjugierten Antikörpern an der Oberfläche einer Zielzelle wird durch die Bindungsaffinität eines speziellen Antikörpers an ein Antigen beeinflusst. Die Bindungsaffinität eines Antikörpers ist eine Eigenschaft, die für jedes Antikörper-Antigen-Paar spezifisch ist. Dies gilt insbesondere für monoklonale Antikörper, die für die Antigene, an die sie binden, selektiv sind. Die Affinität ist eine Funktion des chemischen Aufbaus und der Struktur der jeweiligen Bindungsstellen an dem Antikörper und dem Antigen.

[0103] Die Affinität kann hinsichtlich der Bindungskinetik dargestellt werden. **Fig.** 10 stellt die Reaktions-

kurven für die Reaktion von zwei verschiedenen Arten von monoklonalen Antikörpern mit einer einzelnen Antigenart dar. Trotz der Tatsache, dass die Temperatur, Antikörperkonzentration, Anzahl von Antigenbindungsstellen pro Zelle gleich sind, verlaufen die zwei Reaktionen mit verschiedenen Geschwindigkeiten. Die Kurve **134** stellt die Geschwindigkeit dar, mit der eine Reaktion verläuft, wenn eine relativ niedrige Antikörper-Antigen-Affinität ($A_1$) vorliegt. Die Kurve **136** stellt die Geschwindigkeit dar, mit der eine Reaktion verläuft, wenn eine relativ hohe Antikörper-Antigen-Affinität ($A_1$) vorhanden ist. Nach einer Inkubationszeit von $t_1$ hat die Reaktion mit der Affinität $A_2$ zweimal so viele Antikörper gebunden wie die Reaktion mit der Affinität $A_1$.

[0104] **Fig.** 11 ist eine Kurve, die die Spitzenhöhe für Zellen, die mit Anti-CD4-Antikörpern markiert sind, die an einen Fluoreszenzfarbstoff konjugiert sind, nach verschiedenen Inkubationszeiten aufträgt. Die Y-Achse ist die Spitzenintensität. Die Spitzenintensität steht mit der Anzahl von an eine Zelle gebundenen Antigenen proportional in Beziehung. Jeder Punkt entlang der Kurve stellt die mittlere Höhe einer Anzahl von Spitzen, die in einem ähnlichen Zeitintervall erfasst werden, dar. Je länger die Probe inkubieren kann, desto enger nähert sich die Konzentration an fluoreszenzkonjugierten Antikörpern einem Sättigungspunkt.

[0105] Die Verlängerung der Inkubationszeit vor dem Abtasten kann die Konzentration an fluoreszenzkonjugierten Antikörpern an einer speziellen Zelle erhöhen, aber eine verlängerte Inkubation hat eine potentiell unerwünschte Nebenwirkung, das Auftreten von unspezifischem Binden. Unspezifisches Binden ist ein Phänomen, bei dem sich Antikörper an Antigene anhängen, auf die der Antikörper nicht spezifisch gerichtet ist. Antikörper sind Immunoglobulinmoleküle, die in der Lage sind, an spezifische Antigene mit Schlüssel-Schloss-Kompatibilität zu binden. Normalerweise binden bestimmte Antikörper nur an eine Art Oberflächenantigen. Dies gilt insbesondere für monoklonale Antikörper, die vorzugsweise für Tests gemäß der vorliegenden Erfindung verwendet werden. Unter bestimmten Umständen binden auch monoklonale Antikörper an Oberflächenproteine anstatt das Antigen, an das sie charakteristisch und spezifisch binden. Unspezifisches Binden ist nicht bei jedem Test ein Problem. Wenn es bei einem speziellen Test ein Faktor ist, weist das unspezifische Binden häufig weniger günstige thermodynamische und kinetische Eigenschaften auf. Folglich kann ein kürzerer Inkubationszeitraum unspezifisches Binden mildern.

[0106] Eine Erhöhung der Temperatur, bei der die Inkubation stattfindet, kann die Geschwindigkeit, mit der fluoreszenzkonjugierte Antikörper an Zielantigene an Zielzellen binden, erheblich erhöhen. Die Bindung von fluoreszenzkonjugierten Antikörpern an Antigene in einer Probe von ganzem Blut bei Körpertemperatur geschieht mit einer viel schnelleren Geschwindigkeit als es unter einer identischen Bedingung bei Raumtemperatur geschehen würde. Das Erhöhen der Temperatur einer Probe ist besonders wichtig, wenn die Proben vor der Analyse gekühlt werden.

[0107] Die Bindungskinetik wird auch durch die Konzentration von Antikörpern in der Lösung beeinflusst. Eine hohe Konzentration an Antikörpern ermöglicht, dass die Zellen einen Sättigungspunkt schneller erreichen. Niedrigere Konzentrationen von Antikörpern erfordern längere Inkubationszeiten, um denselben Sättigungspegel zu erreichen. Wenn die ideale Konzentration eines Antikörpers festgelegt wird, wird der mit der schnelleren Reaktionskinetik und mit dem höheren Sättigungspegel in kürzerer Zeit verbundene Vorteil mit dem resultierenden höheren Hintergrundrauschen, das durch eine höhere Konzentration an ungebundenen Antikörpern, die in der Probe gelöst bleiben, verursacht wird, ins Gleichgewicht gebracht.

[0108] Faktoren wie z. B. Antikörper-Antigen-Affinität und Antigenpopulation stehen nicht notwendigerweise unter der Kontrolle des geschulten Handwerkers. Solche Faktoren sehen Begrenzungen dessen vor, wie eine Probe in einer Abtastkapillare präpariert werden kann. Andere Faktoren können gemäß der vorliegenden Erfindung eingestellt werden, um die Fähigkeit eines Abtasters, eine Spitze über einer Zelle zu erfassen, zu maximieren. Die Länge der Inkubation, die Temperatur der Inkubation und die Konzentration an Antikörpern in Lösung sind Variablen, die manipuliert werden können, um das Fluoreszenzsignal von den mit Antikörpern markierten Zielzellen zu maximieren.

## BEISPIEL 1

[0109] Blut wurde in ein EDTA-Vacutainer-Röhrchen (Becton-Dickenson, San Jose, CA) von einem gesunden menschlichen Patienten gesogen. Das Blut wurde für fünf Minuten geschüttelt, dann wurde die Kappe entfernt. Einhundert Mikroliter (µl) wurden mit einer Präzisionspipette (Pipetman, Ranin Instruments, Woburn, Mass.) entnommen. Das Blut wurde dann in ein Polypropylen-Mikrozentrifugenröhrchen von 0,6 ml gegeben. Im Boden des Röhrchens waren zwei mit Farbstoff markierte Antikörper getrocknet worden. Der erste Anti-CD4 (Leu-3a, Becton-Dickenson) war mit dem Farbstoff "CY5.5" (BDS Systems, Inc.) konjugiert und der zweite war Anti-CD3 (Becton Dickenson), der mit "CY5.0" (BDS Systems, Inc.) konjugiert war. Um ihre Integrität zu bewahren, wurden die Antikörper als Teil eines 2%igen Rinderserums und einer 4%igen Saccharoselösung getrocknet. Bei Zubereitung mit den 100 µl Blut waren die Antikörper-Endkonzentrationen **1**,**0** Mikrogramm pro Milliliter (µg/ml) und 1,5 µg/ml.

[0110] Das Mikrozentrifugenröhrchen wurde für fünf Sekunden verwirbelt, um mit den Antikörpern zu vermischen, und ließ man dann 20 Minuten inkubieren.

Eine Glasmikrokapillare (Vitro Dynamics Inc., Rockaway, N. J.) mit den Abmessungen von 0,038 × 0,40 × 60,0 Millimeter (mm) wurde horizontal auf einem Kunststoffhalter angeordnet. Nach der Inkubation von 20 Minuten wurde das Blut fünf Sekunden verwirbelt. Ein Tropfen von zehn Mikrolitern wurde dann auf ein Ende der Kapillare pipettiert. Die Lösung wurde in ungefähr einer Minute in die Kapillare gezogen. Die mittleren 40 Millimeter der Kapillare wurden dann durch die Abtastvorrichtung auf HeNe-Basis, wie hierin beschrieben, abgefragt.

[0111] **Fig.** 12 ist ein zweidimensionales Streudiagramm, das aus der Abfrage der Probe erzeugt wird. Jeder Punkt im Streudiagramm stellt eine erfasste Spitze vom Abbildungsinstrument dar. Das Verhältnis der Fluoreszenzintensität auf der Y-Achse zur Fluoreszenzintensität auf der X-Achse unterscheidet Subpopulationen von Zellen. Aufgrund der ungleichmäßigen Hämatokritschicht sind die Zellen theoretisch ununterscheidbar.

BEISPIEL 2

[0112] Derselben Prozedur wie in Beispiel 1 wurde gefolgt, außer dass ein Waschmittel (Zwittergent 3–08, Calibochem, Inc.) mit den Antikörpern getrocknet wurde. Bei Rehydratisierung mit dem Blut lag es in einer Konzentration von 30 millimolar vor. Die Zugabe des zwitterionischen Waschmittels erzeugt eine gleichmäßige Hämatokritschicht.

[0113] **Fig.** 13 stellt ein Streudiagramm der gemäß dem Verfahren von Beispiel 2 präparierten Probe dar. Das Streudiagramm zeigt drei unterschiedliche Subpopulationen von Zellen. Die Population **200** sind Zellen, die CD4+/CD3+ sind. Die Population **202** sind Zellen, die nur CD3+ sind. Die Population **204** ist Hintergrundrauschen. Somit ermöglicht die Zugabe des Reagens eine angemessene Zählung der Zielkomponente.

BEISPIEL 3

[0114] Derselben in Beispiel 1 beschriebenen Prozedur wurde bis einschließlich des Inkubationsschritts gefolgt. An diesem Punkt wurden 174 Mikroliter von phosphatgepufferter Salzlösung, die zwei Prozent Rinderserum enthielt, zum inkubierten Blut zugegeben und verwirbelt. Zehn Mikroliter des verdünnten Bluts wurden dann auf das Ende einer Glasmikrokapillare von 0,10 × 0,67 × 60 Millimeter (Vitro Dynamics, Inc.) getropft und die Mikrokapillare füllte sich durch Kapillarwirkung in etwa 15 Sekunden.

[0115] **Fig.** 14 stellt ein Streudiagramm der gemäß dem Verfahren von Beispiel 3 präparierten Probe dar. Die Zugabe der gepufferten Lösung erzeugt eine gleichmäßige Hämatokritschicht. Das Streudiagramm zeigt drei unterschiedliche Subpopulationen von Zellen. Die Population **206** sind Zellen, die CD4+/CD3+ sind. Die Population **208** sind Zellen, die nur CD3+ sind. Die Population **210** ist Hintergrundrauschen. Wiederum wird die Zielkomponente durch das Abbildungsinstrument korrekt gezählt.

BEISPIEL 4

[0116] Einhundert Milliliter von antikoaguliertem Venenblut wurden mit monoklonalem CD4-Antikörper (Leu-3a, Becton-Dickenson), der mit dem Farbstoff "CY5.5" konjugiert war, mit einer Konzentration von 1,0 Mikrogramm pro Milliliter (µg/ml) inkubiert. Nach der Inkubation von 20 Minuten wurden 100 Mikroliter Blut zu vier Mikrozentrifugenröhrchen zugegeben. Diese wurden dann mit 1000 U/min für zehn Minuten geschleudert, um das Plasma von den Zellen zu trennen. Das erste Röhrchen wurde intakt belassen. Zehn Mikroliter Plasma wurden aus dem zweiten Röhrchen, 20 Mikroliter aus dem dritten Röhrchen und 30 Mikroliter aus dem vierten Röhrchen entnommen. Die Proben wurden dann fünf Sekunden verwirbelt.

[0117] Die Hämatokritkonzentration wurde für jede Probe unter Verwendung eines Statspin-3-Instruments (Statspin Technologies, Norwood, MA) gemessen. Zehn Mikroliter jeder Probe wurden dann in eine Kapillare von 0,1 × 0,67 × 80,0 Millimetern gegeben und dann wurden 40 Millimeter in der Mitte der Kapillare unter Verwendung des Abbildungsinstruments abgetastet. Da die Kapillare 100 µm dick ist, kann der Hämatokritprozentsatz direkt in eine Mikrometerdicke des Hämatokrits in der Kapillare umgewandelt werden. **Fig.** 15–18 zeigen jeweils Histogramme der Spitzenintensität als Funktion der Anzahl von Zellen für die vier Hämatokritniveaus. Die CD4-Population lässt sich bei den Hämatokritniveaus von 46 und 52 Prozent deutlich über dem Hintergrundrauschen unterscheiden, kann jedoch bei den Niveaus von 60 oder 80 Prozent nicht unterschieden werden. Somit ist es erforderlich, die Hämatokritschicht auf weniger als etwa sechzig Mikrometer zu verkleinern.

BEISPIEL 5

[0118] Blutproben von einundzwanzig Patienten wurden unter Verwendung des in Beispiel 1 beschriebenen Verfahrens auf CD4 getestet. Die Proben von denselben Patienten wurden unter Verwendung eines FACS-Abtast-Durchflusszytometers (Becton Dickenson, San Jose, CA) auf CD4 analysiert. Die Prozeduren und Reagenzien, die vom Hersteller geliefert werden, wurden verwendet, um die Durchflusszytometeranalyse durchzuführen. Die Steigung der Regressionslinie-betrug 1,051. Die "R-Quadrat"-Korrelation zwischen den zwei Verfahren war 0,994. **Fig.** 19 ist ein Diagramm, das die Regressionsanalyse darstellt.

**Patentansprüche**

1. Verfahren zum Zählen von Zielkomponenten

(**88**) in einer Probe, die Blutkörperchen enthält, mit den Schritten:
Färben der Probe (**12**) mit einer Fluoreszenzverbindung (**84**), die dazu ausgelegt ist, selektiv an die Zielkomponenten (**88**) der Probe (**12**) zu binden;
Zugeben eines Reagens zu den Blutkörperchen in der Probe (**12**), um die Blutkörperchen innerhalb der Probe gleichmäßig zu verteilen, ohne irgendwelche der Blutkörperchen von der Probe zu trennen, und um rote Blutkörperchen an einer Aggregation innerhalb der Probe zu hindern;
Anordnen der Probe (**12**) in einem Probenhalter (**10**), so dass die Blutkörperchen innerhalb des Probenhalters (**10**) eine gleichmäßige Schicht von Blutkörperchen bilden, die größer ist als ein Körperchen tief ist, wobei der Probenhalter (**10**) eine Tiefe im Bereich von zehn bis zweihundert Mikrometern aufweist;
Anregen der Fluoreszenzverbindung (**84**) mit Licht mit einer Anregungswellenlänge, die bewirkt, dass die Fluoreszenzverbindung fluoresziert; und
Erfassen und Zählen der Zielkomponenten (**88**), wobei das Reagens aus einem von einer Gruppe ausgewählt wird, die umfasst: eine isotonische Salzlösung, eine hypotonische Lösung, ein Reagens, das den pH-Wert der Probe (**12**) verändert, ein Waschmittel, eine zwitterionische Alkylverbindung, eine Verbindung mit der Formel n-Octyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propansulfonat, eine Pufferlösung, eine milde Lösung von HCl, eine milde Lösung von NaOH, ein zwitterionisches Waschmittel, eine Verbindung mit der Formel n-Decyl-N,N-dimethyl-3-amino-1-propansulfonat, eine Verbindung mit der Formel n-Dodecyl-N,N-dimethyl-3-amonio-1-propansulfonat, eine Verbindung mit der Formel n-Tetradecyl-N,N-dimethyl-3-amonio-1-propansulfonat, Polysorbat 20, Polyoxyethylen(20)sorbitanmonolaurat, Polyethylenglycol-p-isooctylphenylether oder Octylphenoxypolyethoxyethanol.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Zielkomponenten (**88**) aus einer von einer Gruppe ausgewählt werden, die eine Zellensubpopulation, ein weißes Blutkörperchen, einen Virus, ein Blutplättchen, ein Bakterium, einen Lymphozyten, ein Protozoa, einen Parasiten, ein DNA-Molekül oder ein RNA-Molekül umfasst.

3. Verfahren nach Anspruch 1, wobei der Färbeschritt das Binden der Fluoreszenzverbindung (**84**) an ein RNA-Molekül innerhalb der Zielkomponenten (**88**) umfasst.

4. Verfahren nach Anspruch 1, wobei der Färbeschritt nach dem Schritt des Zugebens eines Reagens durchgeführt wird.

5. Verfahren nach Anspruch 1, wobei der Schritt des Zugebens eines Reagens das Zugeben eines getrockneten Reagens umfasst.

6. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Licht Laserlicht mit einer Wellenlänge von mehr als fünfhundertfünfzig (**550**) Nanometern ist.

7. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Fluoreszenzverbindung (**84**) eine Emissionswellenlänge von mehr als fünfhunderzfünfzig (**550**) Nanometern aufweist.

8. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Fluoreszenzverbindung (**84**) eine Emissionswellenlänge im Bereich von 650 bis 700 Nanometern aufweist.

9. Verfahren nach Anspruch 1, wobei der. Schritt des Färbens der Probe (**12**) das Inkubieren einer Fluoreszenzverbindung mit der Probe (**12**), so dass die Fluoreszenzverbindung an Zielkomponenten (**88**) der Blutprobe bindet, umfasst.

10. Verfahren nach Anspruch 9, wobei der Schritt des Anordnens der Probe (**12**) das Anordnen eines Teils der Pröbe in der Kammer umfasst, wobei die Tiefe der Schicht von Blutkomponenten (**88**) im Bereich von fünf bis sechzig Mikrometern liegt.

11. Verfahren nach Anspruch 1, wobei der Schritt des Anordnens der Probe (**12**) das Anordnen eines Teils der Blutprobe (**12**) in einer Abtastkapillare mit einer Tiefe im Bereich von zehn bis zweihundert Mikrometern umfasst.

12. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Fluoreszenzverbindung ein Cyaninfarbstoff ist, der an einen monoklonalen Antikörper gebunden ist.

13. Verfahren nach Anspruch 1, welches ferner den Schritt des Zugebens einer bekannten Anzahl von Mikroteilchen zur Blutprobe (**12**) umfasst, um ein Volumen der Blutprobe (**12**) in der Kammer zu ermitteln.

14. Statische Probenpräparation, die in einen Abtaster einsetzbar ist, der über eine zweidimensionale Fläche abtastet und der Zielkomponenten (**88**) erfasst und zählt, wobei die statische Probenpräparation umfasst:
eine Kammer;
Körperchen, einschließlich Zielkomponenten (**88**);
ein Reagens, das die Aggregation von roten Blutkörperchen inhibiert, ohne irgendeine Blutkomponente von der gesamten Blutprobe (**12**) zu trennen, wobei das Reagens aus einem von einer Gruppe ausgewählt ist, die umfasst: eine isotonische Salzlösung, eine hypotonische Lösung, ein Reagens, das den pH-Wert der Probe (**12**) verändert, ein Waschmittel, eine zwitterionische Alkylverbindung, eine Verbindung mit der Formel n-Octyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propansulfonat, eine Pufferlösung, eine milde Lösung von HCl, eine milde Lösung von NaOH, ein zwitterionisches Waschmittel, eine Verbindung mit

der Formel n-Decyl-N,N-dimethyl-3-amino-1-propansulfonat, eine Verbindung mit der Formel n-Dodecyl-N,N-dimethyl-3-amonio-1-propansulfonat, eine Verbindung mit der Formel n-Tetradecyl-N,N-dimethyl-3-amonio-1-propansulfonat, Polysorbat 20, Polyoxyethylen(20)sorbitanmonolaurat, Polyethylenglycol-p-isooctylphenylether oder Octylphenoxypolyethoxyethanol; und
einen Fluoreszenzkomplex, der ausgewählt ist, um an die Zielkomponenten (**88**) zu binden, wobei die Körperchen und der Fluoreszenzkomplex in der Kammer angeordnet werden und eine gleichmäßige Schicht von statischen Körperchen aufweisen, die größer ist als ein Körperchen tief ist, und wobei der Fluoreszenzkomplex einen Fluoreszenzfarbstoff umfasst, der an einen Antikörper gebunden ist, der für ein Antigen spezifisch ist, das an den Zielkomponenten (**88**) exprimiert ist.

15. Statische Probenpräparation nach Anspruch 14, wobei die Kammer eine Abtastkapillare ist.

16. Statische Probenpräparation nach Anspruch 14, wobei die Kammer eine Abtastkapillare mit einer Tiefe im Bereich von zehn bis zweihundert Mikrometern ist.

17. Probenpräparation nach Anspruch 14, wobei der Fluoreszenzkomplex einen Fluoreszenzfarbstoff umfasst, der kovalent an einen Antikörper gebunden ist, der für ein Antigen spezifisch ist, das an einem weißen Blutkörperchen exprimiert ist, welches innerhalb der gesamten Blutprobe (**12**) enthalten ist.

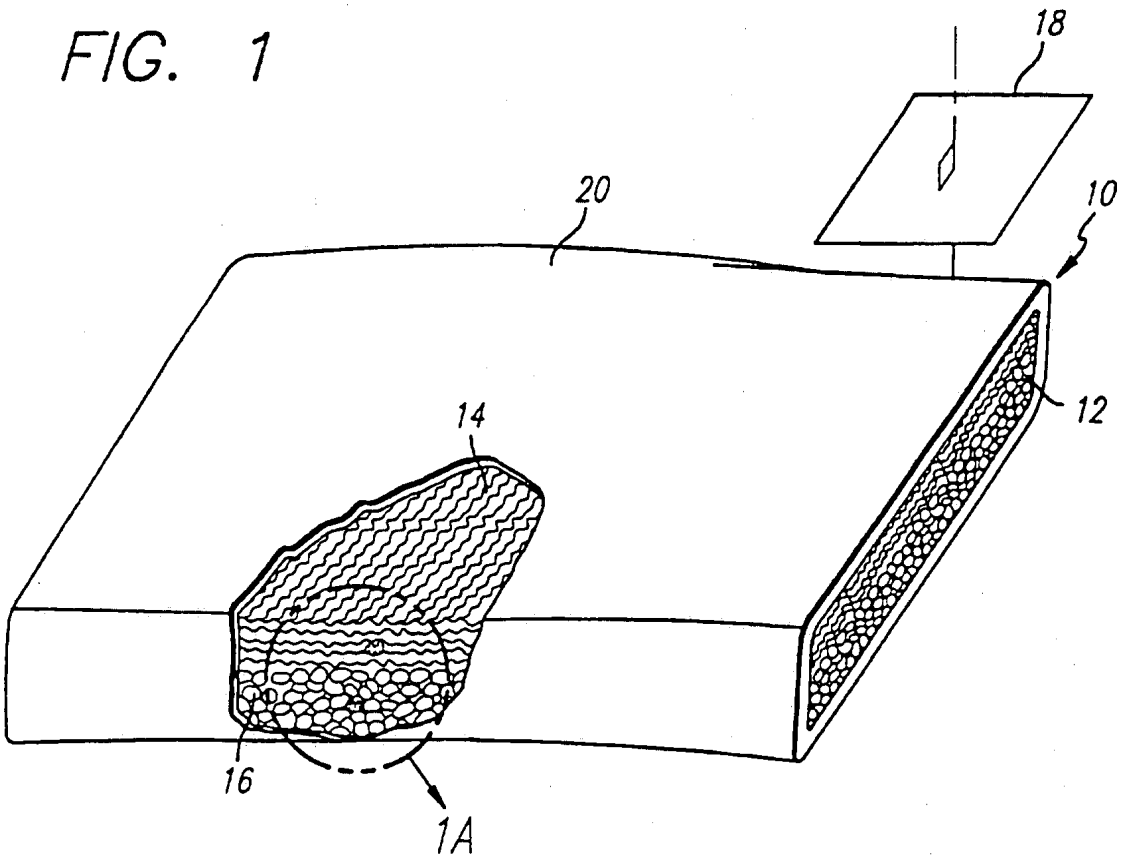
18. Probenpräparation nach Anspruch 14, wobei die Hämatokritschicht eine Tiefe im Bereich von fünf bis sechzig Mikrometern aufweist.

19. Verfahren nach Anspruch 14, wobei die Zielkomponenten (**88**) aus einer von einer Gruppe ausgewählt werden, die eine Zellensubpopulation, ein weißes Blutkörperchen, einen Virus, ein Blutplättchen, ein Bakterium, einen Lymphozyten, ein Protozoa, einen Parasiten, ein DNA-Molekül oder ein RNA-Molekül umfasst.

Es folgen 11 Blatt Zeichnungen

**Anhängende Zeichnungen**

FIG. 1



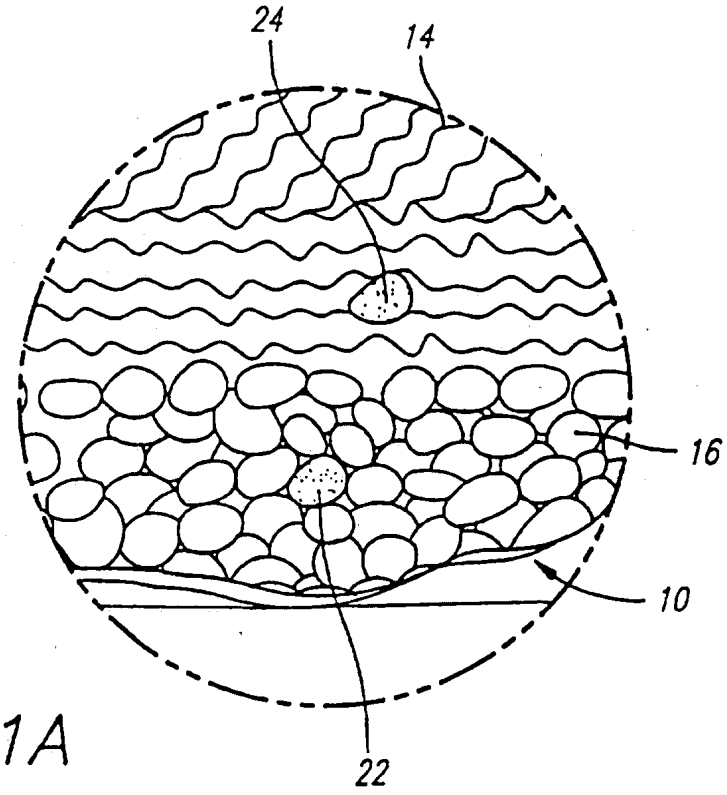
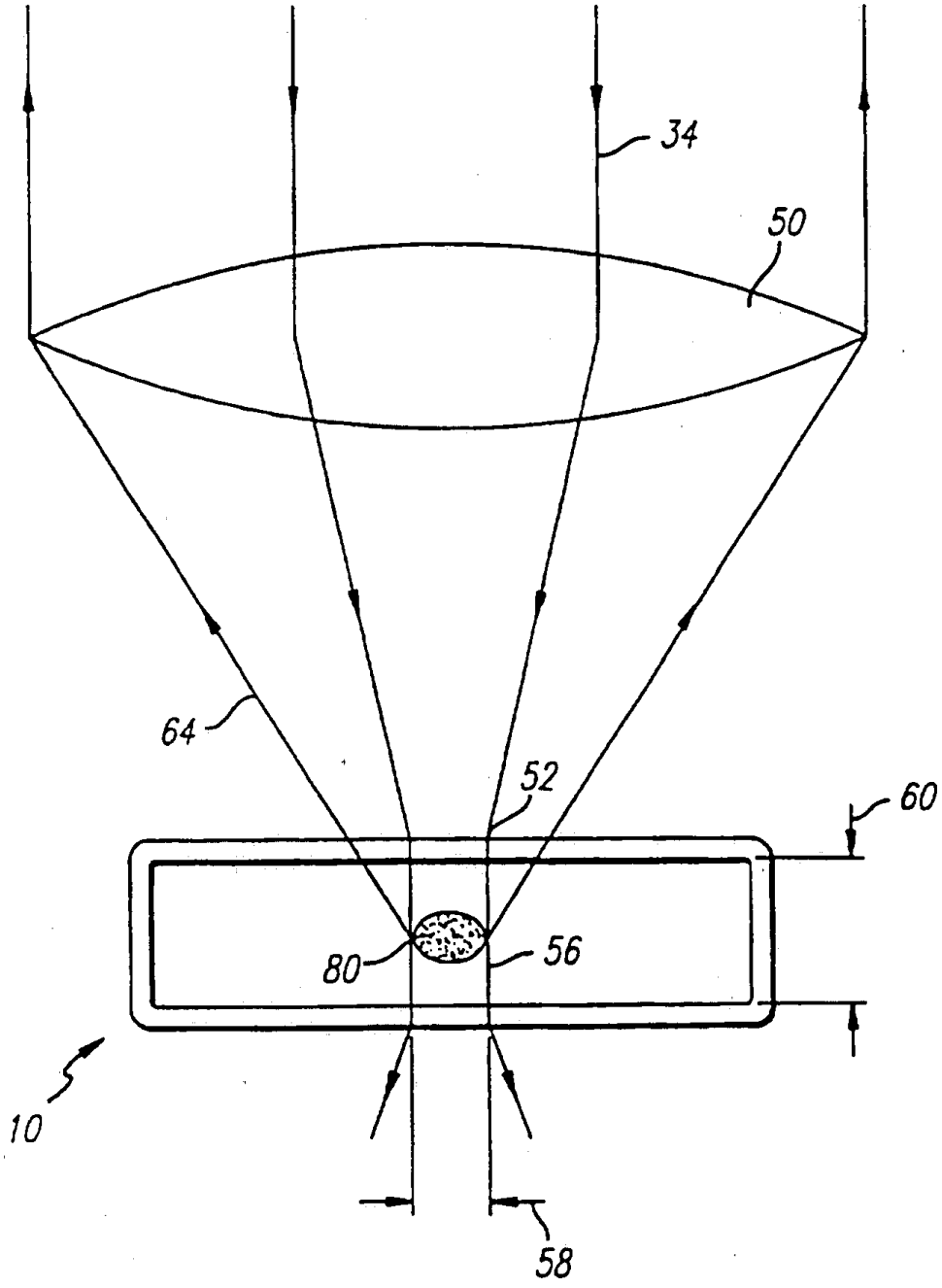




FIG. 1A

FIG. 2



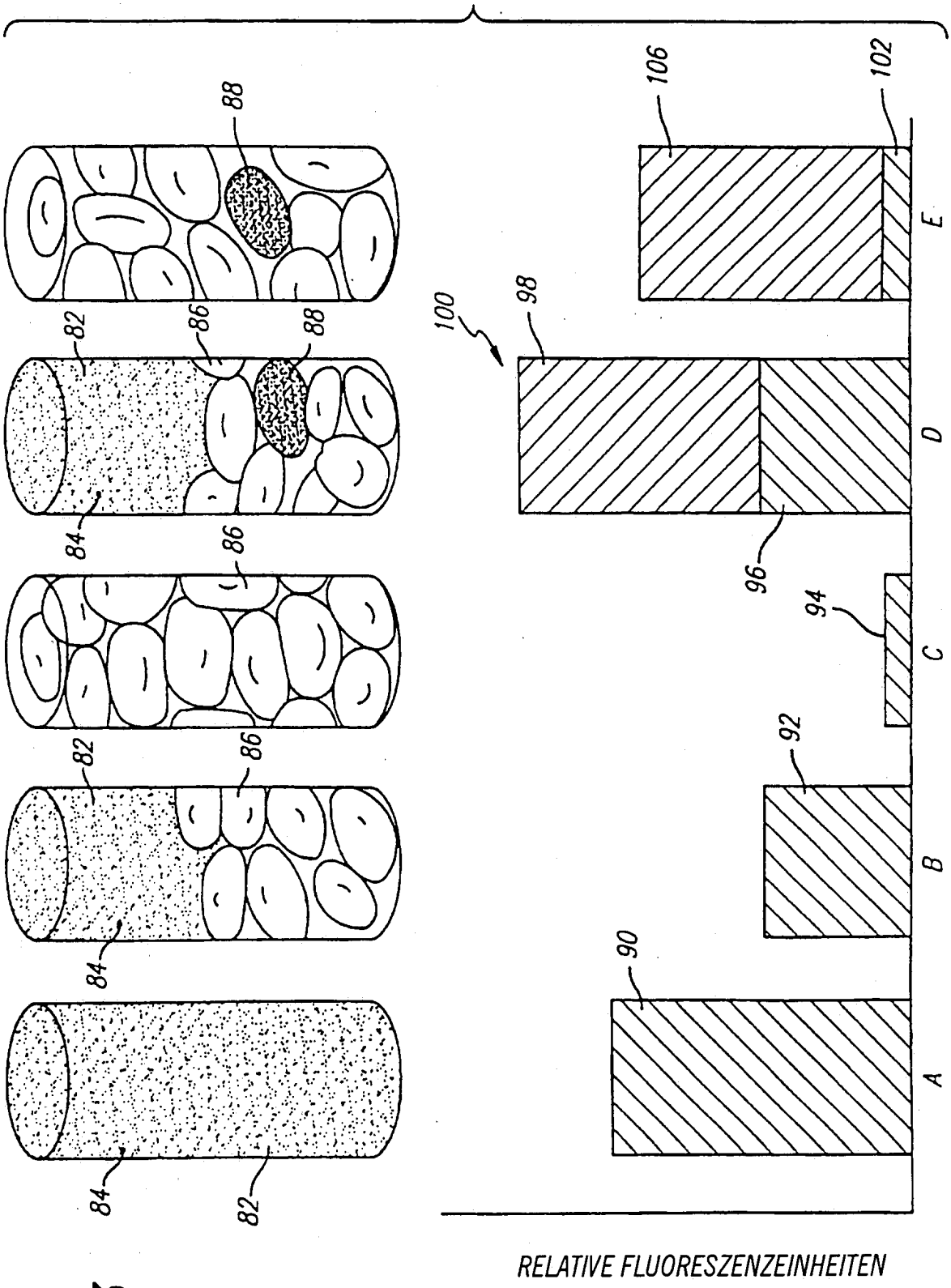

88
82
86
88
84
86
82
86
84
82
84
82
100
98
106
102
E
D
96
94
C
92
B
90
A
RELATIVE FLUORESZENZEINHEITEN

FIG. 3

FIG. 4A

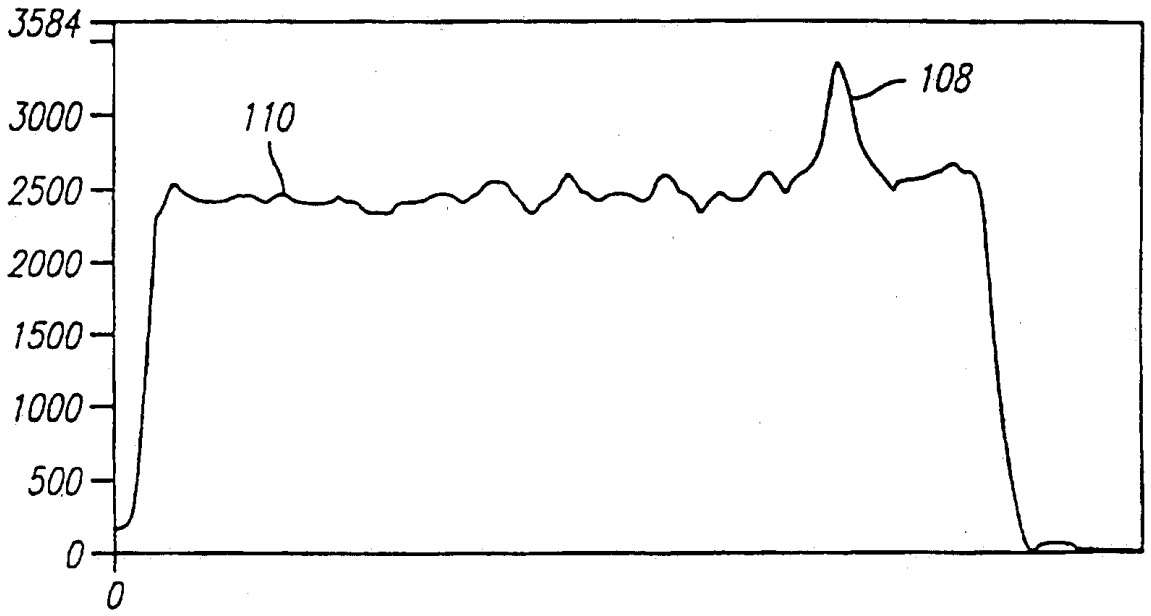

3584
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
0
110
108

FIG. 4B

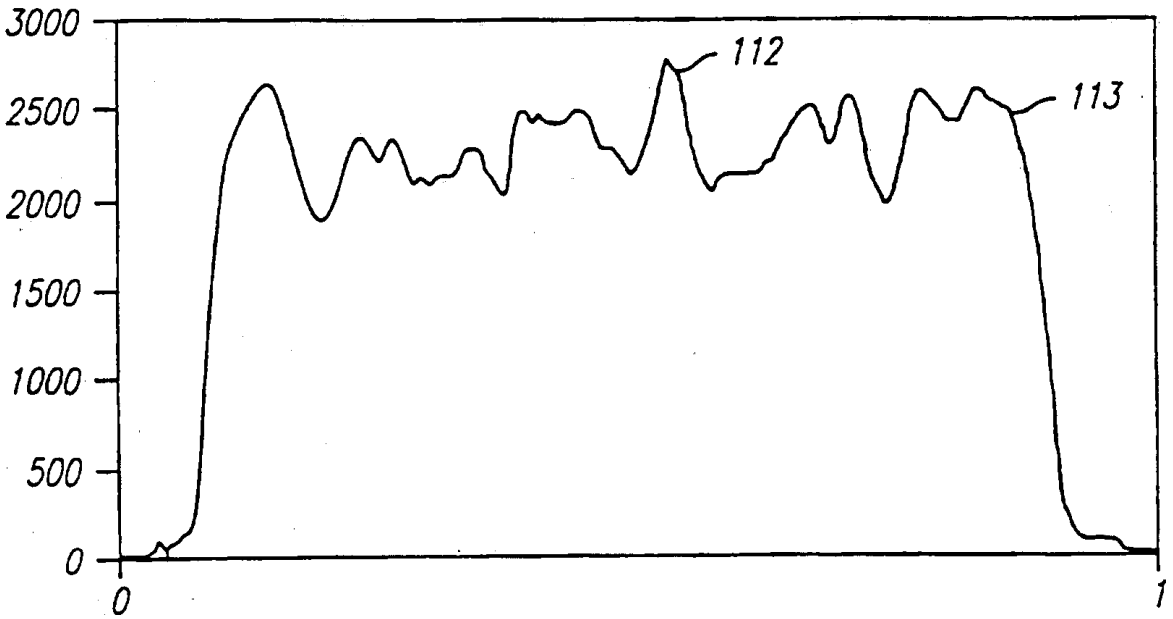

3000
2500
2000
1500
1000
500
0
0
1
112
113

FIG. 5

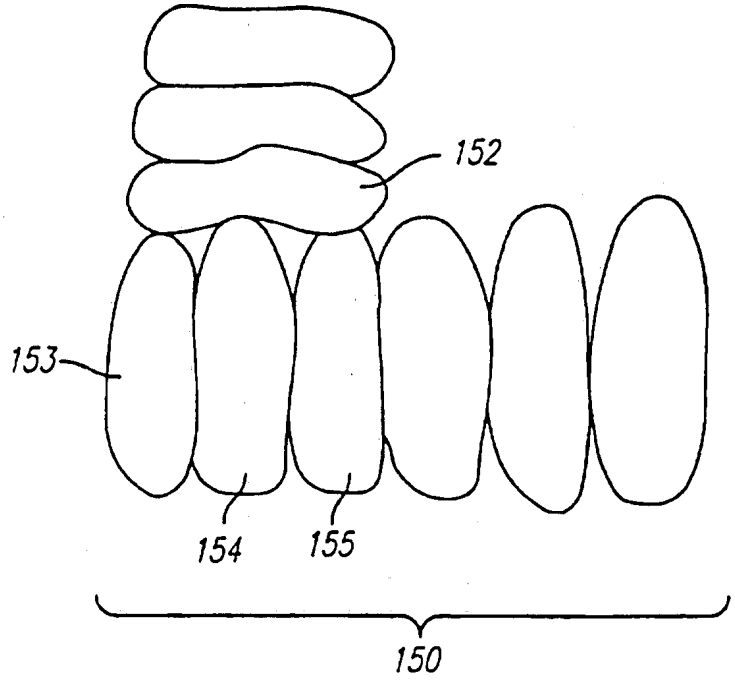
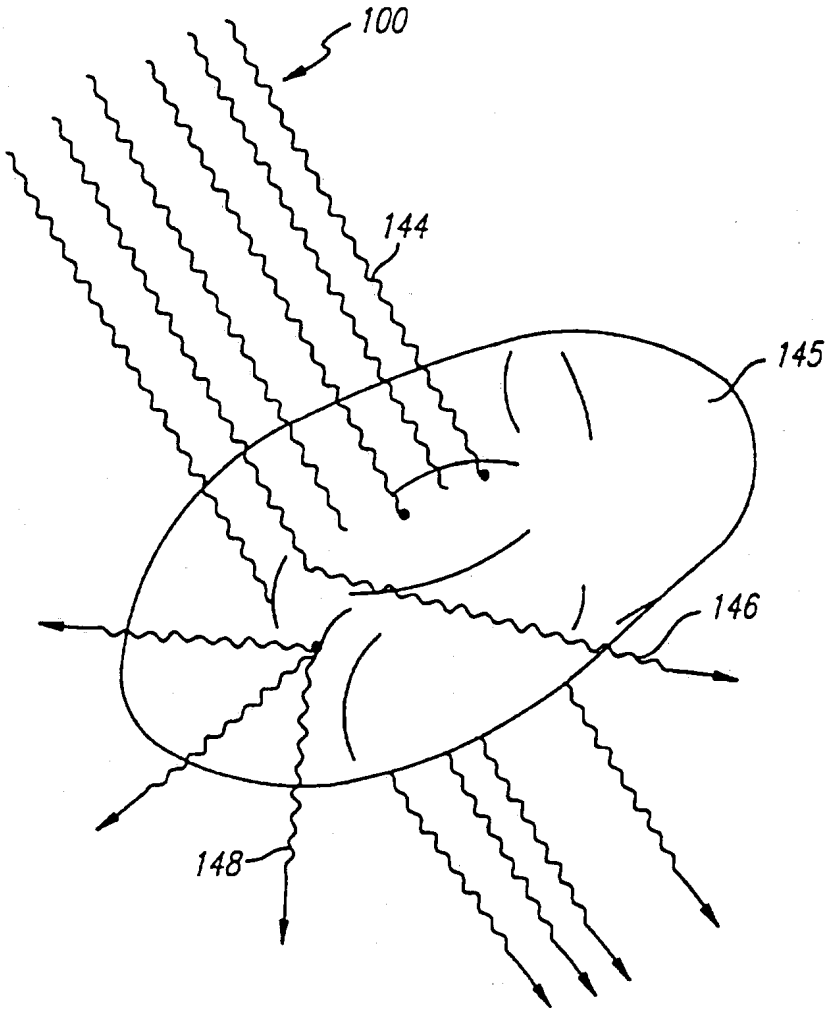



FIG. 7



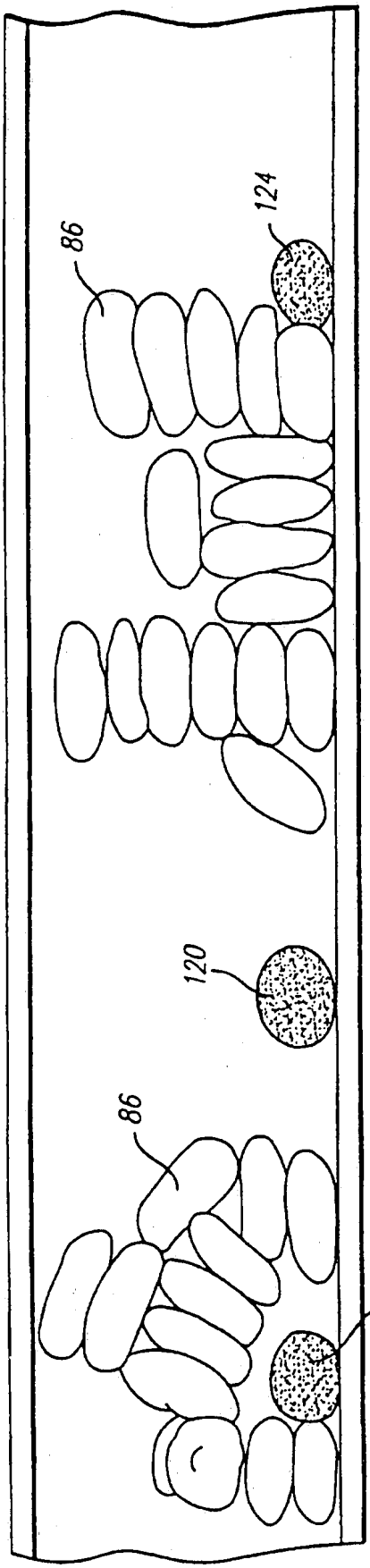

86
124
120
86
122

FIG. 6A

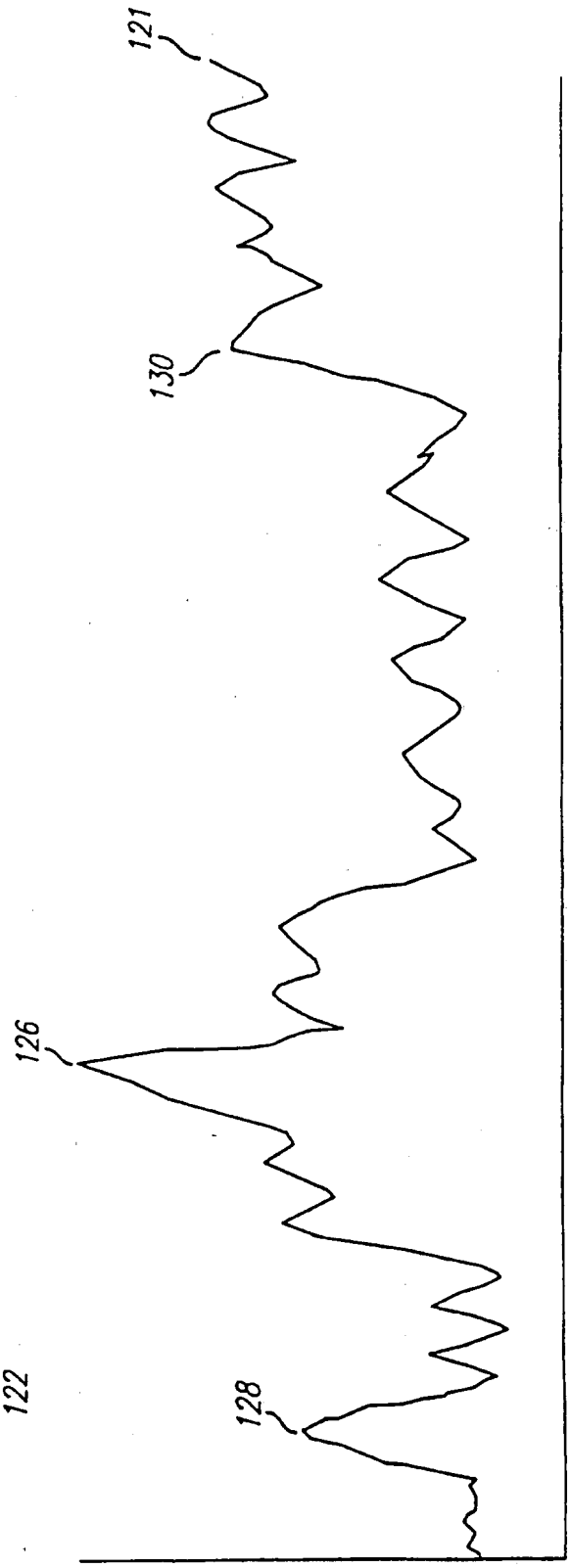

121
130
126
128
RELATIVE FLUORESZENZEINHEITEN

FIG. 6B

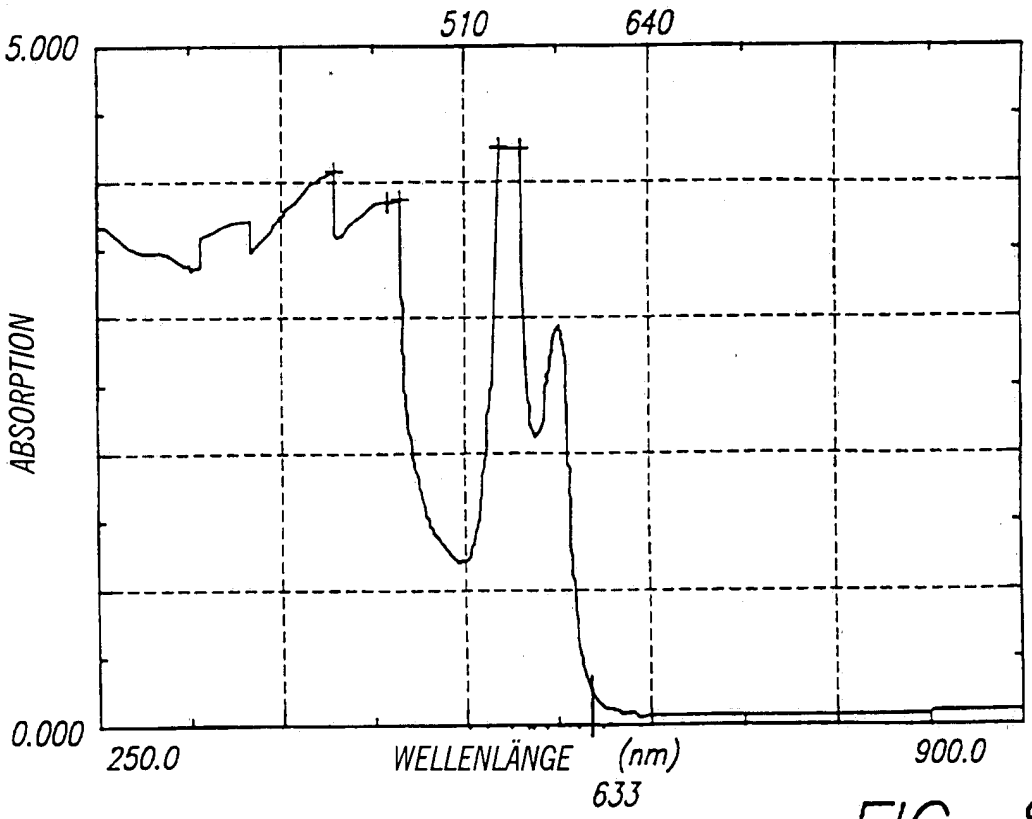

510
640
5.000
ABSORPTION
0.000
250.0
WELLENLÄNGE (nm)
900.0
633

FIG. 8

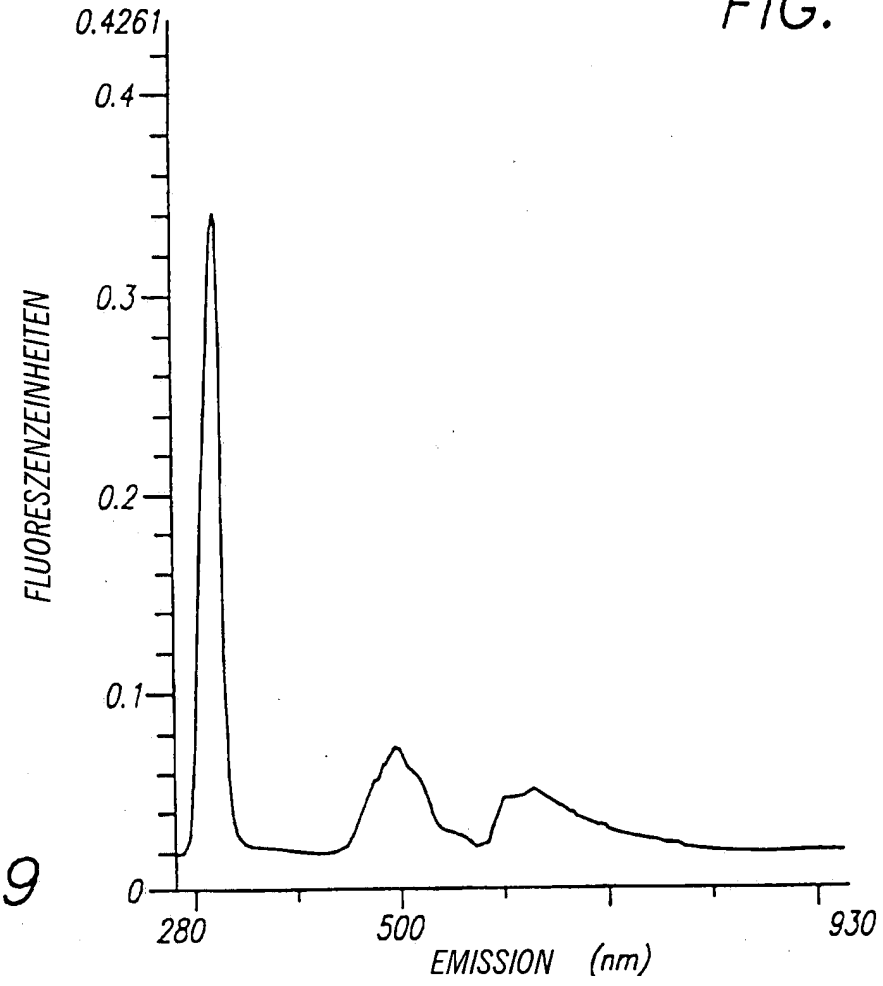

0.4261
0.4
0.3
0.2
0.1
0
FLUORESZENZEINHEITEN
280
500
930
EMISSION (nm)

FIG. 9

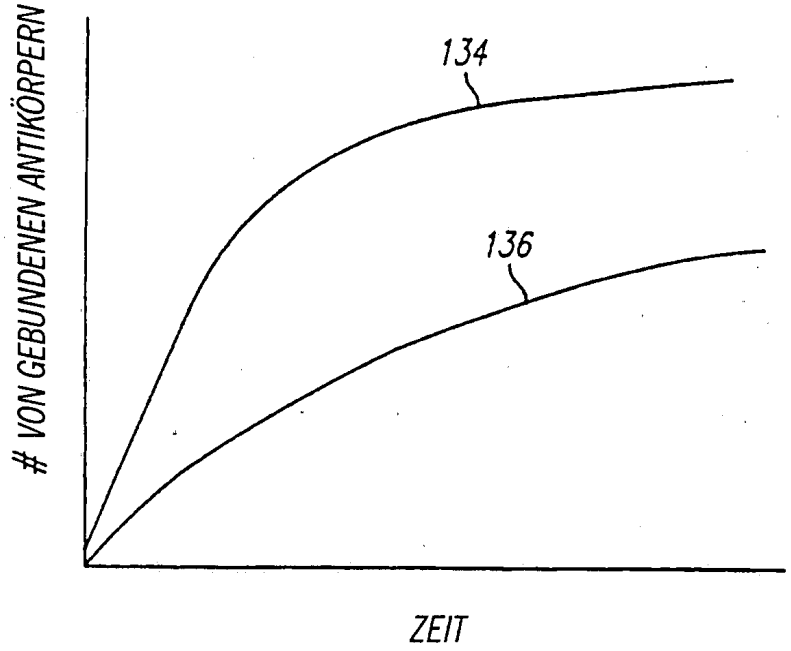

# VON GEBUNDENEN ANTIKÖRPERN
134
136
ZEIT

FIG. 10

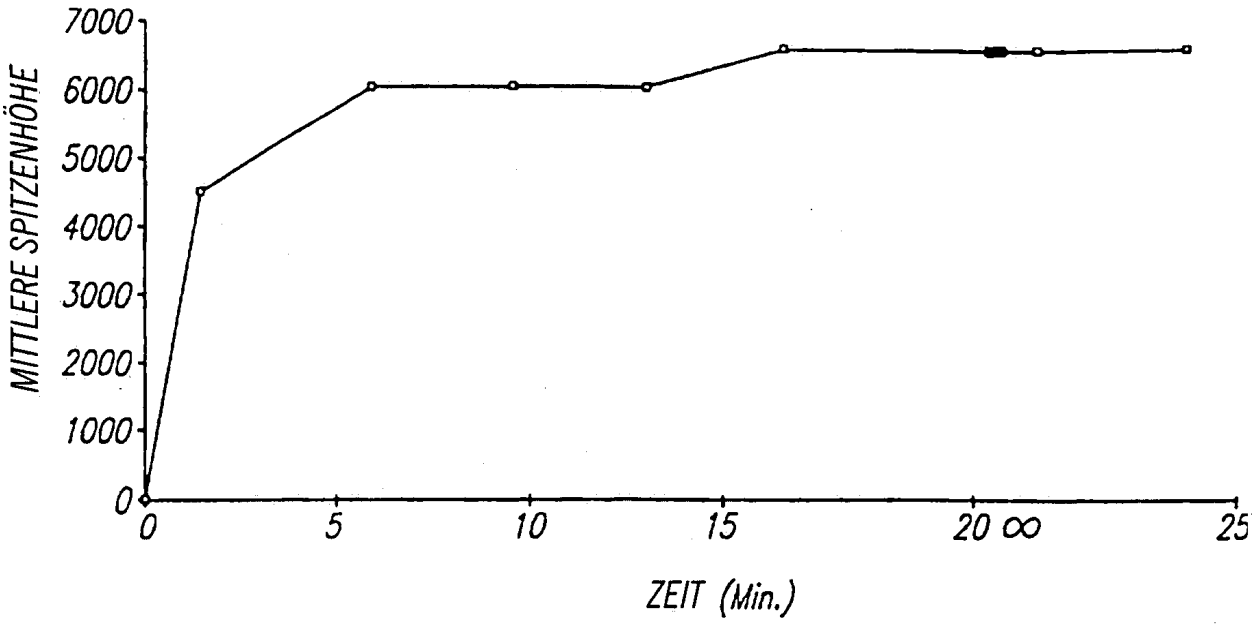

MITTLERE SPITZENHÖHE
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
0
5
10
15
20 ∞
25
ZEIT (Min.)

FIG. 11

FIG. 12

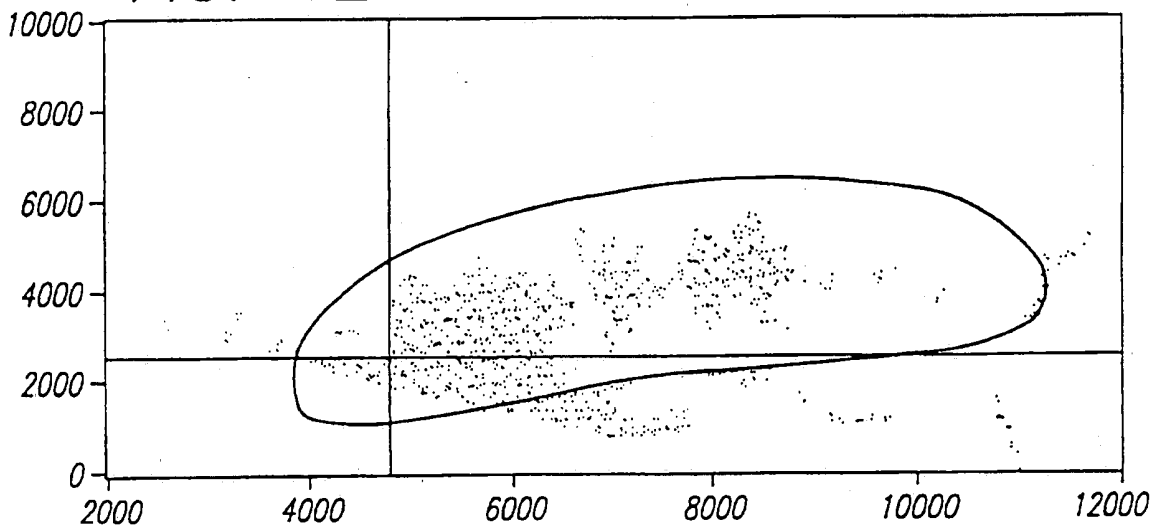



FIG. 13

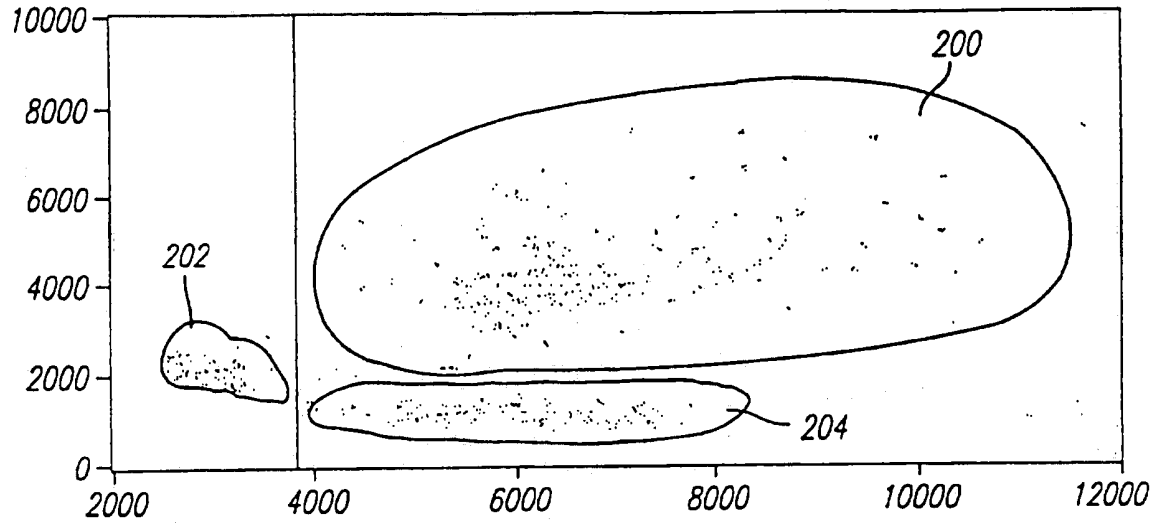



FIG. 14

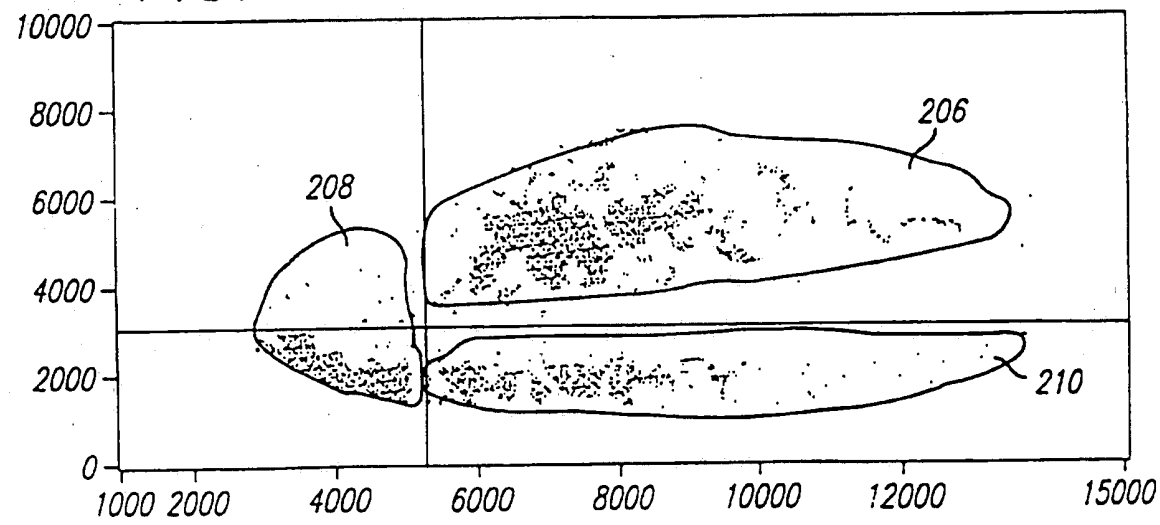


FIG. 15

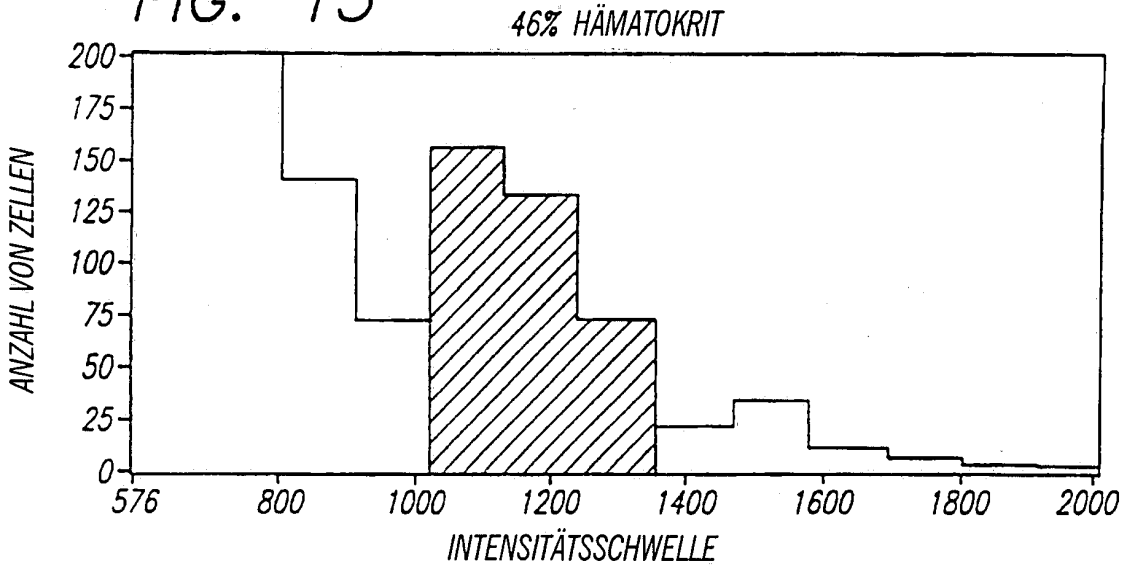



FIG. 16

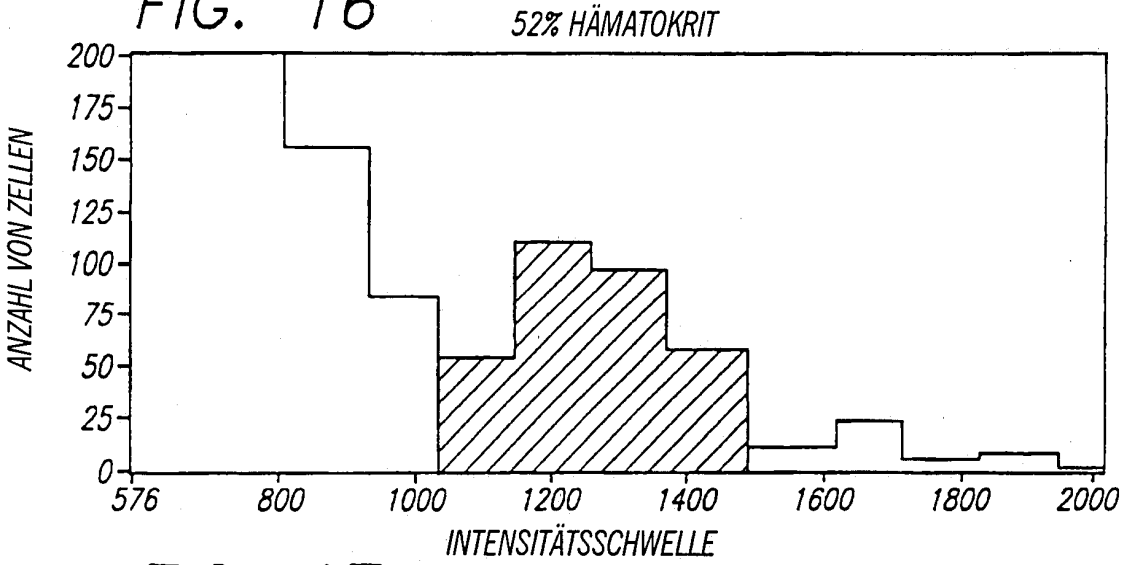



FIG. 17

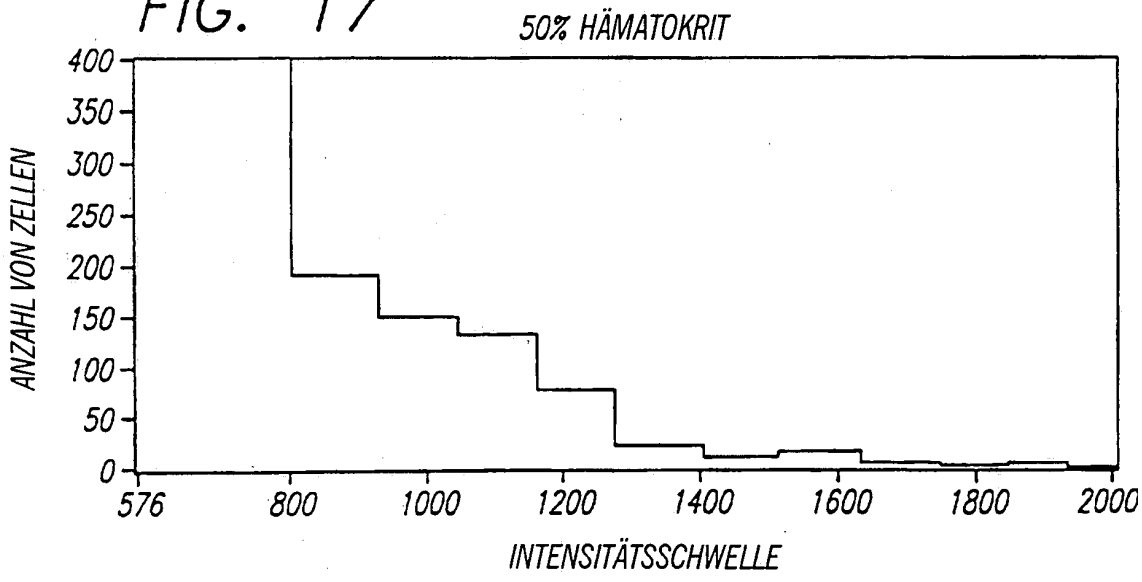


FIG. 18

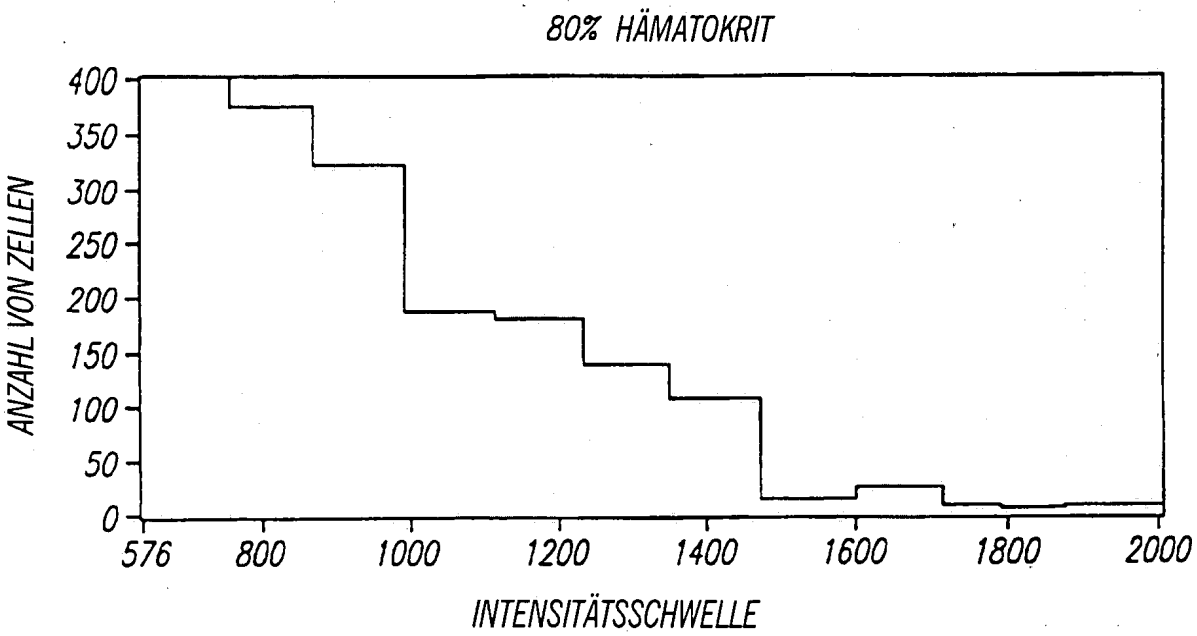
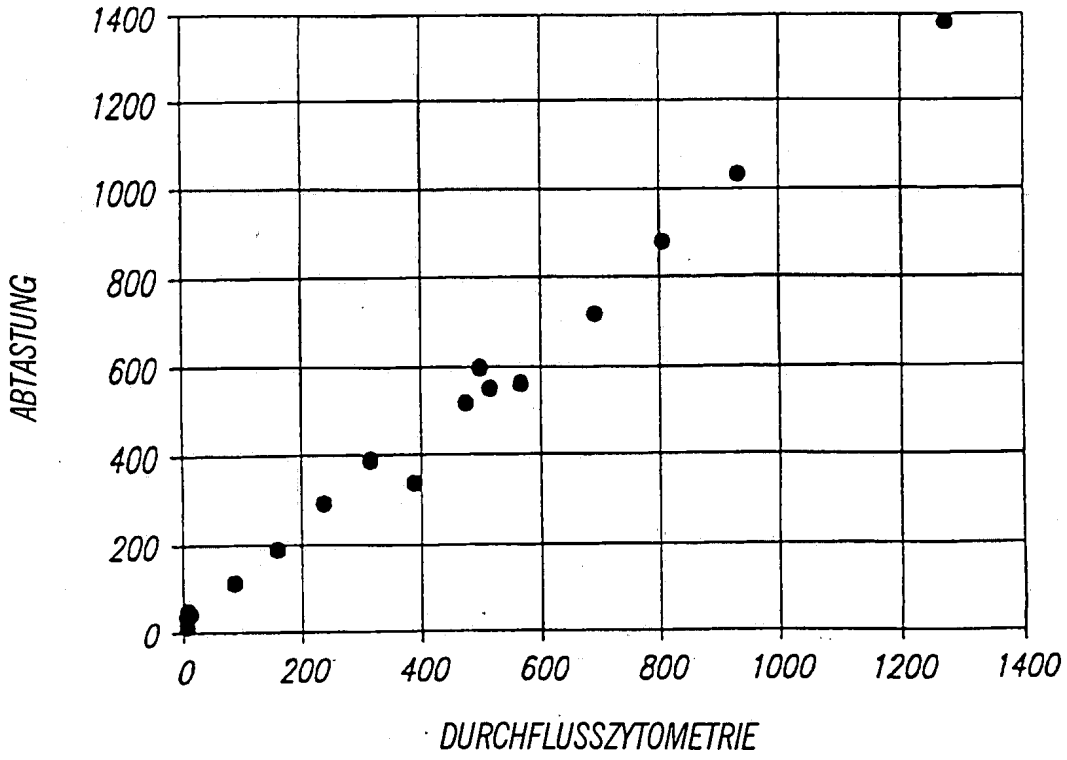

80% HÄMATOKRIT
ANZAHL VON ZELLEN
400
350
300
250
200
150
100
50
0
576
800
1000
1200
1400
1600
1800
2000
INTENSITÄTSSCHWELLE

FIG. 19


ABTASTUNG
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
200
400
600
800
1000
1200
1400
DURCHFLUSSZYTOMETRIE