

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum

Internationales Büro

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
29. Juni 2017 (29.06.2017)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2017/108129 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:

G01N 15/14 (2006.01) G01N 15/10 (2006.01)
G01N 15/00 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2015/081156

(22) Internationales Anmeldedatum:
23. Dezember 2015 (23.12.2015)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(71) Anmelder: SIEMENS HEALTHCARE GMBH
[DE/DE]; Henkestr. 127, 91052 Erlangen (DE).

(72) Erfinder: HAYDEN, Oliver; Dachsweg 4 a, 91074 Herzogenaurach (DE). RICHTER, Lukas; Bügstraße 14, 96114 Hirschaid (DE). UGELE, Matthias; Kiefernweg 6, 92318 Neumarkt (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,

GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

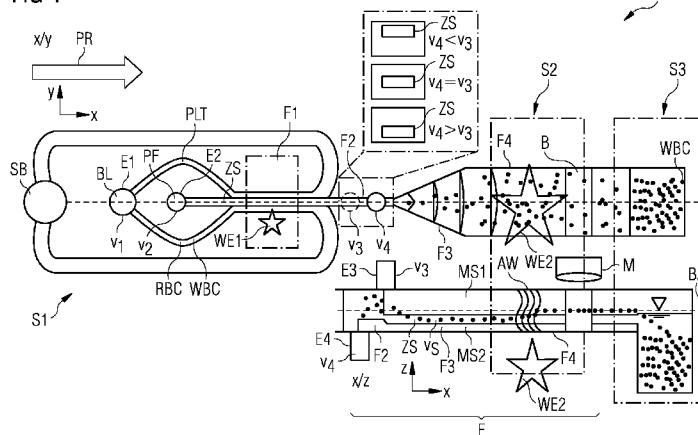
Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)

(54) Title: FLOW CELL FOR ANALYZING PARTICLES IN A LIQUID TO BE EXAMINED

(54) Bezeichnung : FLIESSZELLE ZUR ANALYSE VON PARTIKELN IN EINER ZU UNTERSUCHENDEN FLÜSSIGKEIT

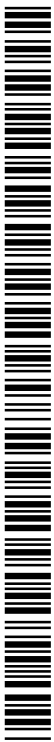
FIG 1



(57) Abstract: The invention relates to a device (1, 2) for examining particles (RBC, WBC, PLT) in a liquid to be examined, comprising a flow passage (F) through which the liquid (BL) to be examined is moved. The flow passage (F) has at least one inlet (E3, E4) through which at least one sheath fluid (PF1, PF2) flows into the flow passage (F) such that the at least one sheath fluid (PF1, PF2) forms at least one sheath flow (MS1, MS2) in the flow passage (F). The device (1, 2) further comprises a wave generating device (WE2) for piezoacoustically generating sound waves (AW) which propagate through the flow passage (F) transversely to the flow direction of the liquid (BL) to be examined and form wave nodes (KN) on a monitoring plane (BA) such that particles (WBC, RBC, PLT) to be examined of the liquid (BL) to be examined are moved onto the monitoring plane (BA) and accumulate thereon on the basis of the pressure effect of the sound waves (AW) in the transversal direction.

(57) Zusammenfassung:

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]



WO 2017/108129 A1



Es wird eine Vorrichtung (1, 2) zur Untersuchung von Partikeln (RBC, WBC, PLT) in einer zu untersuchenden Flüssigkeit beschrieben, die eine Fließpassage (F) umfasst, durch die die zu untersuchende Flüssigkeit (BL) bewegt wird. Die Fließpassage (F) weist mindestens einen Einlass (E3, E4) auf, durch den mindestens eine Mantelflüssigkeit (PF1, PF2) in die Fließpassage (F) strömt, derart, dass die mindestens eine Mantelflüssigkeit (PF1, PF2) mindestens einen Mantelstrom (MS1, MS2) in der Fließpassage (F) ausbildet. Die Vorrichtung (1, 2) umfasst außerdem eine Wellenerzeugungseinrichtung (WE2) zur piezoakustischen Erzeugung von Schallwellen (AW), welche sich transversal zur Fließrichtung der zu untersuchenden Flüssigkeit (BL) durch die Fließpassage (F) ausbreiten und Wellenknoten (KN) in einer Beobachtungsebene (BA) ausbilden, so dass aufgrund der Druckwirkung der Schallwellen (AW) in Transversalrichtung zu untersuchende Partikel (WBC, RBC, PLT) der zu untersuchenden Flüssigkeit (BL) in die Beobachtungsebene (BA) verschoben und dort angereichert werden.

Beschreibung

Fließzelle zur Analyse von Partikeln in einer zu untersuchen-
den Flüssigkeit

5

Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung zur Untersuchung von
Partikeln in einer zu untersuchenden Flüssigkeit. Weiterhin
betrifft die Erfindung eine Vorrichtung zur mikroskopischen
Beobachtung von Partikeln in einer zu untersuchenden Flüs-
10 sigkeit. Zudem betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Un-
tersuchung von Partikeln in einer zu untersuchenden Flüs-
sigkeit. Überdies betrifft die Erfindung die Verwendung einer
Fließzelle und einer Wellenerzeugungseinrichtung zur piezo-
akustischen Erzeugung von Schallwellen.

15

Blut besteht aus mehreren Bestandteilen, die im Blut in un-
terschiedlichen Konzentrationen vorliegen. Rote Blutkörper-
chen, auch Erythrozyten genannt, machen 98% des Blutes aus,
Blutplättchen, auch Thrombozyten genannt, umfassen hingegen
20 nur 1,9% des Blutes und weiße Blutkörperchen, auch Leukozyten
genannt, haben sogar nur einen Anteil von 0,1% am Blut. Wenn
man nur die Blutbestandteile mit geringem Anteil, d.h. die
Blutplättchen oder die weißen Blutkörperchen untersuchen
will, gibt es zwei Möglichkeiten der Vorgehensweise. Entweder
25 detektiert man die bis zu tausendfach häufiger vorhandenen
roten Blutkörperchen zusammen mit dem interessierenden Zell-
typ, d.h. den Thrombozyten oder den Leukozyten, oder man ent-
fernt vor der Analyse die roten Blutkörperchen, um die inte-
ressierenden Bestandteile in der Analyseflüssigkeit entspre-
30 chend anzureichern.

Bei der ersten Art der Herangehensweise verlängert sich die
Gesamtanalysezeit erheblich, nämlich um einen Faktor entspre-
chend dem Verhältnis zwischen dem Anteil der roten Blutkör-
35 perchen und dem Anteil des zu analysierenden Zelltyps. Außer-
dem erhöht sich die dabei zu verarbeitende Datenmenge extrem.
Bei der zweiten Art der Herangehensweise ist ein Arbeitsgang
vor der eigentlichen Analyse notwendig, bei dem die nicht zu

analysierenden Bestandteile des Blutes aus der Analyseflüssigkeit entfernt werden. Nur bei der zweiten Vorgehensweise wird eine akzeptable Reduzierung der Analysezeit erreicht.

5 Herkömmliche Analyseverfahren beruhen auf elektrischen Methoden, wie zum Beispiel dem Coulter-Prinzip. Das Prinzip des Coulter-Zählers basiert auf der Messung der Änderung der mittleren elektrischen Leitfähigkeit zwischen zwei Elektroden. Diese tauchen in eine elektrisch leitfähige Flüssigkeit, welche Partikel mit einer zur Flüssigkeit unterschiedlichen Leitfähigkeit enthält. Die bei dem Verfahren verwendete Messeinrichtung umfasst zwei Messkammern. In jeder der beiden Kammern, die durch eine schmale Öffnung voneinander getrennt sind, ist eine Messelektrode angeordnet. Dabei richtet sich die Größe der Öffnung nach der Größe der zu untersuchenden Partikel.

Andere herkömmliche Analyseverfahren beruhen auf optischen Methoden. In diesem Zusammenhang ist die Durchflusszytometrie zu nennen. Dabei werden zu untersuchende Zellen in einer Flüssigkeit, die mit hoher Geschwindigkeit einzeln ein elektrisches Feld oder einen Lichtstrahl passieren, analysiert. Je nach Form, Struktur oder Färbung der Zellen, ergeben sich unterschiedliche Effekte, auf deren Basis die Eigenschaften der jeweiligen Zelle ermittelt werden. Dieses Prinzip wird zum Beispiel bei Hämatologie-Analysegeräten oder Fluoreszenz-Durchflusszytometern verwendet. Bei der Fluoreszenz-Durchflusszytometrie werden mit einem fluoreszierenden Marker versehene Zellen je nach Färbung in unterschiedliche Reagenzgefäße sortiert.

Weiterhin wird auch die Mikroskopie zur Analyse von Blutbestandteilen eingesetzt. Dabei werden beispielsweise Zellen auf einem Objektträger angefärbt und mit einem Mikroskop beobachtet. Es kann ein hoher Durchsatz von zu untersuchenden Zellen erreicht werden, wenn das Anfärben von Zellen mit Fluoreszenzstoffen und eine mikroskopische Beobachtung mit der Durchflusszytometrie kombiniert werden.

Zur Trennung von zu untersuchenden Partikeln in Flüssigkeiten werden auch Methoden mit hochviskosen Mantelflüssigkeiten (im Englischen als „sheath flow“ bezeichnet) und piezoakustischer Zelltrennung eingesetzt. Derartige Verfahren sind zum Beispiel in US 2004/0070757 A1, US 2010/0009333 A1, Laurel et al., Chem. Soc. Rev., 2007, 36, 492-506 und A. Nilsson et al., Micro Total Analysis Systems 2002, Kluwer Academic Publishers, Nara, Japan 2002 beschrieben.

10

Allerdings wurden die genannten Verfahren bisher nicht dafür eingesetzt, schwach konzentrierte Bestandteile von zu untersuchenden Flüssigkeiten anzureichern.

15

Es ist somit eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, eine verbesserte Vorrichtung und ein entsprechendes Verfahren zur Untersuchung von Partikeln in einer zu untersuchenden Flüssigkeit anzugeben, welche auch zur Analyse von schwach konzentrierten Partikeln in zu untersuchenden Flüssigkeiten geeignet sind.

20

Diese Aufgabe wird durch eine Vorrichtung zur Untersuchung von Partikeln in einer zu untersuchenden Flüssigkeit gemäß Patentanspruch 1, eine Vorrichtung zur mikroskopischen Beobachtung von Partikeln in einer zu untersuchenden Flüssigkeit gemäß Patentanspruch 12, ein Verfahren zur Untersuchung von Partikeln in einer zu untersuchenden Flüssigkeit gemäß Patentanspruch 14 und eine Verwendung einer Fließzelle und einer Wellenerzeugungseinrichtung zur piezoakustischen Erzeugung von Schallwellen gemäß Patentanspruch 15 gelöst.

30

Die erfindungsgemäße Vorrichtung zur Untersuchung von Partikeln in einer zu untersuchenden Flüssigkeit weist eine Prozessstufe zum Trennen und Positionieren der zu untersuchenden Partikel auf. Die Prozessstufe umfasst eine Fließpassage, durch die die zu untersuchende Flüssigkeit mit einer ersten Flussrate bewegt wird. Eine solche Fließpassage ist vorzugsweise derart ausgebildet, dass die durch die Fließpassage

35

hindurchfließenden Flüssigkeiten laminar fließen. Hierzu werden geeignete Durchmesser der Fließpassage und die Flussraten bzw. die Fließgeschwindigkeiten der durch die erste Fließpassage hindurchfließenden Flüssigkeiten gewählt. Die Fließpassage kann zum Beispiel durch Verwendung eines Leitungselements oder eines rohrartigen Bauelements, welches vorzugsweise optisch transparent ist, realisiert sein. Als Flussrate soll ein durch einen Querschnitt hindurchfließendes Flüssigkeitsvolumen pro Zeit definiert sein.

10

Die Fließpassage umfasst mindestens einen Einlass, durch den jeweils mindestens eine Mantelflüssigkeit mit mindestens einer zweiten Flussrate in die Fließpassage strömt, derart, dass die mindestens eine Mantelflüssigkeit mindestens einen Mantelstrom in der Fließpassage ausbildet und die zu untersuchende Flüssigkeit längs zu dem mindestens einen Mantelstrom durch die Fließpassage fließt. Als Mantelstrom soll in diesem Zusammenhang also ein Flüssigkeitsstrom verstanden werden, der einen anderen Flüssigkeitsstrom zumindest in einer Richtung umgibt bzw. auf einer Seite des anderen Flüssigkeitsstroms in dessen Fließrichtung vorbeifließt, wobei der Mantelstrom und der andere Flüssigkeitsstrom in dieselbe Richtung fließen. Der Mantelstrom kann jedoch eine andere Geschwindigkeit und eine andere Flussrate aufweisen als der von ihm umgebene bzw. an seiner Seite fließende andere Flüssigkeitsstrom. Als Mantelstromflüssigkeit, auch Mantelflüssigkeit genannt, werden üblicherweise sogenannte Pufferlösungen verwendet, in denen zu untersuchende Partikel haltbar bleiben bzw. vor Änderungen durch die Trägerflüssigkeit geschützt sind.

30

Die erfindungsgemäße Vorrichtung zur Untersuchung von Partikeln in einer zu untersuchenden Flüssigkeit umfasst außerdem eine Wellenerzeugungseinrichtung zur piezoakustischen Erzeugung von Schallwellen. Unter einer piezoakustischen Erzeugung von Schallwellen wird die periodische, elektrische Anregung von piezokeramischen Schwingungselementen verstanden. Dabei werden die piezokeramischen Schwingungselemente mit

35

Hilfe eines elektrischen Feldes bzw. einer elektrischen Spannung zu einer mechanischen Schwingung angeregt, durch welche wiederum Schallwellen hervorgerufen werden, die sich in den durch die Fließpassage fließenden Flüssigkeiten ausbreiten.

5 Durch die Anordnung von der Wellenerzeugungseinrichtung gegenüberliegenden Reflexionselementen wird die Ausbildung von stehenden Wellen erreicht. Im einfachsten Fall genügt hierzu beispielsweise die Seitenwand einer Rohrleitung, welche die durch die Fließpassage fließenden Flüssigkeiten umgibt und

10 leitet.

Die mit Hilfe der piezokeramischen Schwingungselemente erzeugten Schallwellen breiten sich transversal zur Fließrichtung der zu untersuchenden Flüssigkeit durch die Fließpassage

15 aus und bilden Wellenknoten in einer Beobachtungsebene aus, so dass aufgrund der Druckwirkung der Schallwellen in Transversalrichtung zu untersuchende Partikel der zu untersuchenden Flüssigkeit in die Beobachtungsebene verschoben werden und dort angereichert werden. Eine Anreicherung der zu unter-

20 suchenden Partikel in der Beobachtungsebene wird erreicht, weil bei der Verschiebung der zu untersuchenden Partikel deren spezifisches kinematisches Verhalten unter dem Einfluss von Schallwellen genutzt wird. Beispielsweise werden im Vergleich zu den übrigen Partikeln relativ groß dimensionierte

25 Partikel durch die Schallwellen mit höherer Geschwindigkeit in Querrichtung bewegt als kleinere Partikel. Dieser Geschwindigkeitsunterschied, kann zum Beispiel dazu genutzt werden, dass deutlich mehr größere Partikel in der Beobachtungsebene angereichert werden, als unerwünschte kleinere

30 Partikel.

Die zu untersuchenden Partikel werden in Ausbreitungsrichtung der Schallwellen bis zu den Wellenknoten befördert, wo sie keiner Kraft in Querrichtung mehr ausgesetzt sind und sich

35 daher nur noch in Flussrichtung weiterbewegen. Eine Beobachtungsebene bzw. ein Beobachtungsbereich umfasst einen in Querrichtung zur Flussrichtung eng begrenzten Abschnitt in der Fließpassage, in der mit einer zur Beobachtung der zu un-

tersuchenden Partikel verwendeten optischen Beobachtungseinrichtung Objekte, insbesondere die zu untersuchenden Partikel, scharf beobachtet werden können. Die Ausdehnung des Beobachtungsbereichs in Querrichtung hängt also von der Schärfentiefe der verwendeten optischen Beobachtungseinrichtung ab. Ferner hängt die Position des Beobachtungsbereichs in Querrichtung von der Einstellung und Anordnung der optischen Beobachtungseinrichtung ab.

10 Bei der Ansteuerung der Einlässe bzw. von Einrichtungen zur Bewegung der Flüssigkeiten ist der Wert der mindestens einen zweiten Flussrate derart gewählt, dass der mindestens eine Mantelstrom einen vorbestimmten Querschnitt aufweist, so dass die Beobachtungsebene bzw. der Beobachtungsbereich durch den
15 mindestens einen Mantelstrom verläuft und die zu untersuchenden Partikel in dem mindestens einen Mantelstrom bzw. der mindestens einen Mantelflüssigkeit angereichert werden. Die Wahl bzw. Steuerung der Flussraten kann über eine Steuereinheit geschehen, welche Werte für die einzelnen Flussraten vorausberechnet und aufeinander abstimmt und die Antriebselemente zum Erzeugen der einzelnen Flüsse der Mantelflüssigkeiten sowie der zu untersuchenden Flüssigkeit entsprechend den
20 ermittelten Flussraten ansteuert.

25 Auf diese Weise wird also der Zentralstrom dezentriert, so dass zu untersuchende Partikel bei der Separation aus dem Zentralstrom in einen vorzugsweise hochtransparenten Mantelstrom versetzt werden können und sich dort gleichzeitig in der Beobachtungsebene bzw. dem Beobachtungsbereich befinden.
30 Die so separierten, zu untersuchenden Partikel können dann in dem vorzugsweise hochtransparenten Mantelstrom stromabwärts mit einer entsprechenden Beobachtungseinrichtung leicht beobachtet werden, ohne dass die übrigen Partikel, welche sich in dem Zentralstrom befinden, die Sicht auf die zu untersuchenden Partikel stören oder gar verhindern könnten. Mit Hilfe der erfindungsgemäßen Vorrichtung zur Untersuchung von
35 Partikeln in einer zu untersuchenden Flüssigkeit wird also eine Anreicherung von zu untersuchenden Partikeln in einer

Beobachtungsebene erreicht. Zusätzlich wird mit Hilfe der akustischen Wellen auch eine Ausrichtung der zu untersuchenden Partikel entsprechend der Orientierung der Beobachtungsebene erzielt, so dass diese gut beobachtet werden können.

5 Zur Ausrichtung der Partikel wird eine Ausbreitungsrichtung der akustischen Wellen senkrecht zur Beobachtungsebene gewählt. Somit kann auf eine Zugabe von Polymerstoffen zur Ausrichtung der zu untersuchenden Partikel, wie es oft herkömmlich angewandt wird, verzichtet werden oder zumindest die
10 Dauer, für die die zu untersuchenden Partikel den Polymeren zu ihrer Ausrichtung ausgesetzt sind, reduziert werden. Da die genannten Polymerstoffe bei zu lang andauernder Einwirkung auf die zu untersuchenden Partikel deren äußere Gestalt unerwünscht verändern können, ist es besonders vorteilhaft,
15 wenn deren Anwendung eingeschränkt oder gar ganz darauf verzichtet werden kann. Auf diese Weise kann also die Qualität der zu beobachtenden Partikel aufrecht erhalten werden und trotzdem eine optimale Ausrichtung dieser Partikel erreicht werden, so dass sie entsprechend einer Orientierung einer Beobachtungsebene ausgerichtet sind.
20

Die Tatsache, dass die zu untersuchenden Partikel aus dem Partikelstrom in eine andere Ebene gehoben werden und damit dem Strom der zu untersuchenden Flüssigkeit entzogen sind, so
25 dass die in dem Hauptstrom befindlichen Bestandteile keinen störenden Einfluss auf eine Beobachtung der zu untersuchenden Partikel haben, kann zum Beispiel bei der Untersuchung von Blut dahingehend sehr vorteilhaft sein, dass im Gegensatz zu herkömmlichen Vorgehensweisen zur Untersuchung unverdünntes
30 Blut verwendet werden kann, das eine höhere Viskosität als verdünntes Blut aufweist. Damit aber eignet es sich besonders für laminare Strömungen, wie sie in der beschriebenen erfindungsgemäßen Vorrichtung auftreten. Bei laminaren Strömungen kommt es nicht zur Vermischung der Mantelflüssigkeiten mit
35 dem Zentralstrom, so dass eine Separation von Partikeln aus dem Zentralstrom besonders effektiv durchgeführt werden kann.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung zur mikroskopischen Beobachtung von Partikeln in einer zu untersuchenden Flüssigkeit umfasst eine erfindungsgemäße Vorrichtung zur Untersuchung von Partikeln in einer zu untersuchenden Flüssigkeit. Darüber
5 hinaus weist die erfindungsgemäße Vorrichtung zur mikroskopischen Beobachtung von Partikeln in einer zu untersuchenden Flüssigkeit ein Mikroskop auf, welches an einer Längsposition der ersten Fließpassage zur Beobachtung von Partikeln der zu untersuchenden Flüssigkeit in der Beobachtungsebene angeordnet
10 ist. Ein solches Mikroskop kann insbesondere ein optisches Mikroskop sein, es kann aber auch ein Elektronenmikroskop oder ein Mikroskop eines anderen zur Beobachtung von Flüssigkeiten geeigneten Typs sein. Mit dem Mikroskop können beispielsweise einzelne zu untersuchende Partikel identifiziert
15 und gezählt werden. Weiterhin können die zu untersuchenden Partikel mit Hilfe des Mikroskops differenziert bzw. klassifiziert werden. Zum Beispiel können Leukozyten, Thrombozyten und Erythrozyten unterschieden werden. Überdies kann auch eine Einteilung der beobachteten Partikelarten in Unterarten
20 vorgenommen werden. Zum Beispiel können Leukozyten nach fünf verschiedenen Subtypen klassifiziert werden.

Es können auch Details der zu untersuchenden Partikel beobachtet werden. Aufgrund der Separation der zu untersuchenden
25 Partikel und der Verschiebung dieser Partikel in die Beobachtungsebene bzw. den Beobachtungsbereich des Mikroskops kann die Beobachtung auf die zu untersuchenden Partikel beschränkt werden, ohne dass störende Partikel die Sicht behindern würden. Da die störenden Partikeln bei einer Beobachtung einer
30 die zu beobachtenden Partikel enthaltenden Flüssigkeit in dem Beobachtungsbereich nicht oder nur vermindert auftreten, müssen sie nicht zusätzlich begutachtet werden und eventuell verworfen werden, so dass eine Beobachtung und Analyse der
35 die zu beobachtenden Partikel enthaltenden Flüssigkeit deutlich erleichtert ist und aufgrund der geringeren Anzahl der zu überprüfenden Partikel erheblich beschleunigt ist.

Die zu überprüfenden Partikel werden durch die akustische Kraft bzw. die Kraft der Schallwellen gezielt in die Untersuchungsebene bzw. Beobachtungsebene eines Mikroskops verschoben, um diese dort anzureichern bzw. die kleineren Partikel, wie zum Beispiel Erythrozyten oder Thrombozyten gegenüber den großen Partikeln, insbesondere den Leukozyten, abzureichern. Auf diese Weise kann zum Beispiel eine 200-2000-fache Anreicherung von Leukozyten erzielt werden.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren zur Untersuchung von Partikeln in einer zu untersuchenden Flüssigkeit wird eine zu untersuchende Flüssigkeit mit einer ersten Flussrate durch eine Fließpassage bewegt. Es wird außerdem mindestens eine Mantelflüssigkeit mit mindestens einer zweiten Flussrate durch einen ersten Einlass in die Fließpassage eingebracht, so dass die mindestens eine Mantelflüssigkeit einen ersten Mantelstrom in der Fließpassage ausbildet und die zu untersuchende Flüssigkeit längs dem mindestens einen Mantelstrom durch die Fließpassage fließt. Es werden weiterhin Schallwellen piezoakustisch erzeugt. Die Schallwellen breiten sich transversal bzw. quer zur Fließrichtung der zu untersuchenden Flüssigkeit durch die Fließpassage aus und bilden einen Wellenknoten in einer Beobachtungsebene aus, so dass aufgrund der Druckwirkung der Schallwellen in Transversalrichtung zu untersuchende Partikel der zu untersuchenden Flüssigkeit in die Beobachtungsebene verschoben werden und dort angereichert werden. Dabei wird der Wert der mindestens einen zweiten Flussrate derart gewählt, dass der mindestens eine Mantelstrom einen vorbestimmten Querschnitt aufweist, so dass die Beobachtungsebene durch den mindestens einen Mantelstrom verläuft und die zu untersuchenden Partikel in der mindestens einen Mantelflüssigkeit angereichert werden. Die in die Beobachtungsebene bzw. den Beobachtungsbereich verschobenen zu untersuchenden Partikel können dann mit einer optischen Beobachtungseinheit, wie zum Beispiel ein Mikroskop, leicht beobachtet werden.

Bei der erfindungsgemäßen Verwendung erfolgt eine Verwendung einer Fließzelle und einer Wellenerzeugungseinrichtung zur piezoakustischen Erzeugung von Schallwellen, insbesondere einer erfindungsgemäßen Vorrichtung zur Untersuchung von Partikeln in einer zu untersuchenden Flüssigkeit, zur Separation von Leukozyten aus einer Blutflüssigkeit. Wie bereits erwähnt, tritt bei der herkömmlichen Beobachtung von Leukozyten das Problem auf, dass diese nur in geringer Konzentration im Blut vorliegen. Eine Beobachtung bzw. Untersuchung der Leukozyten ohne deren Separation führt daher dazu, dass dabei auch die roten Blutkörperchen mit berücksichtigt und verworfen werden müssen. Vorteilhaft wird bei der Verwendung der erfindungsgemäßen Vorrichtung der Sachverhalt genutzt, dass sich die weißen Blutkörperchen unter dem Einfluss der Schallwellen schneller bewegen als die anderen Bestandteile des Bluts. Unter Nutzung dieses Sachverhalts können nun in einer vorbeifließenden Blutflüssigkeit mit Hilfe von Schallwellen die weißen Blutkörperchen quer zur Flussrichtung versetzt und separiert werden. Die Beobachtung der im Vergleich zu der großen Anzahl von roten Blutkörperchen geringen Zahl an separierten weißen Blutkörperchen lässt sich anschließend mit viel geringerem Aufwand durchführen, so dass die Beobachtungszeit vorteilhaft deutlich reduziert ist.

Die wesentlichen Komponenten der erfindungsgemäßen Vorrichtung zur Untersuchung von Partikeln in einer zu untersuchenden Flüssigkeit können zum überwiegenden Teil in Form von Softwarekomponenten ausgebildet sein. Dies betrifft insbesondere Teile der Wellenerzeugungseinrichtung, wie zum Beispiel eine Steuerungseinrichtung zur Steuerung der Erzeugung von Schallwellen. Weiterhin betrifft dies auch Steuerungseinheiten, welche zur Steuerung der Flussraten der über die Einlässe der Fließpassage zufließenden Flüssigkeiten eingesetzt werden.

35

Grundsätzlich können diese Komponenten aber auch zum Teil, insbesondere wenn es um besonders schnelle Berechnungen geht, in Form von softwareunterstützter Hardware, beispielsweise

FPGAs oder dergleichen, realisiert sein. Ebenso können die benötigten Schnittstellen, beispielsweise wenn es nur um eine Übernahme von Daten aus anderen Softwarekomponenten geht, als Softwareschnittstellen ausgebildet sein. Sie können aber auch
5 als hardwaremäßig aufgebaute Schnittstellen ausgebildet sein, die durch geeignete Software angesteuert werden.

Eine weitgehend softwaremäßige Realisierung hat den Vorteil, dass auch schon bisher verwendete Steuereinrichtungen auf
10 einfache Weise durch ein Software-Update nachgerüstet werden können, um auf die erfindungsgemäße Weise zu arbeiten. Insofern wird die Aufgabe auch durch ein entsprechendes Computerprogrammprodukt mit einem Computerprogramm gelöst, welches direkt in eine Speichereinrichtung einer Steuereinrichtung
15 der erfindungsgemäßen Vorrichtung zur Untersuchung von Partikeln in einer zu untersuchenden Flüssigkeit ladbar ist, mit Programmabschnitten, um alle Schritte des erfindungsgemäßen Verfahrens auszuführen, wenn das Programm in der Steuereinrichtung ausgeführt wird. Ein solches Computerprogrammprodukt
20 kann neben dem Computerprogramm gegebenenfalls zusätzliche Bestandteile wie z. B. eine Dokumentation und/oder zusätzliche Komponenten auch Hardware-Komponenten, wie z.B. Hardware-Schlüssel (Dongles etc.) zur Nutzung der Software, umfassen

25 Zum Transport zur Steuereinrichtung und/oder zur Speicherung an oder in der Steuereinrichtung kann ein computerlesbares Medium, beispielsweise ein Memorystick, eine Festplatte oder ein sonstiger transportabler oder fest eingebauter Datenträger dienen, auf welchem die von einer Rechereinheit der
30 Steuereinrichtung einlesbaren und ausführbaren Programmabschnitte des Computerprogramms gespeichert sind. Die Rechereinheit kann z.B. hierzu einen oder mehrere zusammenarbeitende Mikroprozessoren oder dergleichen aufweisen.

35 Die abhängigen Ansprüche sowie die nachfolgende Beschreibung enthalten jeweils besonders vorteilhafte Ausgestaltungen und Weiterbildungen der Erfindung. Dabei können insbesondere die Ansprüche einer Anspruchskategorie auch analog zu den ab-

hängigen Ansprüchen einer anderen Anspruchskategorie weitergebildet sein. Zudem können im Rahmen der Erfindung die verschiedenen Merkmale unterschiedlicher Ausführungsbeispiele und Ansprüche auch zu neuen Ausführungsbeispielen kombiniert werden.

In einer Ausgestaltung der erfindungsgemäßen Vorrichtung zur Untersuchung von Partikeln in einer zu untersuchenden Flüssigkeit weist die Fließpassage einen ersten Einlass auf, durch den eine erste Mantelflüssigkeit mit einer zweiten Flussrate in die Fließpassage strömt. Weiterhin umfasst die Fließpassage einen dem ersten Einlass gegenüberliegenden zweiten Einlass auf, durch den eine zweite Mantelflüssigkeit mit einer dritten Flussrate in die Fließpassage strömt. Der erste Einlass und der zweite Einlass sind derart gegenüberliegend angeordnet, dass die erste Mantelflüssigkeit einen ersten Mantelstrom in der Fließpassage ausbildet und die zweite Mantelflüssigkeit einen zweiten Mantelstrom in der Fließpassage ausbildet, so dass die zu untersuchende Flüssigkeit zwischen dem ersten Mantelstrom und dem zweiten Mantelstrom durch die Fließpassage fließt. Der Wert der zweiten Flussrate und der dritten Flussrate ist derart gewählt, dass die Mantelströme einen vorbestimmten Querschnitt aufweisen, so dass die Beobachtungsebene durch einen der beiden Mantelströme verläuft. Mit Hilfe der beiden Mantelströme kann eine Position des Zentralstroms der zu untersuchenden Flüssigkeit im Querschnitt der Fließpassage bzw. in Transversalrichtung zur Fließrichtung eingestellt werden. Insbesondere kann damit erreicht werden, dass der Zentralstrom nicht mehr in der Beobachtungsebene fließt, so dass zu untersuchende Partikel aus dem Zentralstrom in die Beobachtungsebene gehoben werden können. Die Verwendung von zwei Mantelströmen erlaubt eine freie Positionierung des Zentralstroms sowie eine größere Flexibilität bei der Wahl der Beobachtungsebene in die die zu untersuchenden Partikel transferiert werden, wo sie mit Hilfe eines Beobachtungsgeräts, wie zum Beispiel ein Mikroskop, beobachtet werden können.

In einer Ausgestaltung der erfindungsgemäßen Vorrichtung zur Untersuchung von Partikeln in einer zu untersuchenden Flüssigkeit ist die Fließpassage derart dimensioniert, dass die durch sie fließenden Flüssigkeiten laminar fließen. Dies kann
5 zum Beispiel dadurch erreicht werden, dass die Fließpassage einen Mikrofluidkanal umfasst. Ob eine laminare Strömung in der Fließpassage vorherrscht, hängt von dem Durchmesser der Fließpassage sowie von der Geschwindigkeit der durch sie hindurch fließenden Flüssigkeiten und deren Viskosität ab. Bei
10 gegebener Flussrate und Viskosität wird also der Durchmesser der Fließpassage entsprechend gewählt, so dass die die Fließpassage passierenden Flüssigkeiten laminar hindurchströmen können. Das Vorliegen einer laminaren Strömung hat den Vorteil, dass in der Fließpassage keine Turbulenzen auftreten,
15 die zu einer unerwünschten Vermischung von Zentralstrom und Mantelstrom führen könnten.

In einer bevorzugten Ausgestaltung der erfindungsgemäßen Vorrichtung zur Untersuchung von Partikeln in einer zu untersuchenden Flüssigkeit umfasst die zu untersuchende Flüssigkeit
20 Blutflüssigkeit. Wie bereits erwähnt, eignet sich die erfindungsgemäße Vorrichtung zur Untersuchung von Partikeln in einer zu untersuchenden Flüssigkeit besonders gut zur Separation und anschließenden Beobachtung von Leukozyten, welche in
25 relativ geringer Konzentration in der Blutflüssigkeit vorkommen.

Bevorzugt wird bei der erfindungsgemäßen Vorrichtung zur Untersuchung von Partikeln in einer zu untersuchenden Flüssigkeit die Position der Knoten der akustischen Wellen in Transversalrichtung durch Einstellen der Frequenz der Schallwellen festgelegt. Die Position der Knoten in Querrichtung zur
30 Flussrichtung hängt von der Wellenlänge der stehenden Wellen und damit von der zur Anregung der Wellen verwendeten Frequenz ab. Auf diese Weise lässt sich die Position der Wellenknoten auf eine gewünschte Position einer Beobachtungsebene bzw. einen Zentralbereich eines Beobachtungsbereichs in Querrichtung zur Flussrichtung einstellen.
35

In einer besonders bevorzugten Variante der erfindungsgemäßen Vorrichtung zur Untersuchung von Partikeln in einer zu untersuchenden Flüssigkeit weisen die zu untersuchenden Partikel
5 Leukozyten oder Erythrozyten oder Thrombozyten auf. Das beschriebene Anreicherungsverfahren lässt sich auch auf die Anreicherung von Erythrozyten anwenden. Erythrozyten haben eine Größe von 5 bis 6 μm und sind doppelt so groß wie Thrombozyten, welche ungefähr 1,5 bis 3,5 μm groß sind. Somit lassen
10 sich auch die Erythrozyten mit Hilfe von Schallwellen von den Thrombozyten separieren. Zusätzlich könnte auch eine zusätzliche Prozessstufe der beschriebenen Prozessstufe nachgeschaltet sein, welche noch die Leukozyten von den Erythrozyten trennt und analog zu der beschriebenen Prozessstufe funktioniert.
15

Die Thrombozyten können als kleinste Teilchen dadurch separiert werden, dass alle anderen Blutbestandteile, d.h. die Leukozyten und die Erythrozyten auf die beschriebene Weise
20 separiert werden und der Zentralstrom mit den Thrombozyten in die Beobachtungsebene gelenkt wird.

Besonders bevorzugt weist die erfindungsgemäße Vorrichtung zur Untersuchung von Partikeln in einer zu untersuchenden
25 Flüssigkeit eine der Fließpassage vorgeschaltete Trennstufe auf. Dabei weist die Trennstufe eine zusätzliche Fließpassage mit einem Zentralstrom mit einer zunächst von den zu untersuchenden Partikeln freien Flüssigkeit und mindestens einem Mantelstrom, im Folgenden als Trennstufen-Mantelstrom bezeichnet, auf, welcher längs dem Zentralstrom durch die
30 Fließpassage der Trennstufe fließt und die zu untersuchende Flüssigkeit aufweist. Vorzugsweise umgibt der mindestens eine Trennstufen-Mantelstrom den Zentralstrom. Als Zentralstrom soll in diesem Zusammenhang ein Flüssigkeitsstrom betrachtet
35 werden, neben dem mindestens ein weiterer Flüssigkeitsstrom parallel fließt, in diesem Fall ein Mantelstrom. Wie beschrieben, wird der Zentralstrom vorzugsweise von dem mindes-

tens einen Mantelstrom umgeben, so dass er dann zentral durch die Fließpassage fließt.

Bei dieser Variante weist die Trennstufe außerdem eine zusätzliche Wellenerzeugungseinrichtung zur piezoakustischen Erzeugung von Schallwellen auf, welche sich transversal zur Fließrichtung der zu untersuchenden Flüssigkeit durch die Fließpassage der Trennstufe ausbreiten und einen Wellenknoten in einer Ebene durch den Zentralstrom ausbilden, so dass aufgrund der Druckwirkung der Schallwellen in Transversalrichtung Partikel, insbesondere Partikel mit einem größeren Durchmesser im Vergleich zu anderen Partikeltypen in der zu untersuchenden Flüssigkeit, in den Zentralstrom verschoben werden und dort angereichert werden. Bei dieser besonders vorteilhaften Variante erfolgt also eine zusätzliche Separation der zu untersuchenden Partikel aus der zu untersuchenden Flüssigkeit vor der Separation der zu untersuchenden Partikel und deren Verschiebung in die Beobachtungsebene, so dass die Zuverlässigkeit und Effektivität der Separation der zu untersuchenden Partikel erhöht ist.

In einer besonders vorteilhaft anzuwendenden Variante der erfindungsgemäßen Vorrichtung zur Untersuchung von Partikeln in einer zu untersuchenden Flüssigkeit ist die von den zu untersuchenden Partikeln zunächst freie Flüssigkeit transparent. Die hohe Transparenz der von den zu untersuchenden Partikeln freien Flüssigkeit erlaubt eine erleichterte Beobachtung von in diese Flüssigkeit transferierten zu untersuchenden Partikeln.

In einer besonders vorteilhaften Ausgestaltung der erfindungsgemäßen Vorrichtung zur Untersuchung von Partikeln in einer zu untersuchenden Flüssigkeit sind die Wellenerzeugungseinrichtungen der Trennstufe und der Prozessstufe derart ausgebildet, dass die Ausbreitungsrichtung der Schallwellen in der Trennstufe und die Ausbreitungsrichtung der Schallwellen in der Fließpassage der Prozessstufe zueinander orthogo-

nal und orthogonal zur Fließrichtung der zu untersuchenden Flüssigkeit verlaufen.

Alternativ können die Trennstufe sowie die Prozessstufe derart ausgebildet sein, dass die Separation in der Trennstufe und die anschließende Verschiebung des Zentralstroms in der Prozessstufe in derselben Richtung verlaufen.

Dazu kann man entweder die Dimensionen eines die Fließpassage bzw. die Fließstrecke definierenden Kanals vertauschen oder die Wellenerzeugungseinrichtung seitlich anstatt in der Vertikalen positionieren.

Die Ausrichtung der Ausbreitungsrichtung der akustischen Wellen richtet sich nach der geometrischen Form der die Fließpassage umgebenden Leitungselemente und nach der Ausrichtung und Position einer daran anzuordnenden Beobachtungseinheit, wie zum Beispiel ein Beobachtungsmikroskop.

In einer speziellen Variante der erfindungsgemäßen Vorrichtung zur Untersuchung von Partikeln in einer zu untersuchenden Flüssigkeit weitet sich die Fließpassage der Prozessstufe vor der Längsposition der Wellenerzeugungseinrichtung der Prozessstufe quer zur Fließrichtung auf, so dass die Fließgeschwindigkeit der zu untersuchenden Flüssigkeit und der mindestens einen Mantelflüssigkeit reduziert sind. Infolge der geringeren Fließgeschwindigkeit lassen sich zu untersuchende Partikel leichter beobachten und analysieren, da mehr Zeit verbleibt, in der sich die Partikel im Beobachtungsbereich eines verwendeten Beobachtungsgeräts aufhalten.

Bevorzugt weist die erfindungsgemäße Vorrichtung zur Untersuchung von Partikeln in einer zu untersuchenden Flüssigkeit eine Pufferzugabeeinheit auf. Die Pufferzugabeeinheit ist dazu eingerichtet, einen Puffer zur hypotonischen Lösung dem Zentralstrom oder der zu untersuchende Flüssigkeit beizugeben. Mit Hilfe des zusätzlichen Puffers werden Partikel mit höherem intrazellulärem osmotischen Druck aufgelöst, während

Partikel mit niedrigerem intrazellulärem osmotischen Druck erhalten bleiben.

Bei der Separation von weißen Blutkörperchen aus einer Blut-
5 flüssigkeit werden mit Hilfe der zusätzlichen Pufferlösung
rote Blutkörperchen aufgrund ihres höheren intrazellulären
osmotischen Drucks aufgelöst, während weiße Blutkörperchen
erhalten bleiben. Diese Maßnahme ermöglicht somit eine weiter
verbesserte Trennung von zu untersuchenden weißen Blutkörper-
10 chen von der Blutflüssigkeit.

Besonders bevorzugt weist die erfindungsgemäße Vorrichtung
zur Untersuchung von Partikeln in einer zu untersuchenden
Flüssigkeit eine Einheit auf, welche vorzugsweise mit dem
15 zweiten Einlass in Verbindung steht und dazu eingerichtet
ist, der mindestens einen Mantelflüssigkeit Marker für die
Zielpartikel zuzugeben. Marker können spezifische chemische
Eigenschaften haben, so dass sie sich nur mit bestimmten zu
analysierenden Bestandteilen einer zu untersuchenden Flüssig-
20 keit verbinden. Sie können zum Beispiel eine spezielle Farbe
aufweisen und somit die interessierenden Bestandteile der zu
untersuchenden Flüssigkeit leicht kenntlich machen. Die Ver-
wendung von Markern erleichtert also die Auffindbarkeit von
zu beobachtenden Partikeln in einer zu untersuchenden Flüs-
25 sigkeit. Marker können auch spezifische physikalische Eigen-
schaften haben, die eine Separation der mit Ihnen behafteten
Partikel erleichtert oder auch erst möglich macht. Beispiels-
weise könnte man grundsätzlich schwer zu trennende Partikel
mit geeigneten Markern versehen, so dass die vorstehend be-
30 schriebenen Separationsverfahren leichter und effektiver an-
wendbar sind. Bisweilen kann eine Situation vorliegen, bei
der in einer Flüssigkeit vorhandene unterschiedliche Partikel
annähernd gleich groß sind und daher mit Schallwellen nur
schwer voneinander zu separieren wären. Versieht man nun die
35 interessierenden Partikeln mit entsprechend groß dimensio-
nierten Markern, kann trotzdem eine Separation der interes-
sierenden Partikel mit Hilfe von Schallwellen erfolgen.

Überdies kann die erfindungsgemäße Vorrichtung zur mikroskopischen Beobachtung von Partikeln in einer zu untersuchenden Flüssigkeit eine Sammeleinheit aufweisen, welche der Prozessstufe nachgeschaltet, stromabwärts der Längsposition des Mikroskops angeordnet ist und dazu eingerichtet ist, die untersuchten Partikel zu sammeln. Die gesammelten Partikel können anschließend mit einer weiteren Untersuchungsmethode, welche eine Anreicherung der untersuchten Partikel benötigt, vorzugsweise molekularbiologische Messmethoden, weiter untersucht werden. Auf diese Weise kann die mit Hilfe der erfindungsgemäßen Vorrichtung erzielte Separation und Anreicherung von zu untersuchenden Partikeln mehrfach und für verschiedene Untersuchungen nacheinander genutzt werden.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung zur mikroskopischen Beobachtung von Partikeln in einer zu untersuchenden Flüssigkeit kann zudem eine Partikeltransfereinrichtung aufweisen, welche stromabwärts, d.h. der Prozessstufe nachgeschaltet, hinter der Längsposition des Mikroskops angeordnet ist und zum Transfer der Partikel, insbesondere der untersuchten Partikel, von der Fließpassage auf einen Objektträger zur weiteren Untersuchung der Partikel ausgebildet ist. Eine solche Transfereinrichtung kann zum Beispiel Teil der beschriebenen Sammeleinheit sein und eine Öffnung aufweisen, durch die mit den untersuchten Partikeln angereicherte Flüssigkeitstropfen hindurchbewegt werden, so dass sie anschließend auf einen Objektträger fallen. Der Objektträger kann als Transportmittel der untersuchten Partikel an eine andere Position genutzt werden, an der weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

Die Erfindung wird im Folgenden unter Hinweis auf die beigefügten Figuren anhand von Ausführungsbeispielen noch einmal näher erläutert. Es zeigen:

FIG 1 eine schematische Darstellung einer Vorrichtung zur Untersuchung von weißen Blutkörperchen gemäß einem Ausführungsbeispiel der Erfindung,

- FIG 2 eine schematische Darstellung eines Trennvorgangs von
weißen Blutkörperchen in einer Trennstufe,
- 5 FIG 3 eine schematische Darstellung einer Verschiebung von
weißen Blutkörperchen in eine Beobachtungsebene,
- 10 FIG 4 eine Zusammenschau der Trenn- und Verschiebungsvor-
gänge in einer Vorrichtung zur Untersuchung von wei-
ßen Blutkörperchen bei der Anwendung einer hypotoni-
schen Lösung gemäß einem Ausführungsbeispiel der Er-
findung,
- 15 FIG 5 eine schematische Darstellung einer Vorrichtung zur
Untersuchung von weißen Blutkörperchen gemäß einem
Ausführungsbeispiel der Erfindung mit einem nachge-
schalteten Objektträger,
- 20 FIG 6 ein Flussdiagramm, mit dem der Ablauf eines Verfah-
rens zur Untersuchung von weißen Blutkörperchen gemäß
einem Ausführungsbeispiel der Erfindung veranschau-
licht wird.

Ein erstes Ausführungsbeispiel einer Vorrichtung 1 zur Unter-
suchung von weißen Blutkörperchen WBC wird im Zusammenhang
25 mit FIG 1 bis FIG 3 beschrieben.

In FIG 1 ist eine Draufsicht auf ein Mikrofluidkanalsystem 1
gezeigt, welches als Fließzelle zur Untersuchung von weißen
Blutkörperchen WBC dient eine Vorrichtung zur Untersuchung
30 von Partikeln in einer zu untersuchenden Flüssigkeit gemäß
einem Ausführungsbeispiel der Erfindung darstellt. Das Mikro-
fluidkanalsystem umfasst eine Trennstufe S1, eine der Trenn-
stufe nachgeschaltete Prozessstufe S2 und eine der Prozess-
stufe nachfolgende Sammeleinheit S3. Die Draufsicht erfolgt
35 auf die x/y-Ebene. Dabei ist die Fließrichtung der zu unter-
suchenden Flüssigkeit die x-Richtung. Zusätzlich ist in FIG 1
der auf der rechten Seite abgebildete Teil, d.h. die Prozess-
stufe S2, umfassend eine Fließpassage F, und die Sammelein-

heit S3 des Mikrofluidkanalsystems 1 unten rechts im Bild in Seitenansicht, d.h., in der x/z-Ebene dargestellt.

Das Mikrofluidkanalsystem 1 weist eine Trennstufe S1 auf. Die
5 Trennstufe S1 umfasst einen ersten Einlass E1, in dem Blut-
flüssigkeit BL mit einer ersten Flussrate v_1 in das Mikroflu-
idkanalsystem 1 hineinströmt. Zusätzlich umfasst das Mikro-
fluidkanalsystem 1 einen zweiten Einlass E2, durch den eine
10 von der Blutflüssigkeit freie Flüssigkeit PF, in diesem Fall
eine Pufferflüssigkeit PF, mit einer zweiten Flussrate v_2
einströmt. Die beiden Flüssigkeiten BL, PF werden in einer
Fließpassage F1 bzw. einem ersten Fließpassagenabschnitt F1
zusammengeführt und zwar derart, dass die Pufferflüssigkeit
PF einen Zentralstrom ZS bildet und die Blutflüssigkeit BL
15 einen Trennstufen-Mantelstrom MS um die Pufferflüssigkeit PF
bildet, der auf beiden Seiten außen an dem Zentralstrom ZS
vorbeifließt. Aufgrund der kleinen Abmessungen des Mikroflu-
idkanals 1 (die Breite beträgt zwischen 100 und 1500 μm und
die Höhe beträgt etwa 30 bis 500 μm) verhalten sich der Zent-
20 ralstrom ZS und der Trennstufen-Mantelstrom MS bei typischen
Fließgeschwindigkeiten jeweils laminar, so dass sie aneinan-
der vorbeiströmen, ohne sich zu vermischen. Die zu untersu-
chende Blutflüssigkeit BL strömt an dem Zentralstrom ZS auf
beiden Seiten vorbei und nach dem Absolvieren des ersten
25 Fließpassagenabschnitts F1 schließlich zu einem Abflussbe-
reich SB zurück, welcher in FIG 1 auf der dem zweiten Einlass
E2 gegenüberliegenden Seite des ersten Einlasses E1, d.h.
ganz links eingezeichnet ist. Die Blutflüssigkeit BL umfasst
in dem in FIG 1 gezeigten Ausführungsbeispiel rote Blutkör-
30 perchen RBC, weiße Blutkörperchen WBC und Blutplättchen PLT.

An dem ersten Fließpassagenabschnitt F1 ist auch eine erste
Wellenerzeugungseinrichtung WE1 zur piezoakustischen Erzeu-
gung von Schallwellen AW (siehe FIG 2) angeordnet. Die erste
35 Wellenerzeugungseinrichtung WE1 ist in FIG 1 mit einem Stern
symbolisiert. Mit Hilfe der ersten Wellenerzeugungseinrich-
tung WE1 werden sich senkrecht zur Flussrichtung ausbreitende
Schallwellen AW (siehe FIG 2) erzeugt, welche Wellenknoten in

einem Zentralbereich des ersten Fließpassagenabschnitts F1 bilden, in dem der Zentralstrom ZS verläuft. Weiße Blutkörperchen WBC, die sich in dem Trennstufen-Mantelstrom MS aufhalten, werden aufgrund ihrer Größe durch die Schallwellen AW mit höherer Geschwindigkeit in Richtung des Zentralstroms ZS abgelenkt als andere Bestandteile des Bluts BL, wie zum Beispiel rote Blutkörperchen RBC oder Blutplättchen PLT. Auf diese Weise kommt es in dem ersten Fließpassagenabschnitt F1 zu einer ersten Anreicherung von weißen Blutkörperchen WBC in dem Zentralstrom ZS.

Im weiteren Prozessverlauf PR erfolgt nun ein Übergang des Zentralstroms ZS in eine Prozessstufe S2 des Mikrofluidkanalsystems 1. Die Prozessstufe S2 umfasst eine Fließpassage F mit einem zweiten F2, einem dritten F3 und einem vierten Fließpassagenabschnitt F4. In den zweiten Fließpassagenabschnitt der Fließpassage F strömt aus einem dritten Einlass E3 eine Pufferflüssigkeit PF1 mit einer dritten Flussrate v_3 und aus einem in z-Richtung dem dritten Einlass E3 gegenüberliegenden vierten Einlass E4 strömt eine Pufferflüssigkeit PF2 mit einer vierten Flussrate v_4 in den zweiten Fließpassagenabschnitt der Fließpassage F. Die beiden Pufferflüssigkeiten PF1, PF2 bilden jeweils einen ersten bzw. zweiten Mantelstrom MS1, MS2 und beschränken den Zentralstrom ZS mit den weißen Blutkörperchen WBC auf einen zwischen den beiden Mantelströmen MS1, MS2 liegenden Bereich, der nicht in einer Beobachtungsebene bzw. einem Beobachtungsbereich BA eines später zur Beobachtung verwendeten Mikroskops M liegt (siehe auch FIG 2). Diese Flussstruktur ist in einem dritten Fließpassagenabschnitt F3 erreicht. In dem dritten Fließpassagenabschnitt F3 wird der Mikrofluidkanal 1 in y-Richtung, d.h. quer zur Fließrichtung, aufgeweitet, um die Geschwindigkeit der ersten und zweiten Mantelströme MS1, MS2 und des Zentralstroms ZS zu reduzieren. Eine Verlangsamung der Strömungsgeschwindigkeiten ist notwendig, damit nachfolgend einzelne weiße Blutkörperchen WBC mit einem Mikroskop M beobachtet werden können. Wie in einer vergrößerten Darstellung in FIG 1 zu erkennen ist, hängt die Position des Zentralstroms ZS von

der Größe der Flussraten v_3 , v_4 der ersten und zweiten Mantelströme an. Ist $v_4 < v_3$, so ist der Zentralstrom in z-Richtung nach oben hin verschoben. Ist $v_4 = v_3$, so liegt der Zentralstrom ZS in z-Richtung betrachtet genau in der Mitte
5 des Querschnitts der Fließpassage F, und ist $v_4 > v_3$, so liegt der Zentralstrom ZS in z-Richtung betrachtet unterhalb der Mitte des Querschnitts der Fließpassage F.

In einem vierten Fließpassagenabschnitt F4 werden mit Hilfe
10 einer zweiten Wellenerzeugungseinrichtung WE2 (in FIG 1 als Stern symbolisiert) erneut sich senkrecht zur Flussrichtung ausbreitende Schallwellen AW, allerdings anstatt in y-Richtung ausbreitend diesmal in z-Richtung ausbreitend erzeugt. Die Schallwellen AW, wobei es sich vorzugsweise um stehende
15 Wellen handelt, weisen erneut Wellenknoten KN auf, die allerdings diesmal nicht in dem Strömungsbereich des Zentralstroms ZS liegen, sondern benachbart im Strömungsbereich eines der beiden Mantelströme MS1, MS2 liegen (in FIG 3 liegen die Knoten KN in dem ersten Mantelstrom MS1). Die Wellenknoten lie-
20 gen allerdings in der Beobachtungsebene BA bzw. in z-Richtung betrachtet auf der Höhe des Beobachtungsbereichs BA des Mikroskops M. Aufgrund der bereits erläuterten Größenunterschiede werden nun wieder die weißen Blutkörperchen WBC bevorzugt in die Beobachtungsebene BA abgelenkt, d.h. sie gerate-
25 ten in den ersten Mantelstrom MS1 (siehe FIG 3), durch den auch die Beobachtungsebene BA des Mikroskops M verläuft. Der erste Mantelstrom MS1 ist vorzugsweise farblos, so dass die im ersten Mantelstrom MS1 befindlichen weißen Blutkörperchen WBC gut zu erkennen sind. In einem am Ende des vierten Fließ-
30 passagenabschnitts F4 angeordneten Beobachtungsabschnitt B erfolgt nun senkrecht zur Flussrichtung der weißen Blutkörperchen WBC deren Beobachtung durch ein senkrecht zur Fließrichtung, d h. in z-Richtung ausgerichtetes, an dem vierten Fließpassagenabschnitt F4 positioniertes Mikroskop M.
35 Beispielsweise können die weißen Blutkörperchen WBC mit Hilfe des Mikroskops M gezählt werden und/oder deren Struktur und Aufbau beobachtet werden. Anschließend erfolgt in einem dritten Abschnitt des Mikrofluidkanalsystems 1, auch als Sammel-

bereich S3 bezeichnet, eine Sammlung der weißen Blutkörperchen WBC, die im Anschluss noch für zusätzliche Untersuchungen genutzt werden können.

5 In FIG 2 ist der Vorgang der Separation von weißen Blutkörperchen WBC in dem ersten Fließpassagenabschnitt F1 der Trennstufe S1 und deren Anreicherung in einem eine Pufferlösung umfassenden Zentralstrom ZS vergrößert gezeigt. Wie bereits erläutert, werden die weißen Blutkörperchen WBC, welche
10 sich in dem Trennstufen-Mantelstrom MS befinden, mit Hilfe von Schallwellen AW in Richtung des Zentralbereichs des ersten Fließpassagenabschnitts F1 abgelenkt, wo sie aufgrund der Anordnung der Knoten KN der Schallwellen AW auf der Mittelachse des ersten Fließpassagenabschnitts F1 in dem Zentralstrom ZS verbleiben. Die Knoten KN sind durch sich kreuzende
15 Linien angedeutet. Die Schallwellen AW werden auf der der Schallwellenerzeugungseinrichtung WE1 gegenüberliegenden Seite der Berandung des ersten Fließpassagenabschnitts F1 reflektiert und bilden stehende Wellen aus, welche die skizzierten Wellenknoten ausbilden. Die akustischen Wellen AW ermöglichen es den größeren Zellen, in diesem Fall den weißen Blutkörperchen WBC (ungefähr 7 bis 15 μm Durchmesser), sich
20 schneller in Richtung Zentralbereich des ersten Fließpassagenabschnitts F1 zu bewegen als kleinere Zellen, wie zum Beispiel rote Blutkörperchen RBC (ungefähr 5 bis 6 μm) groß. Im Zentralbereich des ersten Fließpassagenabschnitts F1, wo sich die Knoten KN der akustischen Wellen AW befinden, werden die weißen Blutkörperchen WBC nur durch den laminaren Zentralstrom ZS bewegt und somit entlang der Zentralachse des Mikrofluidkanals 1 stromabwärts, d.h. in Prozessrichtung PR bewegt. Während der Positionsänderung der weißen Blutkörperchen
25 WBC senkrecht zur Flussrichtung werden die weißen Blutkörperchen WBC in ein anderes Medium, das Medium des Zentralstroms ZS, überführt. Der Zentralstrom ZS ist frei von anderen Partikeln und daher hochtransparent. Der Durchmesser des Trennstufen-Mantelstroms MS und des Zentralstroms ZS bzw. deren
30 Position sowie die Anreicherung der weißen Blutkörperchen WBC im Zentralstrom ZS kann mit Hilfe der Flussraten v_1 bzw. v_2

des Mantelstroms MS bzw. des Zentralstroms ZS beeinflusst werden. Bei einem Verhältnis zwischen der ersten Flussrate v_1 und der zweiten Flussrate v_2 von 10 wird eine Anreicherung von weißen Blutkörperchen WBC in dem Zentralstrom ZS erreicht, was andererseits mit einem stark reduzierten Anteil der roten Blutkörperchen im Zentralstrom ZS im Vergleich zu der Blutflüssigkeit BL in dem Trennstufen-Mantelstrom MS verbunden ist.

10 Wie bereits erwähnt, fließt der Zentralstrom ZS weiter stromabwärts zu einer Prozessstufe S2 und dort in einem zweiten Fließpassagenabschnitt F2 an einem dritten und einem vierten Einlass E3, E4 vorbei, aus denen erste und zweite Mantelströme MS1, MS2 mit dritten und vierten Flussraten v_3 , v_4 in den
15 Mikrofluidkanal 1 hineinströmen. Die beiden ersten und zweiten Mantelströme MS1, MS2 steuern die Positionierung des Zentralstroms ZS in z-Richtung. Dieses Szenario ist in FIG 3 vergrößert gezeigt. Zum einen wird die Ausdehnung des Zentralstroms ZS, welcher eine Flussrate v_s aufweist, durch die
20 ersten und zweiten Mantelströme MS1, MS2 in z-Richtung eingeschränkt, zum anderen wird die Lage des Zentralstroms ZS mit Hilfe der Wahl der dritten und vierten Flussraten V_3 , V_4 der beiden Mantelströme MS1, MS2 derart festgelegt, dass der Zentralstrom ZS außerhalb einer Beobachtungsebene bzw. eines
25 Beobachtungsbereichs BA eines Mikroskops M liegt, welches an einer Beobachtungsposition bzw. einem Beobachtungsabschnitt B des Mikrofluidkanals 1 angeordnet ist. Diese Positionierung des Zentralstroms ZS erfolgt in einem dritten Fließpassagenabschnitt F3. Die Flussrate des Zentralstroms ZS, zunächst
30 mit v_2 bezeichnet, bleibt selbstverständlich gleich, jedoch ändert sich nach dem zweiten Fließpassagenabschnitt F2 der Querschnitt bzw. die Querschnittsfläche des Zentralstroms ZS. Um dies anzudeuten, wird ab dem dritten Fließpassagenabschnitt F3 das Bezugszeichen „ v_s “ verwendet. Der Querschnitt
35 des Zentralstroms ZS hängt ab dem dritten Fließpassagenabschnitt F3 von den Flussraten der ersten und zweiten Mantelströme MS1, MS2 ab.

Um die weißen Blutkörperchen WBC weiter anzureichern und noch im Zentralstrom ZS vorhandene rote Blutkörperchen RBC aus dem Beobachtungsbereich BA herauszuhalten, wird der Zentralstrom ZS mit Hilfe der ersten und zweiten Mantelströme MS1 und MS2 in einer nicht-zentrischen Position innerhalb des Mikrofluidkanals 1 gehalten.

Im weiteren Prozessverlauf PR werden in einem vierten Fließpassagenabschnitt F4 mit Hilfe einer zweiten Wellenerzeugungseinrichtung WE2 akustische Wellen AW mit einer Ausbreitungsrichtung quer zur Flussrichtung und Wellenknoten KN in der Beobachtungsebene bzw. dem in z-Richtung eingeschränkten Beobachtungsbereich BA erzeugt. Somit werden in Folge des Drucks der Schallwellen AW die größeren weißen Blutkörperchen WBC in den ersten Mantelstrom MS1 und damit in die Beobachtungsebene BA verschoben, während die kleineren roten Blutkörperchen RBC mehrheitlich in dem Zentralstrom ZS verbleiben. Aufgrund der deutlich größeren Kräfte der akustischen Wellen AW im Vergleich zu den Fließkräften des Zentralstroms ZS sowie der beiden Mantelströme MS1, MS2 haben die weißen Blutkörperchen WBC ausreichend Zeit, in den ersten Mantelstrom MS1 zu wechseln, bevor sie in den Beobachtungsabschnitt B geraten. Dort können die weißen Blutkörperchen WBC in der transparenten Pufferlösung PF1 des ersten Mantelstroms MS1 leicht beobachtet werden. Das Mikroskop M weist aufgrund seiner begrenzten Tiefenschärfe einen in z-Richtung beschränkten Beobachtungsbereich BA auf. Indem die weißen Blutkörperchen WBC genau in diesen Beobachtungsbereich BA versetzt werden, können sie mit optimaler Auflösung beobachtet werden.

30

In FIG 4 ist der in FIG 1 bis FIG 3 veranschaulichte zweistufige Separations- und Positionierungsprozess noch einmal durch eine sequentielle Darstellung der beiden Trennungs- und Positionierungsvorgänge veranschaulicht, wobei bei dem Ausführungsbeispiel gemäß FIG 4 zusätzlich bei dem ersten Fließpassagenabschnitt F1 in den Zentralstrom ZS ein hypotonischer Puffer gegeben wird. Während in dem ersten Fließpassagenabschnitt F1 eine erste Anreicherung von weißen Blutkörper-

35

chen WBC in einem Zentralstrom ZS durch Verschiebung der weißen Blutkörperchen WBC in y-Richtung erfolgt und diese auch durch den hypotonischen Puffer unbeeinträchtigt bleiben, werden rote Blutkörperchen, welche aus dem Trennstufenmantelstrom MS unerwünscht ebenfalls in den Zentralstrom ZS gelangen, durch die hypotonischen Bedingungen in dem Zentralstrom ZS nach und nach aufgelöst, so dass die Konzentration der roten Blutkörperchen in dem Zentralstrom ZS allmählich abnimmt. Dies ist durch die Schraffur eines die Konzentration der roten Blutkörperchen symbolisierenden Pfeils KE verdeutlicht, wobei größere Abstände zwischen Schraffurlinien eine geringere Konzentration von roten Blutkörperchen bedeuten sollen.

Anschließend wird dieser Zentralstrom ZS in einem zweiten Fließpassagenabschnitt F2 (siehe FIG 1) in z-Richtung dezentriert. Nach der Aufweitung der Flüssigkeitsströme ZS, MS1, MS2 in y-Richtung, werden in einem vierten Fließpassagenabschnitt F4 erneut weiße Blutkörperchen WBC separiert (siehe FIG 4 auf der rechten Seite), allerdings diesmal aus dem Zentralstrom ZS in z-Richtung in einen ersten Mantelstrom MS1. Dort werden die weißen Blutkörperchen WBC in einem dem Beobachtungsbereich BA entsprechenden z-Bereich gehalten und geraten anschließend stromabwärts an die Längsposition B (siehe FIG 1), an der ein Mikroskop M angeordnet ist. Auch während der Passage des vierten Fließpassagenabschnitts F4 werden eventuell in dem Zentralstrom ZS noch vorhandene rote Blutkörperchen weiter aufgelöst. Wie bereits erwähnt, soll mit Hilfe des in Prozessrichtung PR verlaufenden Pfeils KE die in Stromabwärtsrichtung immer geringer werdende Konzentration der roten Blutkörperchen in dem Zentralstrom ZS symbolisiert werden, so dass kurz vor der Position B des Mikroskops M in dem Beobachtungsbereich BA fast nur weiße Blutkörperchen WBC vorhanden sind. Zusätzlich können dem ersten Mantelstrom MS1 über den vierten Einlass E4 in dem zweiten Fließpassagenabschnitt F2 auch farbige Marker, wie zum Beispiel SDS, beigegeben werden, mit denen die Morphologie der Zellen geändert wird.

In FIG 5 ist eine schematische Darstellung eines Mikrofluidkanalsystems 2 zur Untersuchung von weißen Blutkörperchen WBC gemäß einem Ausführungsbeispiel der Erfindung mit einem nachgeschalteten Objektträger OT veranschaulicht. Der Aufbau des in FIG 5 gezeigten Mikrofluidkanalsystems 2 entspricht weit-

5
hend dem des in FIG 1 gezeigten Systems 1. Zusätzlich umfasst das in FIG 5 gezeigte System 2 jedoch noch einen Objektträger OT, auf den aus dem Sammelbereich S3 des Mikrofluidkanalsystems 2 Tropfen D_{WBC} mit einem definierten Volumen von z.B. 20

10
bis 35 μ l fallen (Schwerkraft in x-Richtung), welche weiße Blutkörperchen WBC enthalten. Der Objektträger OT kann in Bewegungsrichtung MD, in diesem Fall in y-Richtung, verschoben werden, so dass die einzelnen Tropfen D_{WBC} mit den weißen Blutkörperchen WBC hintereinander und geordnet auf dem Ob-

15
jektträger OT zu liegen kommen. Die Tropfen D_{WBC} auf dem Objektträger OT können anschließend mit Hilfe verschiedener Standard-Färbungs-Technologien zur Zellidentifizierung, wie zum Beispiel die Hoechst-Färbung, bearbeitet werden. Infolge der starken Anreicherung der weißen Blutkörperchen WBC mit

20
Hilfe des Verfahrens gemäß der Erfindung wird zum Beispiel das Identifizieren von Pathologien von weißen Blutkörperchen WBC mit einer viel höheren statistischen Signifikanz ermöglicht, als es zum Beispiel aktuell mit Hilfe einer Giemsa-Färbung von weißen Blutkörperchen WBC in einer nicht angereich-

25
erten Blutprobe der Fall ist.

In FIG 6 ist ein Flussdiagramm 600 gezeigt, mit dem der Ablauf eines Verfahrens zur Untersuchung von weißen Blutkörperchen gemäß einem Ausführungsbeispiel der Erfindung veranschaulicht wird. Bei dem Schritt 6.I wird Blutflüssigkeit BL in einer Trennstufe S1 über einen ersten Einlass E1 in ein peripher angeordnetes Zuflusssystem eines ersten Fließpassagenabschnitts F1 eines Mikrofluidkanalsystems 1 eingebracht. Bei dem Schritt 6.II wird ein zweiter Einlass E2 des Mikro-

30
fluidkanalsystems 1 geöffnet, über den eine Pufferlösung PF in einen zentral angeordneten Zufluss des ersten Fließpassagenabschnitts F1 hineinströmt. Während das durch den ersten Einlass E1 strömende Blut in dem ersten Fließpassagenab-

35

schnitt F1 einen Trennstufen-Mantelstrom MS mit einer ersten Flussrate v_1 bildet, bildet die zentral durch die Fließpassage F1 fließende Pufferlösung PF einen Zentralstrom ZS mit einer zweiten Flussrate v_2 . Bei dem Schritt 6.III werden nun von einer Schallwellenerzeugungseinrichtung, beispielsweise mit Hilfe von Piezoelementen, Schallwellen AW erzeugt, welche sich quer zu der Flussrichtung des ersten Fließpassagenabschnitts F1 des Mikrofluidkanalsystems 1 ausbreiten. Infolge des durch die Schallwellen AW entstehenden Drucks in Querrichtung des ersten Fließpassagenabschnitts F1 werden vermehrt weiße Blutkörperchen WBC aus dem Trennstufen-Mantelstrom MS in den Zentralstrom ZS transferiert, so dass sie sich in der den Zentralstrom ZS bildenden Pufferlösung PF anreichern. Bei dem Schritt 6.IV werden nun nach dem Übergang in eine Prozessstufe S2 mit einer Fließpassage F in einem zweiten Fließpassagenabschnitt F2 der Fließpassage F ein dritter Einlass E3 und ein vierter Einlass E4 derart angesteuert, dass hochtransparente Pufferlösungen PF1, PF2 in den zweiten Fließpassagenabschnitt F2 des Mikrofluidkanalsystems 1 hineinströmen und in z-Richtung den Zentralstrom ZS umgebende erste und zweite Mantelströme MS1, MS2 bilden. Dabei sind die Flussraten v_3 , v_4 der ersten und zweiten Mantelströme MS1, MS2 derart gewählt, dass der Zentralstrom ZS in z-Richtung, d.h. in Beobachtungsrichtung eines Mikroskops, dezentriert wird, d.h. der Zentralstrom ZS wird in z-Richtung verschoben, so dass er nicht mehr in einer späteren Beobachtungsebene BA fließt.

Nachdem die Fließpassage F sich in einem dritten Fließpassagenabschnitt F3 aufgeweitet hat, so dass die Fließgeschwindigkeit sowohl des Zentralstroms ZS als auch der ersten und zweiten Mantelströme MS1, MS2 verringert wurden, werden bei einem Schritt 6.V in einem vierten Fließpassagenabschnitt F4 der Fließpassage F erneut in Querrichtung zur Flussrichtung Schallwellen AW erzeugt, welche sich quer zu der Flussrichtung des Fließpassagenabschnitts F4 der Fließpassage F des Mikrofluidkanalsystems 1 ausbreiten. Infolge des durch die Schallwellen AW entstehenden Drucks in Querrichtung des

Fließpassagenabschnitts F4 werden vermehrt weiße Blutkörperchen WBC aus dem dezentrierten Zentralstrom ZS in einen der ersten und zweiten Mantelströme MS1, MS2 transferiert. Die Schallwellen AW bilden stehende Wellen aus, deren Wellenknoten in z-Richtung derart positioniert sind, dass sie in z-Richtung betrachtet, auf der Höhe bzw. in einer Beobachtungsebene, welche durch einen Beobachtungsbereich BA eines stromabwärts angeordneten Mikroskops M verläuft, angeordnet sind. Bei einem Schritt 6.VI passieren die weißen Blutkörperchen WBC eine Längsposition B des Mikrofluidkanalsystems 1, an der ein Mikroskop M angeordnet ist. Die in z-Richtung in dem Beobachtungsbereich BA des Mikroskops M positionierten weißen Blutkörperchen WBC werden nun mit dem Mikroskop M beobachtet. Nach der Beobachtung werden die weißen Blutkörperchen WBC bei einem Schritt 6.VII in einer Sammeleinheit S3 gesammelt und anschließend bei einem Schritt 6.VIII in Tropfenform für weitere Analysen auf einen Objektträger OT ausgegeben.

Es wird abschließend noch einmal darauf hingewiesen, dass es sich bei den vorbeschriebenen Verfahren und Vorrichtungen lediglich um bevorzugte Ausführungsbeispiele der Erfindung handelt und dass die Erfindung vom Fachmann variiert werden kann, ohne den Bereich der Erfindung zu verlassen, soweit er durch die Ansprüche vorgegeben ist. Beispielsweise wurde die Mikrofluidkanalanordnung 1 im Zusammenhang mit der Beobachtung und Analyse von weißen Blutkörperchen WBC beschrieben. Allerdings ist die Erfindung nicht auf die Separation und Beobachtung von weißen Blutkörperchen WBC beschränkt, sondern kann auch auf andere Blutzellen oder auch andere Flüssigkeiten als Blut und in diesen Flüssigkeiten auftretende Partikel angewandt werden. Es wird der Vollständigkeit halber auch darauf hingewiesen, dass die Verwendung der unbestimmten Artikel „ein“ bzw. „eine“ nicht ausschließt, dass die betreffenden Merkmale auch mehrfach vorhanden sein können. Ebenso schließt der Begriff „Einheit“ nicht aus, dass diese aus mehreren Komponenten besteht, die gegebenenfalls auch räumlich verteilt sein können.

Patentansprüche

1. Vorrichtung (1, 2) zur Untersuchung von Partikeln (WBC, RBC, PLT) in einer zu untersuchenden Flüssigkeit (BL), aufweisend eine Prozessstufe (S2) zum Trennen und Positionieren der zu untersuchenden Partikel (WBC, RBD, PLT), welche umfasst:

- eine Fließpassage (F), durch die die zu untersuchende Flüssigkeit (BL) mit einer ersten Flussrate (v_s) hindurchbewegt wird, mit mindestens einem Einlass (E3, E4), durch den mindestens eine Mantelflüssigkeit (PF1, PF2) mit mindestens einer zweiten Flussrate (v_3 , v_4) in die erste Fließpassage (F) strömt, derart, dass die mindestens eine Mantelflüssigkeit (PF1, PF2) mindestens einen Mantelstrom (MS1, MS2) in der Fließpassage (F) ausbildet und die zu untersuchende Flüssigkeit (BL) längs zu dem mindestens einen Mantelstrom (MS1, MS2) durch die Fließpassage (F) fließt,
- eine Wellenerzeugungseinrichtung (WE2) zur piezoakustischen Erzeugung von Schallwellen (AW), welche sich transversal zur Fließrichtung der zu untersuchenden Flüssigkeit (BL) durch die Fließpassage (F) ausbreiten und Wellenknoten (KN) in einer Beobachtungsebene (BA) ausbilden, so dass aufgrund der Druckwirkung der Schallwellen (AW) in Transversalrichtung zu untersuchende Partikel (WBC, PLT, RBC) der zu untersuchenden Flüssigkeit (BL) transversal in die Beobachtungsebene (BA) verschoben werden und dort angereichert werden,

wobei der Wert der mindestens einen zweiten Flussrate (v_3 , v_4) derart gewählt ist, dass der mindestens eine Mantelstrom (MS1, MS2) einen vorbestimmten Querschnitt aufweist, so dass die Beobachtungsebene (BA) durch den mindestens einen Mantelstrom (MS1, MS2) verläuft und die zu untersuchenden Partikel (WBC, PLT, RBC) in der mindestens einen Mantelflüssigkeit (PF1, PF2) angereichert werden.

2. Vorrichtung (1, 2) nach Anspruch 1, wobei die Fließpassage (F) einen ersten Einlass (E3) aufweist, durch den eine erste Mantelflüssigkeit (PF1) mit einer zweiten Flussrate (v_3) in

die Fließpassage (F) strömt, und einen dem ersten Einlass (E3) gegenüberliegenden zweiten Einlass (E4), durch den eine zweite Mantelflüssigkeit (PF2) mit einer dritten Flussrate (V_4) in die Fließpassage (F) strömt, derart, dass die erste
5 Mantelflüssigkeit (PF1) einen ersten Mantelstrom (MS1) in der Fließpassage (F) ausbildet und die zweite Mantelflüssigkeit (PF2) einen zweiten Mantelstrom (MS2) in der Fließpassage (F) ausbildet und die zu untersuchende Flüssigkeit (BL) zwischen dem ersten Mantelstrom (MS1) und dem zweiten Mantelstrom
10 (MS2) durch die Fließpassage (F) fließt,
wobei der Wert der zweiten Flussrate (V_3) und der dritten Flussrate (V_4) derart gewählt ist, dass die Mantelströme (MS1, MS2) einen vorbestimmten Querschnitt aufweisen, so dass die Beobachtungsebene (BA) durch einen der beiden Mantelströme (MS1, MS2) verläuft.

3. Vorrichtung nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Fließpassage (F) derart dimensioniert ist, dass die durch sie fließenden Flüssigkeiten (BL, PF1, PF2) laminar fließen, und/oder die
20 Fließpassage (F) einen Mikrofluidkanal (MFK) umfasst.

4. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die zu untersuchende Flüssigkeit (BL) Blutflüssigkeit umfasst und/oder die zu untersuchenden Partikel (WBC, RBC, PLT) der
25 zu untersuchenden Flüssigkeit (BL) mindestens eine der folgenden Blutbestandteile aufweisen:
- Leukozyten,
- Thrombozyten
- Erythrozyten.

30 5. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die Position der Knoten (KN) der akustischen Wellen (AW) in Transversalrichtung durch Einstellen der Frequenz der Schallwellen (AW) festgelegt wird.

35 6. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, aufweisend eine der Prozessstufe (S2) vorgeschaltete Trennstufe (S1), wobei die Trennstufe (S1) umfasst:

- eine Fließpassage (F1) mit einem Zentralstrom (ZS) mit einer zunächst von den zu untersuchenden Partikeln (WBC, RBC, PLT) freien Flüssigkeit (PF), und mindestens einem Trennstufen-Mantelstrom (MS), welcher längs dem Zentralstrom
5 (ZS) durch die Fließpassage (F1) der Trennstufe (S1) fließt und die zu untersuchende Flüssigkeit (BL) aufweist,
- eine zusätzliche Wellenerzeugungseinrichtung (WE1) zur piezoakustischen Erzeugung von Schallwellen (AW), welche sich transversal zur Fließrichtung der zu untersuchenden Flüssigkeit (BL) durch die Fließpassage (F1) der Trennstufe
10 (S1) ausbreiten und einen Wellenknoten (KN) in einer Ebene durch den Zentralstrom (ZS) ausbilden, so dass aufgrund der Druckwirkung der Schallwellen (AW) in Transversalrichtung Partikel (WBC, PLT) der zu untersuchenden Flüssigkeit (BL)
15 in den Zentralstrom (ZS) verschoben werden und dort angereichert werden.

7. Vorrichtung nach Anspruch 6, wobei der mindestens eine Trennstufen-Mantelstrom (MS) den Zentralstrom (ZS) in Transversalrichtung zur Fließrichtung umgibt und/oder die von den
20 zu untersuchenden Partikeln (WBC, RBC, PLT) zunächst freie Flüssigkeit (PF) transparent ist.

8. Vorrichtung nach Anspruch 6 oder 7, wobei die Wellenerzeugungseinrichtungen (WE1, WE2) derart ausgebildet sind, dass
25 die Ausbreitungsrichtung der Schallwellen (AW) in der Trennstufe (S1) und die Ausbreitungsrichtung der Schallwellen (AW) in der Prozessstufe (S2) zueinander orthogonal und orthogonal zur Fließrichtung der zu untersuchenden Flüssigkeit (BL) verlaufen.
30

9. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 2 bis 8, wobei sich die Fließpassage (F3) der Prozessstufe (S2) vor der Längsposition der Wellenerzeugungseinrichtung (WE2) der Prozessstufe
35 (S2) quer zur Fließrichtung aufweitet, so dass die Fließgeschwindigkeit der zu untersuchenden Flüssigkeit (BL) und der mindestens einen Mantelflüssigkeit (PF1, PF2) reduziert sind.

10. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 9, aufweisend eine Pufferzugabeeinheit zur Zugabe eines Puffers zur hypotonischen Lösung in den Zentralstrom (ZS) oder die zu untersuchende Flüssigkeit (BL).

5

11. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 10, aufweisend eine Einheit, welche vorzugsweise mit dem zweiten Einlass (E4) in Verbindung steht, zur Zugabe von Markern für die zu untersuchenden Partikel (WBC, RBC, PLT), so dass die zweite
10 Mantelflüssigkeit (PF2) die Marker umfasst.

12. Vorrichtung zur mikroskopischen Beobachtung von Partikeln (RBC, WBC) in einer zu untersuchenden Flüssigkeit, umfassend:
- eine Vorrichtung (1, 2) nach einem der Ansprüche 1 bis 11,
15 - ein Mikroskop (M), welches an einer Längsposition der Fließpassage (F) der Prozessstufe (S2) angeordnet ist, zur Beobachtung von Partikeln (WBC, RBC, PLT) der zu untersuchenden Flüssigkeit in der Beobachtungsebene (BA).

20 13. Vorrichtung nach einem Anspruch 12, ferner aufweisend:
- eine Sammeleinheit (S3), welche der Prozessstufe (S2) nachgeschaltet, stromabwärts der Längsposition des Mikroskops (M) angeordnet ist und dazu eingerichtet ist, die untersuchten Partikel (WBC, RBC, PLT) zu sammeln, um diese mit
25 einer weiteren Untersuchungsmethode, welche eine Anreicherung der untersuchten Partikel (WBC, RBC, PLT) benötigt, vorzugsweise einer molekularbiologischen Messmethode, weiter zu untersuchen, und/oder
- eine Partikeltransfereinrichtung, welche stromabwärts hinter der Längsposition des Mikroskops (M) angeordnet ist und
30 zum Transfer der Partikel (WBC, RBC, PLT) von der Fließpassage (F) auf einen Objektträger (OT) zur weiteren Untersuchung der Partikel (WBC, RBC, PLT) ausgebildet ist.

35 14. Verfahren zur Untersuchung von Partikeln (RBC, WBC, PLT) in einer zu untersuchenden Flüssigkeit (BL), aufweisend die Schritte:

- Bewegen einer zu untersuchenden Flüssigkeit (BL) mit einer ersten Flussrate (V_3) durch eine Fließpassage (F),
- Zuführen mindestens einer Mantelflüssigkeit (PF1, PF2) durch einen ersten Einlass (E3) mit einer zweiten Flussrate (V_3) zu der Fließpassage (F), derart, dass die mindestens eine Mantelflüssigkeit (PF1, PF2) mindestens einen Mantelstrom (MS1, MS2) in der Fließpassage (F) ausbildet und die zu untersuchende Flüssigkeit (BL) längs zu dem mindestens einen Mantelstrom (MS1, MS2) durch die Fließpassage (F) fließt,
- piezoakustisches Erzeugen von Schallwellen (AW), welche sich transversal zur Fließrichtung der zu untersuchenden Flüssigkeit (BL) durch die Fließpassage (F) ausbreiten und Wellenknoten (KN) in einer Beobachtungsebene (BA) ausbilden, so dass aufgrund der Druckwirkung der Schallwellen (AW) in Transversalrichtung zu untersuchende Partikel (WBC, RBC, PLT) der zu untersuchenden Flüssigkeit (BL) transversal in die Beobachtungsebene (BA) verschoben werden und dort angereichert werden,
- Wählen des Werts der mindestens einen zweiten Flussrate (V_3) Flussrate (V_4) derart, dass der mindestens eine Mantelstrom (MS1, MS2) einen vorbestimmten Querschnitt aufweist, so dass die Beobachtungsebene (BA) durch den mindestens einen Mantelstrom (MS1, MS2) verläuft und die zu untersuchenden Partikel (WBC, RBC, PLT) in der mindestens einen Mantelflüssigkeit (PF1, PF2) angereichert werden.

15. Verwendung einer Fließzelle und einer Wellenerzeugungseinrichtung (WE2) zur piezoakustischen Erzeugung von Schallwellen (AW), insbesondere einer Vorrichtung (1, 2) nach einem der Ansprüche 1 bis 13, zur Separation von Leukozyten (WBC) aus einer Blutflüssigkeit (BL).

FIG 1

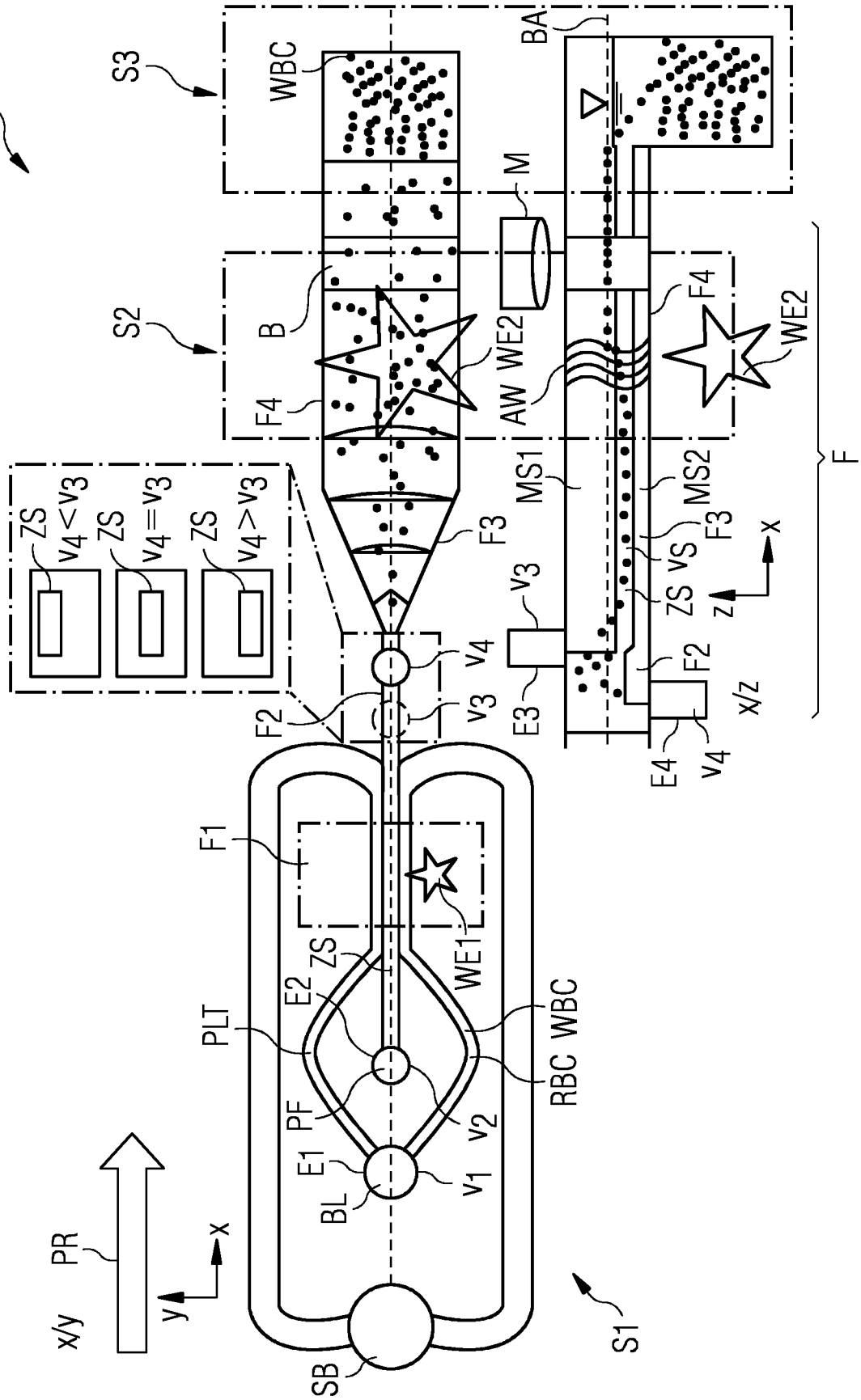


FIG 2

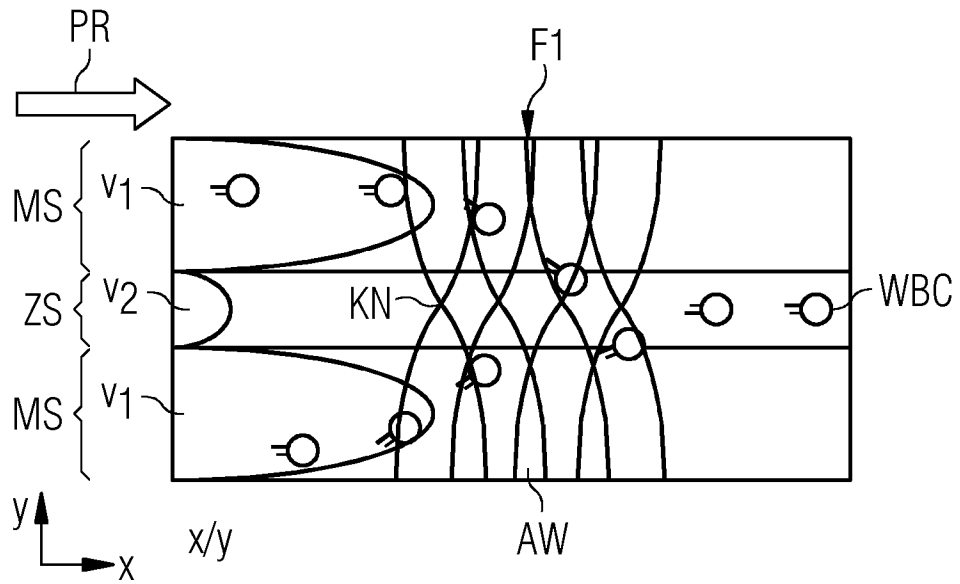


FIG 3

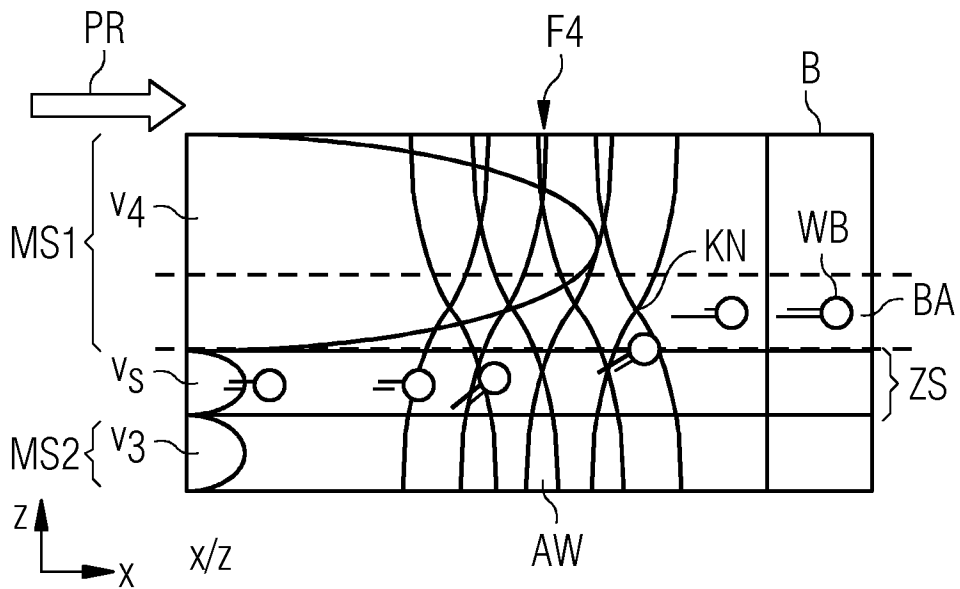
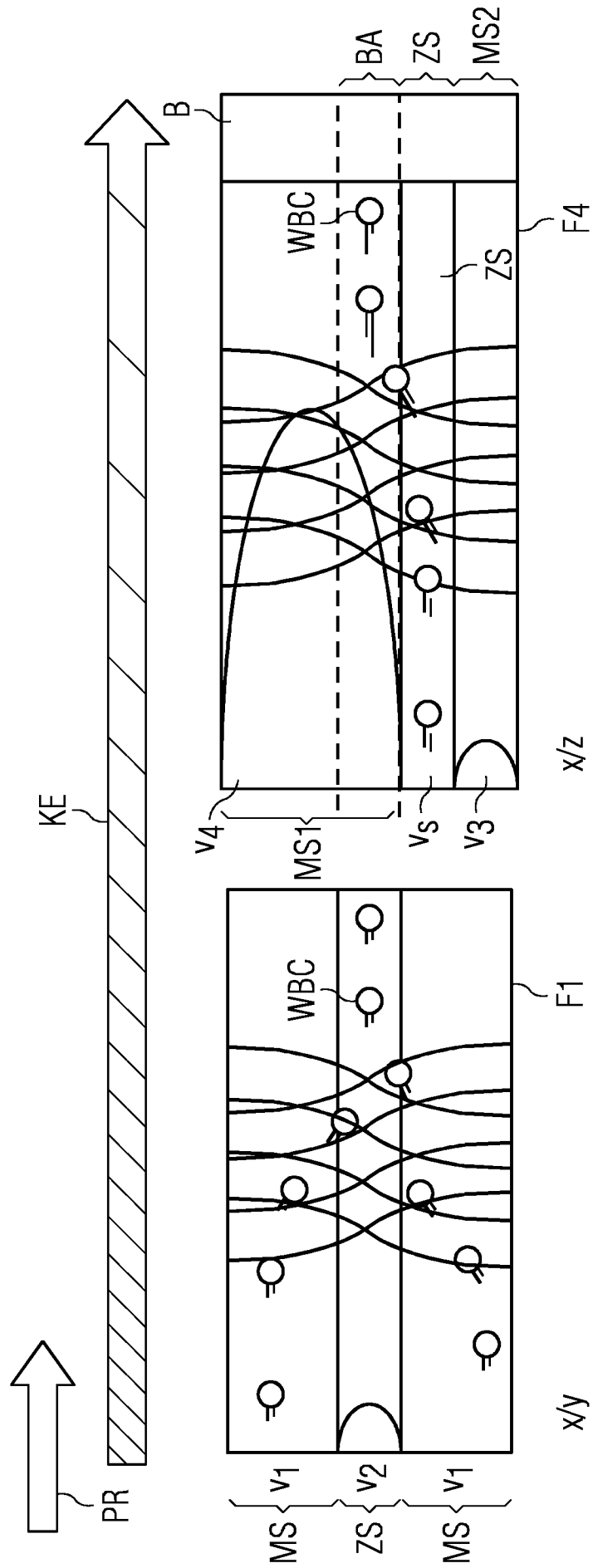


FIG 4



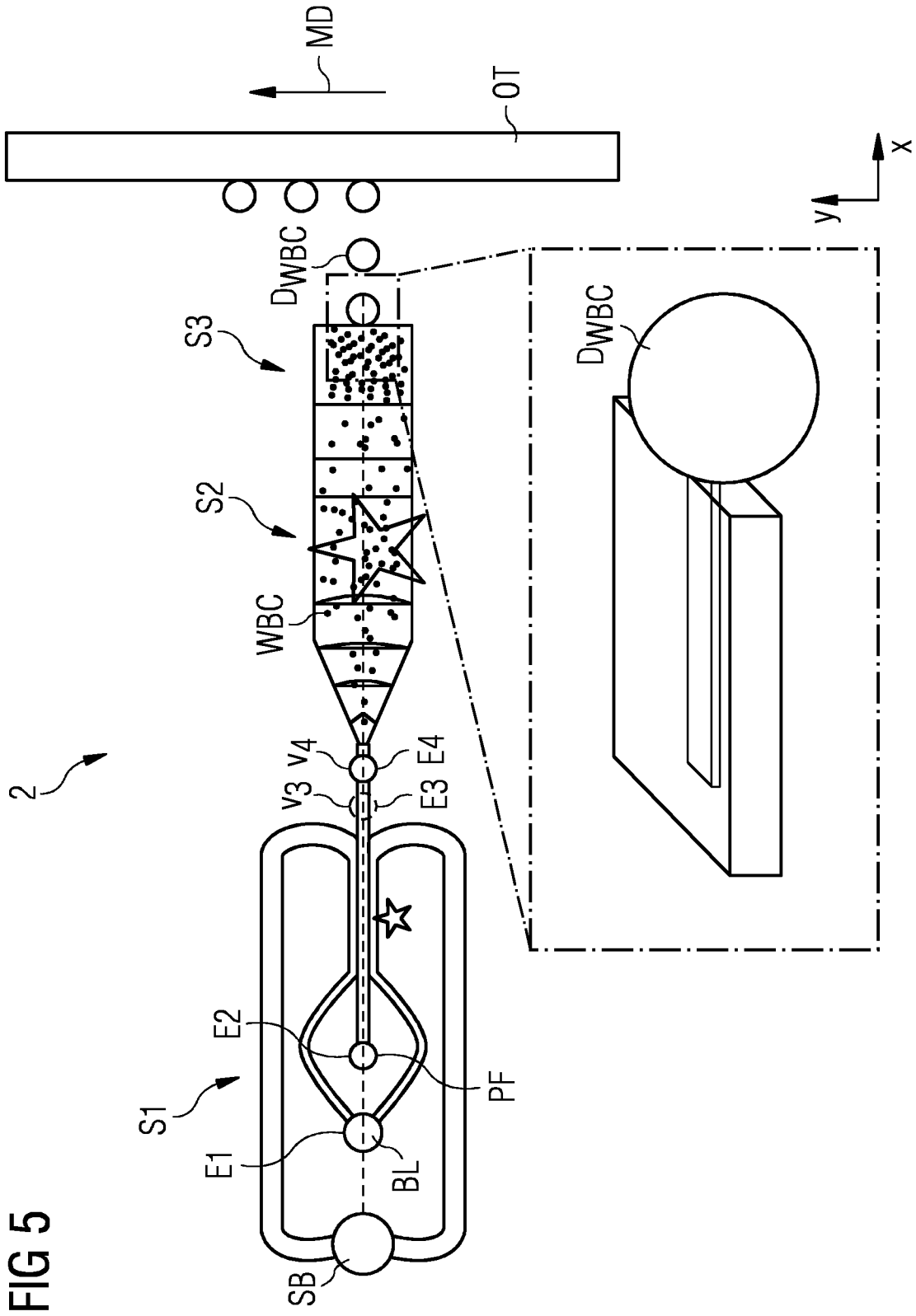
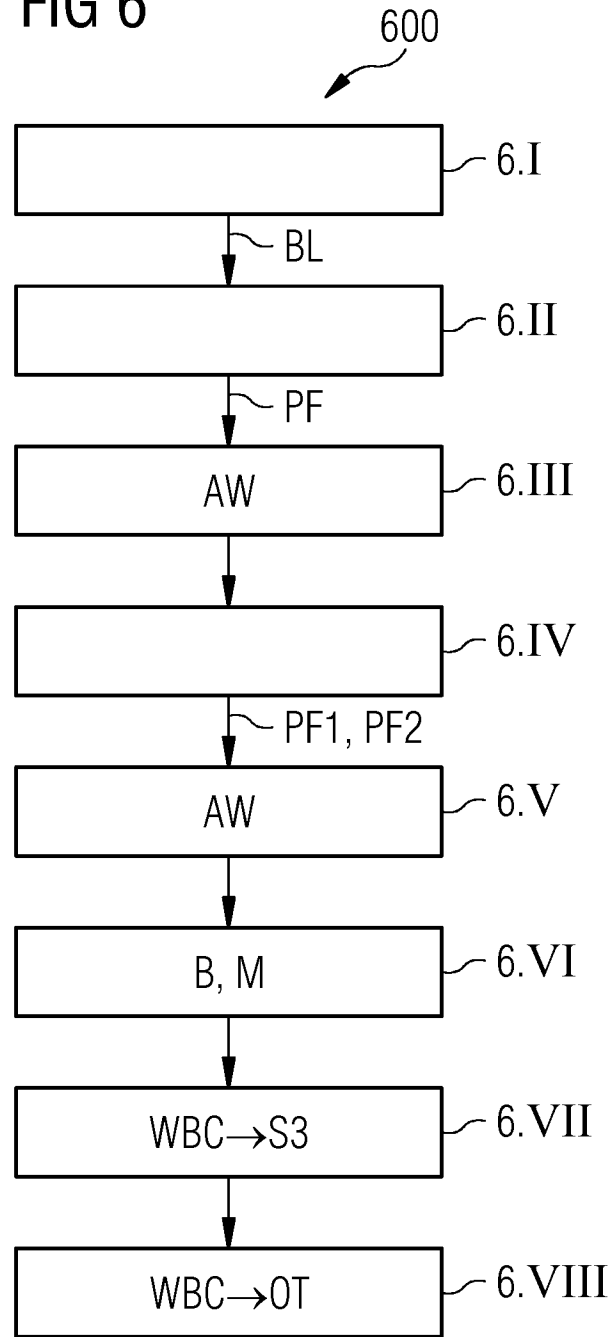


FIG 5

FIG 6



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2015/081156

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. G01N15/14 G01N15/00 G01N15/10
ADD.
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2014/147860 A1 (KADUCHAK GREGORY [US] ET AL) 29 May 2014 (2014-05-29) paragraphs [0002], [0012], [0054], [0062], [0102] - [0105], [0110], [0155], [0189], [0196], [0287]; figures 7c,8,27A	1-15
A	US 2013/139575 A1 (LEE CHANGYANG [US] ET AL) 6 June 2013 (2013-06-06) paragraph [0033] - paragraph [0036]; figures 4,5	1-15
A	US 2014/336062 A1 (GRAVES STEVEN W [US] ET AL) 13 November 2014 (2014-11-13) paragraphs [0034] - [0043], [0047]; figures 1,16	8
	----- -/--	

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 9 September 2016	Date of mailing of the international search report 20/09/2016
--	---

Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Eidmann, Gunnar
--	--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2015/081156

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2014/008307 A1 (GULDIKEN RASIM OYTUN [US] ET AL) 9 January 2014 (2014-01-09) paragraph [0134]; figure 3.4 -----	12
A	US 2009/178716 A1 (KADUCHAK GREGORY [US] ET AL) 16 July 2009 (2009-07-16) paragraph [0048]; figure 3 -----	1-15
A	US 2010/009333 A1 (AUER ROBERT E [US]) 14 January 2010 (2010-01-14) paragraph [0028] - paragraph [0040]; figures 1-4 -----	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No PCT/EP2015/081156

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2014147860	A1	29-05-2014	EP 2724160 A2 30-04-2014 US 2014147860 A1 29-05-2014 WO 2013003498 A2 03-01-2013

US 2013139575	A1	06-06-2013	NONE

US 2014336062	A1	13-11-2014	NONE

US 2014008307	A1	09-01-2014	US 2014008307 A1 09-01-2014 WO 2012135663 A2 04-10-2012

US 2009178716	A1	16-07-2009	AU 2009206101 A1 23-07-2009 BR PI0906520 A2 14-07-2015 CA 2710024 A1 23-07-2009 CN 101971247 A 09-02-2011 CN 104949909 A 30-09-2015 CN 105181559 A 23-12-2015 EA 201001165 A1 28-02-2011 EP 2240927 A2 20-10-2010 JP 5364725 B2 11-12-2013 JP 5716063 B2 13-05-2015 JP 5886908 B2 16-03-2016 JP 2011510299 A 31-03-2011 JP 2013242335 A 05-12-2013 JP 2014211454 A 13-11-2014 JP 2016027346 A 18-02-2016 KR 20100112578 A 19-10-2010 KR 20150096808 A 25-08-2015 KR 20160002927 A 08-01-2016 SG 193165 A1 30-09-2013 US 2009178716 A1 16-07-2009 US 2014261721 A1 18-09-2014 WO 2009091925 A2 23-07-2009

US 2010009333	A1	14-01-2010	NONE

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 INV. G01N15/14 G01N15/00 G01N15/10
 ADD.

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
 G01N

Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 2014/147860 A1 (KADUCHAK GREGORY [US] ET AL) 29. Mai 2014 (2014-05-29) Absätze [0002], [0012], [0054], [0062], [0102] - [0105], [0110], [0155], [0189], [0196], [0287]; Abbildungen 7c, 8, 27A	1-15
A	----- US 2013/139575 A1 (LEE CHANGYANG [US] ET AL) 6. Juni 2013 (2013-06-06) Absatz [0033] - Absatz [0036]; Abbildungen 4, 5	1-15
A	----- US 2014/336062 A1 (GRAVES STEVEN W [US] ET AL) 13. November 2014 (2014-11-13) Absätze [0034] - [0043], [0047]; Abbildungen 1, 16	8
	----- -/--	



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" frühere Anmeldung oder Patent, die bzw. das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

9. September 2016

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

20/09/2016

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Eidmann, Gunnar

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	US 2014/008307 A1 (GULDIKEN RASIM OYTUN [US] ET AL) 9. Januar 2014 (2014-01-09) Absatz [0134]; Abbildung 3.4 -----	12
A	US 2009/178716 A1 (KADUCHAK GREGORY [US] ET AL) 16. Juli 2009 (2009-07-16) Absatz [0048]; Abbildung 3 -----	1-15
A	US 2010/009333 A1 (AUER ROBERT E [US]) 14. Januar 2010 (2010-01-14) Absatz [0028] - Absatz [0040]; Abbildungen 1-4 -----	1-15

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2015/081156

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 2014147860 A1	29-05-2014	EP 2724160 A2	30-04-2014
		US 2014147860 A1	29-05-2014
		WO 2013003498 A2	03-01-2013

US 2013139575 A1	06-06-2013	KEINE	

US 2014336062 A1	13-11-2014	KEINE	

US 2014008307 A1	09-01-2014	US 2014008307 A1	09-01-2014
		WO 2012135663 A2	04-10-2012

US 2009178716 A1	16-07-2009	AU 2009206101 A1	23-07-2009
		BR PI0906520 A2	14-07-2015
		CA 2710024 A1	23-07-2009
		CN 101971247 A	09-02-2011
		CN 104949909 A	30-09-2015
		CN 105181559 A	23-12-2015
		EA 201001165 A1	28-02-2011
		EP 2240927 A2	20-10-2010
		JP 5364725 B2	11-12-2013
		JP 5716063 B2	13-05-2015
		JP 5886908 B2	16-03-2016
		JP 2011510299 A	31-03-2011
		JP 2013242335 A	05-12-2013
		JP 2014211454 A	13-11-2014
		JP 2016027346 A	18-02-2016
		KR 20100112578 A	19-10-2010
		KR 20150096808 A	25-08-2015
		KR 20160002927 A	08-01-2016
		SG 193165 A1	30-09-2013
		US 2009178716 A1	16-07-2009
		US 2014261721 A1	18-09-2014
		WO 2009091925 A2	23-07-2009

US 2010009333 A1	14-01-2010	KEINE	
