



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 27 441 T2 2005.11.24**

(12)

## Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 0 895 086 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 698 27 441.5

(96) Europäisches Aktenzeichen: 98 306 131.8

(96) Europäischer Anmeldetag: 31.07.1998

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 03.02.1999

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: 10.11.2004

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 24.11.2005

(51) Int Cl.<sup>7</sup>: **G01N 33/80**

**G01N 21/82**

(30) Unionspriorität:  
**904506** 01.08.1997 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE**

(73) Patentinhaber:  
**Ortho-Clinical Diagnostics, Inc., Rochester, N.Y., US**

(72) Erfinder:  
**Shen, Jian, Princeton, New Jersey 08540, US**

(74) Vertreter:  
**BOEHMERT & BOEHMERT, 80336 München**

(54) Bezeichnung: **Nachweis von abnormen Reaktionen in einer Erythrozyten-Agglutination**

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 eingelebt, 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]** Diese Erfindung bezieht sich auf das Gebiet der Erfassung und Quantifizierung von Agglutinationen für die Klassifikation von roten Blutkörperchen und insbesondere auf ein Verfahren zum Erfassen und Kennzeichnen der häufigsten, abnormalen Reaktionen, die eine geeignete Klassifikation, die auf Agglutinationen basiert, stören. Ferner enthalten einige dieser Reaktionen selbst wichtige diagnostische Informationen.

**[0002]** Immunologische Agglutinationsreaktionen werden verwendet zum Identifizieren von Blutgruppen und Erfassen verschiedener Antikörper und Antigene in Blutproben und anderen wässrigen Medien.

**[0003]** Bei einem herkömmlichen Verfahren werden Partikel mit Bindemitteln, wie z. B. roten Blutkörperchen, mit einer Probe oder einem Reagenz in Teströhrchen oder Mikrotiterplatten gemischt und das Gemisch kann dann bebrütet und zentrifugiert werden. Verschiedene Reaktionen treten entweder ein oder treten nicht ein, abhängig von den Antigenen und Antikörpern, die in der Partikelloberfläche und den Reagenzproben vorhanden sind. Typischerweise manifestieren sich diese Reaktionen als eine Anhäufung von Zellen oder Partikel, die als Agglutination bezeichnet wird. Daher zeigt ein Fehlen von solchen Anhäufungen an, daß keine Reaktion eingetreten ist. Das Vorhandensein solcher Anhäufungen zeigt, daß eine Reaktion eingetreten ist, wobei die Größe und Menge solcher Anhäufungen ein semi-quantitativer Indikator der Menge oder Konzentration von Antigenen oder Antikörpern in der Probe oder ein Indikator der Reaktionsstärke bzw. Reaktionsaffinität des Komplexes, auf den die Blutprobe getestet wurde, ist.

**[0004]** Vor kurzem wurde eine neue Agglutinationsuntersuchung, die als Säulen-Agglutinations-Technologie (column agglutination technology-CAT) bezeichnet wird, entwickelt. Dieses Agglutinationstestverfahren verwendet eine Filtration als ein Mittel zum Trennen agglutinierter Partikel von Komponenten, die nicht reagiert haben, für Immunoassay-anwendungen. Bei diesem Verfahren befinden sich Gel- oder Glasperlen in Form von Mikropartikeln in einer kleinen Säule, die als Mikrosäule bezeichnet wird, zusammen mit einem Reagenz, wie z. B. Anti-IgG. Rote Blutkörperchen oder Partikel mit einem Bindemittel werden in einer Reaktionskammer oberhalb der Säule angeordnet. Während des Zentrifugierens werden die Zellen oder Partikel mit dem Reagenz gemischt und können in der Säule reagieren. Wenn die Reaktion eintritt, agglutinieren ein Teil oder alle Zellen und sind in dem Perlenbereich nach dem Zentrifugieren gefangen. Wenn die Reaktion nicht eintritt, werden die nicht agglutinierten Zellen an den Boden der Säule durch die Zentrifugalkraft gedrückt. Dementsprechend ist die Art und Verteilung der Partikel in der Mikrosäule nach dem Zentrifugieren eine visuelle Indikation, ob irgendeine Reaktion eingetreten ist, und, falls diese eingetreten ist, der Stärke der Reaktion.

**[0005]** Typischerweise wird eine Agglutinationsreaktion als negativ (falls keine Reaktion eingetreten ist) oder als positiv (wenn eine Reaktion eingetreten ist) bezeichnet und, falls positiv, wird die Reaktion weiter klassifiziert als eine Klasse +0,5, +1, +2, +3 oder +4-Reaktion, abhängig von der Stärke der Antigen-Antikörper-Wechselwirkung. Eine unbestimmte Reaktion liegt vor, wenn die Art der Reaktion nicht sicher klassifiziert werden kann. Bei dem CAT-Verfahren können die Klassen von Agglutinationsreaktionen auf der Basis des Verteilungsmusters der roten Blutkörperchen in der Mikrosäule bestimmt werden.

**[0006]** In der US-A-5,594,808 ist ein System und eine Software zum automatischen Klassifizieren von Agglutinationsreaktionsarten beschrieben, die in dem vorigen Absatz beschrieben wurden, die als normale Reaktionen bezeichnet werden. Dieses System und diese Software sind für die meisten Fälle ausreichend. Gelegentlich treten jedoch andere Arten von immunologischen Reaktionen mit roten Blutkörperchen ein, die in dem Rahmen dieser Erfindung als abnormal bezeichnet werden. Diese umfassen:

**[0007]** Hämolysereaktion: Bei einer Hämolysereaktion sind ein Teil oder alle roten Blutkörperchen aufgrund der Antigen-Antikörper-Reaktion aufgebrochen (hämolsiert). Sind die Zellen einmal aufgebrochen, so wird das Hämoglobin aus den roten Blutkörperchen in die Testprobe abgegeben, was zu einer Änderung der Farbe der Flüssigkeit in den roten Bereich hinein führt.

**[0008]** Reaktion im gemischten Bereich: Bei einer Reaktion im gemischten Bereich werden ein Teil der roten Blutkörperchen agglutinieren, wohingegen die übrigen roten Blutkörperchen nicht agglutinieren. Dies kann darauf hin deuten, daß die Testprobe zwei verschiedene Populationen von roten Blutkörperchen enthält, was durch eine vorhergehende Transfusion oder andere pathologische Umstände verursacht sein kann. Diese Reaktionen und andere Abnormalitäten können die Erfassung durch das System und die Software, die in dem zuvor genannten '808 Patent beschrieben sind, stören.

**[0009]** Ich habe ein Verfahren für den Umgang mit den zuvor genannten Abnormalitäten und anderen Um-

ständen, die die Erfassung, die in dem '808 Patent beschrieben ist, stören, entwickelt.

**[0010]** Insbesondere ist ein Verfahren zum Erfassen von abnormalen Reaktionen in einer Kassette, die verwendet wird, um eine Agglutination von roten Blutkörperchen zu klassifizieren, wie in Anspruch 1 definiert, bereitgestellt.

**[0011]** Ein Ergebnis dieses Verfahrens ist es, daß es möglich ist, das Verfahren vor dem Schritt des Korrelieurs d), der oben angeführt ist, anzuhalten, und, falls erforderlich, das gesamte Verfahren mit einem frischen Aliquot der Probe zu wiederholen.

**[0012]** Daher ist es ein vorteilhaftes Merkmal der Erfindung, daß die Wahrscheinlichkeiten für die Reaktionsklassifikationsroutine des '808 Patentes verringert werden, durch das Vorhandensein der angeführten Abnormalitäten falsifiziert zu werden.

**[0013]** Die europäische Patentanmeldung EP-A2-0 864 858, die Stand der Technik gemäß Artikel 54 III EPÜ ist, offenbart ein Verfahren zum Kalibrieren eines Instrumentes, das in der Lage ist, Zellagglutinationen in einer Säule zu erfassen, wobei elektronische Bildgebungsmittel und ein Abbilden des erfaßten Bildes auf eine Ausgangsantwort, die mit dem Ausmaß der Agglutination korreliert ist, verwendet werden.

**[0014]** Das Patent der Vereinigten Staaten von Amerika US 5,225,350 offenbart ein Verfahren, bei dem Bilder von Partikelmustern einer Probe optisch von einer Bildleseeinheit einer Partikelagglutinationsmusterbeurteilungsvorrichtung vermessen werden und die vermessenen Bilder der Partikelmuster von einem Datenverarbeitungskontroller abgefragt werden, um das Musterbeurteilungsverfahren auszuführen. Der Datenverarbeitungskontroller erhält vorbestimmte Parameter auf der Grundlage der Bilder der Partikelmuster, die von der Bildleseeinheit eingelesen wurden, und beurteilt automatisch eine Agglutination, Nicht-Agglutination oder nicht-identifizierte Attribute eines jeden Partikelmusters auf der Grundlage der erhaltenen Parameter.

**[0015]** Ein weiteres, vorteilhaftes Merkmal ist, daß eine Abnormalität, die bei der Diagnose nützlich ist, erfaßt werden kann und als ein Ergebnis verwendet werden kann.

**[0016]** Weitere, vorteilhafte Merkmale werden im Licht der folgenden, detaillierten Beschreibung augenscheinlich, wenn diese im Licht der beigefügten Zeichnungen gelesen wird.

**[0017]** [Fig. 1](#) ist eine schematische Darstellung eines automatisierten Blutanalysesystems, das in der vorliegenden Erfindung verwendet wird;

**[0018]** [Fig. 2](#) und [Fig. 3](#) sind Vorder- und Seitenansichten einer Kassette, die in der vorliegenden Erfindung verwendet werden kann;

**[0019]** [Fig. 4](#) ist eine unvollständige, teilweise schematische Darstellung eines Abschnittes der Kassette, die in [Fig. 2](#) gezeigt ist, wobei die Darstellung die Lage einiger Bereiche der Kassette zeigt, die in dem erfindungsgemäßigen Verfahren identifiziert werden;

**[0020]** [Fig. 5](#) ist eine vergrößerte, unvollständige Ansicht einer einzelnen Säule der [Fig. 4](#), die die Lage von weiteren Bereichen der Kassette zeigt, die in dem erfindungsgemäßigen Verfahren identifiziert werden;

**[0021]** [Fig. 6](#) ist eine vergrößerte, unvollständige Ansicht des Bodenabschnittes der Säule der [Fig. 5](#), wobei ein Pellet in dem PNeg Bereich angeordnet ist und weitere Ausdrücke gezeigt sind, die in dem erfindungsgemäßigen Verfahren verwendet werden;

**[0022]** [Fig. 7](#) ist eine unvollständige Ansicht, ähnlich zu der der [Fig. 5](#), die jedoch weitere Bereiche der Kassette zeigt, die in dem erfindungsgemäßigen Verfahren identifiziert werden;

**[0023]** [Fig. 8](#) und [Fig. 9](#) sind unvollständige Ansichten von Kassettensäulen, wie sie tatsächlich erscheinen, wenn sie entsprechend der Erfindung verarbeitet werden, wobei [Fig. 8](#) ein Beispiel einer Agglutination im gemischten Bereich ist und/oder eine Fibrinreaktion zeigt; und

**[0024]** [Fig. 10](#) ist ein Flußdiagramm der Verfahrensschritte der Erfindung und des Algorithmuses, der verwendet wird, um die Erfindung auf einem allgemein üblichen Computer auszuführen.

**[0025]** Die Erfindung wird in dieser Schrift folgend in Verbindung mit bestimmten, bevorzugten Ausführungsformen beschrieben, die eine Kassette mit einer bestimmten Form und Zusammensetzung verwenden, die bevorzugte Reagenzien enthält, und die verarbeitet wird, um Agglutinationen von roten Blutkörperchen in bestimmte, bevorzugte Klassen nach einem Zentrifugieren zu klassifizieren. Ferner ist die Erfindung ausführbar, unabhängig von der Form oder Zusammensetzung der Kassette oder der darin enthaltenen Reagenzien oder der Klassen der normalen Agglutination, die verwendet werden, nachdem das Zentrifugieren ausgeführt wurde, solange die Säulen oder Behälter der Kassette Bereiche aufweisen, die denen entsprechen, die in dieser Schrift identifiziert werden, um mit den Algorithmen geeignet zusammenzuarbeiten, die in dieser Schrift verwendet werden, um die angeführten Abnormalitäten zu kennzeichnen.

**[0026]** US-A-5,594,808 offenbart ein bevorzugtes Verarbeitungssystem und eine Kassette zum Ausführen dieser Erfindung. Wie in dem '808 Patent erklärt, umfaßt das bevorzugte, automatisierte, optische Lesesystem **10** im allgemeinen ein Haltemittel **12**, ein Beleuchtungsmittel **14**, ein Bildgebungsundersystem **16** und ein Verarbeitungsundersystem **20**; bevorzugt umfaßt das System **10** ferner ein Transportundersystem **22**, ein Speichermedium **24**, einen Abfallbehälter **26** und einen Barcodeleser **30**. Bei der Ausführungsform des Systems **10**, die in [Fig. 1](#) gezeigt ist, umfaßt das Haltemittel **12** eine Basis **32** und einen Rahmen **34** und das Beleuchtungsmittel **14** umfaßt ein Paar Fluoreszenzleuchten und Streukörper, nicht dargestellt. Das Bildgebungsundersystem **16** umfaßt eine Pixelanordnung **42**, ein Gehäuse **44** und eine Linsenanordnung **46**. Ferner umfaßt das bevorzugte Verarbeitungsundersystem **20** einen Prozessor **56**, einen Hauptprozessor **60** und ein Eingabemittel, wie z. B. eine Tastatur **62**; das bevorzugte Transportundersystem **22**, das in [Fig. 1](#) gezeigt ist, umfaßt ein Tragmittel **64** und eine Bewegungseinrichtung **66**.

**[0027]** Typischerweise ist das Haltemittel **12** bereitgestellt, um eine Testprobe für eine Analyse zu halten, und das Beleuchtungsmittel **14** ist bereitgestellt, um ein ausgeleuchtetes Bild der Testprobe auf dem Bildgebungsundersystem **16** zu erzeugen. Das Untersystem **16** erzeugt einen Satz von Signalen, die das ausgeleuchtete Bild darstellen, das auf diesem Untersystem **16** gebildet ist, und überträgt diese Signale an das Verarbeitungsundersystem **20**. Das Verarbeitungsundersystem empfängt diese Signale von dem Untersystem **16** und verarbeitet diese Signale entsprechend einem vorbestimmten Programm, um festzustellen, ob ein Agglutinationsmuster in einer Testprobe, die analysiert wird, vorliegt, und um dieses Muster in eine Klasse einer Vielzahl von vorbestimmten Klassen zu klassifizieren, falls dies der Fall ist.

**[0028]** Die bevorzugte Ausführungsform des Systems **10**, die in dieser Schrift beschrieben ist, ist besonders gut geeignet zum Analysieren von Blutproben und diese Proben werden oft als Lösungen bezeichnet. Es sollte festgehalten werden, daß die vorliegende Erfindung in Systemen verkörpert sein kann, die andere Materialien analysieren, umfassend andere wäßrige Lösungen, wie z. B. Urin. Es ist jedoch nicht notwendig, daß das zu analysierende Material eine Flüssigkeit oder ein Fluid ist; und daher wird der Ausdruck „Lösung“, wie er in dieser Schrift verwendet wird, in der allgemeinen Bedeutung verwendet, nämlich als irgendeine Mischung aus flüssigen oder festen Substanzen.

**[0029]** Ferner sind die Testproben, die in dem System analysiert werden, bevorzugt in Behältern aufbewahrt und eine große Anzahl von Behältertypen und Behältergrößen können mit dem System **10** verwendet werden. Jedoch ist die bevorzugte Ausführungsform des Systems **10**, die in dieser Schrift im Detail beschrieben wird, besonders gut geeignet für eine Verwendung mit Kassettenbehältern der Art, wie sie in den [Fig. 2](#) und [Fig. 3](#) mit dem Bezugszeichen **80** gezeigt ist. Diese Behälter, die in dieser Schrift folgend als Kassetten bezeichnet werden, sind aus einem transparenten, in einem Stück gegossenen Kunststoffmaterial hergestellt. Eine Vielzahl von Hohlräumen oder Löchern **82**, [Fig. 2](#), die als Säulen oder Mikrosäulen bezeichnet werden, sind in den Kassetten gebildet und erstrecken sich von der oberen Kante **84** der Kassette nach unten und die Kassette, die in den [Fig. 2](#) und [Fig. 3](#) gezeigt ist, enthält bspw. sechs solcher Mikrosäulen.

**[0030]** Eine Vielzahl von sehr kleinen, transparenten Glasperlen **90**, die Durchmesser in der Größenordnung von 10 bis 100 Mikrometer aufweisen, sind in dem unteren Abschnitt einer jeden Mikrosäule angeordnet und bilden einen Filter. Alternativ kann der untere Abschnitt einer jeden Mikrosäule mit einem geeigneten Gel versehen sein, das auf die gleiche, bekannte Weise wie die Mikropartikel wirkt. Reagenzien können in die Säulen der Kassette vorgefüllt sein; nachdem die Säulen der Kassette mit den gewünschten Materialien versehen sind, wird typischerweise eine Folie auf der oberen Kante **84** der Kassette befestigt, um die Oberseite der Säulen **82** abzudecken und zu verschließen.

**[0031]** Wenn irgendeine, bestimmte Kassette **80** verwendet wird, können eine, einige oder alle Mikrosäulen **82** in der Kassette verwendet werden. Ferner kann jede Kassette für Blutproben von einer Person oder von mehreren Personen verwendet werden. In jede Mikrosäule, die verwendet wird, wird eine Probe von roten Blut-

körperchen und eine Reagenz oder mehrere Reagenzien, die mit bekannten Mitteln reagieren, pipettiert, um diese Blutprobe auf das Vorhandensein dieses einen Mittels oder mehrerer Mittel zu testen. Die Kassette kann bebrütet werden und wird folgend zentrifugiert. Wenn ein Mittel, auf das die Blutprobe getestet wird, in der Mikrosäule vorliegt, reagiert das Mittel mit den roten Blutkörperchen, um Agglutinationen zu bilden; die Anzahl, Größe und Verteilung der Agglutinationen in der Mikrosäule ist ein Indikator der Stärke dieser Reaktion.

**[0032]** Mit erneutem Bezug auf die [Fig. 1](#) richtet das Beleuchtungsmittel **14**, das bevorzugt ein Paar von Fluoreszenzleuchten umfaßt, Licht durch die Testprobe, die von der Bewegungseinrichtung **66** gehalten wird, und auf das Bildgebungsuntersystem **16**, und insbesondere auf die Pixelanordnung **42**, die dann eine Reihe von Signalen erzeugt, die die Testprobe darstellen. Genauer betrachtet, ist die Pixelanordnung **42** in einem Kameragehäuse **44** angeordnet und die Pixelanordnung umfaßt bevorzugt eine Vielzahl von Lichtsensoren, von denen jeder in der Lage ist, einen elektrischen Strom zu erzeugen, der eine Höhe aufweist, die proportional ist zu der Intensität des auf diesen Sensor einfallenden Lichtes oder diese darstellt. Bevorzugt sind diese Lichtsensoren oder Pixel in einem gleichmäßigen Gitter einer gegebenen Anzahl von gleichmäßig beabstandeten Spalten und Zeilen angeordnet.

**[0033]** Wie von Fachleuten erkannt werden wird, kann irgendeine geeignete Lichtquelle **14**, Linse, Filter und Kamera **44** in dem System **10** verwendet werden. In einer Ausführungsform des Systems **10**, die gerade in die Praxis überführt wurde, ist z. B. die Kamera **44** eine Sony XC75CE Videokamera und die Pixelanordnung oder das sensorische Element in dieser Kamera ist ein charged coupled device (CCD), das eine Matrix aus Pixeln in einer rechteckigen Anordnung, 752 Pixel mal 582 Pixel, umfaßt. Der Abstand zwischen der Kamera und der in dem Rahmen **34** gehaltenen Kassette wurde so eingestellt, daß jedes Bild auf der Pixelanordnung zwei Spalten **82** der Kassette umfaßt, wobei die Breite jeder Säule in dem Bild 140 Pixel ist.

**[0034]** Eine Componon Mikrolinse, die von der Firma Schneider hergestellt wurde, wurde auf eine Blende F von F/4.0 eingestellt und auf der Kamera mittels eines Adapters befestigt. Zwischen der Linse und dem CCD-Element wurde ein Bandpassfilter mit einer mittleren Wellenlänge von 550 nm und einer Bandbreite von 40 nm befestigt. Dieser Filter verstärkt das Bild der roten Blutkörperchen und verbessert das Signal/Rauschen-Verhältnis; der Filter wurde auf der Grundlage von spektrophometrischen Messungen ausgewählt, die zeigen, daß rote Blutkörperchen eine erhöhte Absorption des Lichtes in dem entsprechenden Wellenlängenbereich aufweisen.

**[0035]** Wie genauer in dem '808 Patent beschrieben, ist der Prozessor **60** programmiert, die Datenwerte zu verarbeiten und zu analysieren, die in dem Bildprozessor gespeichert sind, um das Agglutinationsmuster in der Testprobe, die analysiert wird, zu identifizieren, falls dieses vorhanden ist.

**[0036]** Bevorzugt ist der Hauptprozessor ein Personalcomputer oder eine Komponente davon, der ebenso eine Tastatur **62** und einen Terminal (nicht dargestellt) umfaßt. Die Tastatur **62** ist mit dem Prozessor **60** verbunden, um dem Bediener eine Eingabe in diesen zu ermöglichen, und das Terminal wird verwendet, um visuell Daten oder Nachrichten anzuzeigen, die in den Prozessor eingegeben werden. Ferner kann ein Monitor mit dem Prozessor **56** verbunden sein, um Videobilder von den Datenwerten zu erzeugen, die in dem Prozessor oder in dem Bildprozessor **56** gespeichert sind. Zum Beispiel können die S-Datenwerte an den Monitor übermittelt werden, um auf diesem ein Bild des realen Bildes zu erzeugen, das auf der Pixelanordnung **42** erzeugt wurde. Andere Sätze von Datenwerten können an den Monitor übertragen werden, um verfeinerte oder verarbeitete Bilder des realen Bildes zu erzeugen. Ein Drucker kann mit dem Prozessor **60** verbunden sein, um eine visuelle, dauerhafte Aufzeichnung von ausgewählten Datenwerten zu ermöglichen, die an den Drucker von dem Prozessor übertragen werden.

**[0037]** Wie von Fachleuten verstanden werden wird, kann das Untersystem **20** mit anderen oder zusätzlichen Eingabe- oder Ausgabeeinrichtungen verbunden sein, um es einem Bediener oder Analytiker zu ermöglichen, mit den Prozessoren **56** und **60** in Wechselwirkung zu treten. Ferner sind die einzelnen Komponenten des Untersystems **20** von herkömmlicher Art und Fachleuten wohl bekannt.

**[0038]** Ein Speichermittel **24** ist nahe dem Haltemittel **12** angeordnet und bereitgestellt, um mehrere Testproben zu halten, und bevorzugt ist ein Indexmittel, wie z. B. ein Schrittmotor, bereitgestellt, um das Speichermittel durch eine Reihe von Stellungen zu bewegen, um jede der Testproben, die in dieser gehalten ist, an dem Haltemittel auszurichten. Das in [Fig. 1](#) gezeigte Speichermittel **24** ist insbesondere ausgelegt, um die Kassetten **80** zu halten, und das Speichermittel bildet eine Vielzahl von Kanälen oder Schlitzen **24a**, um diese Kassetten zu halten. Das Indexmittel bewegt dieses Speichermittel **24**, um jeden der Kanäle **24a** an der Kassettenbewegungseinrichtung **66** auszurichten, wodurch es den Kassetten möglich ist, aus dem Speichermittel heraus und

in diesen Rahmen zu gleiten.

**[0039]** Bevorzugt weist jede Kassette **80** eine Barcode **86** auf, der ausgewählte Daten über die Kassette identifiziert, und ein Barcodeleser **30** ist bereitgestellt, um den Barcode auf jeder Kassette zu lesen, und die darin enthaltenen Daten an den Prozessor **60** zu übertragen. Zum Beispiel kann der Barcode auf der Kassette den Kassettentyp, das Datum der Herstellung der Kassette und ein empfohlenes Ablaufdatum für die Kassette enthalten. Der Barcode kann andere Daten umfassen, die den Kassettenhersteller wie auch die Herstellungszeit und den Herstellungsort angeben. Wie in [Fig. 1](#) gezeigt, ist der Codeleser, der ein herkömmlicher Barcodeleser sein kann, bevorzugt zwischen dem Speichergestell **24** und der Bewegungseinrichtung **66** angeordnet, sodaß der Leser den Barcode auf jeder Kassette liest, wenn die Kassette aus dem Speichergestell in eine Stellung vor der Pixelanordnung **42** überführt wird. Wenn der Barcode **86** nicht alle ausgewählten Daten hinreichend identifiziert, kann das System **10** wahlweise so eingestellt sein, daß eine Verarbeitung jedweder Bilddaten von der Kassette **80** nicht erfolgt. Dies kann z. B. dadurch geschehen, daß kein Bild von der Kassette auf der Pixelanordnung **42** erzeugt wird oder, falls ein Bild erzeugt wird, dieses Bild nicht verarbeitet wird.

**[0040]** Im Betrieb des Systems **10** wird eine Vielzahl von Testproben in einem Karussell **24** angeordnet und das Karussell wird gedreht, um einen ausgewählten Schlitz der Slitze **24a** an der Bewegungseinrichtung **66** auszurichten. Die Bewegungseinrichtung **66** läßt die Testprobe in diesen ausgewählten Karussellschlitz gleiten, in die gewünschte Lage vor der Pixelanordnung **42**, und das Beleuchtungsmittel **14** richtet dann einen Lichtstrahl durch die Testprobe und auf die Pixelanordnung **42**. Die Bewegungseinrichtung **66** wird durch ihre Basis **32** bewegt, um es zu ermöglichen, daß die gegenüberliegende Seite der Kassette abgebildet wird. Das Positionieren der Kassette wird bestimmt durch ein Erfassen der Lage der Säulen. Gesonderte Positionsmarkierungen sind nicht erforderlich.

**[0041]** Weitere Details der Verarbeitung können in dem '808 Patent gefunden werden.

**[0042]** Normale Agglutinationsreaktionen fallen in die folgenden Reaktionsarten – negativ, positiv (+0.5, +1, +2, +3, +4) und unbestimmten Reaktionen. Wie in dem '808 Patent offenbart, umfaßt das Verfahren zum Auslesen einer Reaktion die Schritte von Bildakquisition, Säulenerfassung, Merkmalextraktion und Reaktionseinstufung. Nach dem Vollenden der Merkmalextraktion durch die Bildverarbeitungsroutine wird der Satz von Merkmalen, der sich auf das Reaktionsmuster bezieht, für jede Säule berechnet. Diese Merkmale, zusammen mit den Intensitätsreferenzwerten, werden einem Reaktionsklassifikationsprogramm (Klassifizierer) zugeführt und der Reaktionsklassifizierer überführt diese Merkmalswerte in eine der Reaktionsklassen, die zuvor angeführt wurden.

#### Die Erfindung

**[0043]** Das Problem ist, daß es abnormale Reaktionen gibt, die das System und die Software des '808 Patentes davon abhalten, die zuvor angeführte Klassifikation durchzuführen. Diese umfassen die abnormalen Reaktionen und Umstände, die zuvor in der Beschreibung des Hintergrundes der Erfindung und der Zusammenfassung angeführt wurden. Um mit diesen abnormalen Reaktionen umzugehen, wurden bestimmte Ausdrücke festgelegt, insbesondere die, die mit den Säulen **82** der Kassette **80** verbunden sind. Diese Ausdrücke und ihre Lage relativ zu der Kassette sind unten in der Tabelle 1 aufgeführt:

Tabelle 1

Ausdruck	Definition
above (oberhalb)	Mittlere Lichtintensität in einem vorbestimmten Bereich in dem klaren Flüssigkeitsabschnitt 92, Fig. 4, oberhalb Mikropartikel 90, die gepunktet dargestellt sind.

outer (außerhalb)	Mittlere Lichtintensität in einem vorbestimmten Bereich in Abschnitten der Kassette, außerhalb von und zwischen Säulen 82, Fig. 4.
Ppos	Gesamtgröße des Bereichs von Agglutinationen roter Blutkörperchen in einem Gebiet, das den Bodenabschnitt der klaren Flüssigkeit 92, unterhalb von „oberhalb“, Fig. 5, und den oberen Abschnitt der Perlen 90 umfaßt. In vertikaler Richtung ist dies der Bereich, der durch die Dicken D1 und D2 gebildet wird. Höchst bevorzugt ist D1 = 2 mm und D2 = 1 mm.
Zone1	Gesamtgröße des Bereiches von Agglutinationen von roten Blutkörperchen, die in dem Gebiet erscheinen, das mit „Zone1“ gekennzeichnet ist, wie in Fig. 5 gezeigt.
Zone2	Gesamtgröße des Bereiches von Agglutinationen von roten Blutkörperchen, die in dem Gebiet erscheinen, das durch „Zone2“ markiert ist, wie in Fig. 5 gezeigt.
Zone3	Gesamtgröße des Bereiches von Agglutinationen von roten Blutkörperchen, die in dem Gebiet erscheinen, das mit „Zone3“ gekennzeichnet ist, wie in Fig. 5 gezeigt.
PNeg	Größe eines Pellets von roten Blutkörperchen, siehe Fig. 5.

**[0044]** Der PNeg-Abschnitt ist der Abschnitt, der ein Pellet **94** von nicht agglutinierten Zellen enthält, falls welche vorhanden sind. Wie in [Fig. 6](#) gezeigt, wird dem Pellet **94**, wenn dieses abgebildet wird, eine „Neigung“ („slope“), Linie **96**, zugewiesen, die eine am besten angepaßte, gerade Linie an das erfaßte Bild der oberen Oberfläche **98** des Pellets ist. Um das Compilieren zu vereinfachen, wird die „Neigung“ als ein arctan-Wert ausgedrückt, insbesondere entsprechend der Gleichung:

$$\text{„Neigung“} = 1000 \cdot \tan(\theta),$$

wobei  $\theta$  der Winkel für die Linie **96** ist, wie in [Fig. 6](#) dargestellt, und 1000 ein Faktor ist, der verwendet wird, um die „Neigung“ in einen Integerwert zu überführen, der einfacher von dem Computer gehandhabt wird. Die Linie **96** wird wiederum um einen Abstand abweichen, der mit „Abweichung“ („deviation“) gekennzeichnet ist, [Fig. 6](#), wenn jedes Pixel des Bildes von der tatsächlichen Oberfläche **98** in diesem Pixel betrachtet wird.

**[0045]** Ferner ist die untere Hälfte einer Säule unterteilt, [Fig. 7](#), in ein „B links“ („BLeft“) Gebiet und ein „B rechts“ („BRight“) Gebiet.

**[0046]** Zusätzlich zu den Ausdrücken, die für die [Fig. 4](#) bis [Fig. 7](#) beschrieben wurden, gibt es weitere Ausdrücke, die abgeleitete Ausdrücke sind, die wie folgt definiert werden müssen:

**[0047]** Zunächst sind viele der Intensitätstransmissionsmessungen, die an den Bildern vorgenommen werden, die Summe der Ergebnisse der „vorderseitigen“ („front“) und „rückseitigen“ („back“) Bilder. „Vorderseitig“ und „rückseitig“ wiederum bedeuten, daß jede Säule zweimal abgebildet wird – zuerst mit einer Seite **81A**, [Fig. 3](#), die der Kamera zugewandt ist, und dann mit der anderen Seite **81B**, die dann der Kamera zugewandt ist. Welche von diesen tatsächlich die „vorderseitige“ ist, ist rein willkürlich, solange dieselbe Konvention für alle Kassetten beibehalten wird.

**[0048]** Daher ist, wie in dieser Schrift verwendet, der Ausdruck „AboveVar“ die Summe von „FrontAboveVar“ und „BackAboveVar“, wobei jeder dieser letzten Ausdrücke für folgendes steht: Die Flüssigkeitintensitätsvari-

anz für ein vorderseitiges Bild einer Säule in dem „oberhalb“ Gebiet und eine derartige Flüssigkeitintensitätsvarianz für ein rückseitiges Bild einer Säule in dem „oberhalb“ Gebiet. „Flüssigkeitintensitätsvarianz“ („liquid intensity variance“) steht wiederum für das folgende: Die Standardabweichung (root mean square deviation) der tatsächlichen Intensitäten für jedes Pixel, und insbesondere der Wert, der durch die Formel berechnet wird:

$$\sqrt{\frac{\sum_{\substack{\text{alle Pixel} \\ \text{in dem interessierenden} \\ \text{Gebiet}}} (I_{\text{Mittelwert}} - I_{\text{tatsächlich}})^2}{N}}$$

wobei  $I_{\text{Mittelwert}}$  („ $I_{\text{mean}}$ “) die gemittelte Intensität über alle Pixel in dem interessierenden Gebiet ist,  $I_{\text{tatsächlich}}$  („ $I_{\text{actual}}$ “) die tatsächliche Intensität eines gegebenen Pixels ist und N der Gesamtzahl von Pixeln in dem interessierenden Gebiet entspricht.

**[0049]** Ferner, wie in dieser Schrift verwendet, ist „Resid“ die Summe von „FrontResid“ und „BackResid“, wobei jeder von diesen die Standardabweichung (root mean square of deviation) der Linie 96 von der tatsächlichen Peltoberfläche 98, [Fig. 6](#), für jedes Pixel ist, gemessen entsprechend der Formel:

$$\sqrt{\frac{\sum_{\substack{\text{alle Pixel} \\ \text{in dem interessierenden} \\ \text{Gebiet}}} (\text{tatsächliche Abweichung für Pixel})^2}{N}}$$

und wie von der Vorderseite und Rückseite abgebildet, wie zuvor beschrieben.

**[0050]** Wie in dem '808 Patent offenbart, umfaßt das Verfahren des Auslesens einer Reaktion zusammenfassend dann die Schritte von Bildaquisition, Säulenerfassung, Merkmalextraktion und Reaktionseinstufung. Es werden Bilder von sowohl der Vorderseite wie auch der Rückseite der Kassette analysiert. Nach Vollendung der Bildverarbeitung, gibt die Softwareroutine zwei Sätze von Merkmaldaten heraus, die einem jeden Behältnis für die Vorder- und Rückansicht zugeordnet sind. Bevor die Klassifizierung ausgeführt wird, werden die beiden Datensätze von der Vorder- und Rückansicht in einen Vektor kombiniert. Der Kombinationsvorgang addiert dieselben Parameter von beiden Ansichten für jeden der folgenden wesentlichen Ausdrücke, die in den Berechnungen verwendet werden, die folgend beschrieben werden:

Above = FrontAbove + BackAbove

AboveVar = FrontAboveVar + BackAboveVar

Outer = FrontOuter + BackOuter

PPos = FrontPPos + BackPPos

PNeg = FrontPNeg + BackPNeg

Zone1 = FrontZone1 + BackZone1

Zone2 = FrontZone2 + BackZone2

Zone3 = FrontZone3 + BackZone3

Slope = FrontSlope + BackSlope

Resid = FrontResid + BackResid

BLeft = FrontBLeft + BackBRight

BRight = FrontBRight + BackBLeft

**[0051]** Die kombinierten Merkmaldaten werden dann als Eingabe für die Reaktionsklassifizierungsroutine verwendet, die diese Werte verwendet, um festzustellen, ob eine Abnormalität vorliegt.

Abnormalitäten, die erfaßt werden sollen

**[0052]** Die folgende Beschreibung betrifft bestimmte Abnormalitäten, auf die getestet wird, sowie eine Ausführung zu den Berechnungen, die verwendet werden, um ihr Vorliegen zu untersuchen, und die Begründung für diese Berechnungen. Obwohl bestimmte Fehler und bestimmte Berechnungen für die Erfassung bevorzugt sind, ist sofort verständlich, daß ebenso andere verwendet werden könnten. Zum Beispiel sind die numerischen Begrenzungen teilweise eine Funktion der verwendeten Vorrichtung und irgendwelche Veränderungen in der Vorrichtung können zu Veränderungen in den numerischen Begrenzungen führen, die für einen Fachmann leicht zu bestimmen sind.

**[0053]** Im allgemeinen wurden die tatsächlichen Berechnungen abgeleitet von einem künstlichen Erzeugen der zuvor angeführten Abnormalitäten in einer Anzahl von Kassetten, in einem größeren oder geringeren Aus-

maß, oder von einem Auswählen von Proben von Patienten, von denen bekannt ist, daß sie die Umstände aufweisen, und einem folgenden Weiterleiten dieser Kassetten an Experten, um visuell auszuwerten, ob diese bestimmte Säule dieser Kassette diese Abnormalität aufweist oder nicht. Diejenigen Kassetten, die als wirklich „abnormal“ eingestuft wurden, wurden dann einer Signalverarbeitung zugeführt, um festzulegen, welche numerischen Beschränkungen, die weiter unten beschrieben werden, eingestellt werden müssen, um diese Abnormalitäten als unterschiedlich von „normalen“ Proben zu kennzeichnen, die diese Merkmale nicht aufweisen.

**[0054]** Zum Beispiel: bei der Abnormalität „Vorhandensein zu weniger Zellen“ („insufficient cells present“), wurden mehrere Säulen an Experten gegeben, die verschiedene Zellmengen enthielten: 1  $\mu\text{L}$ , 3  $\mu\text{L}$ , 5  $\mu\text{L}$ , 7  $\mu\text{L}$  und 10  $\mu\text{L}$  (beispielsweise), wobei 10  $\mu\text{L}$  der Nominalwert ist. Die Experten legten fest, daß 3  $\mu\text{L}$  und weniger „zu wenige“ Zellen waren. Die Säulen, die diese Menge enthielten, wurden dann verarbeitet und die Algorithmen (weiter unten beschrieben) so eingestellt, daß nur 3  $\mu\text{L}$  und weniger gekennzeichnet wurden.

**[0055]** Das Folgende sind dann die besonderen Abnormalitäten, die erfaßt wurden:

Fehler im Verfahren beim Erzeugen von Daten außerhalb des Bereiches

**[0056]** Fehler im Testverfahren oder beim Bilderzeugen könnten ein Bild erzeugen, das so fehlerhaft ist, daß dieses nicht in die Datenbank von Bildern paßt, die bei „normalen“ Proben beobachtet wurden. Insbesondere liegen solche „außerhalb des Bereiches“ Bilder häufig in der Verteilung von erfaßten Zellen in der Säule vor, und insbesondere in den links-zu-rechts Unterschieden und in der Form irgendeines Pellets von Zellen, das an dem Boden der Säule gebildet ist.

**[0057]** Um einen unzulässigen Unterschied in der links-zu-rechts Zellverteilung zu bestimmen, berechnet der Computer das Zellgleichgewicht =  $|BLeft - BRight|$ . Dieser verwendet dann diesen neuen Ausdruck wie auch die Ausdrücke „Neigung“ und „Resid“, die oben definiert sind, in der folgenden Gleichung:

**[0058]** Falls (Zellgleichgewicht > 3600) oder (Neigung > 4500) oder (Resid > 2000), dann ist der Test „außerhalb des Bereiches“ und die Reaktion für diese Säule endet.

**[0059]** Die Begründung für dieses Vorgehen ist wie folgt: es sollte kein großes Ungleichgewicht von Zellen geben, wenn „BLeft“ mit „BRight“ verglichen wird, [Fig. 7](#). Jedes Ungleichgewicht, das zu einem ausgelesenen Zellgleichgewicht > 3600 führt, bedeutet, daß das Bild niemals bei den „normalen“ Proben der Datenbank eingesortiert wurde, und ein Fehler beim Verarbeiten muß angenommen werden.

**[0060]** Alternativ muß die Pelletform innerhalb bestimmter Parameter liegen. „Neigung > 4500“ bedeutet eine Neigung, bei der der Winkel  $\theta$ , [Fig. 6](#), größer ist als  $66^\circ$ . „Resid > 2000“ bedeutet eine Abweichung in der Oberfläche **98** oberhalb oder unterhalb der Linie **96**, die das überschreitet, was normalerweise auftritt. Falls entweder die „Neigung“ oder der „Resid“ (die Abweichung) jenseits dieser Grenzwerte liegt, hält das Programm an, um weitere Klassifizierungsschritte einzusparen, die möglicherweise fehlerhafte Ergebnisse liefern.

### Hämolyse der Probe

**[0061]** Wie bereits bekannt ist, führt die Hämolyse von roten Blutkörperchen zu einem Freisetzen von Hämoglobin, was zu einem durchgehenden, roten Einfärben der Probenflüssigkeit führt, das im allgemeinen nicht durch den Schritt des Zentrifugierens beeinflußt wird. Ferner verringert es das Volumen von Zellen, das abgebildet werden kann.

**[0062]** Dementsprechend betrachtet die Signalverarbeitung insbesondere „oberhalb“ („above“), „außerhalb“ („outer“) und „AboveVar“ und ferner berechnet der Computer zwei abgeleitete Ausdrücke:

**[0063]** Einer ist „Verhältnis“ („Ratio“), der die Formel verwendet:

Verhältnis = oberhalb/außerhalb.

(Ratio = above/outer)

**[0064]** Der andere ist „Zellvolumen“, der die Formel verwendet:

Zellvolumen = PPos + PNeg + (Zone1 + Zone2 + Zone3)/3.

(A)

**[0065]** Die verwendete Gleichung ist wie folgt:

**[0066]** Wenn (Verhältnis < 0,75) und (Verhältnis·Zellvolumen < 1000) und (Zellvolumen·AbvoveVar < 20000) ist, dann wird eine Hämolyse vorausgesetzt und das Verfahren zum Klassifizieren des Blutes nach Gruppentypen wird aufgrund dieser Abnormalität beendet.

**[0067]** Die Begründung dafür ist wie folgt: das Hämoglobin wird die Flüssigkeit in dem „oberhalb“ Gebiet eintrüben, wodurch die erfaßte Intensität in diesem Gebiet sinkt. Dies wird jedoch nicht die Bildintensität in dem „außerhalb“ Gebiet, [Fig. 4](#), verringern. Somit die Messung des Verhältnisses. Empirische Untersuchungen, wie zuvor beschrieben, die Experten betreffend, ergab ein cut-off „Verhältnis“ von 0,75.

**[0068]** Dies alleine ist nicht genug, aufgrund der Variation der optischen Dichte in dem Plasma. Eine echte Hämolyse wird ferner das Zellvolumen reduzieren. Jedoch kann das Zellvolumen an sich variieren, aufgrund von normalen Unterschieden in der Konzentration von roten Blutkörperchen in der Probe und des Volumens, das ursprünglich in die Säule eingebracht wurde. Ferner ist das Zellvolumen nicht einfach die Summe von allen abgebildeten Volumina, jedoch addiert dieses bevorzugt die Mittelwerte für Zone1, Zone2 und Zone3, da herausgefunden wurde, daß diese dazu neigen, andernfalls unzulässig zu einer Zählung der Zellen beizutragen.

**[0069]** Dadurch, daß das so definierte Zellvolumen in dem Algorithmus verwendet wird, wird diese verarbeitete Zahl sowohl mit dem „Verhältnis“, vor einer Überprüfung an einer empirisch bestimmten Grenze, und mit „AboveVar“ (Flüssigkeitsintensitätsunterschied), vor einer Überprüfung an einer zweiten empirisch bestimmten Grenze, multipliziert. Das heißt, es wurde herausgefunden, daß der Flüssigkeitsintensitätsunterschied abnehmen muß, zusammen mit dem „Verhältnis“, bevor man sich darauf verlassen kann, daß ein Abfall des „Zellvolumens“ eine genaue Voraussage der Hämolyse ist. (Ein großer Flüssigkeitsintensitätsunterschied ist charakteristisch für Umstände, wie z. B. ein Blutgerinsel, und daher wird die Gleichung auf kleiner 20000 eingestellt). Ferner wurde herausgefunden, daß es bevorzugt ist, daß alle diese drei getrennten Umstände eines Abfalls beim Verhältnis, eines Abfalls in dem Produkt aus Zellvolumen und Verhältnis und eines Abfalls in dem Produkt aus Zellvolumen und Flüssigkeitsintensitätsunterschied vorliegen müssen.

**[0070]** Es ist bekannt, daß der Umstand einer Hämolyse nicht nur eine Abnormalität ist, die das normale Testen stören kann, sondern auch eine nützliche, diagnostische Information darstellt.

#### Test auf leere Säule

**[0071]** Konzeptionell ist dieser Test eine Untermenge des Tests auf „zu wenige Zellen“, der weiter unten beschrieben wird. Das heißt, dieser Test wird auch ein Abnormalitätskennzeichen triggern, wenn gar keine Zellen in der Säule vorliegen, insofern, als der Test ausgelegt ist, mehr als Null, jedoch weniger als einen Grenzwert (der auf 3 µL bei einem nominellen Wert von 10 µL festgelegt wurde) zu erfassen.

#### Zu wenige/zu viele Zellen liegen vor

**[0072]** Zu wenige Zellen oder zu viele Zellen sind offensichtlich ein Fehler in dem Verfahren. Beide Extreme müssen erfaßt und aussortiert werden. Zu diesem Zwecke überprüft der Computer erneut den Zellvolumenausdruck, wie er zuvor für die Hämolyse abgeleitet wurde, und berechnet ferner ein modifiziertes Zellvolumen', wie folgt: Zellvolumen' = (PPos/2) + PNeg + (Zone1 + Zone2 + Zone3)/3. Dann führt dieser die folgende Berechnung aus:

**[0073]** Wenn (Zellvolumen < 800), dann liegen zu wenige Zellen vor und das Verfahren der Blutklassifikation endet für diese Säule.

**[0074]** Wenn (Zellvolumen' > 7000), dann liegen zu viele Zellen vor und das Verfahren zur Blutklassifikation endet für diese Säule.

**[0075]** Als Begründung für die angeführten Grenzen und die Verwendung des Zellvolumens' seien empirische Tests angeführt. Aus bestimmten Gründen kann PPos sehr hoch sein, ohne notwendigerweise abnormal zu sein. Daher wird der Divisor zwei verwendet.

#### Agglutination im gemischten Bereich oder Fibrinolysis

**[0076]** Eine Agglutination im gemischten Bereich, folgend einfach „gemischter Bereich“ genannt, ist bei wei-

tem die am schwierigsten zu quantifizierende Abnormalität und somit auch am schwierigsten zu testen. Tatsächlich ist es so kompliziert, daß es gegenwärtig nicht möglich ist, bei einem gekennzeichneten Beispiel zwischen dem Vorliegen einer Reaktion im gemischten Bereich und dem Vorliegen von Fibrin zu unterscheiden, außer einem mechanischen Versuchen, jegliches Fibrin von den oberen Mikropartikeln abzuziehen, wodurch bestätigt wird, daß es Fibrin ist und nicht das Vorliegen einer Reaktion im gemischten Bereich.

**[0077]** Wie im Stand der Technik verstanden wird, bedeutet eine Reaktion im gemischten Bereich, daß mehr als eine Gruppe der Blutklassifikation vorliegt. Beispiele würden eine Frau umfassen, deren Kreislauf fetale Blutzellen umfaßt. Derartiges Blut wird als ein „gemischter Bereich“ klassifiziert. Blutbänke bemühen sich aus offensichtlichen Gründen eifrig, mögliche Spenden derartigen Blutes zu verhindern. Somit ist deren Erfassung wichtig und so bedeutend, daß selbst die Tatsache, daß Fibrin zu dem gleichen Ergebnis führen kann und an sich vollständig akzeptabel ist, genug ist, den Test zu beenden und dieses Ergebnis zu berichten.

**[0078]** Die Schwierigkeit bei der Erfassung ist insofern bedeutend, als eine Reaktion im gemischten Bereich einige Merkmale von verschiedenen, normalen Agglutinationstypen visuell aufweist. Normalerweise wird eine Reaktion im „gemischten Bereich“ durch das Vorhandensein von zu vielen Zellen an oder nahe den oberen Mikropartikeln der Säule, wobei gleichzeitig zu viele an dem Boden der Säule (wo sich das Pellet bildet) und zu wenige oder nur ein paar Zellen in Abschnitten der Säule zwischen den genannten oberen Mikropartikeln und dem Boden erfaßt werden, bestimmt. Dies ist insofern verständlich, als eine normale +4 Reaktion sehr viele Zellen erzeugt, die an oder nahe dem zuvor genannten oberen Bereich agglutiniert sind, wohingegen eine normale negative Reaktion sehr viele nicht agglutinierte Zellen in dem Pellet an dem Boden erzeugt und eine normale +2 Reaktion die Zellen verteilt (einige in den oberen Bereich, einige in den unteren Bereich und am wichtigsten ist, daß einige in den Zwischenbereich gelangen). Daher ist jedes Ergebnis, das sehr viele Zellen sowohl im oberen Bereich wie auch im unteren Bereich, jedoch nicht genug dazwischen, abbildet, wahrscheinlich eine Reaktion im gemischten Bereich.

**[0079]** Die [Fig. 8](#) und [Fig. 9](#) stellen die Art der Reaktion im gemischten Bereich besser dar. Insbesondere die Löcher 82 der [Fig. 8](#) zeigen eine Bandbreite von Reaktionen im gemischten Bereich (oder Fibrin), wobei im Vergleich dazu die Löcher 82 der [Fig. 9](#) zwei „normale“ Reaktionen zeigen, die die Bandbreite umfassen, die in [Fig. 8](#) gezeigt ist.

**[0080]** Aus diesem Grunde weist das Behältnis 82A in [Fig. 8](#) eine große Menge von Agglutinationen auf, die in dem PPos Gebiet 100 gesammelt sind, welches die obere Oberfläche der Mikropartikel ist, die als Abschnitt 90 in [Fig. 4](#) gezeigt ist. (Die Mikropartikel sind in den [Fig. 8](#) und [Fig. 9](#) nicht gepunktet dargestellt, so daß die Blutzellen identifiziert werden können.) Ferner führt eine kleine, jedoch signifikante PNeg-Ansammlung bei 102 von nicht agglutinierten Zellen dazu, daß dieses Behältnis als Reaktion im gemischten Bereich eingestuft wird. Dies ist dann eine Reaktion im gemischten Bereich von +4, wegen des Bildes bei 100, und von Null, wegen des Bildes bei 102.

**[0081]** Das Behältnis 82B ist ähnlich zu dem von 82A, wobei der einzige Unterschied ist, daß die PNeg-Ansammlung sehr signifikant bei 102 ist, so daß die Ergebnisse erneut als eine Reaktion im gemischten Bereich von (4/0) klassifiziert werden.

**[0082]** In den Löchern 82C und 82D ist zum ersten Mal eine Verteilung von kleinen Agglutinationen roter Blutkörperchen in dem Gebiet 104 zu sehen, das die Zone1, Zone2 und Zone3 der [Fig. 5](#) wie auch das Gebiet 100 und 102 (PPos und PNeg) überdeckt. Diese Verteilung in dem Gebiet 104 deutet daraufhin, daß die Probe +3 ist, jedoch führt die signifikante Menge bei PNeg (Gebiet 102) auch zu einer Nullklassifikation – d. h. mit anderen Worten zu einer Reaktion im gemischten Bereich. (Das Behältnis 82D unterscheidet sich von dem Behältnis 82C dadurch, daß in dem Behältnis 82D die nicht agglutinierte Ansammlung bei 102 größer ist als in 82C.)

**[0083]** Es könnte ebenso sein, daß das Behältnis 82B ein Beispiel von Fibrin ist, d. h., daß die dunkle Erscheinung in dem Gebiet 100 durch Fibrin an den oberen Mikropartikeln verursacht ist, was andernfalls zu einer Null-Klassifikationsreaktion führen würde. Unabhängig davon ist weder eine visuelle noch automatisierte Untersuchung in der Lage, zu unterscheiden, ob es eine Reaktion im gemischten Bereich oder Fibrin ist.

**[0084]** Zum Vergleich zeigt das Behältnis 82' in [Fig. 9](#) eine normale +4 Reaktion, die durch das große Vorkommen von Agglutinationen im Gebiet 100 und das Fehlen jeglicher, signifikanter Zellen im Gebiet 102 (PNeg) angezeigt ist. Vergleiche dies mit dem Behältnis 82A der [Fig. 8](#). Ebenso ist das Behältnis 82" eine normale Null-Klassifikation, da alle Zellen nach unten in das Gebiet 102 zentrifugiert wurden. Die gestrichelte Linie bei 100' in dem Behältnis 82" ist nur dargestellt, um anzudeuten, wo die obere Oberfläche der Mikropartikel

angeordnet ist. Es gibt keine Zellen bei **100'**.

**[0085]** Das Verfahren dieser Erfindung ist in der Lage, all die Umstände der [Fig. 8](#) als abnormal einzustufen und einen Abschluß des Testens zu fordern, wie auch bei den Umständen, die z. B. in [Fig. 9](#) gezeigt sind.

**[0086]** Der Computer macht daher die folgende Berechnung, um festzustellen, ob entweder eine Reaktion im gemischten Bereich oder Fibrin vorliegt:

- (i) Wenn ( $PNeg > 300$ ) und
- (ii) ( $PPos > 260$ ) oder ( $Zone1 > 1200$ ) und
- (iii) ( $Zone2 < 500$ ) oder ( $Zone2 < 0,33 \cdot (PPos + Zone1)$  und  $Zone2 < (1,5 \cdot PNeg)$ ),

dann liegt entweder eine Reaktion im gemischten Bereich oder Fibrin vor und die Klassifikation für diese Säule endet.

**[0087]** Die Begründung für die Teile (i) und (ii) der oben genannten Berechnung ergibt sich schnell. Diese beiden messen, daß sowohl ein großes Pellet gebildet ist als auch oben eine große Agglutination gebildet ist. Der Teil (iii) mißt das Fehlen vieler Zellen im mittleren Bereich und für dies wurde herausgefunden, daß die Messung in Zone2 am verlässlichsten ist. Wenn Zone2 unterhalb einer absoluten Zahl liegt oder weniger ist als ein Bruchteil der oberen Abschnitte ( $PPos$  und  $Zone1$ ) der Mikropartikel, dann ist dies suspekt. Jedoch selbst dann ist die Zone2 nur suspekt, wenn ihr reduzierter Inhalt auch geringer ist als eine Konstante (hier 1,5) mal dem Pelletvolumen ( $PNeg$ ).

**[0088]** Wie angeführt, beendet ein Kennzeichnen aufgrund dieses Umstandes die Klassifizierung, die andernfalls fortfahren würde, wobei diese Säule der Kassette und die Hardware und Software des '808 Patentes verwendet würde. Wie jedoch bei all den anderen Abnormalitäten, die durch diese Erfindung gekennzeichnet werden, muß der Bediener dort nicht aufhören. Alternativ kann eine neue Säule verwendet werden, in derselben oder einer anderen Kassette, um den Test mit einem frischen Aliquot zu wiederholen, das aus demselben, fraglichen Blutvorrat stammt. Beispielsweise könnte in dem Fall, in dem eine Kennzeichnung mit „Reaktion im gemischten Bereich/Fibrin“ erfolgte, ein erneuter Test keine abnormale Reaktion zeigen, was zu der wahrscheinlichen Schlußfolgerung führt, daß sich das erste Ergebnis aufgrund von Fibrin ergab. Im Gegensatz zu einer „Reaktion im gemischten Bereich“ gibt es keinen Grund, warum das fragliche Blut nicht für eine Blutbank geeignet sein sollte, wenn der wahre Grund der war, daß Fibrin vorlag.

#### Beispiele

**[0089]** Die folgenden Arbeitsbeispiele sind nicht erschöpfend und nur dargestellt, um die Ausführungsformen zu erklären, die oben beschrieben sind. In jedem Beispiel wurde eine Kassette mit sechs Säulen, die von Ortho Diagnostic Systems unter dem Markennamen „Ortho BioVue Systems“ erhältlich ist, getestet, wobei die Vorrichtung und Software verwendet wurde, die in dem zuvor genannten '808 Patent beschrieben ist.

#### Beispiel 1 – Hämolysereaktion

**[0090]** Eine bewußt hämolysierte Probe wurde in eine „Ortho BioVue“ Kassette zum Testen eingebracht. Tabelle II zeigt die tatsächlichen Intensitätswerte, die erfaßt wurden.

Tabelle II

Merkmal	Vorderseite	Rückseite
Above	79	82
Outer	238	238

AboveVar	4,57	6,42
PPos	0	4
PNeg	606	622
Zone1	0	0
Zone2	17	0
Zone3	54	0
Slope	110	63
Resid	205	111
BLeft	86	37
BRight	159	51

**[0091]** Aus diesen Daten wurde das „Verhältnis“ („Ratio“) berechnet zu:

(FrontAbove + BackAbove)/(FrontOuter + BackOuter) oder

$$(79 + 82)/(238 + 238) = 161/476 = 0,338.$$

Zellvolumen (unter Verwendung der obigen Formel (A)) =

$$(0 + 4) + (606 + 622) + [(0 + 0) + (17 + 0) + (54 + 0)]/3$$

$$\text{oder } 1232 + 71/3 = 1255,7.$$

AboveVar =

FrontAboveVar + BackAboveVar =

$$4,57 + 6,42 = 10,99.$$

**[0092]** Da der Test untersucht, ob das Verhältnis  $< 0,75$  und

Verhältnis-Zellvolumen  $< 1000$  und

Zellvolumen·AboveVar  $< 2000$  ist, ergibt die Berechnung

0,338 ist  $< 0,75$  und

$0,338 \cdot 1255,7 \approx 424$ , ist  $< 1000$  und

$1255,7 \cdot 10,99 \approx 13800$ , ist  $< 20000$ .

**[0093]** Da alle drei Bedingungen erfüllt sind, wurde die Probe als hämolytiert gekennzeichnet.

#### Beispiel 2 – Merkmale außerhalb des Bereiches

**[0094]** Die Ergebnisse des Beispiels 1 können ferner überprüft werden, um festzustellen, ob irgendwelche Parameter außerhalb des Bereiches liegen, wie zuvor beschrieben. Dementsprechend wurde das Zellgleichgewicht berechnet zu  $|(86 + 37) - (159 + 51)|$ , sodaß das Zellgleichgewicht = 87 ist. Der Test bezüglich des Zellgleichgewichts ergibt somit 73600 und die Antwort ist nein.

**[0095]** Die „Neigung“ wird ebenso überprüft, um festzustellen, ob die „Neigung“  $> 4500$  ist. Vorliegend ist die Neigung =  $110 + 63 = 173$  und dies ist nicht  $> 4500$ .

**[0096]** Schließlich wird „Resid“ überprüft, um festzustellen, ob Resid  $> 2000$  ist. Vorliegend ist Resid =  $205 + 111 = 316$ , was nicht  $> 2000$  ist. Dieses Beispiel ist nicht außerhalb des Bereiches.

**[0097]** Bei der tatsächlichen Ausführung der Erfindung wird der „außerhalb des Bereiches“ Test zuerst ausgeführt, weil, wenn dieser außerhalb des Bereiches anzeigt, es keinen Grund gibt, den Hämolysetest auszuführen, was der Computer auch nicht tut.

#### Beispiel 3 – Zu wenige Zellen

**[0098]** Beispiel 1 wurde wiederholt, jedoch wurden dieses Mal zu wenige Zellen angeordnet, d. h. es wurde ein Volumen von lediglich 3  $\mu\text{L}$  verwendet. Tabelle III zeigt die ausgelesenen Ergebnisse, die erfaßt wurden, und die Berechnungen, die sich ergaben:

Tabelle III

Merkmal	Vorderseite	Rückseite
PPos	0	0
PNeg	313	435
Zone1	0	8
Zone2	6	16
Zone3	0	0
Slope	27	16
Resid	43	36
BLeft	22	54
BRight	32	38

**[0099]** Aus diesen Daten ergab die Berechnung bezüglich zu weniger Zellen das Ergebnis:  $[(0 + 0) + (313 + 435) + 0,33] \cdot [(0 + 8) + (6 + 16) + (0 + 0)] = 758$  und dies ist tatsächlich  $< 800$ . Daher wurden die Ergebnisse mit „zu wenig Zellen“ gekennzeichnet.

#### Beispiel 4 – Zu viele Zellen

**[0100]** Beispiel 1 wurde wiederholt, bis auf die Tatsache, daß bewußt zu viele Zellen hinzugefügt wurden, durch Hinzufügen eines Volumens von 50  $\mu\text{L}$ . Tabelle IV zeigt die erfaßten, ausgelesenen Ergebnisse und die Berechnungen, die sich aus diesen ergaben:

Tabelle IV

Merkmal	Vorderseite	Rückseite
PPos	0	0
PNeg	5365	4665
Zone1	0	29
Zone2	0	55
Zone3	0	0
Slope	0	0
Resid	0	0
BLeft	0	0
BRight	0	0

**[0101]** Verwendet man die Berechnung für zu viele Zellen, so erhält man das Ergebnis von  $0,5 \cdot (0 + 0) + (5365 + 4665) + 0,33 \cdot [(0 + 29) + (0 + 55) + (0 + 0)] \cong 10058$  und dies ist tatsächlich  $> 7000$ . Daher wurde diese Säule mit „zu viele Zellen“ gekennzeichnet.

#### Beispiel 5 – Agglutination im gemischten Bereich

**[0102]** Beispiel 1 wurde wiederholt, bis auf die Tatsache, daß die Probe, die hinzugefügt wurde, von Patien-

tenproben genommen wurde, von denen bekannt war, daß sie eine Reaktion im gemischten Bereich aufweisen, was visuell von Experten bestimmt wurde. Tabelle V zeigt die ausgelesenen Ergebnisse, die erfaßt wurden, und die Berechnungen, die sich aus diesen ergaben:

Tabelle V

Merkmal	Vorderseite	Rückseite
PPos	868	644
PNeg	1381	1636
Zone1	0	0
Zone2	6	0
Zone3	0	0
Slope	4	1
Resid	45	90
BLef	79	252
BRigh	100	276

**[0103]** Aus diesen Daten wurde die Berechnung für „Reaktion im gemischten Bereich“ wie folgt durchgeführt:

(i) Ist  $PNeg > 300$ ?

Das heißt  $(1381 + 1636) \approx 3000$ ,  
sodaß dies  $> 300$  ist.

(ii) Ist  $(PPos > 260)$  oder  $(Zone1 > 1200)$ ?

Das heißt, ist  $868 + 644$  größer als 260,  
obwohl  $0 + 0$  nicht größer als 1200 ist.

Daher ist das erste von diesen wahr.

(iii) Ist  $(Zone2 < 500)$  oder ist  $((Zone2 < 0,33 (PPos + Zone1))$  und ist  $Zone2 < (1,5 Pneg)$ ? Das heißt  $(6 + 0)$  ist kleiner als 500, sodaß dies erfüllt ist. Somit sind alle drei (i), (ii) und (iii) erfüllt und die Säule wurde daher mit Reaktion im gemischten Bereich gekennzeichnet.

#### Software

**[0104]** Eine Standardprogrammierung wird verwendet, um den Computer zu programmieren, wobei ein Code verwendet wird, der die Schritte des Flußdiagramms der [Fig. 10](#) ausführt. (Dies kann schon durch einen Sourcecode von 200 Zeilen für die Schritte **1002** bis **1034** erreicht werden.) In dem Schritt **1000** werden die Ergebnisse, die von der Bildgebungsverarbeitungssoftware stammen, wie in dem '808 Patent beschrieben, in das Klassifikationsprogramm in den Prozessor **60** eingegeben. Als nächstes überprüft der Computer im Schritt **1002**, ob Verarbeitungsfehler vorliegen, die dazu führen, daß Merkmale der Säulenbilder außerhalb des Bereichs liegen, wie zuvor beschrieben. Wenn einer von diesen erfaßt wird, Schritt **1004**, wird die Säule so gekennzeichnet und diese Probe/Säule wird nicht durch weitere Berechnungen geführt, Schritt **1006**. Liegen in dem Schritt **1004** keine Kennzeichnungen vor, führt der Computer einen Test auf Hämolyse aus, Schritt **1010**, wie zuvor beschrieben. Wird eine Hämolyse erfaßt, wird die Säule so gekennzeichnet, Schritt **1012**, und das Verfahren endet für diese Säule, Schritt **1014**.

**[0105]** Als nächstes, wenn immer noch keine Kennzeichnung erfolgt ist, überprüft der Computer das Volumen der roten Blutkörperchen, Schritt **1020**, d. h. liegt entweder ein zu geringes Zellvolumen oder ein zu großes Zellvolumen vor, wie zuvor beschrieben? Falls einer dieser Tests positiv ausfällt, erfolgt eine Kennzeichnung mit „falsches Zellvolumen“, Schritt **1022** (wobei dies auch ausführlicher erfolgen kann, um anzugeben, was es tatsächlich ist) und das Verfahren endet für diese Säule, Schritt **1024**.

**[0106]** Erfolgte immer noch keine Kennzeichnung, untersucht der Computer als nächstes, ob eine Reaktion im gemischten Bereich/Fibrin vorliegt, wie zuvor beschrieben, Schritt **1030**. Wenn dieser positiv testet, erfolgt eine Kennzeichnung für diese Säule, Schritt **1032**, und es erfolgen keine weiteren Berechnungen für diese

Säule, Schritt 1034.

**[0107]** Schließlich, vorausgesetzt, daß sich alle Tests auf Abnormalitäten als „negativ“ erwiesen, fährt der Computer mit dem Klassifizierungsschritt **1200** fort, der ein Untersuchen umfaßt, ob die Probe in der positiven Gruppierung **1210** oder der „negativen“ Gruppierung **1211** ist. Falls die Probe in der positiven Gruppierung ist, wird sie folgend weiter klassifiziert als +1, +2, +3 oder +4, Schritt **1212**, wie vollständig in dem '808 Patent beschrieben. Falls die Probe in der „negativen“ Gruppierung liegt, wird dies weiter unterklassifiziert in die bekannten Klassen 0, +0,5 oder unbestimmt, Schritt **1214**, in [Fig. 10](#) als „Ind“ gezeigt.

**[0108]** Daher führt der Computer bevorzugt den Test **1002** vor dem Test **1010**, vor dem Test **1020**, was vor dem Test **1030** ist, aus. Die Begründung dafür, den Test **1002** als erstes auszuführen, ist offensichtlich – wenn die Ergebnisse experimentell außerhalb des Bereiches liegen, ist kein weiterer Test gültig. Ferner wird der Test **1010** bevorzugt vor dem Test **1020** oder **1030** ausgeführt, sodaß der Zustand der Hämolyse bekannt ist, obwohl das System andernfalls die Probe mit „zu wenigen Zellen“ kennzeichnen könnte. Es ist jedoch nicht notwendig, daß der Test **1020** vor dem Test **1030** ausgeführt wird.

### Patentansprüche

1. Verfahren zum Erfassen von abnormalen Reaktionen in einer Kassette, die verwendet wird, um eine Agglutination von roten Blutkörperchen zu klassifizieren, wobei das Verfahren folgende Schritte umfaßt:

- a) Einbringen einer Blutprobe eines Patienten in eine Kassette, die Agglutinationsreagenzien und eine Säule von Mikropartikeln aufweist;
- b) Zentrifugieren der Kassette, um nicht-agglutinierte Blutzellen dazu zu bewegen, durch die Säule zu fließen, wobei agglutinierte Zellen an Anzeigepositionen in der Spalte gehalten werden;
- c) Erzeugen eines Bildes der Säule und der Blutzellen, die in der und um die Säule verteilt sind, auf einer Detektoranordnung, die eine Vielzahl von Pixeln umfaßt;
- d) Korrelieren des Bildes auf der Anordnung mit vordefinierten Klassen von Bildern, die Agglutinationsreaktionen von bekannten Klassen darstellen, und
- e) vor dem Schritt d), Erfassen der Existenz, falls vorhanden, einer Abnormalität in dem erzeugten Bild, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die besteht aus:
  - i) Fehler bei dem Ausführen der Schritte a), b) oder c), die dazu führen, daß abgebildete Merkmale der Säule oder irgendein Pellet, das in der Säule hergestellt wurde, außerhalb des Bereiches liegen, wobei die Fehler diejenigen umfassen, die durch ein abnorm großes Ungleichgewicht in der Zellverteilung in der Säule vertreten sind, wenn eine Hälfte der Säule mit der anderen Hälfte verglichen wird, oder durch ein ungeeignet geformtes Zellpellet, das durch Schritt b) an den Boden der Säule gedrückt wird, und wobei das ungeeignet geformte Pellet der Abnormalität i) durch die Neigung einer Linie definiert ist, die an die obere Oberfläche des Pellets angepaßt ist, die durch den Schritt c) erfaßt wurde, und durch die Standardabweichung (root mean square) zwischen der angepaßten Linie und der realen unteren Oberfläche;
  - ii) Hämolyse der Probe, die in Schritt a) eingebracht wurde, wobei die Hämolyse berechnet wird aus dem Verhältnis der Intensität der Flüssigkeit, die innerhalb der Säule oberhalb der Mikropartikel abgebildet wurde, und der Intensität, die in einem vorbestimmten Bereich außerhalb der Säule abgebildet wurde, und der Varianz des Zellvolumens und Flüssigkeitintensität, wobei die Varianz mittels der Quadratwurzel des quadratischen Mittelwertes der Differenz des Intensitätswertes eines jeden Pixels und des mittleren Intensitätswertes in dem Messbereich berechnet wird;
  - iii) Vorhandensein zu weniger oder zu vieler Blutzellen in der Kassette, anhand des Zellvolumens bestimmt, wobei das Zellvolumen berechnet wird als Summe der Zellen, die an der oberen Grenzfläche der Mikropartikel abgebildet wurden, des Pellets, falls an dem Boden der Säule vorhanden, und dem Mittelwert der Zellen, die in den Bereichen zwischen der oberen Grenzfläche und dem Pellet erfaßt werden;
  - iv) eine Agglutination im gemischten Bereich oder das Vorhandensein von Fibrin an der Oberseite der Mikropartikel, wobei die Abnormalität iv) bestimmt wird durch das Erfassen von zu vielen Zellen, die an oder nahe der Oberseite der Mikropartikel der Säule zusammen mit zu vielen Zellen an dem Boden der Säule und zu wenigen Zellen, die in Bereichen der Säule zwischen der Oberseite und dem Boden erfaßt werden, vorliegen.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Schritt e) das Vorhandensein einer jeden der Abnormalitäten i) bis iii) erfaßt und, ob die Abnormalität iv) vorliegt.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Verfahren vor dem Ausführen des Schrittes d) angehalten wird, wenn in dem Schritt e) irgendeine der Abnormalitäten erfaßt wurde.

4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Schritte a) bis e) mit einem frischen, ali-

quoten Teil derselben Blutprobe in einer anderen Säule wiederholt werden, wenn irgendeine der Abnormalitäten i) bis iv) erfaßt wurde.

5. Verfahren nach Anspruch 1, wobei ein Faktor in der Berechnung der Abnormalität ii) ist, daß das Verhältnis kleiner als 0,75 ist.

6. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Abnormalität iii) ein Erfassen umfaßt, ob eine Blutprobe in der Säule vorliegt.

7. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Erfassungsschritt e) der Reihe nach die Abnormalitäten i) bis iii) überprüft, gefolgt von einem gleichzeitigen Testen, ob entweder ein gemischter Bereich oder Fibrin vorliegt.

Es folgen 6 Blatt Zeichnungen

## Anhängende Zeichnungen

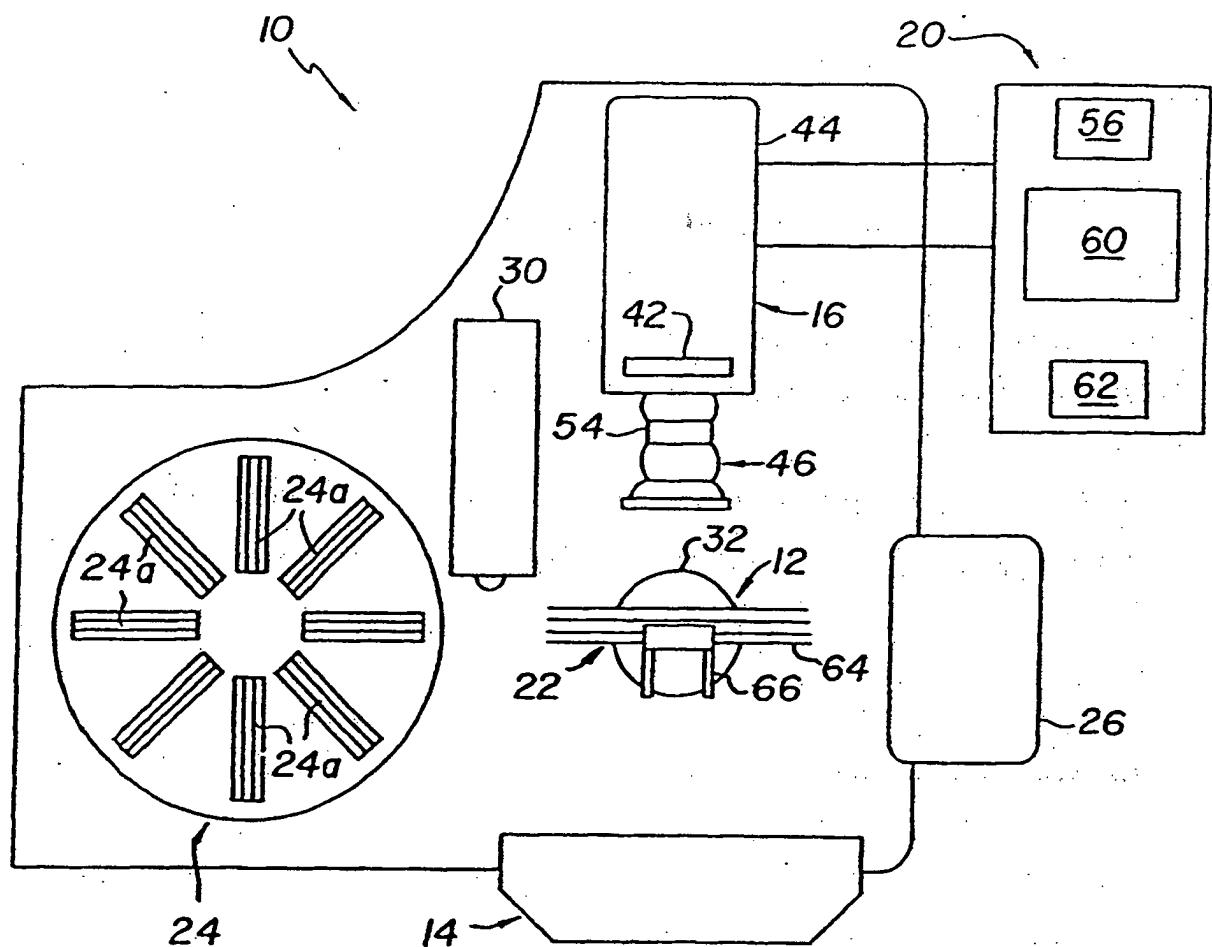


FIG. 1

FIG. 2

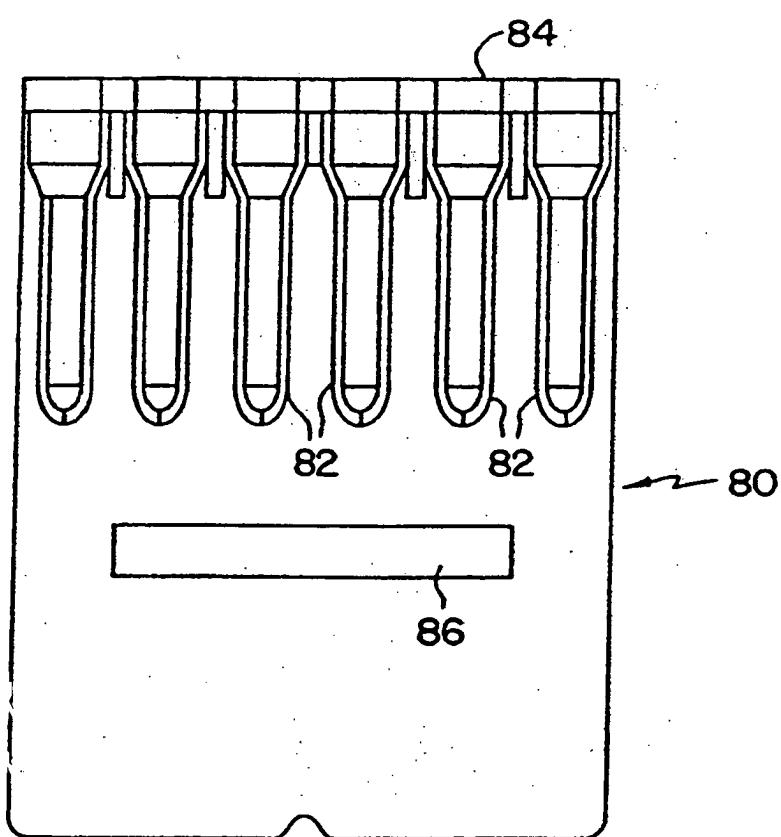
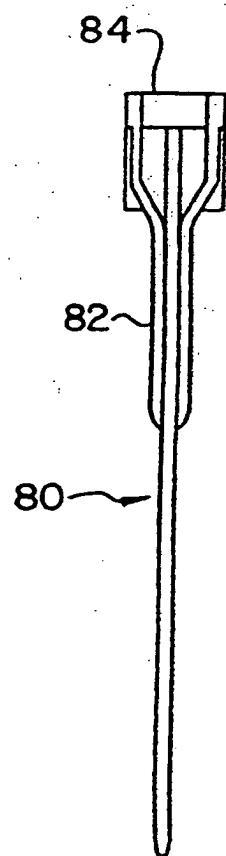
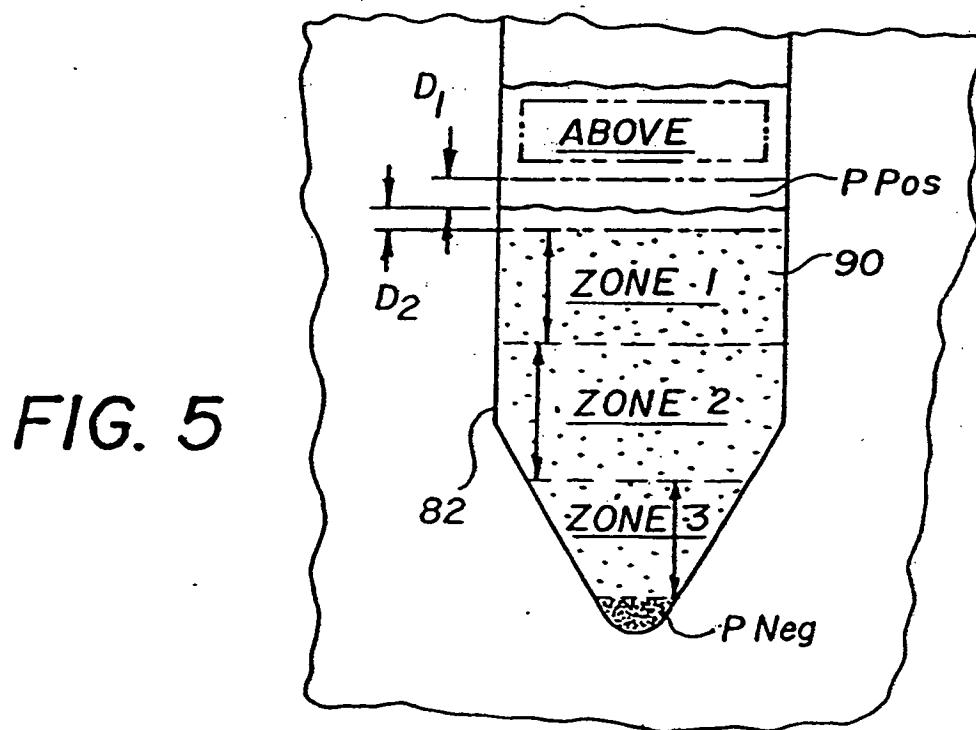
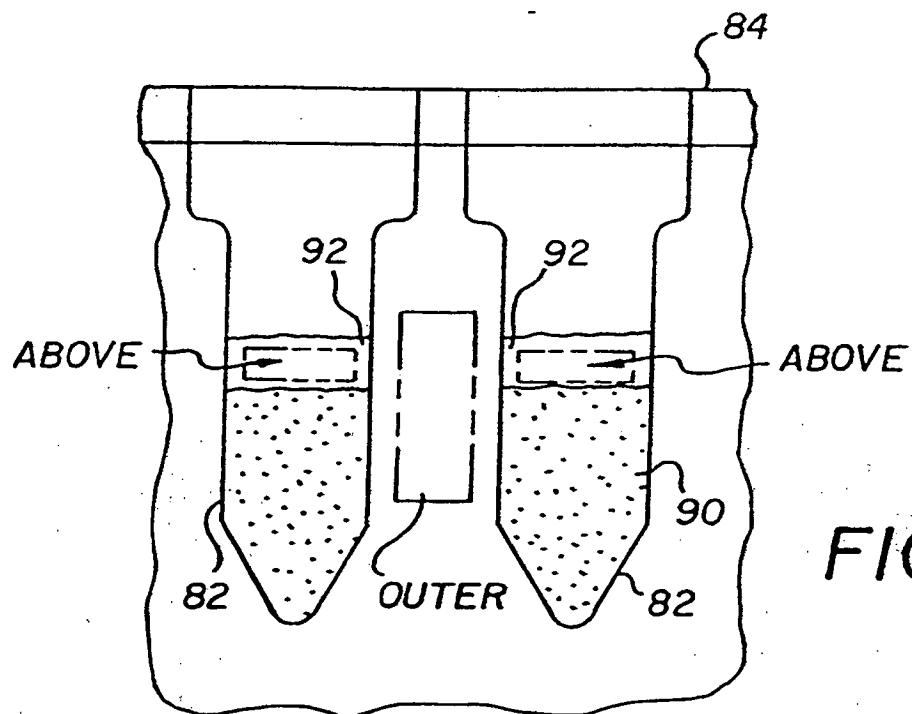
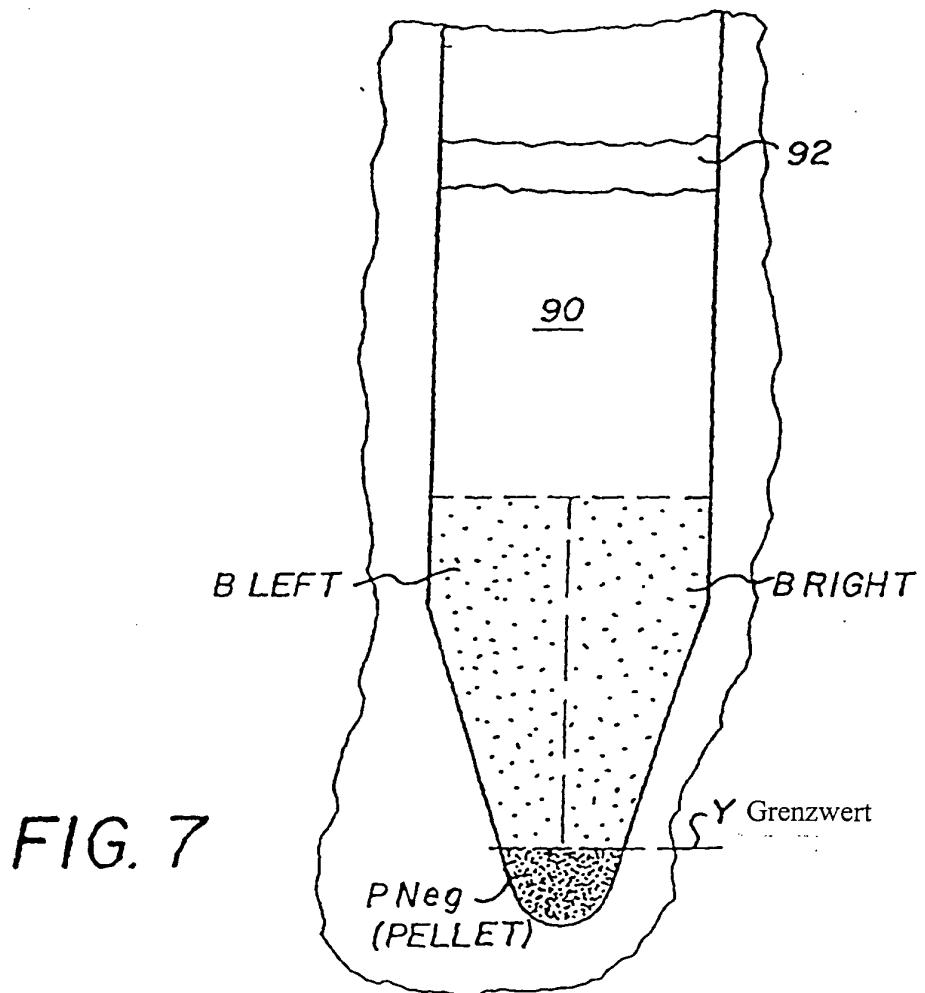
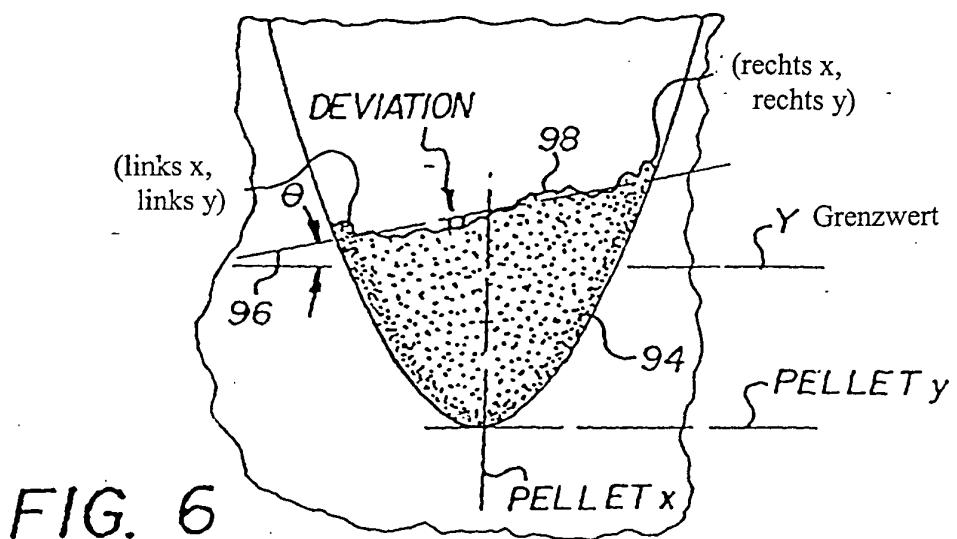


FIG. 3







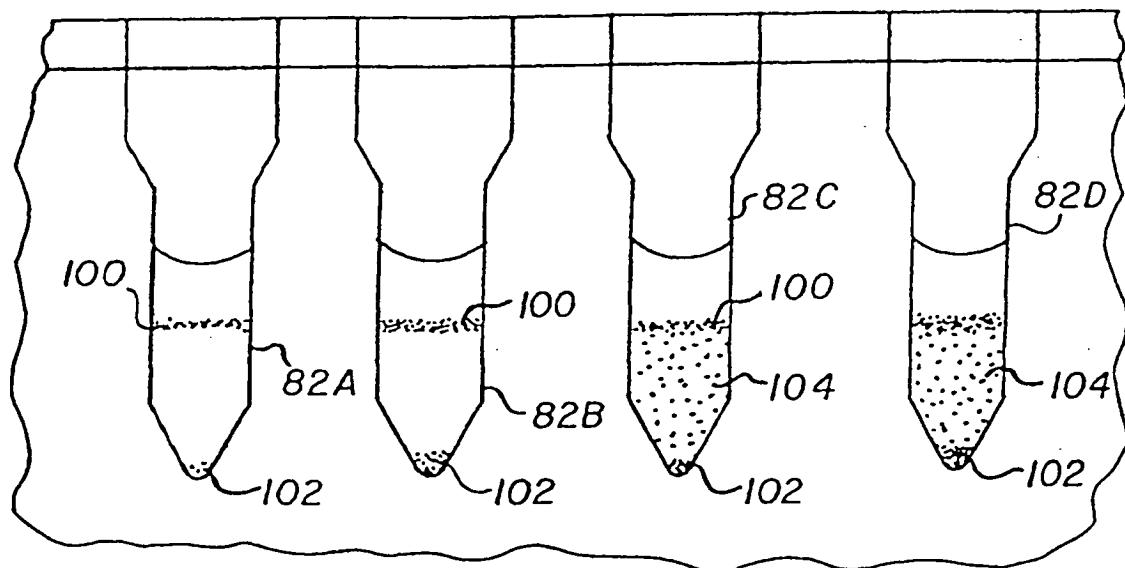
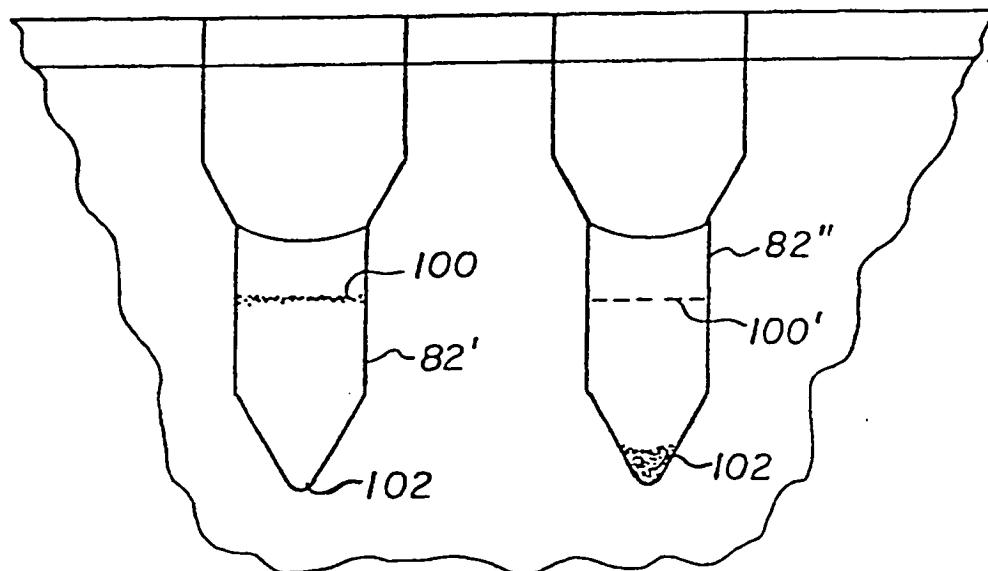


FIG. 8



Vergleichsbeispiel

FIG. 9

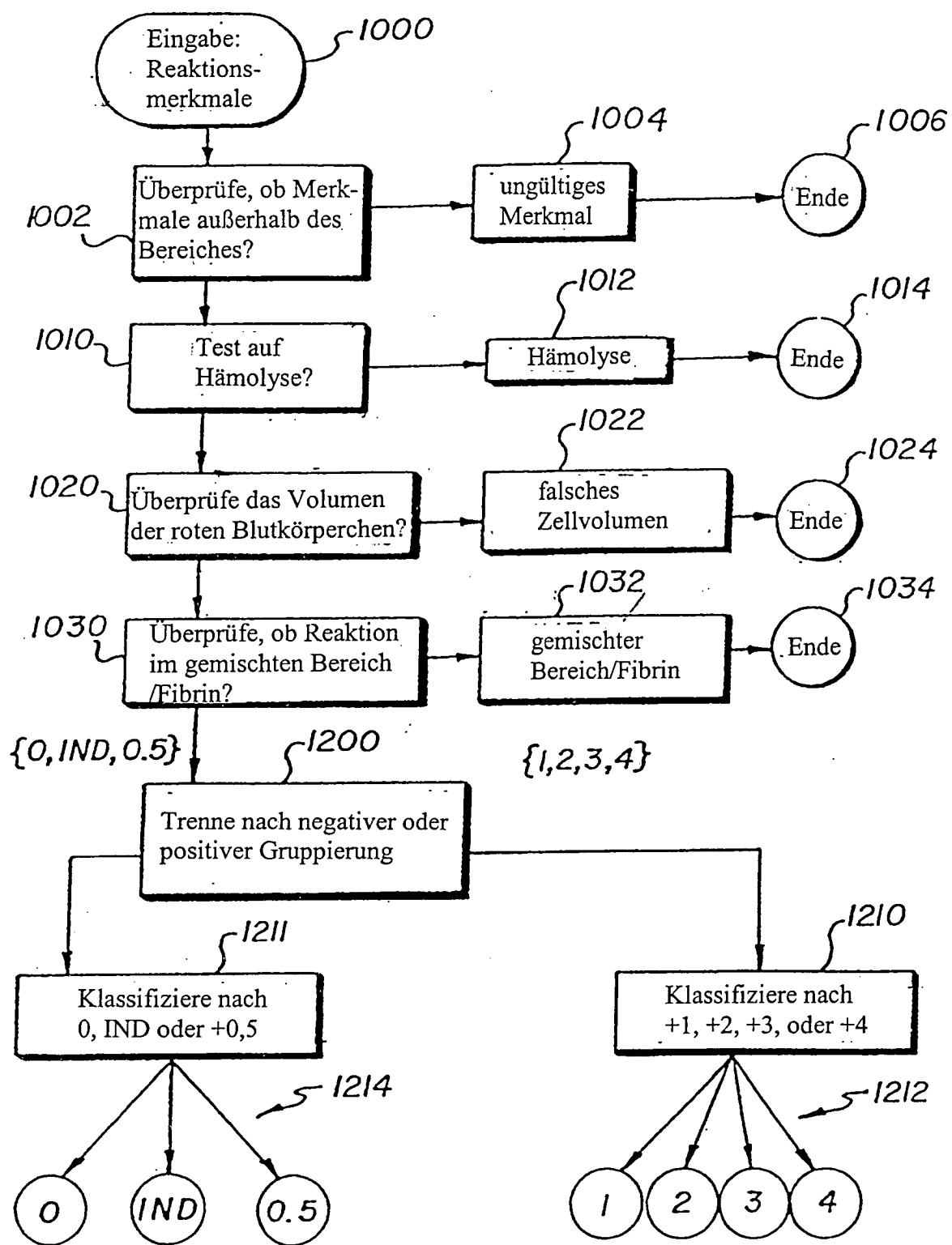


FIG. 10