

(12)

Patentschrift

(21) Anmeldenummer: A 1582/2009
(22) Anmeldetag: 07.10.2009
(45) Veröffentlicht am: 15.06.2013

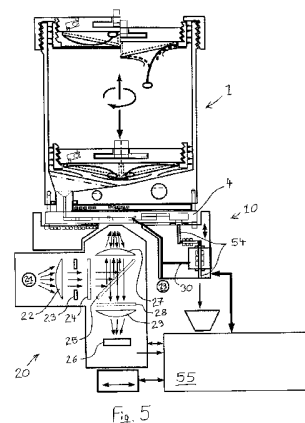
(51) Int. Cl. : **G01N 21/05** (2006.01)
G01N 33/00 (2006.01)
B65D 39/00 (2006.01)

(56) Entgegenhaltungen:
US 2005105077 A1
US 2002033939 A1
WO 200186285 A2
EP 1203944 A1 EP 1262776 A2

(73) Patentinhaber:
ONKOTEC GMBH
3830 WAIDHOFEN/THAYA (AT)

(54) ANALYSEGERÄT UND VERFAHREN

(57) Analysegerät mit einer Probenbehältereinheit (1) aus einem Probenbehälter zur Aufnahme einer im Wesentlichen flüssigen Probe und Markierung der in der Probe enthaltenen Partikel, mit einem Deckel zum flüssigkeitsdichten Verschließen des Probenbehälters; einer Messzelleneinheit (4), welche mit dem Probenbehälter über einen Abfluss in Fluidverbindung steht, welche Messzelleneinheit einen flüssigkeitsleitenden Kanal aufweist, wobei mindestens eine Kanalwand zumindest teilweise transparent ausgebildet ist; einer Trägereinheit (10), welche Mittel zum kontaktlosen Transport und/oder Aufkonzentrierung von in der Probenflüssigkeit enthaltenen markierten Partikeln aufweist; sowie mit einer optischen Einheit (20) zur spektroskopischen und/oder mikroskopischen Erfassung der markierten Partikel, mit mindestens einer Lichtquelle (19, 21) zum Anregen der markierten Partikel in der Probe.



Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft ein Analysegerät mit einer Probenbehältereinheit aus einem Probenbehälter zur Aufnahme einer im Wesentlichen flüssigen Probe und Markierung der in der Probe enthaltenen Partikel, mit einem Deckel zum flüssigkeitsdichten Verschließen des Probenbehälters; einer Messzelleneinheit, welche mit dem Probenbehälter über einen Abfluss in Fluidverbindung steht, welche Messzelleneinheit einen flüssigkeitsleitenden Kanal aufweist, wobei mindestens eine Kanalwand zumindest teilweise transparent ausgebildet ist und eine spektroskopische und/oder mikroskopische Beobachtungskammer bildet; sowie mit einer optischen Einheit zur spektroskopischen und/oder mikroskopischen Erfassung der markierten Partikel, mit mindestens einer Lichtquelle zum Anregen der markierten Partikel in der Probe. Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zum Analysieren einer im Wesentlichen flüssigen Probe unter Verwendung des zuvor genannten Gerätes mit darin frei beweglichen Partikeln.

[0002] Es ist bekannt, Partikel, wie beispielsweise Zellen, in Flüssigkeiten fluoreszenzspektroskopisch zu analysieren. Im Folgenden umfasst der Begriff Partikel biologische Zellen verschiedener Herkunft oder gegebenenfalls Feststoffe oder Moleküle. Für die Analyse werden flüssige Proben mit einem Farbstoff, z.B. mit einzelnen proteomischen Markern, versetzt, die sich an den Partikeln in der Probe anlagern. Es ist auch bekannt, mit diesen Verfahren die Erkennung und Quantifizierung von Tumorzellen in verschiedenen Körperflüssigkeiten, z.B. in Harn, vorzunehmen. Die bekannten Verfahren besitzen die Nachteile, dass sie länger als 50 Minuten dauern, bis ein aufbereitetes Probenpräparat vorliegt und viele einzelne Arbeitsschritte benötigt werden, die nur vom Fachpersonal durchgeführt werden können. Ferner ist dabei der Einsatz unterschiedlichster Geräte erforderlich, deren Bedienung ebenfalls besonders geschultes Personal erfordert.

[0003] Die US 2005/0105077 A1 beschreibt ein Analysesystem für biologische Partikel durch Fluoreszenzdetektion. Die Probe, die sich bevorzugt in einem Einwegbehälter befindet, wird in das Analysegerät eingeschoben, die Partikel gegebenenfalls (magnetisch) markiert und bei Durchgang durch einen Kanal spektroskopisch erfasst. Nachteilig bei dieser Lehre ist, dass das Gerät aufgrund hoher Erfordernisse bei der Platzeinsparung so einfach ausgeführt sein muss, dass sich die Probe nicht immer gleichmäßig durchmischt und auf Umweltfaktoren, die die Messung beeinflussen können, keine Rücksicht genommen werden kann. Die Messergebnisse werden dadurch ungenau.

[0004] Die US 2002/0033939 A1 bezieht sich auf ein Analysegerät, in dem die zu analysierenden Partikel zu deren besserer Detektierbarkeit einer hydrodynamischen Fokussierung unterzogen werden. Auch in diesem Dokument wird vorgeschlagen, die zu analysierenden Partikel vor der Detektion zu markieren.

[0005] Die WO 2001/086285 A2 betrifft ein Nachweisverfahren für Partikel, wie beispielsweise Zellen, im Rahmen dessen die Probe mit einem Farbstoff oder mit einem magnetischen Agens markiert wird und bei Durchleiten derselben durch einen Mikrokanal spektroskopisch erfasst wird. Vorgeschlagen wird weiters, die Partikel vor Durchfluss durch den Mikrokanal durch z.B. Anlegen eines elektrischen Feldes zu konzentrieren. Ferner können im besagten Verfahren Heiz- oder Kühleinrichtungen verwendet werden.

[0006] Nachteilig bei den beiden vorgenannten Lehren ist, dass die jeweiligen Geräte als einfache Laborinstrumente offenbart sind, in welchen auf die Durchmischung der Probe nicht mit besonderen Mitteln eingewirkt wird, und auf Umweltfaktoren, die die Messung beeinflussen können, ebenso wenig Rücksicht genommen wird. Auch hier geraten die Messergebnisse somit ungenau.

[0007] In der EP 1203944 A1 wird eine Tumorzellenidentifizierungsvorrichtung beschrieben, die aus einem, gegebenenfalls mit einem lichtundurchlässigen Deckel versehenen Probeaufnahmebehälter besteht, der sich zur Messkammer hin verjüngt. Die Tumorzellen werden mit Protoporphyrin angereichert und im Anschluss daran mit Licht einer Wellenlänge von im Wesentlichen 400 nm bestrahlt. Diese Lehre geht auf Problematiken hinsichtlich der Messgenauigkeit

nicht ein.

[0008] Die EP 1262776 A2 offenbart ein Verfahren zum Nachweis epithelialer Tumorzellen, im Rahmen dessen in einer Körperflüssigkeit enthaltene Tumorzellen mit magnetischen Partikeln markiert und angereichert sowie im Anschluss daran mittels Laser-Scanning-Cytometrie erfasst werden. Auch in dieser Lehre sind technische Lösungen für eine Erhöhung der Messgenauigkeit nicht enthalten.

[0009] Die Erfindung zielt darauf ab, ein Analysegerät sowie ein Verfahren zu schaffen, welche es ermöglichen, die Analysezeit zum quantitativen und qualitativen Erkennen vorbestimmter Partikel in einer Flüssigkeit gegenüber bekannten Verfahren zu verkürzen und somit wirtschaftlicher zu machen. Ein weiteres Ziel besteht darin, die Analyse einfach und zuverlässig ausführbar und das Ergebnis visuell erfahrbar zu machen.

[0010] Das erfindungsgemäße Analysegerät erreicht dies dadurch, dass es eine Trägereinheit aufweist, welche mindestens einen Temperatursensor enthält, sowie dass zwischen dem Eingang des flüssigkeitsleitenden Kanals und der spektroskopischen und/oder mikroskopischen Beobachtungskammer eine Mischkammer angeordnet ist, und wobei im flüssigkeitsleitenden Kanal Barrieren oder Blenden zur Bündelung der markierten Partikel angeordnet sind.

[0011] Das erfindungsgemäße Verfahren erreicht dies dadurch, dass es die Schritte umfasst: a) Markierung der Partikel mit einem Farbstoff und/oder magnetischen Agenzien, b) räumliche Bündelung der markierten Partikel, gegebenenfalls strömungsmechanisch durch Barrieren oder Blenden und/oder unter Erzeugung eines Magnetfeldes zur räumlichen Bündelung magnetisch sensitiver Partikel und/oder Sedimentation, und c) Durchführung einer spektroskopischen und/oder mikroskopischen Analyse der in der Probe enthaltenen Partikel.

[0012] Die vorliegende Erfindung ermöglicht bei kurzer Inkubationsdauer von 5 bis 10 Minuten eine hohe Treffsicherheit, d.h. eine Sensitivität und Selektivität > 95 %, insbesondere auch bei einer Erkrankung im Frühstadium.

[0013] Das erfindungsgemäße Analysegerät weist einen kompakten Aufbau mit kurzen Fluidkanälen auf, sodass nur geringe Volumina von Agenzien und Probeflüssigkeiten benötigt werden, wodurch u.a. die Analysekosten gesenkt werden können.

[0014] Das erfindungsgemäße Analysegerät und das mit diesem Analysegerät durchgeführte Verfahren ermöglichen insbesondere eine rasche und objektivierte computerunterstützte Erkennung von krankhaft veränderten Partikel, insbesondere in Körperflüssigkeiten, wie Harn oder Sputum, aber auch von Partikel in Blut und aus Zellsuspensionen von Geweben. Das erfindungsgemäße Analysegerät sowie das erfindungsgemäße Verfahren kann zur zytologischen Erkennung von Krebserkrankungen, bei Dopingkontrollen oder zur Zählung von Partikel und Bakterien in vorteilhafter Weise angewandt werden.

[0015] Eine bevorzugte Ausführungsform zeichnet sich dadurch aus, dass der Deckel des Probenbehälters aus einem aufschraubbaren äußeren Deckelteil und einen über eine Sollbruchstelle damit verbundenen mittleren Deckelteil gebildet ist, wobei der Außendurchmesser des mittleren Deckelteils näherungsweise dem Innendurchmesser des Probenbehälters entspricht, sodass der mittlere Deckelteil formschlüssig in den Probenbehälter absenkbar ist.

[0016] Eine weitere bevorzugte Ausführungsform zeichnet sich dadurch aus, dass der mittlere Deckelteil einen in den mittleren Deckelteil hinein bewegbaren inneren Deckelteil umfasst und zwischen der Unterseite des inneren Deckelteils und einer sich zwischen der Unterkante des mittleren Deckelteils erstreckenden Folie ein Hohlraum zur Aufnahme der Agenzien zur Markierung der Partikel in der Probe ausgebildet ist.

[0017] Eine weitere bevorzugte Ausführungsform zeichnet sich dadurch aus, dass in dem Hohlraum zusätzlich vorgespannte Elemente vorgesehen sind, welche im ausgelösten Zustand vorzugsweise in die Probe eintauchen.

[0018] Eine weitere bevorzugte Ausführungsform zeichnet sich dadurch aus, dass Ventile am Eingang und am Ausgang des flüssigkeitsleitenden Kanals angeordnet sind.

[0019] Eine weitere bevorzugte Ausführungsform zeichnet sich dadurch aus, dass abflusseitig der spektroskopischen und/oder mikroskopischen Beobachtungskammer im flüssigkeitsleitenden Kanal ein Filter angeordnet ist.

[0020] Eine weitere bevorzugte Ausführungsform zeichnet sich dadurch aus, dass die Probenbehältereinheit und die Trägereinheit lösbar miteinander verbunden sind.

[0021] Eine weitere bevorzugte Ausführungsform zeichnet sich dadurch aus, dass die Probenbehältereinheit durch Formelemente ausrichtungsselektiv mit der Trägereinheit verbunden werden kann, wobei die Trägereinheit gegenstückige Mittel aufweist.

[0022] Eine weitere bevorzugte Ausführungsform zeichnet sich dadurch aus, dass die Formelemente als ein Satz von mindestens zwei Löchern mit unterschiedlichen Innendurchmessern ausgebildet sind.

[0023] Eine weitere bevorzugte Ausführungsform zeichnet sich dadurch aus, dass die Lichtquelle durch mindestens eine LED, die im wesentlichen monochromatisches Licht aussendet, gebildet ist und dass das Licht mittels eines in der Trägereinheit integrierten Lichtwellenleiters zur spektroskopischen und/oder mikroskopischen Beobachtungskammer geleitet wird.

[0024] Eine weitere bevorzugte Ausführungsform zeichnet sich dadurch aus, dass die Trägereinheit mindestens ein Spulensystem zur Erzeugung von Magnetfeldern aufweist, durch welche magnetisch sensitive Partikel in der Probe räumlich bündelbar oder verteilbar sind.

[0025] Eine weitere bevorzugte Ausführungsform zeichnet sich dadurch aus, dass die Trägereinheit ferner zumindest ein Heizelement zum Erhitzen der Probe vor und/oder nach dem Analyseort aufweist.

[0026] Eine weitere bevorzugte Ausführungsform zeichnet sich dadurch aus, dadurch gekennzeichnet, dass die Trägereinheit einen flüssigkeitsleitenden Kanal in Flussrichtung gesehen hinter der Beobachtungskammer aufweist.

[0027] Schließlich zeichnet sich eine weitere bevorzugte Ausführungsform dadurch aus, dass die Trägereinheit Sensoren zur Ermittlung weiterer Probenparameter aufweist.

[0028] Eine bevorzugte Ausführungsform des Verfahrens zeichnet sich dadurch aus, dass es nach der Analyse der Probe den Schritt umfasst: Zurückspülen des partikulären Anteils wie auch der Probenflüssigkeit gefolgt von einer Reinigungslösung in den Probenbehälter und/oder Desinfizieren der Trägereinheit.

[0029] Die Erfindung wird nachstehend anhand von in den Zeichnungen dargestellten Ausführungsbeispielen näher erläutert. Es zeigen:

[0030] Fig. 1a bis 1f einen Längsschnitt durch eine Probenbehältereinheit aus einem Probenbehälter mit einem Deckel und einer Messzelleneinheit in verschiedenen Stadien des Analyseverfahrens,

[0031] Fig. 2 eine schematische Querschnittsansicht einer Messzelleneinheit,

[0032] Fig. 3 eine schematische Ansicht einer Kombination aus einer Trägereinheit und einer optischen Einheit,

[0033] Fig. 4a bis 4e eine schematische Darstellung einer Steckverbindung und

[0034] Fig. 5 eine schematische Darstellung des Analysegerätes.

[0035] Einen ersten Funktionsteil des Analysegeräts stellt die in Fig. 1a dargestellte Probenbehältereinheit (1) dar, welche im Wesentlichen aus drei Funktionsgruppen: einem Probenbehälter 2, einem Deckel 3 und der mit dem Behälterboden z.B. durch Aufstecken verbindbaren, getrennt dargestellten Messzelleneinheit 4 besteht.

[0036] Die Funktion des Probenbehälters 2 ist die Aufnahme der zu untersuchenden, im Wesentlichen flüssigen Probe, insbesondere während der Markierung der darin enthaltenen Partikel. Der Probenbehälter weist in seinem Boden einen Abfluss 43 auf, durch den die Probe zur

Analyse aus dem Probenbehälter 2 in die Messzelleneinheit 4 gelangt.

[0037] Entsprechend der gewünschten Analysenaufgabe können im Deckel 3 des Probenbehälters 2, gegebenenfalls in sektoral voneinander getrennten Kammern, gewünschtenfalls versiegelt, die für die Analyse erforderlichen Agenzien 5, zum Beispiel ein Farbstoff, und/oder magnetische Beads, gegen Umwelteinflüsse und Alterung geschützt, eingelagert sein. In den Probenbehälter können formschlüssig Einsetzelemente eingelegt werden (nicht gezeigt), die beispielsweise einer Vorfiltration zur Vermeidung von Verstopfungen des Abflusses 43 zur Messzelleneinheit 4 durch grobe Verunreinigungen (Nierensteinfragmente, Gewebeverschorungen von OPs) und oder als Depot für zusätzliche Agenzien dienen. Alternativ zu den Einsetzelementen können Steckelemente (nicht gezeigt) gleicher Funktionalität über die Verbindungsstifte 6 formschlüssig, nicht lösbar und flüssigkeitsdicht äußerlich mit dem Behälterboden verbunden werden. Diese Steckelemente verfügen an ihrer Unterseite Anschlussmöglichkeiten für die Messzelleneinheit 4. Als Übersetzungsstücke (Adapter) können diese Steckelemente eine Verbindung zwischen modifizierten Bauformen der Messzelleneinheit 4 mit dem Probenbehälter ermöglichen.

[0038] Die in Fig. 2 gezeigte Messzelleneinheit 4 wird über Verbindungsstifte 6 mit dem Probenbehälterboden über Löcher 53 mit zwei Einrastpositionen verbunden, wobei eine Fluidverbindung zwischen dem Abfluss 43 und einem in der Messzelleneinheit vorgesehenen flüssigkeitsleitenden Kanal 49 hergestellt wird, und enthält entsprechend der Analysenaufgabe funktionelle Komponenten zur Zellanalyse, die entlang des flüssigkeitsleitenden Kanals 49 angeordnet sind. Diese Komponenten sind u.a. eine Mischkammer 7, eine spektroskopische und/oder mikroskopische Beobachtungskammer 8, welche gegebenenfalls zur Sedimentation dient, und ein Filter 9 zum Filtern von Partikeln.

[0039] Die Messzelleneinheit 4 weist zudem Ventile 42 und 44 auf, um den Fluss der Probe während der Analyse zu steuern. Am Boden der Beobachtungskammer 8 befindet sich ein transparentes Fenster 45, um die Probe spektroskopisch und/oder mikroskopisch, bevorzugt fluoreszenzspektroskopisch und/oder fluoreszenzmikroskopisch untersuchen zu können.

[0040] Die Probenbehältereinheit 1 ist vorzugsweise als Kunststoff-Einwegteil ausgeführt. Jede Probe erfordert in diesem Fall eine eigene Probenbehältereinheit. Ihre Teilkomponenten erfüllen mikrofluidische Funktionen zur Abtrennung der in der Flüssigkeit vorhandenen Partikel, enthalten aber vorzugsweise keine Sensoren. Der partikuläre Anteil der Probe verbleibt vor, während und auch nach der Analyse immer innerhalb der Messzelleneinheit 4 der Probenbehältereinheit 1 und kann mit dieser nach der erfolgten Analyse fachgerecht entsorgt werden.

[0041] Vor dem Einsetzen der Probenbehältereinheit 1 in eine Trägereinheit 10 (Fig. 3 und Fig. 5) bleibt die Fluidverbindung zwischen dem Probenbehälter 2 und der damit verbundenen Messzelleneinheit 4, z.B. durch ein Siegel, geschlossen.

[0042] Einen weiteren Funktionsteil des Analysegerätes stellt die in den Fig. 3 und 5 dargestellte Trägereinheit 10 dar, auf welche die Probenbehältereinheit 1 aufgesetzt wird. Diese dient vor allem als Träger von Komponenten, welche im Zusammenwirken mit der Messzelleneinheit 4 eine fluoreszenzspektroskopische und/oder fluoreszenzmikroskopische Analyse des partikulären Anteils der Probe unterstützen, indem sie den Transport, die Aufkonzentrierung und die Umgebungsbedingungen der zu bestimmenden Partikel steuern. Dazu können in dieser Trägereinheit je nach Ausführungsform Komponenten wie Temperatursensoren 11, Strömungssensoren 12 zur Erfassung von Durchflussraten, Piezoaktuatoren 13 für eine Autofocus-Funktion eines optischen Teils oder auch zur Generierung eines Ultraschallfeldes, Spulensysteme 14 zur Erzeugung magnetischer Felder, elektromechanische oder pneumatische Geber für Ventile der Messzelleneinheit 4, Elemente zur Kühlung oder Temperierung der Messzelleneinheit 4 sowie des Spulensystems 14 integriert werden.

[0043] Insbesondere für die Analyse komplexerer Körperflüssigkeiten, die viele verschiedene Partikel enthalten, ist eine selektive Abtrennung von Zielzellen in der Beobachtungskammer erforderlich, da in solchen Fällen eine einfache Sedimentation durch Schwerkraft nicht zielfüh-

rend ist. Die Zellabscheidung kann dabei feldinduziert, z.B. durch magnetische Felder, bewirkt oder unterstützt werden. Dazu weist die Trägereinheit bevorzugt steuerbare magnetische Spulensysteme 14 auf. Diese Spulensysteme 14 können, in einem Array angeordnet, beliebig zu- und abgeschaltet werden, womit magnetische Wechselfelder zur kontrollierten Durchmischung, aber auch Felder zur Immobilisierung von mit magnetischen Beads behafteten Partikeln erzeugt werden.

[0044] Vorteilhafterweise sind die steuerbaren magnetischen Spulensysteme 14 sowohl oberhalb als auch unterhalb der Messzelleneinheit 4 der Probebehältereinheit 1 angeordnet. Dazu ist zwischen die Probenbehältereinheit 1 mit aufgesteckter Messzelleneinheit 4 eine Ausnehmung 41 vorgesehen, welche einen Steg 18 der Trägereinheit 10, in welchem Spulensysteme 14 vorgesehen sind, aufnimmt. Dieser Steg 18 der Trägereinheit 10 kann zur Unterstützung der Sedimentation der Zellen oder Partikel optional als Modul in das Analysegerät integriert werden.

[0045] Die Trägereinheit 10 ist bevorzugt für den Dauerbetrieb ausgelegt. Dabei kommt bevorzugt keramische Mehrlagenschaltungstechnologie zum Einsatz, welche dem Fachmann bekannt ist. Dadurch können beispielsweise die in den Fig. 3 und 5 gezeigten Spulensysteme 14 integriert hergestellt werden, die mit Strömen von bis zu 10 Ampere durchflossen werden, wodurch stärkere magnetische Kräfte in der Größenordnung von nano-Newton für das Steuern der magnetisch markierten Partikel zur Verfügung stehen. Bevorzugt können ferritische Folien mit einer relativen magnetischen Permeabilität von 100 bis 400 im linearen Bereich eingesetzt werden, womit das magnetische Feld gezielt in das Probemedium fokussiert werden kann.

[0046] Die Keramik gestattet durch geeignete Anordnung der Komponenten auch eine Abführung der entstehenden Wärme. In die Trägereinheit 10 kann auch ein Temperiersystem in Form von Heizelementen 15 mit Temperatursensoren integriert werden, da dadurch die Aktivität der Partikel oder Zellen erhalten bleibt und die Empfindlichkeit des gesamten Analysesystems erhöht werden kann. Heizelemente 15 können auch in Bereichen von in der Trägereinheit 10 vorgesehenen flüssigkeitsleitenden Kanälen 54 zur Weiterleitung oder Ableitung der Probeflüssigkeiten vorgesehen sein, um eine thermische Sterilisierung dieser Kanäle zu ermöglichen.

[0047] Neben den vorstehend genannten Komponenten der Trägereinheit 10 können in einem wahlweisen Analyseabschnitt 16 weitere Sensoren 17 zur Bestimmung zusätzlicher Parameter, wie beispielsweise der flüssigen Anteile der Probe, zur Bestimmung von deren pH-Wert, Ammoniakgehalt und/oder Proteingehalt in die Trägereinheit variabel integriert werden.

[0048] Einen weiteren Funktionsteil des Analysegeräts stellt eine optische Einheit 20 dar, wie sie in den Fig. 3 und 5 gezeigt ist. Diese dient zur Detektion der markierten Zielzellen in der Messzelleneinheit 4 sowie wahlweise zur Anregung der markierten Zielzellen. Dazu besteht die optische Einheit 20 in herkömmlicher Bauweise aus einer LED 21 als Anregungsquelle, einen Kollimator 22 zur Parallelrichtung der Strahlung, einer Blende 23, einem Anregungsfilter 24, einem dichroitischen Strahlteiler 25, welcher Wellen der Anregungsfrequenz reflektiert und Wellen der Emissionsfrequenz in Richtung einer Kamera 26 transmittieren lässt, einem Mikroskopobjektiv 27, einem Emissionsfilter 28, einer plankonvexen Sammellinse 29 und schließlich einer geeigneten Kamera 26. Diese optische Funktionsgruppe kann aus Standardkomponenten zusammengesetzt werden. Die weitere Auswertung kann computergestützt erfolgen, wozu ein entsprechendes elektronisches Gerät 55 vorgesehen ist.

[0049] Alternativ kann die Anregung jedoch auch durch eine optisch schmalbandig emittierende, bevorzugt monochromatische LED 19 über einen Lichtwellenleiter 30 über die Trägereinheit 10 mittels spezieller Brechungsindex gesteuerter Lichtführung, wie ebenfalls in Fig. 3 gezeigt, erfolgen.

[0050] Nachstehend wird das Messverfahren unter Verwendung des erfindungsgemäßen Analysegeräts ebenfalls unter Bezugnahme auf die Zeichnungen näher erläutert. Zu Beginn liegt, wie in Fig. 1b gezeigt, eine mit der Probe versehene Probebehältereinheit 1 mit verschlossenem Deckel 3, aufgesteckter Messzelleneinheit 4 vor. Ein Siegel 57 ist noch verschlossen, und die Messzelleneinheit durch Federzungen 33 vom Behälterboden beabstandet. Anschließend

wird gemäß Fig. 1c ein innerer Deckelteil 36 in einen mittleren Deckelteil 47 geschraubt, wodurch sich eine Folie 35 öffnet, die Agenzien 5 in die Probe fallen und diese inkubieren.

[0051] Zur Durchführung des Messverfahrens wird die Probenbehältereinheit 1 in verwechslungsfreier bzw. ausrichtungsselektiver Lage gemäß den Fig. 4a bis 4e und 5 auf gegenstückige Mittel 31 etwa in Form von tragfähigen Führungsstiften der Trägereinheit 10 aufgeschoben. In den Fig. 4a bis 4e sind die gegenstückigen Mittel 31 in ihrem Querschnitt dargestellt, die in entgegengesetzte Formelemente 52 in Form von Löchern in den Probenbehälter 2 während des Aufschiebens eingreifen. Dieses Aufschieben knickt gemäß Fig. 4b Sollknickzonen 32 jener Federungen 33, welche als Distanzhalter eine unbeabsichtigte Fluidverbindung der am Behälterboden aufgesetzten Messzelleneinheit 4 mit dem Probenbehälter 2 verhindert. Nach dem Aufschieben kann der Probenbehälter 2 bis zum Ende des Messvorgangs gemäß Fig. 4c und 4d nicht abgezogen werden. Die gegenstückigen Mittel 31 mit keilförmiger Aussparung 34 verhindern in Einheit mit den geknickten Federungen 33 am Behälterboden ein Lösen des Probenbehälters 2, beispielsweise mittels Widerhaken. Die gegenstückigen Mittel 31 sind gemäß Fig. 4e um ihre Längsachse drehbar ausgeführt.

[0052] Nach Einleiten der Inkubation werden die gegenstückigen Mittel 31, auf welchen der Probenbehälter 1 arretiert ist, zusammen mit dem oberen Teil der Trägereinheit 10 gemäß Fig. 4c und 4d abgesenkt. Dadurch wird die Messzelleneinheit 4, welche als erster Teil der Probenbehältereinheit 1 fest auf der Trägereinheit 10 aufsitzt, in der Folge gegen die obere Trägereinheit 10 sowie den Behälterboden 1 gedrückt, sodass gemäß Fig. 4d das Übergangsstück 56 der Messzelleneinheit 4 das Siegel 57 des Behälterbodens durchstößt (siehe auch Fig. 1d). Dabei rastet die durch die Verbindungsstifte 6 hergestellte Verbindung zwischen Probenbehälter 2 und Messzelleneinheit 4 unlösbar ein. Durch Niederdrücken der Messzelleneinheit 4 gegen die untere Trägereinheit 10 oder zusätzlich durch Schalten des Ventils 42 wird gleichzeitig eine Fluidverbindung zwischen dem Ausgang der Messzelleneinheit 4 und dem Eingang zur Trägereinheit 10 geöffnet. Beim Einfahren des als Stempel wirkenden mittleren Deckelteils 48 und des inneren Deckelteils 36 wird die Probeflüssigkeit mechanisch in die Messzelleneinheit 4 gepresst.

[0053] Der Probenbehälter 2 übernimmt während des Messvorganges die Funktion einer Perfusionskartusche. Der Deckel 3 wirkt gemäß Fig. 1d als Stempel. Er ist zu diesem Zweck aus einem äusseren Deckelteil 46 und einem mittleren Deckelteil 48 aufgebaut, die gemäß Fig. 1a bis 1c über eine Sollbruchstelle 47 miteinander verbunden sind. Zunächst wird via Perfusor-Spindeltrieb ein innerer Deckelteil 36 bis zum Anschlag eingeschraubt, was die versiegelnde Folie 35 öffnet. Im Probenbehälter 2 wird die Probenflüssigkeit mit dem Farbstoff 5 und erforderlichenfalls mit magnetischen Beads inkubiert. Über Widerhaken sind ab dieser Phase mittlerer Deckelteil 48 und innerer Deckelteil 36 flüssigkeitsdicht gegen Wiederaufschrauben gesichert. Ein weiteres Einschrauben lässt die Sollbruchstelle 47 brechen und senkt nun gemäß Fig. 1d den inneren Deckelteil 36 und den mittleren Deckelteil 48 gemeinsam als Stempel ab.

[0054] Die Agenzien 5 sind z.B. in fester Form im Deckel 3 enthalten, gegebenenfalls flächig auf der Folie 35 aufgebracht oder liegen als Überzug von Mischperlen vor. Alternativ im Deckelinneren verborgene, vorgespannte Elemente 37, beispielsweise aus Kunststoff, entfalten sich beim Brechen der Folie spontan und unterstützen die Durchmischung der Agenzien 5 mit der Probenflüssigkeit. Eine spezielle Geometrie der Deckelinnenseite in Form von Schaufel- oder Störklappen (nicht gezeigt) kann beim weiteren, drehenden Einfahren des Deckels 3 als Stempel die Durchmischung zusätzlich fördern. Eine allfällige im Behälter 2 vorhandene Restluft kann durch ein Entlüftungsventil 38 im Deckel 3 entweichen, welches jedoch keinen Austritt von Flüssigkeit zulässt. Ein optionales Rückspülen der Probe in den Probebehälter 2 nach der Analyse erfolgt durch Zugbelastung auf den Deckel 3, wie in Fig. 1e dargestellt. Das Entlüftungsventil 38 sperrt beispielsweise durch Einrasten eines Ventilstempels oder Schwimmkörpers.

[0055] Nach Einschrauben/Einschieben des inneren Deckelteils 36 rastet dieser im mittleren Deckelteil 48 bevorzugt ein, dass die beiden auch bei Zugbelastung, z.B. während des Rück-

spülens, nicht mehr voneinander getrennt werden können.

[0056] Die inkubierte Probenflüssigkeit gelangt während des Messvorganges in die Mischkammer 7 der Messzelleneinheit 4. Hier können über einen gegebenenfalls zweiten zuschaltbaren Einlass 51 in der Messzelleneinheit 4, wie in Fig. 2 gezeigt, weitere Agenzien bei Bedarf zugeführt werden. Die Zuführung wird wiederum durch ein Ventil 50 gesteuert. Die anschließende Mischung erfolgt durch ein kombiniertes Verfahren, einerseits strömungstechnisch durch in der Mischkammer 7 und/oder der Beobachtungskammer 8 integrierte Barrieren oder Blenden (nicht gezeigt) bei einer abgestimmten Steuerung der Durchflussrate, oder auch feldinduziert durch steuerbare Spulensysteme 14, die sich in der unterhalb bzw. oberhalb der Messzelleneinheit positionierten Trägereinheit 10 befinden.

[0057] Die so markierte und durchmischte Probe fließt zur Beobachtungskammer 8, wo die sowohl farblich und gegebenenfalls auch magnetisch markierten Partikel sedimentieren oder durch ein starkes inhomogenes Magnetfeld, hervorgerufen durch beispielsweise Neodymmagnete (nicht gezeigt) oder durch die Spulensysteme 14, gesammelt werden. Nach Abschalten des Magnetfeldes können die Partikel ebenfalls frei sedimentieren. Alternativ können die Partikel bei aufrechtem Feld durch langsames mechanisch/pneumatisch induziertes Absenken eines Beobachtungskammerdeckels 39, aus weichem und in dunkler Farbe gehaltenem Kunststoff, welcher störende Hintergrundreflexionen unterdrückt, konzentriert werden.

[0058] Die Messzelleneinheit 4 enthält einen Filter 9 zur Abtrennung von weiteren Partikel. Ein verfrühtes Verschließen der Filtermembran des Filters 9 durch Verstopfung bzw. Okklusion kann durch einen Druckanstieg in der Messzelleneinheit detektiert und durch Rückspülimpulse einerseits orthogonal durch die Filtermembran hindurch sowie vorfilterseitig tangential entlang der Filtermembran mittels einer zusätzlichen, nicht gezeigten Kanaleinheit mit Ventil unterdrückt werden. Ebenso können nach Durchströmen des gesamten Probenvolumens jene Partikel, die im Bereich der Filterkammer sedimentieren, durch einen solchen tangentiellen Gegenstrom in Richtung der Beobachtungskammer zurückgespült werden. Die Probenflüssigkeit kann gewünschtenfalls weiteren Analysen in einem Analyseabschnitt 16 unterzogen werden und wird abschließend in einer Abfalleinheit 40 zur Entsorgung gesammelt. Alternativ kann die Probenflüssigkeit im Zuge der Gerätedesinfektion in den Probenbehälter 2 zurückgespült werden. Um dies zu erreichen, wird nach der Analyse der partikuläre Anteil der Probe wie auch die Probenflüssigkeit gefolgt von einer Reinigungslösung in den Probenbehälter zurückgespült und die Trägereinheit 10 desinfiziert, wobei nach der Entnahme der geschlossene Probenbehälter 2 gefahrlos fachgerecht entsorgt werden kann. Mechanisch kann dies beispielsweise gemäß Fig. 4e durch Drehen der als Führungsstifte ausgebildeten gegenstückigen Mittel 31 und daher Aufheben der Arretierung erfolgen, und der Probenbehälter 1 kann entfernt werden.

[0059] Das Verfahren und die Komponenten der Messzelleneinheit 4, der Trägereinheit 10 sowie der optischen Einheit 20 werden bevorzugt über ein elektronisches Gerät 55, wie etwa einen Computer, gesteuert. Die qualitative und/oder quantitative Analyse der markierten Partikel oder Zellen erfolgt bevorzugt ebenfalls computerunterstützt.

[0060] Es versteht sich, dass die geschilderten Ausführungsbeispiele im Rahmen des Erfindungsgedankens verschiedentlich abwandelbar sind, z.B. hinsichtlich der verwendeten Materialien sowie der geometrischen Ausführung von Kanälen und Steckverbindungen, ohne den Rahmen der Erfindung zu verlassen.

BEZUGSZEICHENLISTE

- | | | | |
|----|-----------------------------|----|-----------------------------|
| 1 | Probenbehältereinheit | 30 | Lichtwellenleiter |
| 2 | Probenbehälter | 31 | gegenstückiges Mittel |
| 3 | Deckel | 32 | Sollknickzone |
| 4 | Messzelleneinheit | 33 | Federzungen |
| 5 | Farbstoff / Agenzien | 34 | keilförmige Aussparung |
| 6 | Verbindungsstifte | 35 | Folie |
| 7 | Mischkammer | 36 | innerer Deckelteil |
| 8 | Beobachtungskammer | 37 | vorgespanntes Element |
| 9 | Filter | 38 | Entlüftungsventil |
| 10 | Trägereinheit | 39 | Beobachtungskammerdeckel |
| 11 | Temperatursensoren | 40 | Abfalleinheit |
| 12 | Strömungssensoren | 41 | Ausnehmung |
| 13 | Piezoaktuatoren | 42 | Ventil |
| 14 | Spulensysteme | 43 | Abfluss |
| 15 | Heizelemente | 44 | Ventil |
| 16 | wahlweiser Analyseabschnitt | 45 | transparentes Fenster |
| 17 | Sensoren | 46 | äußerer Deckelteil |
| 18 | Steg | 47 | Sollbruchstelle |
| 19 | monochromatische LED | 48 | mittlerer Deckelteil |
| 20 | optische Einheit | 49 | flüssigkeitsleitender Kanal |
| 21 | LED | 50 | Ventil |
| 22 | Kollimator | 51 | zweiter Einlass |
| 23 | Blende | 52 | Formelement |
| 24 | Anregungsfilter | 53 | Loch |
| 25 | dichroitischer Strahlteiler | 54 | flüssigkeitsleitender Kanal |
| 26 | Kamera | 55 | elektronisches Gerät |
| 27 | Mikroskopobjektiv | 56 | Übergangsstück |
| 28 | Emissionsfilter | 57 | Siegel |
| 29 | plankonvexe Sammellinse | | |

Patentansprüche

1. Analysegerät mit einer Probenbehältereinheit (1) aus einem Probenbehälter (2) zur Aufnahme einer im Wesentlichen flüssigen Probe und Markierung der in der Probe enthaltenen Partikel, mit einem Deckel (3) zum flüssigkeitsdichten Verschließen des Probenbehälters (2); einer Messzelleneinheit, welche mit dem Probenbehälter (2) über einen Abfluss (43) in Fluidverbindung steht, welche Messzelleneinheit einen flüssigkeitsleitenden Kanal (49) aufweist, wobei mindestens eine Kanalwand zumindest teilweise transparent ausgebildet ist und eine spektroskopische und/oder mikroskopische Beobachtungskammer (8) bildet; sowie mit einer optischen Einheit (20) zur spektroskopischen und/oder mikroskopischen Erfassung der markierten Partikel, mit mindestens einer Lichtquelle (19, 21) zum Anregen der markierten Partikel in der Probe, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Analysegerät eine Trägereinheit (10) aufweist, welche mindestens einen Temperatursensor (11) enthält sowie dass zwischen dem Eingang des flüssigkeitsleitenden Kanals (49) und der spektroskopischen und/oder mikroskopischen Beobachtungskammer (8) eine Mischkammer (7) angeordnet ist, und wobei im flüssigkeitsleitenden Kanal (49) Barrieren oder Blenden zur Bündelung der markierten Partikel angeordnet sind.
2. Analysegerät nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Deckel (3) des Probenbehälters (2) aus einem aufschraubbaren äußeren Deckelteil (46) und einen über eine Sollbruchstelle (47) damit verbundenen mittleren Deckelteil (48) gebildet ist, wobei der Außendurchmesser des mittleren Deckelteils (48) näherungsweise dem Innendurchmesser des Probenbehälters (2) entspricht, so dass der mittlere Deckelteil (48) formschlüssig in den Probenbehälter (2) absenkbar ist.
3. Analysegerät nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass der mittlere Deckelteil (48) einen in den mittleren Deckelteil (48) hinein bewegbaren inneren Deckelteil (36) umfasst und zwischen der Unterseite des inneren Deckelteils (36) und einer sich zwischen der Unterkante des mittleren Deckelteils (48) erstreckenden Folie ein Hohlraum zur Aufnahme der Agenzien zur Markierung der Partikel in der Probe ausgebildet ist.
4. Analysegerät nach Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet**, dass in dem Hohlraum zusätzlich vorgespannte Elemente (37) vorgesehen sind, welche im ausgelösten Zustand vorzugsweise in die Probe eintauchen.
5. Analysegerät nach einem der Ansprüche 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, dass Ventile (42, 44) am Eingang und am Ausgang des flüssigkeitsleitenden Kanals (49) angeordnet sind.
6. Analysegerät nach einem der Ansprüche 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, dass abflussseitig der spektroskopischen und/oder mikroskopischen Beobachtungskammer (8) im flüssigkeitsleitenden Kanal (49) ein Filter (9) angeordnet ist.
7. Analysegerät nach einem der Ansprüche 1 bis 6, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Probenbehältereinheit (1) und die Trägereinheit (10) lösbar miteinander verbunden sind.
8. Analysegerät nach Anspruch 7, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Probenbehältereinheit (1) durch Formelemente (52) ausrichtungsselektiv mit der Trägereinheit (10) verbunden werden kann, wobei die Trägereinheit (10) gegenstückige Mittel (31) aufweist.
9. Analysegerät nach Anspruch 8, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Formelemente (52) als ein Satz von mindestens zwei Löchern mit unterschiedlichen Innendurchmessern ausgebildet sind.
10. Analysegerät nach einem der Ansprüche 1 bis 9, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Lichtquelle durch mindestens eine LED (19), die im wesentlichen monochromatisches Licht aussendet, gebildet ist und dass das Licht mittels eines in der Trägereinheit (10) integrierten Lichtwellenleiters (30) zur spektroskopischen und/oder mikroskopischen Beobachtungskammer (8) geleitet wird.

11. Analysegerät nach einem der Ansprüche 1 bis 10, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Trägereinheit (10) mindestens ein Spulensystem (14) zur Erzeugung von Magnetfeldern aufweist, durch welche magnetisch sensitive Partikel in der Probe räumlich bündelbar oder verteilbar sind.
12. Analysegerät nach einem der Ansprüche 1 bis 11, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Trägereinheit (10) ferner wenigstens ein Heizelement (15) zum Erhitzen der Probe vor und/oder nach dem Analyseort aufweist.
13. Analysegerät nach einem der Ansprüche 1 bis 12, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Trägereinheit (10) einen flüssigkeitsleitenden Kanal (54) in Flussrichtung gesehen hinter der Beobachtungskammer (8) aufweist.
14. Analysegerät nach einem der Ansprüche 1 bis 13, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Trägereinheit (10) Sensoren (17) zur Ermittlung des pH-Wertes und/oder des Ammoniakgehaltes und/oder des Proteingehaltes der Probe aufweist.
15. Verfahren zum Analysieren einer im Wesentlichen flüssigen Probe in einem Analysegerät nach einem der Ansprüche 1 bis 13 mit darin frei beweglichen Partikeln, **dadurch gekennzeichnet**, dass es die Schritte umfasst:
 - a) Markierung der Partikel mit einem Farbstoff und/oder magnetischen Agenzien,
 - b) räumliche Bündelung der markierten Partikel, gegebenenfalls strömungsmechanisch durch Barrieren oder Blenden und/oder gegebenenfalls unter Erzeugung eines zweiten Magnetfeldes zur räumlichen Bündelung magnetisch sensibler Partikel und/oder Sedimentation,
 - c) Durchführung einer spektroskopischen und/oder mikroskopischen Analyse der in der Probe enthaltenen Partikel.
16. Verfahren nach Anspruch 15, das nach der Analyse der Probe den Schritt umfasst:
Zurückspülen des partikulären Anteils wie auch der Probenflüssigkeit gefolgt von einer Reinigungslösung in den Probenbehälter und/oder Desinfizieren der Trägereinheit.

Hierzu 6 Blatt Zeichnungen

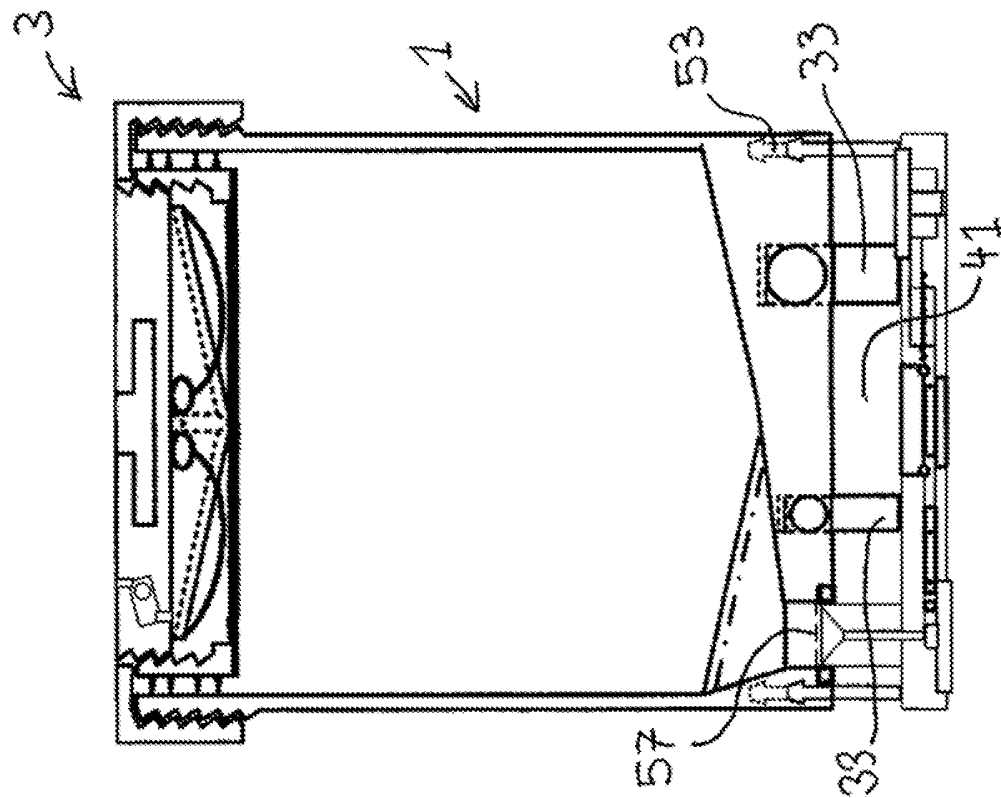


Fig. 1b

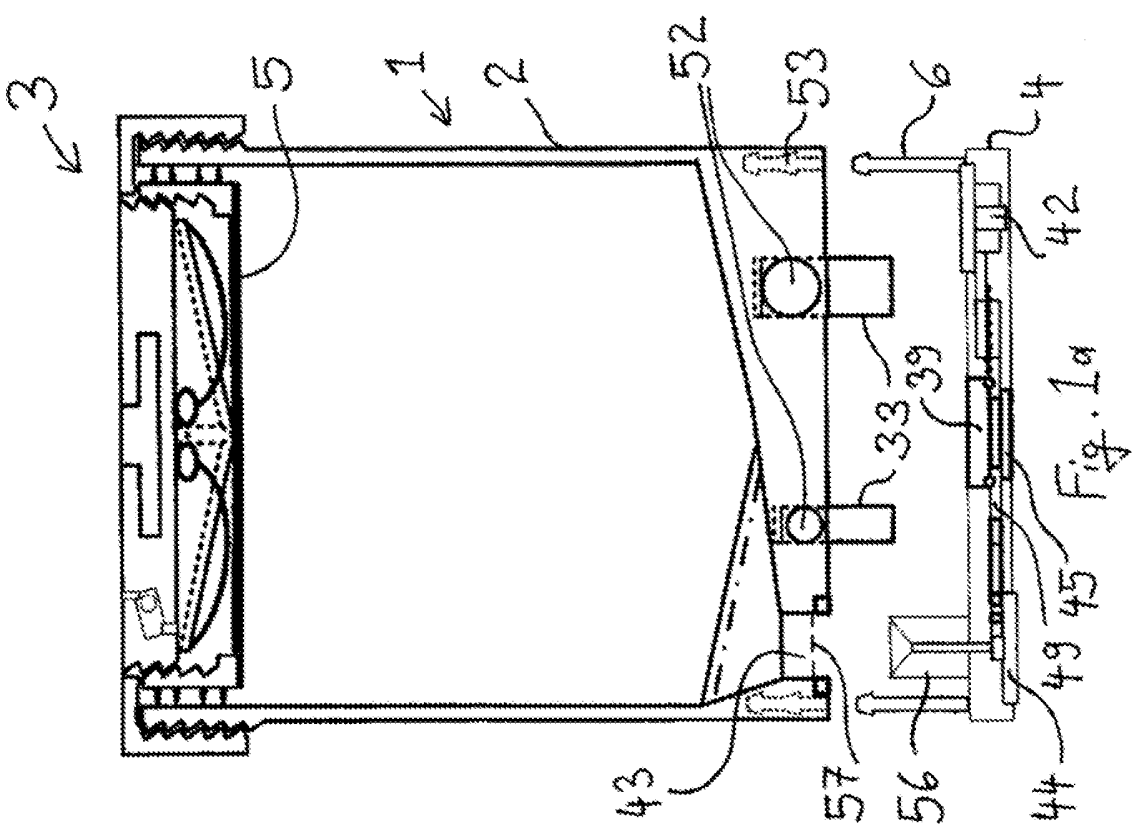


Fig. 1a

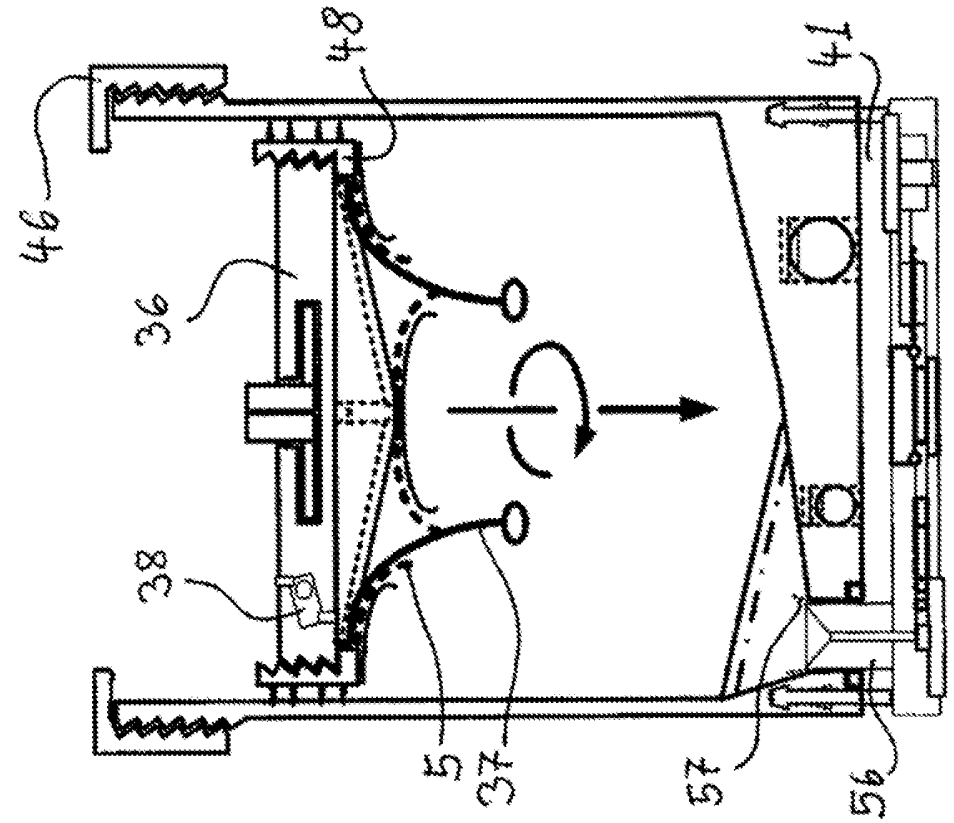


Fig. 1d

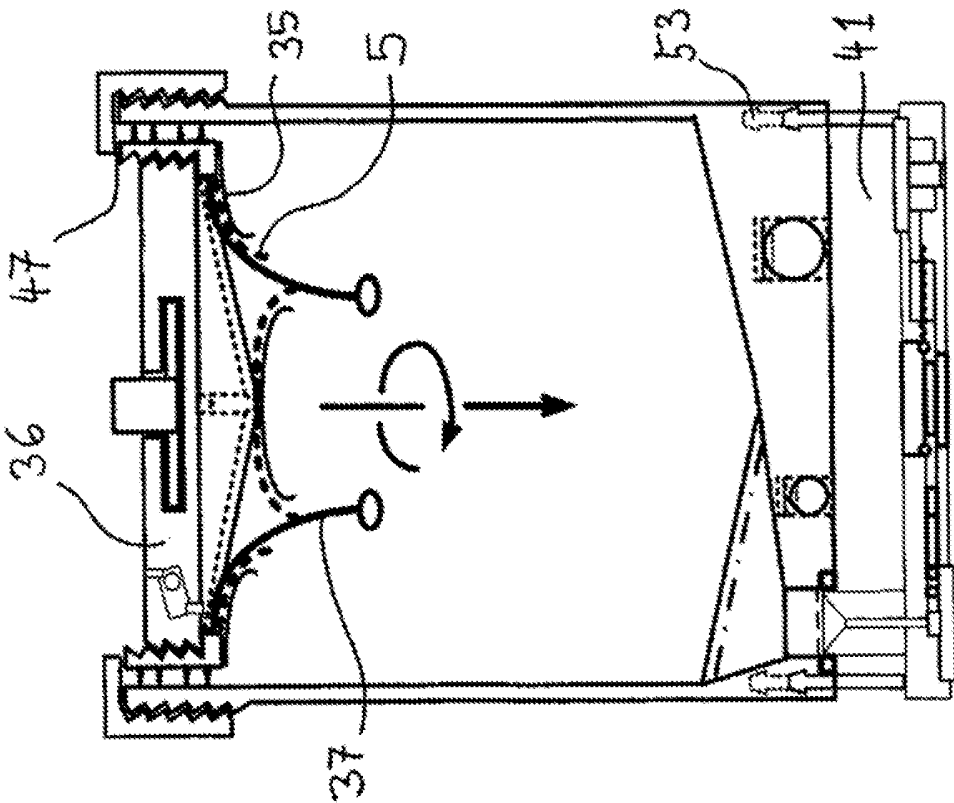


Fig. 1c

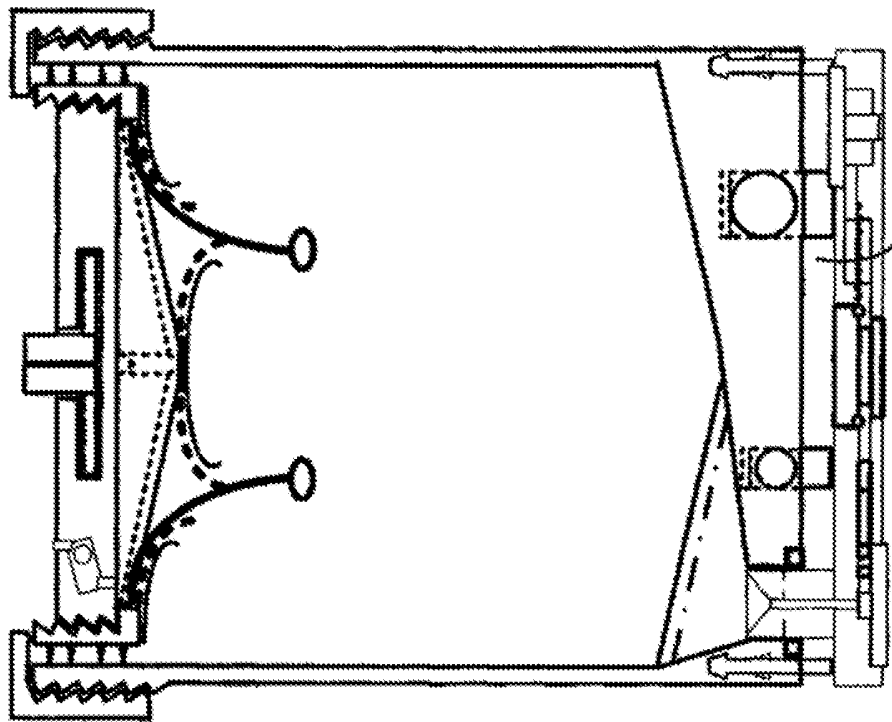


Fig. 1f

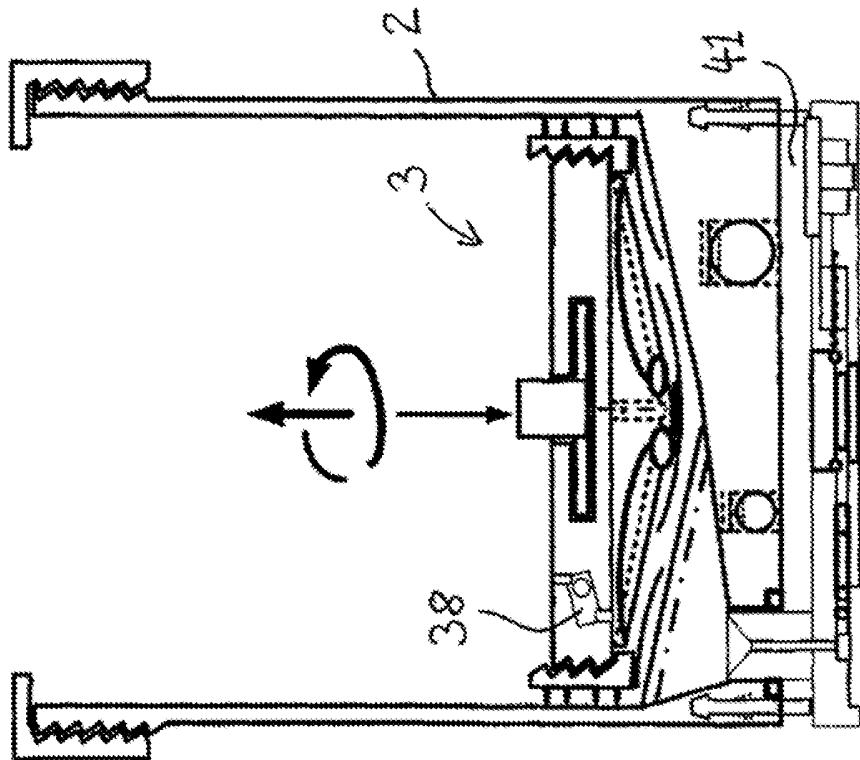


Fig. 1e

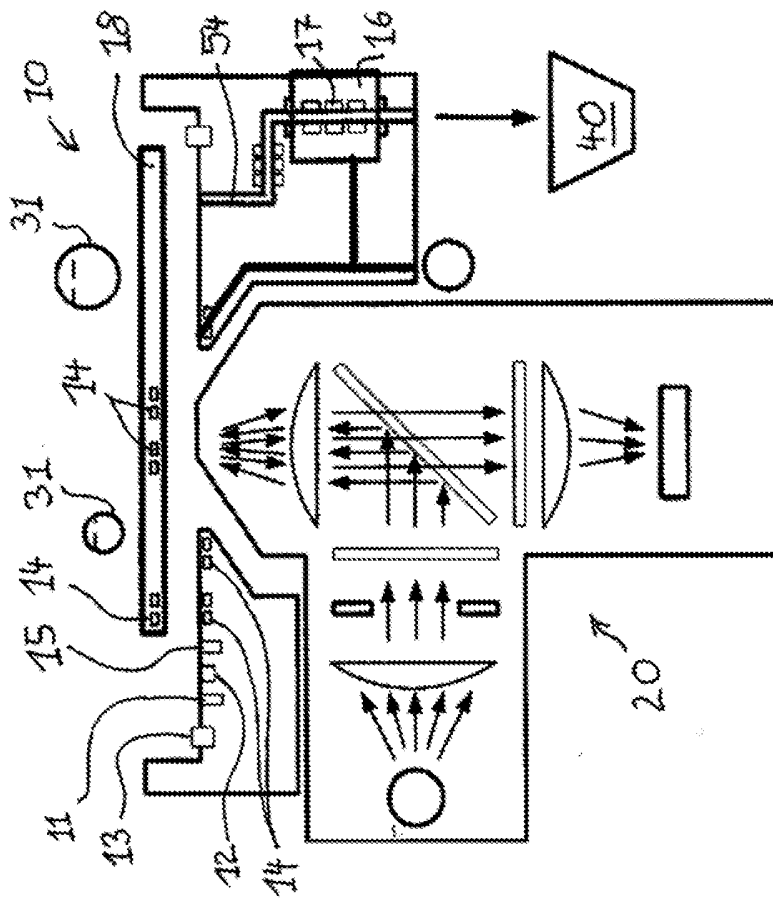


Fig. 3

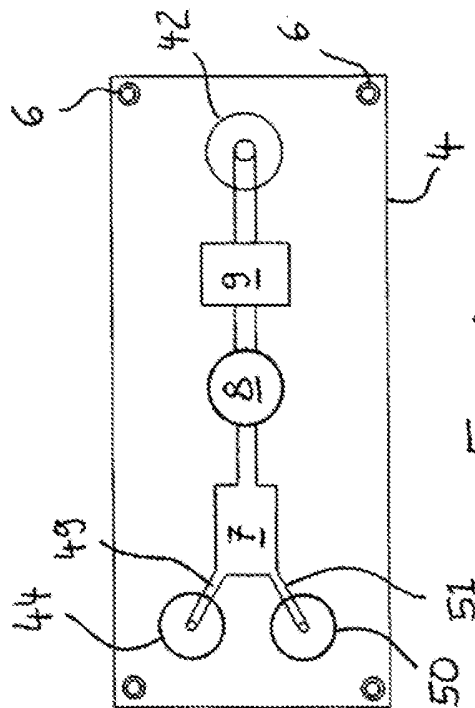


Fig. 2

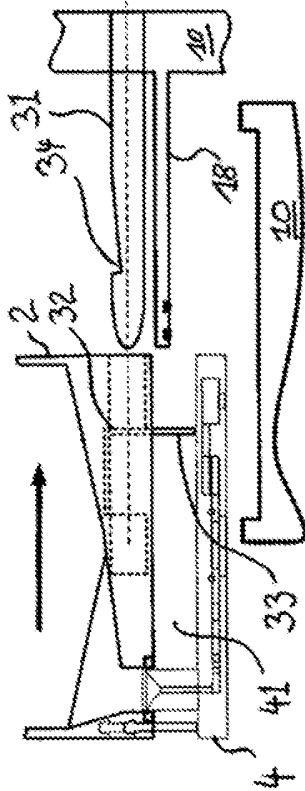


Fig. 4a

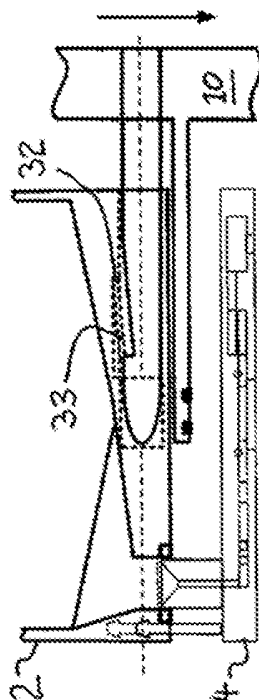


Fig. 4b

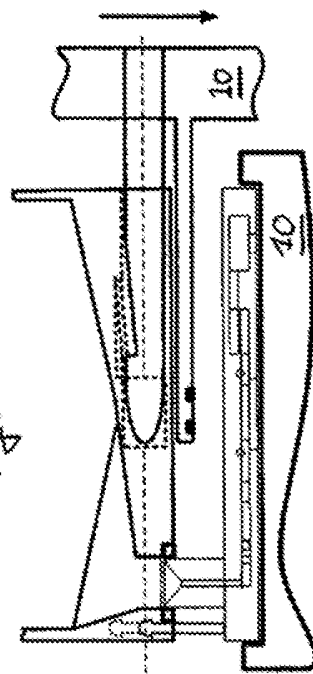


Fig. 4c

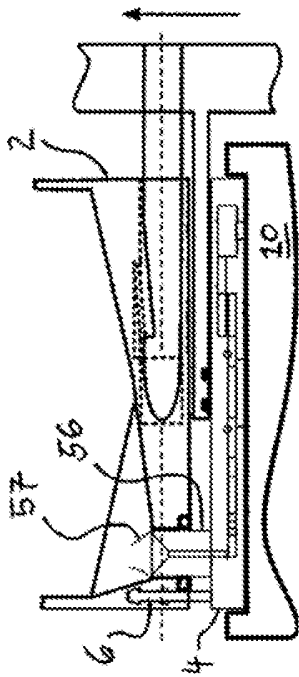


Fig. 4d

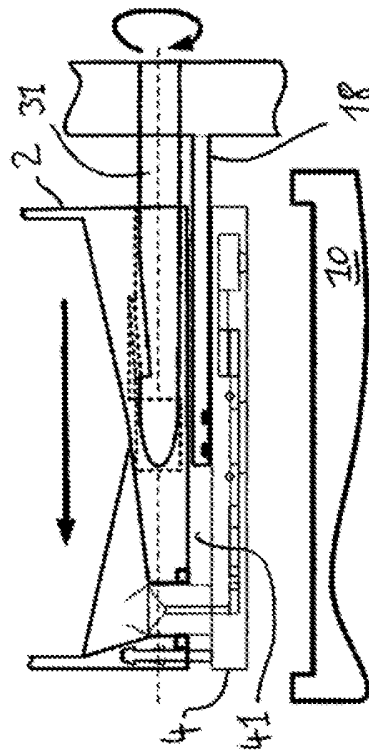


Fig. 4e

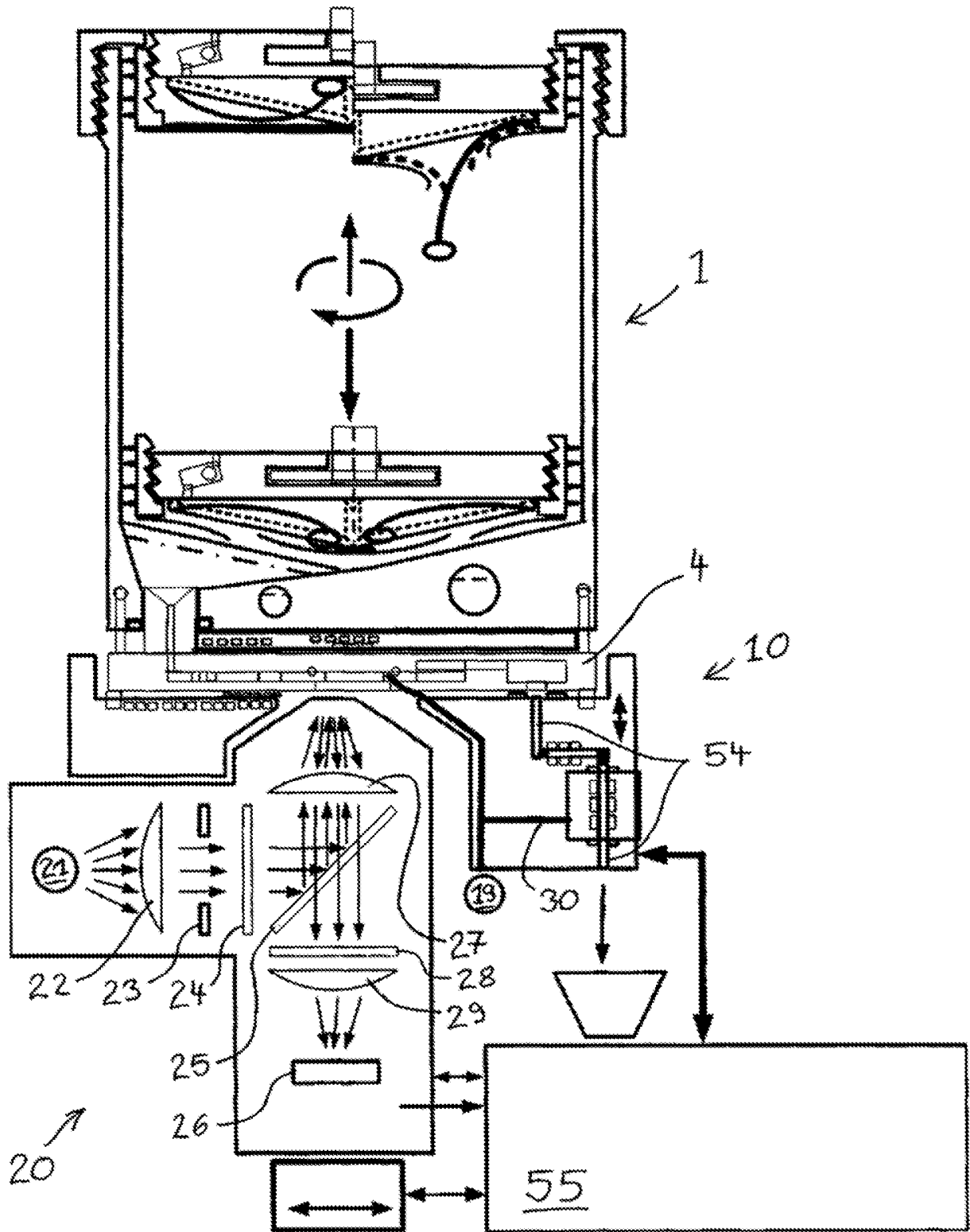


Fig. 5