

(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 18 Absatz 2 Patentgesetz

(19) DD (11) 278 926 A3

4(51) G 01 N 15/14
G 01 N 1/00

PATENTAMT der DDR

(21)	WP G 01 N / 311 169 2	(22)	24.12.87	(45)	23.05.90
(71)	Medizinische Akademie Erfurt, Nordhäuser Straße 74, Erfurt, 5010, DD				
(72)	Braun, Günter, Dr. rer. nat.; Köhler, Peter, Prof. Dr. sc. med.; Matschiner, Hermann, Prof. Dr. sc. nat., DD				
(54)	Verfahren und Vorrichtung zur Probenzuführung für Partikelzähl- und Meßgeräte				

(55) Probenzuführung; Partikelzählgeräte; Partikelanalysengeräte; Hüllstromtechnik; Probenstrom; Hüllstrom; Partikelsuspension; Blutkörperchen; technische Hydrosole

(57) Verfahren und Vorrichtung zur Probenzuführung für Partikelzähl- und Meßgeräte auf der Grundlage der Hüllstromtechnik für die Zuführung der Partikelsuspension zum Meßort, anwendbar an Blutkörperchen/Partikelzählgeräten und Durchflußzytometern mit dem Ziel der Verbesserung der Meß- und Zählgenauigkeit. Mit der Erfindung wird die Aufgabe gelöst, dem Analysatorteil, genannt Hüllstromkammer, ein wohldefiniertes Volumen Partikelsuspension so zuzuführen, daß die hydrodynamisch für die Zählung und Messung optimalen Verhältnisse nicht gestört werden. Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß der dünne Flüssigkeitsstrom, genannt Probenstrom, abwechselnd eine Säule Partikelsuspension wohlbestimmten Volumens und eine Säule partikelfreie Flüssigkeit gleicher physikalischer Eigenschaften wie die Suspensionsflüssigkeit führt und daß diese Säulen aneinandergrenzend in laminarer Strömung einer Hüllstromkammer zugeführt werden.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Probenzuführung für Partikelzähl- und Meßgeräte auf der Grundlage der Hüllstromtechnik für die Zuführung der Partikelsuspension zum Meßort, **gekennzeichnet dadurch**, daß ein Probenstrom abwechselnd eine Säule Partikelsuspension wohldefinierter Volumens und eine Säule partikelfreie Flüssigkeit gleicher physikalischer Eigenschaften wie die Suspensionsflüssigkeit führt, daß diese Säulen aneinandergrenzend in laminarer Strömung einer Hüllstromkammer zugeführt werden und ein Hüllstrom fortwährend in stetiger laminarer Strömung der Hüllstromkammer zugeführt wird.
2. Vorrichtung zur Probenzuführung für Partikelzähl- und Meßgeräte, bestehend aus einer Hüllstromkammer (1) mit Hüllstromzuführung (2) und Probenstromzuführung (3), einem Kanal (5), einem Kanal (11), Ventilen (6), (7), (8), (9), (10), einem Vorratsgefäß für partikelfreie Probenstromflüssigkeit (14), einem Vorratsgefäß für partikelfreie Hüllstromflüssigkeit (15), einer Saugpumpe (12), einem geregelten Drucksystem (16) und einem Ansaugstutzen (17) für die Partikelsuspension, **gekennzeichnet durch** eine Anordnung der Kanäle (5) und (11) und Ventile (6), (7), (8), (9), (10) derart, daß Kanal (5) und Kanal (11) parallel geschaltet sind, daß Kanal (5) volumenkalibriert ist, daß Ventil (6) sich zwischen Ansaugstutzen (17) und Kanal (5) befindet, daß Ventil (10) sich zwischen Kanal (5) und Saugpumpe (12) befindet, daß Ventil (7) und (9) sich zwischen Kanal (5) und Kanal (11) befinden und Ventil (8) sich im Kanal (11) befindet.

Hierzu 1 Seite Zeichnung

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung ist anwendbar in Partikelzähl- und Meßgeräten, die Einzelpartikelmessungen durchführen an kleinen Partikeln, die in Flüssigkeit suspendiert sind, und zwar unabhängig davon, ob die Messung nach dem elektrischen Widerstandsprinzip (Coulter-Counter) oder über optische Antastung (Durchflußmikrofotometer) erfolgt.

Die Erfindung hat damit ein sehr weites Anwendungsgebiet in Medizin, Biotechnologie und Technologie.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Die bekannten technischen Lösungen zur Probendosierung für Partikelzähl- und Meßgeräte sind im Zusammenhang mit dem Wirkprinzip der Partikelzähl- und Meßgeräte zu verstehen. Das Wirkprinzip der Partikelzähl- und Meßgeräte ist dadurch gekennzeichnet, daß die Partikel aus der Suspension heraus vereinzelt zum Meßort geführt und positioniert werden. Dabei hat sich insbesondere die Hüllstromtechnik nach Crosland-Taylor (A Device for counting small particles suspended in a fluid trough a tube, Nature **171** [1953], 37) sowie die hydrodynamische Fokussierung nach Spielman und Goren (Improving resolution in coulter-counting by hydrodynamic focusing). Colloid and interface Sci **26** [1968], 175) bewährt. In typischen Anordnungen werden 1000 Partikel pro sec. gezählt. Für einen weiteren Überblick sei auf Steinkamp (Flow cytometry, Rev. Sci. Instr. **55** [1984], 1375) verwiesen. Eine für die Anwendung der Erfindung relevante Anordnung ist gegeben in Braun, G. et al. DD 222 123 A 1 (Verfahren und Vorrichtung zur fluorometrischen Bestimmung der Menge in Partikeln eingebetteten Stoffs).

Bei der bewährten Hüllstromtechnik werden die Partikel in einem dünnen Flüssigkeitsstrom, genannt Probenstrom, der von einem partikelfreien Flüssigkeitsstrom, genannt Hüllstrom, ummantelt ist, durch den Meßort geführt. Die Aufgabe ist dann, außer der Zählung der Partikel, noch das Flüssigkeitsvolumen des Probenstroms während der Zählung zu bestimmen bzw. das Flüssigkeitsvolumen, in dem gezählt werden soll, präzise zuzuführen. Hierfür sind eine Vielzahl technischer Lösungen bekannt. Die Anzahl der in Betracht kommenden Lösungen wird eingeschränkt durch die Tatsache, daß in Folge der Hüllstromtechnik die zu analysierenden Volumina des Probenstroms sehr klein sein können. Typische Werte für die Probenstromvolumina liegen im Bereich von Mikrolitern. Damit scheiden aus verschiedenen Gründen bekannte Verfahren über die Unterbrechung elektrischer Kontakte durch den Abriß einer leitenden Flüssigkeit (z. B. Gerät Laborscale der Fa. Medicor, Ungarn) aus. Außerdem sind leitende Suspensionsflüssigkeiten bei optischer Antastung der Partikel oft nicht erforderlich bzw. nicht erwünscht.

Andere Verfahren beruhen auf der Triggerung des Zählprozesses beim Durchlauf einer Luftblase in der Partikelsuspension durch ein volumenkalibriertes Kapillarrohr (Geräte der Fa. Ortho Diagnostic Systems, USA). Die Luftblasen können jedoch zu einer Störung der hydrodynamischen Fokussierung und damit der Meßgenauigkeit führen. Ein weiteres Verfahren nutzt die genaue Einstellung von Durchmesser und Flußgeschwindigkeit des Probenstromes (Gerät FACSan der Fa. Becton Dickinson, USA) über Druckstabilisierung aus. Dieses Verfahren ist sehr aufwendig und störanfällig.

Ein weiteres Verfahren, das die definierte Zugabe einer Suspension bekannter Konzentration zu der zu bestimmenden (Haynes, Shorr, PS DE 2748923, G01 N 15/06) nutzt, kommt für Routinemessungen nicht in Frage.

Am aussichtsreichsten sind die Verfahren, bei denen ein abgemessenes Probenvolumen zugeführt wird. Dies ist z. B. realisiert, wenn das Probenvolumen mechanisiert aus einer Spritze herausgedrückt wird (Informationsblatt Neueinführung Leitz MPV 4 - Durchflußzytometer).

Der am weitesten fortgeschrittene Stand wird verkörpert durch EP 101161 A2, G01 N 1/00 der Fa. Technicon Instr. Corp., USA (Farrel, Apparatus and method for passing two fluids simultaneously through and analytical flow cell). Hier wird ein genau bestimmtes Volumen durch die Hüllstromzuführung der Meßkammer gedrückt, während gleichzeitig am Ausgang der Meßkammer ein um ein genau bestimmtes Volumen des Probenstromes vermehrtes Volumen angesaugt wird. Der Nachteil dieser Anordnung ist, daß sie in diskontinuierlicher Weise arbeitet. Präziser ausgedrückt, wird das Strömungsfeld, das die hydrodynamische Fokussierung bewirkt, etwa zur gleichen Zeit aufgebaut, in der der Meßvorgang beginnt. Damit sind Positionsinstabilitäten des Probenstromes verbunden, die sich nachteilig auf die Meßgenauigkeit auswirken, wie das auch in der Literatur beschrieben ist (D.C. Nguyen, R.A. Keller, Ultrasensitive Laser-induced fluorescence detection in hydrodynamically focused flows, Journal of the Optical Society of America **134** [1987], 138).

Ziel der Erfindung

Verbesserung der Meß- und Zählgenauigkeit von Partikelzähl- und Meßgeräten bei der Analyse kleiner Probenvolumina.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, einer Hüllstromkammer von Partikelzähl- und Meßgeräten ein wohldefiniertes Volumen Partikelsuspension in einem Probenstrom so zuzuführen, daß die hydrodynamischen, für die Zählung und Messung optimalen Verhältnisse möglichst nicht gestört werden.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß der Probenstrom abwechselnd eine Säule Partikelsuspension wohlbestimmten Volumens und eine Säule partikelfreie Flüssigkeit gleicher physikalischer Eigenschaften wie die Suspensionsflüssigkeit führt und daß diese Säulen aneinandergrenzend in laminarer Strömung der Hüllstromkammer zugeführt werden, während der partikelfreie Hüllstrom fortwährend in stetiger laminarer Strömung der Hüllstromkammer zugeführt wird.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung zur Probenzuführung für Partikelzähl- und Meßgeräte, bestehend aus einer Hüllstromkammer mit Hüllstromzuführung und Probenstromzuführung, zwei Kanälen, fünf Ventilen, einem Vorratsgefäß für partikelfreie Probenstromflüssigkeit, einem Vorratsgefäß für partikelfreie Hüllstromflüssigkeit, einer Saugpumpe, einem geregelten Drucksystem und einem Ansaugstutzen für die Partikelsuspension ist gekennzeichnet dadurch, daß die Kanäle parallel geschaltet sind, daß einer der Kanäle volumenkalibriert ist, daß ein Ventil sich in der Verbindung des volumenkalibrierten Kanals zum Ansaugstutzen befindet, daß ein Ventil sich in der Verbindung des volumenkalibrierten Kanals zur Saugpumpe befindet, daß jeweils ein Ventil sich in den die Parallelschaltung der Kanäle herstellenden Verbindungen befindet und daß ein Ventil sich im nicht volumenkalibrierten Kanal befindet.

Die Funktionsweise der Vorrichtung wird im folgenden erläutert.

Erstens: Die in der die Parallelschaltung der Kanäle herstellenden Verbindung befindlichen Ventile sind geschlossen, die anderen geöffnet. Auf diese Weise wird der Probenstromzuführung der Hüllstromkammer eine Säule partikelfreie Flüssigkeit aus dem Vorratsgefäß zugeführt, während gleichzeitig der volumenkalibrierte Kanal mit Partikelsuspension gefüllt wird.

Zweitens: Die Ventile in den Verbindungen des volumenkalibrierten Kanals zum Ansaugstutzen und zur Saugpumpe sowie das Ventil im nicht volumenkalibrierten Kanal sind geschlossen, die anderen geöffnet. Auf diese Weise wird eine Säule Partikelsuspension wohlbestimmten Volumens im unmittelbaren Anschluß an die Säule partikelfreie Flüssigkeit der Probenstromzuführung der Hüllstromkammer zugeführt, während die restliche Partikelsuspension zum Abfallbehälter gelangt.

Ausführungsbeispiel

Ein Ausführungsbeispiel soll anhand der Zeichnung näher erläutert werden.

Nach dem erfindungsgemäßen Verfahren wurden die Zählung und Messung der Größenverteilung von menschlichen Erythrozyten, suspendiert in physiologischer Kochsalzlösung, an einem Durchflußzytometer als Probensuspension 4 mittels der erfindungsgemäßen Vorrichtung, bestehend aus einer Hüllstromkammer 1 mit Hüllstromzuführung 2 und Probenstromzuführung 3, einem volumenkalibrierten Kanal 5, dessen Volumen 50 µl beträgt, einem Kanal 11, den Ventilen 6, 7, 8, 9, 10 nach dem Scheibenhahnprinzip, einem Vorratsgefäß 14 für partikelfreie Probenstromflüssigkeit, die aus physiologischer Kochsalzlösung besteht, einem Vorratsgefäß 15 für partikelfreie Hüllstromflüssigkeit, die aus destilliertem Wasser besteht, einer Saugpumpe 12, einem geregelten Drucksystem 16 des Förderdrucks 0,04 MPa, einem Ansaugstutzen 17 sowie einem Abfallbehälter 13, durchgeführt.

Zunächst wurde der Kanal 5 mit der Erythrozytensuspension als Probensuspension 4 gefüllt, während gleichzeitig der Probenstromzuführung 3 der Hüllstromkammer eine Säule partikelfreie Flüssigkeit aus dem Vorratsgefäß 14 zugeführt wird, indem die Ventile 7 und 9 geschlossen sind, während die Ventile 6, 8 und 10 geöffnet sind. Dann wird der Inhalt des volumenkalibrierten Kanals 5, bestehend aus 50 µl Erythrozytensuspension in unmittelbarem Anschluß an die Säule partikelfreie Flüssigkeit der Probenstromzuführung 3 der Hüllstromkammer zugeführt, während die restliche Erythrozytensuspension zum Abfallbehälter 13 gelangt, indem die Ventile 6, 8 und 10 geschlossen und Ventil 7 und Ventil 9 geöffnet sind.

Übereinstimmend mit Messungen an einem kommerziellen Partikelzählgerät Laborscale (Medicor, Ungarn) wurde die Erythrozytenkonzentration zu $(5,08 \pm 0,05) \times 10^{12}/l$ ermittelt. Gegenüber der Messung am Laborscale wurde die Schiefe der Größenverteilung verringert sowie der Variationskoeffizient von $CV = 26\%$ auf $CV = 18\%$ reduziert. Dies ist in der hämatologischen Diagnostik von Bedeutung für das Erkennen pathologischer Befunde (siehe z. B. Bessmann, J. D. et al. Am. J. Clin. Pathol. **80** [1983], 322).

Beispiel 2

Nach dem erfindungsgemäßen Verfahren wurde mittels der erfindungsgemäßen Vorrichtung eine immunologische Untersuchung an einer Lymphozytenpopulation, die nicht mehr als 5×10^5 Zellen enthielt, durchgeführt. Gegenüber Beispiel 1 wurden die Zellen in üblicher Weise in PBS suspendiert. Der angrenzende Probenstrom bestand ebenfalls aus PBS, ansonsten wurden die Bedingungen nach Beispiel 1 nicht geändert. Die zuverlässige Analyse kleinster Probenmengen ist ein weiterer Vorteil der erfindungsgemäßen Lösung (Vergleiche z. B. Chen, Z. et al., Leukemia Res. 10 [1986], 1411).

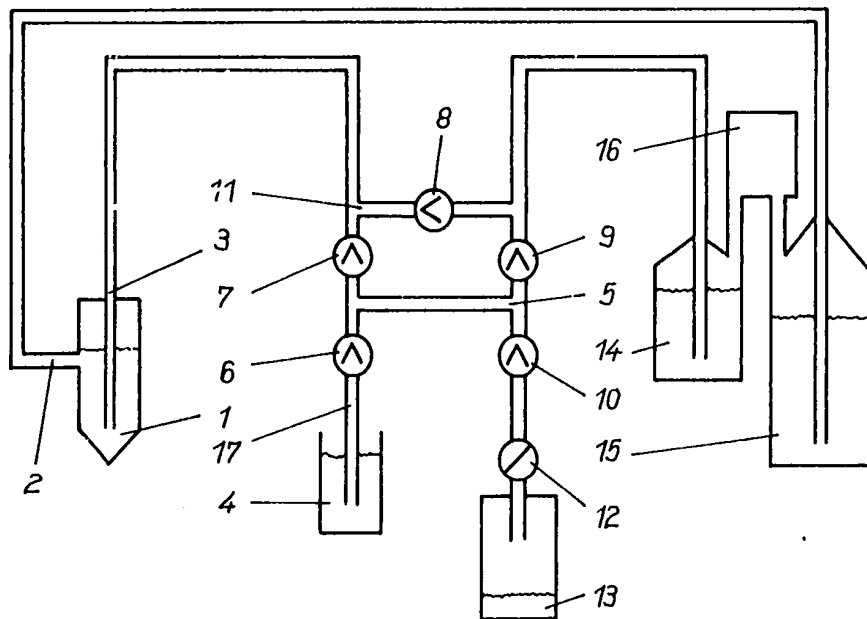


Fig. 1