



(10) **DE 10 2015 119 027 B4** 2021.07.29

(12) **Patentschrift**

(21) Aktenzeichen: **10 2015 119 027.3**
(22) Anmeldetag: **05.11.2015**
(43) Offenlegungstag: **11.05.2017**
(45) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: **29.07.2021**

(51) Int Cl.: **G01N 15/14 (2006.01)**
G01N 27/07 (2006.01)
G01N 33/49 (2006.01)
A61B 5/145 (2006.01)
A61B 5/053 (2021.01)

Innerhalb von neun Monaten nach Veröffentlichung der Patenterteilung kann nach § 59 Patentgesetz gegen das Patent Einspruch erhoben werden. Der Einspruch ist schriftlich zu erklären und zu begründen. Innerhalb der Einspruchsfrist ist eine Einspruchsgebühr in Höhe von 200 Euro zu entrichten (§ 6 Patentkostengesetz in Verbindung mit der Anlage zu § 2 Abs. 1 Patentkostengesetz).

(73) Patentinhaber:
**Bundesrepublik Deutschland, vertreten durch
das Bundesministerium für Wirtschaft und
Energie, dieses vertreten durch den Präsidenten
der Physikalischen Bundesanstalt, 38116
Braunschweig, DE**

(72) Erfinder:
**Simon, Peter, 12049 Berlin, DE; Frankowski,
Marcin, Dr., 10715 Berlin, DE; Neukammer, Jörg,
Dr., 12203 Berlin, DE**

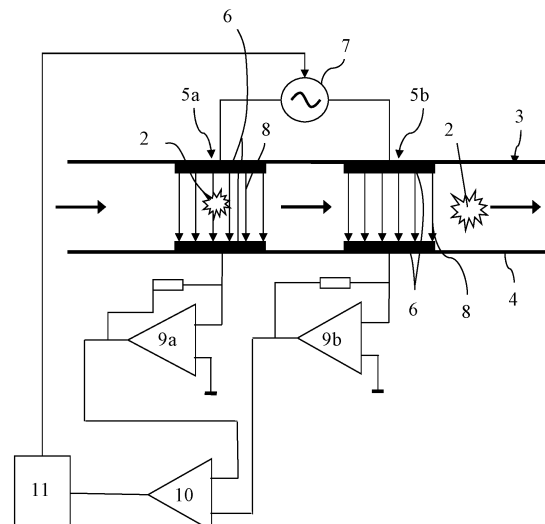
(74) Vertreter:
**Gramm, Lins & Partner Patent- und
Rechtsanwälte PartGmbB, 30173 Hannover, DE**

(56) Ermittelter Stand der Technik:
siehe Folgeseiten

(54) Bezeichnung: **Verfahren und Messeinrichtung zur Bestimmung von Blutkörperchen**

(57) Hauptanspruch: Verfahren zur Bestimmung von Blutkörperchen (2) in einer Blutprobe im Durchfluss mit einem Sensor (5a, 5b) zur Messung der elektrischen Impedanz, gekennzeichnet durch:

- Durchleiten der hämolysefreien Blutprobe mit darin enthaltenen Blutkörperchen (2) durch ein Wechsellspannungsfeld (8) des Sensors (5a, 5b),
- Messen der elektrischen Impedanz der einzelnen Blutkörperchen (2) in der Blutprobe mit dem Sensor (5a, 5b), wobei die elektrische Impedanz mit mindestens zwei unterschiedlichen Messfrequenzen des Wechsellspannungsfeldes (8) gemessen wird, und
- Bestimmen der Arten der im Wechsellspannungsfeld (8) des Sensors (5a, 5b) befindlichen Blutkörperchen (2) in Abhängigkeit von dem Verhältnis des Imaginärteils der Impedanz bei einer zweiten Frequenz ($\text{Im}(Z_2)$) zu dem Realteil der Impedanz bei einer ersten Frequenz ($\text{Re}(Z_1)$), die von der zweiten Frequenz unterschiedlich ist.



(56) Ermittelter Stand der Technik:

4) HOLMES; David [et al.]: Leukocyte analysis and differentiation using high speed microfluidic single cell impedance cytometry. In: Lab Chip, Vol. 9, 2009, S.2881-2889.

CHEUNG, Karen ; GAWAD, Shady ; RENAUD, Philippe: Impedance spectroscopy flow cytometry: on-chip label-free cell differentiation. In: Cytometry, Part A, Vol. 65A, 2005, No. 2, S. 124-132. -ISSN 0196-4763

CHEUNG, Karen C. [et al.]: Microfluidic impedance-based flow cytometry. In: Cytometry, Part A, Vol. 77A, 2010, No. 7, S. 648-666. - ISSN 0196-4763

FRANKOWSKI, Marcin [et al.]: Simultaneous optical and impedance analysis of single cells: a comparison of two microfluidic sensors with sheath flow focusing. In: Engineering in life sciences, Vol. 15, 2015, No. 3, S. 286-296. - ISSN 1618-2863

QIN, Jian ; JONES, Robert C. ; RAMAKRISHNAN, Ramesh: Studying copy number variations using a nanofluidic platform. In: Nucleic Acids Research, Vol. 36, 2008, No. 18, 8 S. - ISSN 0301-5610

SUN, Tao ; MORGAN, Hywel: Single-cell microfluidic impedance cytometry: a review. In: Microfluidics and Nanofluidics, Vol. 8, 2010, No. 4, S. 423-443. - ISSN 1613-4982

Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung von Blutkörperchen in einer Blutprobe im Durchfluss mit einem Sensor zur Messung der elektrischen Impedanz.

[0002] Die Erfindung betrifft weiterhin eine Messvorrichtung zur Bestimmung von Blutkörperchen mit einem solchen Verfahren.

[0003] Die Bestimmung von Blutkörperchen in einer Blutprobe mit der Bestimmung der in der Blutprobe enthaltenen Arten von Blutkörperchen umfassend rote und weiße Blutkörperchen und ihre Subpopulationen spielt in der Labormedizin eine große Rolle. Hierbei besteht ein Bedarf insbesondere die Anzahl der unterschiedlichen Arten von Blutkörperchen in einer Blutprobe zu bestimmen und die verschiedenen Arten von Blutkörperchen in der Blutprobe voneinander zu differenzieren. Hierzu ist die Nutzung der optischen und/oder elektrischen Durchflusszytometrie bekannt.

[0004] In M. Frankowski, P.Simon, N.Bock A. El Hasni, U. Schnakenberg, J. Neukammer: Simultaneous optical and impedance analysis of single cells: A comparison of two microfluidic sensors with sheath flow focusing, in: Engineering Life Sciences 2015, 15, Seiten 286 bis 296 ist ein Verfahren mit einer kombinierten Analyse von Blutproben mittels Durchflusszytometrie in Abhängigkeit von der gemessenen elektrischen Impedanz und von optischen Eigenschaften von Mikropartikeln und Blutzellen beschrieben. Ein mikrostrukturierter Sensor hat einen kapazitiven Sensorbereich, in dem ein Wechselfeld aufgebaut wird durch das die Blutprobe durchgeleitet wird. Ein weiterer Sensor oder Sensorbereich ist zur Messung der elektrischen Impedanz der Blutprobe oder eines Vergleichsmediums ohne Blutkörperchen vorgesehen, um aus dem Differenzsignal der beiden Sensoren eine durch die Blutkörperchen verursachte Impedanzänderung zu bestimmen. Die Subpopulationen der Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten der weißen Blutkörperchen (Leukozyten) lassen sich anhand von Impedanzereignissen mit charakteristischen absoluten Impedanzgrößen bei zwei verschiedenen Frequenzen bestimmen.

[0005] J. Chen, Ch. Xue, Y. Zhao, D. Chen, M-H. Wu und J. Wang: Microfluidic Impedance Flow Cytometry Enabling High-Throughput Single-Cell Electrical Property Characterization, in: International Journal of Molecular Sciences, 2015, 16, S. 9804-9830 beschreiben die aktuellen Entwicklungen in der Durchfluß-Impedanz-zytometrie zur Charakterisierung einzelner Zellen. Eine hinreichende Differenzierung der Bestandteile einer Blutprobe mit Hilfe der Impedanzanalyse ist bislang nur in Kombination mit weiteren

unterschiedlichen Methoden möglich, wobei insbesondere die Lasertechnik eingesetzt wird.

[0006] T. Sun, H. Morgan: Single-cell microfluidic impedance cytometry: a review, in: Microfluidics and Nanofluidics, 2010, S. 423-443 gibt einen Überblick über verschiedene Verfahren der Durchfluss-Impedanz-Zytometrie.

[0007] In K. Cheung, S. Gawad, P. Renaud: Impedance spectroscopy flow cytometry: on-chip label-free cell differentiation, in: Cytometry, Part A, 2005, S. 124-132 wird ein Verfahren der Durchfluss-Impedanz-Zytometrie beschrieben, bei der Impedanzmessungen über einen weiten Frequenzbereich durchgeführt werden. Es wird aufgezeigt, dass eine Differenzierung von Zellen durch die Opazität nur eingeschränkt möglich ist.

[0008] D. Holmes et al.: Leukocyte analysis and differentiation using high speed microfluidic single cell impedance cytometry, in: Lab Chip, 2009, S 2881-2889 beschreibt eine Analyse und Differenzierung von Leukozyten mittels Impedanz-Zytometrie. Dabei werden Impedanzmessungen an zwei unterschiedlichen Frequenzen für eine lysierten Blutprobe durchgeführt und mit einer optischen Erfassung durch einen Laser kombiniert.

[0009] Ein Problem bei der Messung der Konzentration der Subpopulation von Leukozyten nach dem klinischen Standard-Protokoll besteht darin, dass zunächst eine Hämolyse durchgeführt werden muss. Dabei müssen die roten Blutkörperchen (Erythrozyten) zuerst aufgelöst werden. Die nachfolgende Bestimmung der Konzentration von Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten kann bei bestimmten Patientengruppen zu nicht akzeptablen Ungenauigkeiten führen, da durch den Hämolyseprozess die Leukozyten ebenfalls in Mitleidenschaft gezogen werden können.

[0010] Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher ein verbessertes Verfahren zur Bestimmung von Blutkörperchen in einer Blutprobe im Durchfluss mit einem Sensor zur Messung der elektrischen Impedanz sowie eine entsprechende Messvorrichtung zu schaffen.

[0011] Die Aufgabe wird durch die Verfahren mit den Merkmalen der Ansprüche 1 und 2 sowie durch die Messvorrichtung mit den Merkmalen des Anspruchs 12 gelöst. Vorteilhafte Ausführungsformen sind in den Unteransprüchen beschrieben.

[0012] Das Verfahren zur Bestimmung von Blutkörperchen hat die Schritte:

- Durchleiten der hämolysefreien Blutprobe mit darin enthaltenen Blutkörperchen durch ein Wechselfeld des Sensors,
- Messen der elektrischen Impedanz der Blutprobe bzw. der einzelnen Blutkörperchen in der Blutprobe mit dem Sensor, wobei die elektrische Impedanz mit mindestens zwei unterschiedlichen Messfrequenzen des Wechselfeldes gemessen wird,
- Bestimmen der Arten der im Wechselfeld des Sensors befindlichen Blutkörperchen in Abhängigkeit von dem Verhältnis des Imaginärteils der Impedanz bei einer zweiten Frequenz zu dem Realteil der Impedanz bei einer ersten Frequenz, die von der zweiten Frequenz unterschiedlich ist.

[0013] Eine Differenzierung der unterschiedlichen Arten von Blutkörperchen in einer Blutprobe sowie eine Bestimmung der Konzentration der einzelnen Arten von Blutkörperchen in der Blutprobe ist mit Hilfe einer elektrischen Durchflusszytometrie in einem Wechselfeld unter Verwendung von zwei unterschiedlichen Frequenzen des Wechselfeldes möglich. Dabei wird die Blutprobe keiner vorhergehenden Hämolyse unterzogen.

[0014] Eine Differenzierung der unterschiedlichen Arten von Blutkörperchen in der Blutprobe gelingt trotzdem dadurch, dass das Verhältnis des Imaginärteils der Impedanz bei einer zweiten Frequenz zu dem Realteil der Impedanz bei einer ersten Frequenz, die von der zweiten Frequenz unterschiedlich ist, gebildet wird. Es hat sich gezeigt, dass auch bei einer hämolysefreien Blutprobe dieses Verhältnis zwischen dem Imaginärteil und dem Realteil (oder des Kehrwertes) ein charakteristisches Maß für die jeweils im Wechselfeld befindliche Art von Blutkörperchen der Blutprobe ist. Damit kann ohne eine vorhergehende Hämolyse und ohne Beeinträchtigung der Blutprobe eine sehr schnelle und genaue Bestimmung der Blutkörperchen in der Blutprobe erfolgen. Anders als mit der Opazität als Verhältnis der Impedanzbeträge bei zwei unterschiedlichen Frequenzen lassen sich die unterschiedlichen Arten von Blutkörperchen mit dem Verhältnis von Imaginärteil zu Realteil der Impedanz desselben Volumenteils der Blutprobe bei unterschiedlichen Frequenzen wesentlich besser differenzieren. Dies gilt ganz besonders für die Granulozyten und Monozyten, die sich ohne Hämolyse mit der elektrischen Durchflusszytometrie ansonsten nicht ausreichend voneinander differenzieren lassen.

[0015] Für den Fall, dass der Betrag der Impedanz $|Z_1|$ bei der ersten Frequenz von dem Realteil dominiert wird, d.h. dass der Imaginärteil $\text{Im}(Z_1)$ bei der ersten Frequenz wesentlich kleiner (z.B. kleiner 80%) als der Realteil $\text{Re}(Z_1)$ ist, dann kann für den Real-

teil $\text{Re}(Z_1)$ auch der Betrag der Impedanz bei der ersten Frequenz $|Z_1|$ eingesetzt werden. Das heißt, dass das Verhältnis $\text{Im}(Z_2)/\text{Re}(Z_1)$ durch das Verhältnis $\text{Im}(Z_2)/|Z_1|$ ersetzt wird. Es gilt schließlich $|Z_1| = \sqrt{\text{Im}(Z_1)^2 + \text{Re}(Z_1)^2}$. Wenn der Imaginärteil sehr klein ist, gilt $|Z_1| = \sqrt{\text{Re}(Z_1)^2} = \text{Re}(Z_1)$

[0016] Das gleiche gilt sinngemäß auch für den Imaginärteil $\text{Im}(Z_2)$ bei der zweiten Frequenz, für den mit guter Näherung der Betrag $|Z_2|$ der Impedanz bei der zweiten Frequenz eingesetzt werden kann, wenn der Imaginärteil $\text{Im}(Z_2)$ den Realteil $\text{Re}(Z_2)$ bei der zweiten Frequenz dominiert (z.B. größer als 80% ist). Dann kann das Verhältnis $\text{Im}(Z_2)/\text{Re}(Z_1)$ durch das Verhältnis $|Z_2|/\text{Re}(Z_1)$ ermittelt werden.

[0017] Die Bestimmung der Arten der jeweils im Wechselfeld des Sensors befindlichen Blutkörperchen erfolgt im Durchfluss, während die Blutprobe durch das Wechselfeld geleitet wird. Damit kann für eine Menge der Blutprobe aus der zeitlichen Signale der elektrischen Impedanz und der hieraus zu einer Vielzahl von Zeitpunkten gebildeten Verhältnisse des Imaginärteils der Impedanz zum Realteil der Impedanz bei den unterschiedlichen Frequenzen z.B. eine Zählung von Werten erfolgen, die in für die einzelnen Arten von Blutkörperchen charakteristischen Wertebereichen liegen. Damit lassen sich die Anzahl der unterschiedlichen Arten von Blutkörperchen und ihre Konzentration in der Blutprobe ermitteln.

[0018] Dies gelingt auch unter Berücksichtigung der weißen Blutkörperchen ausschließlich durch eine Impedanzmessung ohne die bislang erforderliche Kombination mit anderen Methoden, insbesondere mit optischen Messverfahren und einer Hämolyse, so dass ein sehr einfaches und apparativ weniger aufwendiges Messverfahren möglich ist.

[0019] Die Aufgabe wird auch durch das Verfahren zur Bestimmung von Blutkörperchen in einer Blutprobe im Durchfluss mit einem Sensor zur Messung der elektrischen Impedanz dadurch gelöst, dass die elektrische Impedanz desselben Volumenteils der Blutprobe mit einer ersten Frequenz im Bereich von 1 MHz bis 6 MHz und mit einer zweiten Frequenz im Bereich von 6 MHz bis 15 MHz durchgeführt wird.

[0020] Es hat sich gezeigt, dass sich mit diesen beiden Frequenzbereichen ebenfalls eine verbesserte Differenzierung der unterschiedlichen Arten von Blutkörperchen in der Blutprobe realisiert werden kann. Der kleinere erste Frequenzbereich verbessert die Trennschärfe zur Erfassung der kleinvolumigen Blutkörperchen, wie insbesondere der Thrombozyten, während der größere zweite Frequenzbereich zur Differenzierung der großvolumigen Blutkörperchen, d.h. der weißen Blutkörperchen und ihrer Subpopulationen optimiert ist. Wenn die elektrischen Impedanzen

in diesen zwei Messbereichen miteinander korreliert werden, ergibt sich eine verbesserte Differenzierbarkeit der unterschiedlichen Arten von Blutkörperchen und ihrer Anzahl bzw. Konzentration in der Blutprobe.

[0021] Vorteilhaft ist es, wenn Impedanzänderungs-Ereignisse gezählt werden, bei dem die Impedanzänderung oder das Verhältnis des Imaginärteils der Impedanz bei der zweiten Frequenz zu dem Realteil der Impedanz bei der ersten Frequenz einen vorgegebenen Schwellwert überschreitet, und die Arten von Blutkörperchen sowie ihre Anzahl bzw. Konzentration in der Blutprobe in Abhängigkeit von der Anzahl von Impedanzänderungs-Ereignissen bestimmt wird. Der Schwellwert kann ein einziger Grenzwert sein oder einen Wertebereich mit einem unteren und oberen Grenzwert umfassen.

[0022] Vorteilhaft ist es, wenn ein gleichzeitiges Durchleiten der hämolysefreien Blutprobe mit darin enthaltenen Blutkörperchen durch ein Wechselspannungsfeld eines ersten Sensors und Durchleiten eines Vergleichsmediums durch ein Wechselspannungsfeld eines zweiten Sensors erfolgt. Dann wird die Impedanzdifferenz zwischen dem mit dem ersten und zweiten Sensor gleichzeitig gemessenen elektrischen Impedanz bestimmt. Die Arten der im Wechselspannungsfeld des ersten Sensors befindlichen Blutkörperchen können einen in Abhängigkeit von dem Verhältnis des Imaginärteils der Impedanzdifferenz bei der zweiten Frequenz zu dem Realteil der Impedanzdifferenz bei der ersten Frequenz bestimmt werden. Mit Hilfe der gleichzeitigen Messung der elektrischen Impedanz eines Vergleichsmediums lässt sich somit die durch die Blutkörperchen verursachten Impedanzänderungen auf zuverlässige und einfache Weise differenzieren.

[0023] Vor dem Durchleiten der Blutprobe durch den mindestens einen Sensor erfolgt vorzugsweise ein Verdünnen der hämolysefreien Blutprobe mit einer wässrigen Lösung. Die Blutprobe ist dabei hämolysefrei, indem keine Hämolyse vor dem Durchleiten durch den mindestens einen Sensor durchgeführt wird.

[0024] Mit Hilfe der Verdünnung mit der wässrigen Lösung kann die Blutprobe eingestellt werden, um die Zählraten der Zellen an die verfügbaren elektronischen Baugruppen und die Datenerfassung anzupassen.

[0025] Die zweite Frequenz zum Messen der elektrischen Impedanz ist vorzugsweise größer als die erste Frequenz. So kann die erste Frequenz vorteilhaft im Bereich von 1 MHz bis 6 MHz liegen und besonders bevorzugt 2,3 MHz betragen. Die zweite Frequenz kann vorteilhaft im Bereich von 6 MHz bis 15 MHz liegen und bevorzugt 10,1 MHz betragen.

[0026] Eine Messung der elektrischen Impedanz mit der Durchflusszytometrie in diesen Frequenzbereichen führt zu besonders zuverlässigen und genauen Ergebnissen.

[0027] Besonders vorteilhaft ist eine Differenzierung der Arten von Blutkörperchen, die durch den Sensor durchgeleitet werden, weiterhin in Abhängigkeit des Betrages der elektrischen Impedanz oder Impedanzänderung, die bei einer Frequenz gemessen wurde. Der Betrag der elektrischen Impedanzänderung ist dabei proportional zu der Differenz des Betrages der elektrischen Impedanz der Blutprobe mit Blutkörperchen zu dem Betrag der elektrischen Impedanz des Vergleichsmediums bzw. der Blutprobe ohne Blutkörperchen, die in Wechselspannungsfeldern mit derselben Frequenz gemessen werden.

[0028] Dabei ist es vorteilhaft, wenn die Impedanz des Vergleichsmediums in einem zweiten Sensor gleichzeitig bzw. unmittelbar danach mit der Messung der elektrischen Impedanz der Blutprobe bestimmt wird. Grundsätzlich ist aber auch für alle vorgenannten Ausführungsformen denkbar, dass mit demselben zur Messung der elektrischen Impedanz der Blutprobe vorgesehenen Sensor vor der Messung der elektrischen Impedanz der Blutprobe oder nach dieser Messung ein Vergleichsmedium durch diesen Sensor geleitet wird, um die elektrische Impedanz des Vergleichsmediums zu bestimmen.

[0029] Als Vergleichsmedium eignet sich vorteilhaft die hämolysefreie Blutprobe selbst, wenn diese durch Verdünnung so eingestellt ist, dass der Abstand zweier Blutkörperchen statistisch immer größer als der Abstand von zwei hintereinander liegenden Sensorbereichen ist. Wenn sich nun in einem ersten Sensorbereich die Impedanz durch die Anwesenheit eines Blutkörperchens ändert kann die Differenz zu dem Impedanzwert im zweiten Sensor gebildet werden, der statistisch die Impedanz derselben Blutprobe ohne Blutkörperchen wiedergibt. Eine solche Differenzmessung wird insbesondere mit mikrostrukturierten durchflusszytometrischen Sensoren ermöglicht. Diese können in Platin ausgeführte planare Elektroden haben, die senkrecht zur Durchflussrichtung angebracht sind und typischerweise einen Kondensatorplattenabstand von im Bereich von etwa 30 µm bis 10 µm und bevorzugt von etwa 15 µm +/- 5 µm aufweisen.

[0030] Als Vergleichsmedium kann aber unter Umständen auch ein verdünntes Standard-Blutserum oder die zur Verdünnung der Blutprobe genutzte wässrige Lösung eingesetzt werden. Da das Vergleichsmedium in der Regel eine gleichbleibende Eigenschaft hat, ändert sich mit dem Vergleichsmedium gemessene elektrische Impedanzwert und dessen Imaginär- und Realteil bei den mindestens zwei Frequenzen über die Zeit nicht bzw. kann als kon-

stanter Vergleichswert berücksichtigt werden. Dieser konstante Vergleichswert kann durch Mittelwertbildung umfassend die Option der Bestimmung des Medians bestimmt werden.

[0031] Eine Bestimmung der Menge kleinvolumiger Blutkörperchen, welche die Art der Thrombozyten umfassen, gelingt besonders vorteilhaft, wenn als charakteristisches Maß das auf die relative elektrische Impedanz bei der zweiten Frequenz bezogene Verhältnis des Imaginärteils der Impedanz oder Impedanzänderung bei der ersten Frequenz zu dem Realteil der Impedanz oder Impedanzänderung bei der ersten Frequenz herangezogen wird. Das Verhältnis des Imaginärteils der Impedanz zum Realteil der Impedanz wird somit auf die relative elektrische Impedanz bei der ersten Frequenz, d.h. auf den Betrag der Impedanz bzw. Impedanzänderung aufgetragen. Damit gelingt es, die kleinvolumigen Blutkörperchen charakterisierenden Messwerte schärfer von Rauschanteilen zu trennen.

[0032] Eine Bestimmung der Menge großvolumiger Blutkörperchen, welche die Art der roten Blutkörperchen und der Leukozyten mit ihren Subpopulation der Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten umfassen, gelingt besonders vorteilhaft, wenn das Verhältnis des Imaginärteils der Impedanz oder Impedanzänderung bei der zweiten Frequenz zu dem Realteil der Impedanz oder Impedanzänderung bei der ersten Frequenz auf die relative elektrische Impedanz bei der zweiten Frequenz bezogen wird. Hierbei wird somit das Verhältnis des Imaginärteils zum Realteil der Impedanz oder Impedanzänderung bei den unterschiedlichen Frequenzen auf die relative elektrische Impedanz bei der zweiten Frequenz aufgetragen. Dies führt zur charakteristischen Wertebereichen, bei den sich die Subpopulationen der Arten von roten Blutkörperchen und die Erythrozyten selbst sehr gut voneinander unterscheiden lassen.

[0033] Die Messvorrichtung ist zur Durchführung des vorbeschriebenen Verfahrens eingerichtet. Hierzu kann die Auswerteeinheit beispielsweise eine programmierbare Recheneinheit sein, die geeignet programmiert ist.

[0034] Die Erfindung wird nachfolgend anhand eines Ausführungsbeispiels mit den beigefügten Zeichnungen näher erläutert.

[0035] Es zeigen:

Fig. 1 - Blockdiagramm einer Messvorrichtung zur Bestimmung von Blutkörperchen in einer Blutprobe;

Fig. 2 - Skizze eines Ausschnitts eines Sensorbereichs der Messvorrichtung aus **Fig. 1**;

Fig. 3 - beispielhaftes Diagramm des Verhältnisses des Imaginärteils der elektrischen Impe-

danz bei der zweiten Frequenz zum Realteil der elektrischen Impedanz bei der ersten Frequenz über den relativen Impedanzbetrag bei der ersten Frequenz;

Fig. 4 - beispielhaftes Diagramm des Verhältnisses des Imaginärteils der elektrischen Impedanz bei der zweiten Frequenz zum Realteil der elektrischen Impedanz bei der ersten Frequenz über den relativen Impedanzbetrag bei der zweiten Frequenz;

Fig. 5 - Ausschnittsdarstellung des Bereichs der Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten aus dem Diagramm aus **Fig. 4**;

Fig. 6 - Ausschnittsdarstellung eines Diagramms der Opazität über den relativen Impedanzbetrag bei der zweiten Frequenz mit dem Bereich der Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten im Vergleich zur Auswertung nach **Fig. 5**.

[0036] **Fig. 1** lässt eine Skizze einer Messvorrichtung **1** zur Bestimmung von Blutkörperchen **2** in einem durchflusszytometrischen Sensor **3** erkennen. Es wird deutlich, dass die Blutprobe in Pfeilrichtung durch einen mikrostrukturierten Kanal **4** geleitet wird. In dem mikrostrukturierten Kanal **4** sind mit einem Abstand voneinander zwei Sensoren **5a**, **5b** eingebracht, die zwei in einem Abstand in einem Bereich von etwa 30 µm bis 10 µm und bevorzugt von 15µm +/- 5 µm in dem Kanal **4** voneinander platzierte Elektroden **6** haben, zwischen denen mit Hilfe eines Wechselstromgenerators/Wechselspannungsgenerators **7** ein Wechselspannungsfeld **8** aufgebaut wird. Eine der Elektroden **6** eines Sensors **5a**, **5b** ist mit dem Wechselstromgenerator **7** und die gegenüberliegende Elektrode **6** mit jeweils einem Verstärker **9a**, **9b** verbunden. Die Ausgänge der beiden Verstärker **9a**, **9b** werden dem Eingang eines Differenzverstärkers **10** zugeführt, in dessen Ausgang eine Auswerteeinheit **11** angeschlossen ist. Die Auswerteeinheit **11** kann bspw. eine programmierbare Recheneinheit sein. Die Auswerteeinheit **11** kann einen Analog-Digital-Wandler haben. Denkbar ist aber auch, dass zwischen dem Ausgang des Differenzverstärkers **10** und der Auswerteeinheit **11** ein separater Analog-Digital-Wandler eingeschaltet ist. Die Auswerteeinheit **11** kann auch einen weiteren Mehrfrequenz-zwei Phasen-Lock-in Verstärker haben, der ein Wechselspannungssignal AC bspw. in Form eines Sinussignals auf die Elektrodenplatten **6** direkt beaufschlagt oder ein Synchronisationssignal S zur Synchronisation des Wechselstromgenerators **7** zur Erzeugung eines Wechselspannungsfeldes **8** erzeugt.

[0037] Deutlich wird, dass die hämolysfreie Blutprobe durch Verdünnung so auf den Abstand der beiden Sensoren **5a**, **5b** eingestellt ist, dass statistisch immer nur ein Blutkörperchen **2** in der Blutprobe nur in einem der beiden hintereinander geschalteten Sensoren **5a**, **5b** vorhanden ist. Damit wird durch die

Differenzbildung mit dem Differenzverstärker **10** die durch das Blutkörperchen **2** im Sensor **5a/5b** verursachte Impedanzänderung erfasst und am Ausgang des Differenzverstärkers **10** ausgegeben. Die Auswerteeinheit **11** ist nun in Hardware oder durch geeignete Programmierung als FPGA, ASIC oder Mikrocontroller so eingerichtet, dass diese nicht nur den Betrag der elektrischen Impedanz der Sensoren **5a**, **5b** sondern auch den Realteil der Impedanz und den Imaginärteil der Impedanz erfasst.

[0038] Die Messvorrichtung **1** ist weiterhin so eingerichtet, dass die Sensoren **5a**, **5b** die Impedanz desselben Volumenteils einer Blutprobe mit mindestens zwei unterschiedlichen Frequenzen bestimmt.

[0039] Für die erste Frequenz wird dabei vorzugsweise eine Frequenz im Bereich von 1 MHz bis 6 MHz ausgewählt. Die erste Frequenz liegt besonders bevorzugt bei 2,3 MHz.

[0040] Für die zweite Frequenz wird eine Frequenz im Bereich von 6 MHz bis 15 MHz ausgewählt. Sie liegt bevorzugt bei 10,1 MHz.

[0041] **Fig. 2** lässt eine Skizze eines Ausschnitts des Sensorbereichs eines Sensors **5a/5b** erkennen. Die Elektroden **6** des Sensors sind vorzugsweise aus Platin auf ein mikrostrukturiertes Substrat aufgebracht. In das Substrat ist der Kanal **4** eingebracht, durch welchen die Blutprobe in Pfeilrichtung durchgeleitet wird. Die Elektroden **6** kreuzen den Kanal und sind wie dargestellt als planare Elektroden senkrecht zur Flussrichtung ausgerichtet. Sie haben einen Abstand von etwa 30 μm bis 10 μm und bevorzugt bei etwa 15 μm +/- 5 μm voneinander.

[0042] **Fig. 3** lässt ein Diagramm eines beispielhaften Messergebnisses mit der Messvorrichtung **1** aus **Fig. 1** nach Durchleiten einer hämolysefreien Blutprobe erkennen. Die erste Frequenz beträgt dabei 2,3 MHz und die zweite Frequenz 10,1 MHz. In dem Diagramm ist das Verhältnis des Imaginärteils $\text{Im}(Z_2)$ der elektrischen Impedanz bei der zweiten Frequenz zum Realteil $\text{Re}(Z_1)$ der elektrischen Impedanz bei der ersten Frequenz über den Betrag der relativen elektrischen Impedanz $|Z_1|$ aufgetragen. Unter der relativen Impedanz wird dabei verstanden, dass diese nicht in Ohm kalibriert ist. Dasselbe gilt auch für den Imaginärteil und Realteil der elektrischen Impedanz, wobei dort aufgrund des Quotienten eine Kalibrierung in eine Si-Messeinheit noch unerheblicher ist.

[0043] Deutlich wird, dass eine Differenzierung der einzelnen Arten von Blutkörperchen bei relativ scharfer Trennung vom Rauschen (Noise) möglich wird. Die Thrombozyten Plt („Platelets“) nehmen dabei ein relativ großes Feld neben dem Rauschbereich ein. Sie sind aber relativ scharf von diesem Rauschteil sowie von den angrenzenden roten Blutkörperchen

RBC und den Leukozyten mit ihren Subpopulationen der Lymphozyten Ly, Monozyten M und Granulozyten Gn getrennt.

[0044] Wenn nun wie in **Fig. 4** das Verhältnis des Imaginärteils der elektrischen Impedanz bei der zweiten Frequenz zum Realteil der elektrischen Impedanz bei der ersten Frequenz ($\text{Im}(Z_2) / \text{Re}(Z_1)$) über den Betrag der relativen elektrischen Impedanz $|Z_2|$ bei der zweiten Frequenz aufgetragen wird, dann sind die Thrombozyten Plt nicht mehr so scharf vom Rauschsignal Noise getrennt. Zudem sind auch die roten Blutkörperchen, d.h. die Erythrozyten RBC und die Subpopulation der Leukozyten schärfer voneinander getrennt.

[0045] Dies wird aus **Fig. 5** deutlicher, die einen Ausschnitt aus dem Diagramm aus **Fig. 4** im Bereich der Subpopulation der Leukozyten zeigt. Erkennbar wird, dass die statistische Verteilung der Zellereignisse für die Lymphozyten Ly, die Monozyten M und die Granulozyten Gn ausreichend differenziert voneinander in charakteristischen Wertebereichen zu finden sind.

[0046] **Fig. 6** zeigt für dieselben Messergebnisse eine Auswertung der Opazität über den Betrag der relativen Impedanz bei der zweiten Frequenz. Die Opazität ist das Verhältnis des Betrages der Impedanz bei der zweiten Frequenz zum Betrag der Impedanz bei der ersten Frequenz. Deutlich wird, dass durch die Opazität insbesondere die Monozyten M und Granulozyten Gn ineinander übergehen und auch der Abstand zu den Lymphozyten Ly nicht mehr so scharf ist. Damit wird deutlich, dass durch die Bestimmung der Arten der Blutkörperchen zur Ermittlung der jeweiligen Konzentration in der Blutprobe oder zur Differenzierung für einen anderen Zweck eine Auswertung in Abhängigkeit von dem Verhältnis des Imaginärteils der elektrischen Impedanz bei der zweiten Frequenz zum Realteil der elektrischen Impedanz bei der ersten Frequenz zu besseren Ergebnissen führt.

[0047] Mit einer solchen elektrischen Durchflusssytometrie ohne Durchführung einer vorhergehenden Hämolysen kann somit eine Konzentrationsbestimmung erfolgen. Bei dem AC-Impedanz Zählverfahren erzeugen die Blutkörperchen bzw. Zellen der Blutprobe beim Durchtritt durch die Elektrodenpaare Impedanzänderungen, die proportional zum Volumen der Zellen, zur Kapazität ihrer Membran und zur Leitfähigkeit des Zytoplasmas ist. Ihre jeweiligen Beträge sind abhängig von der gewählten Frequenz. Das Verhältnis $\text{Im}(Z_2) / \text{Re}(Z_1)$ aus dem Imaginärteil der Impedanz (Z_2) bei geeigneter zweiter Frequenz f_2 und dem Realteil der Impedanz Z_1 bei der ersten Frequenz f_1 ist proportional zur Kapazität der Zelle des Blutkörperchens pro Volumeneinheit. Diese Messgrößen oder Parameter dienen dann als Grundlage zur Differenzierung der verschiedenen Zellpopulationen.

[0048] Zur Verbesserung des Signal-zu-Rauschverhältnisses und der Auflösung des Sensors **5a, 5b** werden wie in **Fig. 1** dargestellt zwei Elektrodenpaare **6** zur differentiellen Messung implementiert. Bei dem Durchgang der Blutkörperchen durch diese beiden Messzonen der Sensoren **5a, 5b** wird die isotone Lösung, in der sich die Blutzellen befinden, einmal mit und einmal ohne Zelle gemessen. Die Differenz beider Signale enthält damit ausschließlich den Betrag zur Impedanzänderung, die durch die Zelle, d.h. das Blutkörperchen hervorgerufen wird.

[0049] Da Erythrozyten den überwiegenden Teil der Blutzellen darstellen und mit einem Durchmesser von $7,5 \mu\text{m}$ wesentlich größer als Thrombozyten mit einem Durchmesser im Bereich 1 bis $3 \mu\text{m}$ sind, ist eine Differenzierung ausschließlich mit der elektrischen Impedanzmessung an sich sehr schwierig. Auch die Leukozyten haben mit einer Größe von etwa 8 bis $15 \mu\text{m}$ eine mit den Erythrozyten vergleichbare Größe.

[0050] Nunmehr wird ohne eine zur Zerstörung der Erythrozyten führende Hämolyse und ohne eine immunologische Färbung von weißen Blutzellen mit fluoreszenzmarkieren (monoklonalen) Antikörpern eine Differenzierung mit einer elektrischen AC-Durchflussszytometrie möglich, wenn diese in dem genannten Frequenzbereich der beiden Frequenzen und/oder mit Hilfe des Verhältnisses $\text{Im}(Z_2) / \text{Re}(Z_1)$ durchgeführt wird.

[0051] Durch den Frequenzbereich von 6 MHz bis 15 MHz gelingt eine verbesserte Differenzierung der weißen Blutkörperchen (Leukozyten) zu den roten Blutkörperchen (Erythrozyten). Dieser Frequenzbereich ist zur Differenzierung der großvolumigen Blutkörper geeignet. Mit Hilfe des Frequenzbereichs von 1 MHz bis 6 MHz gelingt eine Trennung der kleinvolumigen Blutkörper, wie Thrombozyten.

[0052] Durch das Verhältnis des Imaginärteils zum Realteil wird die durch die Kapazität des jeweiligen Blutkörpers verursachte Impedanzänderung auf die durch das Volumen des jeweiligen Blutkörpers verursachte Impedanzänderung bezogen. Bei der Auswertung der Impedanzwerte wird vorzugsweise zunächst eine Pulshöhenanalyse durchgeführt, bei der die Maximalwerte bzw. je nach Polrichtung die Minimalwerte als relevante Impedanzänderungsereignisse herangezogen werden, um für diese Ereignisse die Impedanzen und Impedanzverhältnisse zu berechnen.

[0053] Zur Präparation der Blutprobe wird diese mit einer wässrigen Lösung geeignet verdünnt, um die Zählraten der Zellen an die elektronischen Baugruppen und die Datenerfassung anzupassen. Dabei sind Zählraten von 1 bis 10 kHz typisch.

[0054] Weiterhin kann eine Kalibrierung der Identifikation von Blutpartikeln mittels eines AC-Frequenz-

scans im Bereich von 300 kHz bis 100 MHz für das Blut einer Spezies und einem weiteren, unabhängigen Verfahren durchgeführt werden. Damit ergibt sich für eine rein auf der oben beschriebenen durchflussszytometrischen AC-Methode beruhende, mittels geeignet abgeleiteter Impedanzwerte hinreichend genaue Identifikation und Zählung der Blutkörperchen. Eine solche Kalibrierung kann mit Hilfe der zweidimensionalen Darstellung entsprechend der **Fig. 3** bis **Fig. 5** vorgenommen werden.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Bestimmung von Blutkörperchen (2) in einer Blutprobe im Durchfluss mit einem Sensor (5a, 5b) zur Messung der elektrischen Impedanz, **gekennzeichnet durch:**

- Durchleiten der hämolysefreien Blutprobe mit darin enthaltenen Blutkörperchen (2) durch ein Wechselspannungsfeld (8) des Sensors (5a, 5b),
- Messen der elektrischen Impedanz der einzelnen Blutkörperchen (2) in der Blutprobe mit dem Sensor (5a, 5b), wobei die elektrische Impedanz mit mindestens zwei unterschiedlichen Messfrequenzen des Wechselspannungsfeldes (8) gemessen wird, und
- Bestimmen der Arten der im Wechselspannungsfeld (8) des Sensors (5a, 5b) befindlichen Blutkörperchen (2) in Abhängigkeit von dem Verhältnis des Imaginärteils der Impedanz bei einer zweiten Frequenz ($\text{Im}(Z_2)$) zu dem Realteil der Impedanz bei einer ersten Frequenz ($\text{Re}(Z_1)$), die von der zweiten Frequenz unterschiedlich ist.

2. Verfahren zur Bestimmung von Blutkörperchen (2) in einer Blutprobe im Durchfluss mit einem Sensor (5a, 5b) zur Messung der elektrischen Impedanz, **gekennzeichnet durch:**

- Durchleiten der hämolysefreien Blutprobe mit darin enthaltenen Blutkörperchen (2) durch ein Wechselspannungsfeld (8) des Sensors (5a, 5b),
- Messen der elektrischen Impedanz der einzelnen Blutkörperchen in der Blutprobe mit dem Sensor (5a, 5b), wobei die elektrische Impedanz mit mindestens zwei unterschiedlichen Messfrequenzen des Wechselspannungsfeldes (8) gemessen wird, und
- Bestimmen der Arten der im Wechselspannungsfeld (8) des Sensors (5a, 5b) befindlichen Blutkörperchen (2) in Abhängigkeit einer Korrelation der mit einer ersten Frequenz ($\text{Re}(Z_1)$) im Bereich von 1 MHz bis 6 MHz und mit einer zweiten Frequenz ($\text{Im}(Z_2)$) im Bereich von 6 MHz bis 15 MHz gemessenen elektrischen Impedanz desselben Volumenbereichs der Blutprobe.

3. Verfahren nach Anspruch 2, **gekennzeichnet durch:**

- Zählen von Impedanzänderungs-Ereignissen, bei denen die Impedanzänderung oder das Verhältnis des Imaginärteils der Impedanz bei der ersten Frequenz zu dem Realteil der Impedanz bei der zwei-

ten Frequenz einen vorgegebenen Schwellwert überschreitet, und

- Bestimmen der Anzahl von Arten (Untergruppen) von Blutkörperchen (2) und der Anzahl von Impedanzänderungs-Ereignissen zur Ableitung der relativen Konzentrationen der jeweiligen Arten (Untergruppen).

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **gekennzeichnet durch**:

- Durchleiten der hämolysfreien Blutprobe mit darin enthaltenen Blutkörperchen (2) durch ein Wechselfeld (8) eines ersten Sensors (5a) und
 - Durchleiten eines Vergleichsmediums durch ein Wechselfeld (8) eines zweiten Sensors (5b),
 - Bestimmen der Impedanzdifferenz zwischen der mit dem ersten und zweiten Sensor (5a, 5b) gleichzeitig gemessenen elektrischen Impedanz ($\text{Im}(Z_1)$, $\text{Re}(Z_1)$, $\text{Im}(Z_2)$, $\text{Re}(Z_2)$, $|Z_1|$, $|Z_2|$) und
 - Bestimmen der Arten der im Wechselfeld (8) des ersten Sensors (5a) befindlichen Blutkörperchen (2) in Abhängigkeit von dem Verhältnis des Imaginärteils der Impedanzdifferenz bei der ersten Frequenz zu dem Realteil der Impedanzdifferenz bei der zweiten Frequenz.

5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **gekennzeichnet durch** Verdünnen der hämolysfreien Blutprobe mit einer wässrigen Lösung ohne Durchführung einer Hämolysse vor dem Durchleiten durch den mindestens einen Sensor (5a, 5b).

6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass die erste Frequenz zum Messen der elektrischen Impedanz kleiner als die zweite Frequenz ist.

7. Verfahren nach Anspruch 6, **dadurch gekennzeichnet**, dass die erste Frequenz im Bereich von 1 MHz bis 6 MHz liegt.

8. Verfahren nach Anspruch 6 oder 7, **dadurch gekennzeichnet**, dass die zweite Frequenz im Bereich von 6 MHz bis 15 MHz liegt.

9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Zählrate der Blutkörperchen (2) durch den Sensor (5a, 5b) im Bereich von 1 kHz bis 10 kHz liegt.

10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **gekennzeichnet durch** Differenzierung der Arten von Blutkörperchen (2), die durch den Sensor (5a, 5b) durchgeleitet werden, in Abhängigkeit des Betrages der elektrischen Impedanz bei einer Frequenz, wobei der Betrag der elektrischen Impedanz proportional zu der Differenz der elektrischen Impedanz der Blutprobe zu der elektrischen Impedanz des

Vergleichsmediums ist, die in Wechselfeldern (8) mit derselben Frequenz gemessen werden.

11. Verfahren nach Anspruch 10, **gekennzeichnet durch** Bestimmen der Menge großvolumiger Blutkörperchen (2), welche die Art der Thrombozyten (Plt) umfassen, aus dem auf den Betrag der elektrischen Impedanz (Z_1) bei der ersten Frequenz bezogenen Verhältnisses des Imaginärteils der Impedanz oder Impedanzänderung bei der zweiten Frequenz zu dem Realteil der Impedanz oder Impedanzänderung bei der ersten Frequenz.

12. Verfahren nach Anspruch 10 oder 11, **gekennzeichnet durch** Bestimmen der Menge großvolumiger Blutkörperchen (2), welche die Art der roten Blutkörperchen (RBC) und die Leukozyten mit ihren Subpopulationen der Granulozyten (Gn), Monozyten (M) und Lymphozyten (Ly) umfassen, aus dem auf den Betrag der elektrischen Impedanz (Z_2) oder Impedanzänderung (ΔZ_2 ; ΔZ_1) bei der zweiten Frequenz bezogenen Verhältnis des Imaginärteils der Impedanz oder Impedanzänderung bei der zweiten Frequenz zu dem Realteil der Impedanz oder Impedanzänderung bei der ersten Frequenz.

13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **gekennzeichnet durch** Ermitteln des Realteils der Impedanz oder Impedanzänderung ($\text{Re}(Z_1)$; $\text{Re}(\Delta Z_1)$) bei der ersten Frequenz als Betrag der Impedanz oder Impedanzänderung ($|Z_1|$; ΔZ_1) bei der ersten Frequenz, wenn der Imaginärteil ($\text{Im}(Z_1)$) im Vergleich zum Realteil ($\text{Re}(Z_1)$) bei der ersten Frequenz vernachlässigbar klein ist.

14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **gekennzeichnet durch** Ermitteln des Imaginärteils der Impedanz oder Impedanzänderung ($\text{Im}(Z_2)$; $\text{Im}(\Delta Z_2)$) bei der zweiten Frequenz als Betrag der Impedanz oder Impedanzänderung ($|Z_2|$; ΔZ_2) bei der zweiten Frequenz, wenn der Realteil ($\text{Re}(Z_2)$) im Vergleich zum Imaginärteil ($\text{Im}(Z_2)$) bei der zweiten Frequenz vernachlässigbar klein ist.

15. Messvorrichtung (1) zur Bestimmung von Blutkörperchen (2) in einer Blutprobe im Durchfluss mit dem Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Messvorrichtung (1) mindestens einen Sensor (5a, 5b) zur Messung der elektrischen Impedanz (Z) einer durch den Sensor (5a, 5b) geleiteten Blutprobe mit einem Wechselfeld (8) und eine Auswerteeinheit (11) hat, die mit dem mindestens einen Sensor (5a, 5b) verbunden und zur Bestimmung der Arten der im Wechselfeld (8) des Sensors (5a, 5b) befindlichen Blutkörperchen (2) in Abhängigkeit von dem Verhältnis des Imaginärteils der Impedanz bei einer zweiten Frequenz zu dem Realteil der Impedanz bei einer ersten Frequenz, die von der zweiten Frequenz unterschiedlich ist, eingerichtet ist.

16. Messvorrichtung (1) nach Anspruch 15, **gekennzeichnet durch** einen ersten Sensor (5a) zum Durchleiten der hämolysefreien Blutprobe und einem zweiten Sensor (5b) zum Durchleiten eines Vergleichsmediums, wobei die Auswerteeinheit (11) zur Bestimmung der Impedanzdifferenz (ΔZ) zwischen dem mit dem ersten und zweiten Sensor (5a, 5b) gleichzeitig gemessenen elektrischen Impedanzen (Z) und Bestimmen der Arten der im Wechselspannungsfeld (8) des ersten Sensors (5a) befindlichen Blutkörperchen (2) in Abhängigkeit von dem Verhältnis des Imaginärteils der Impedanzdifferenz bei der ersten Frequenz zu dem Realteil der Impedanzdifferenz bei der zweiten Frequenz eingerichtet ist.

17. Messvorrichtung (1) nach Anspruch 16, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Auswerteeinheit (11) zur Differenzierung der Arten von Blutkörperchen (2), die durch den Sensor (5a, 5b) durchgeleitet werden, in Abhängigkeit des Betrages der elektrischen Impedanz (Z) bei einer Frequenz eingerichtet ist.

Es folgen 4 Seiten Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

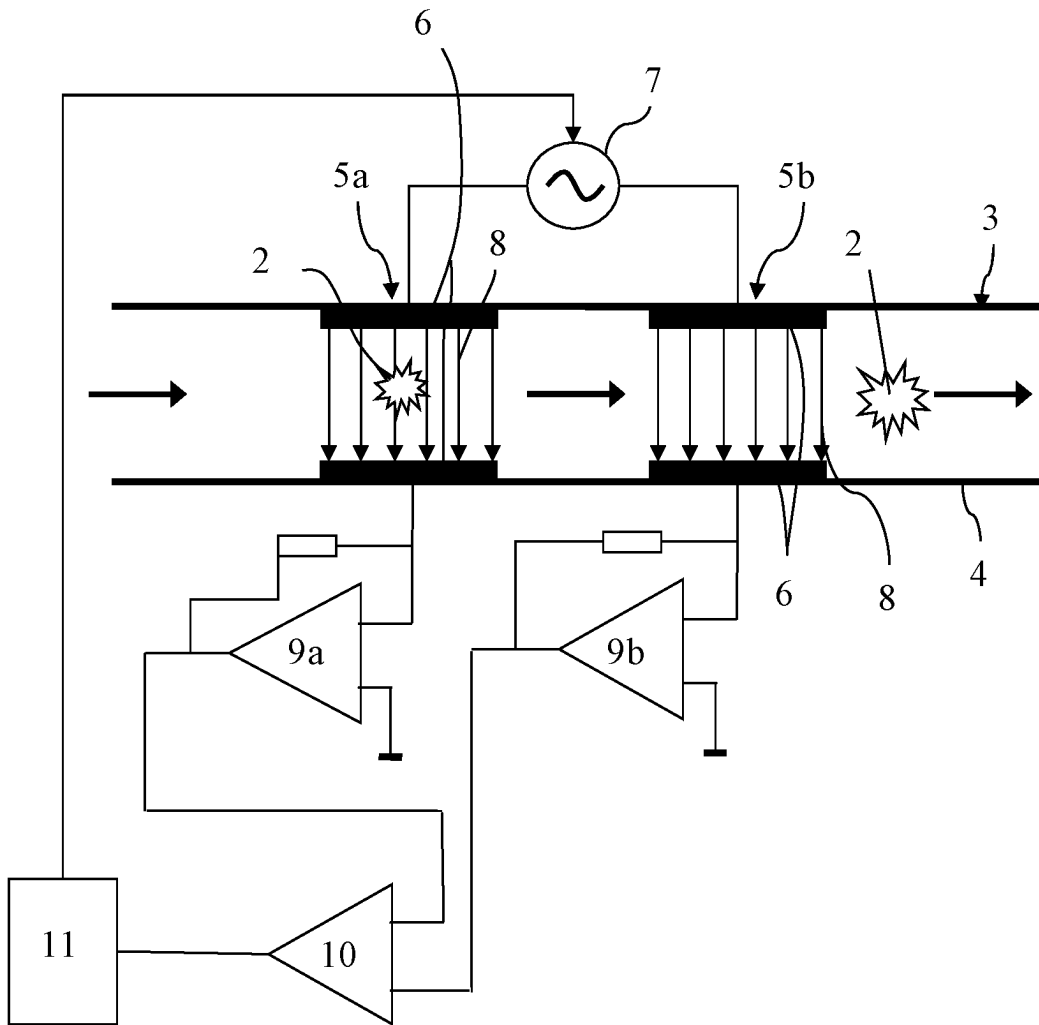


Fig. 1

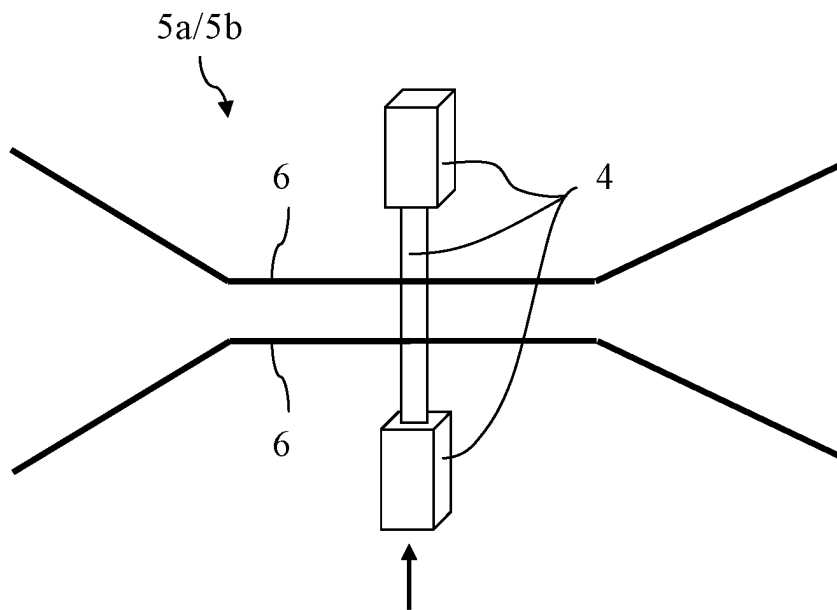


Fig. 2

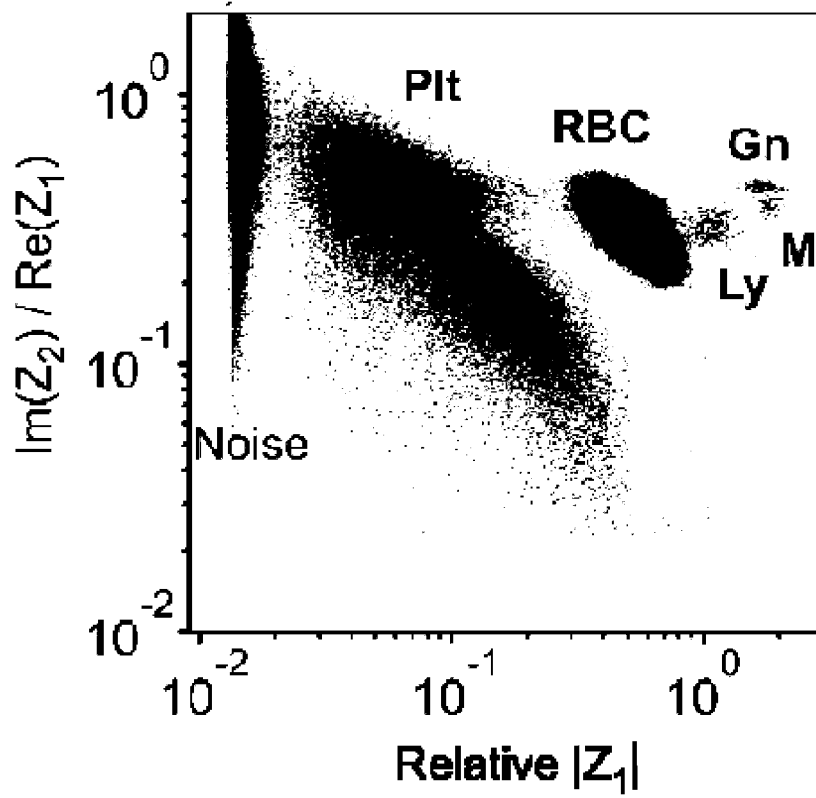


Fig. 3

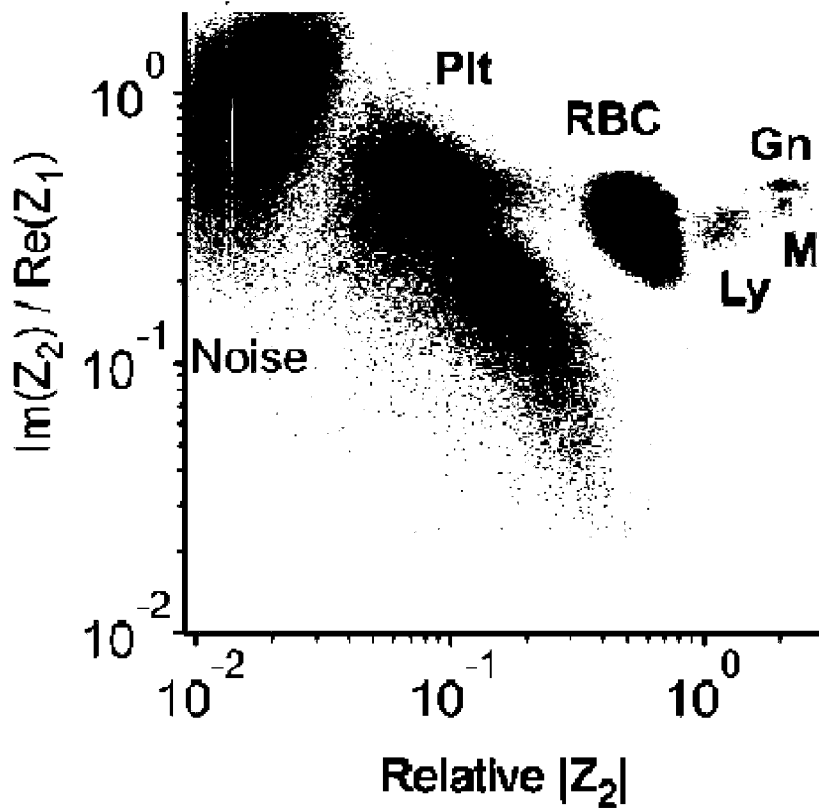


Fig. 4

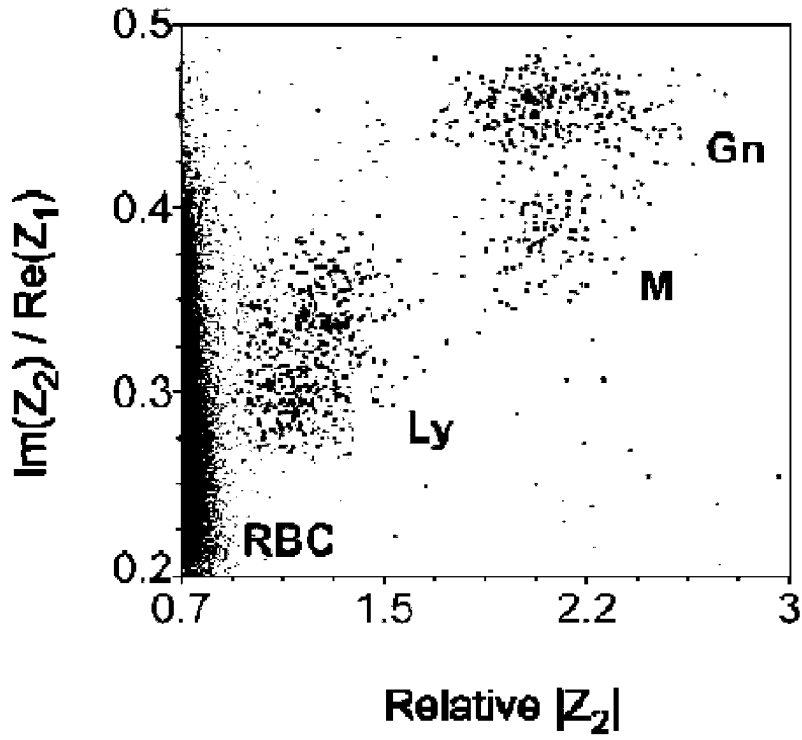


Fig. 5

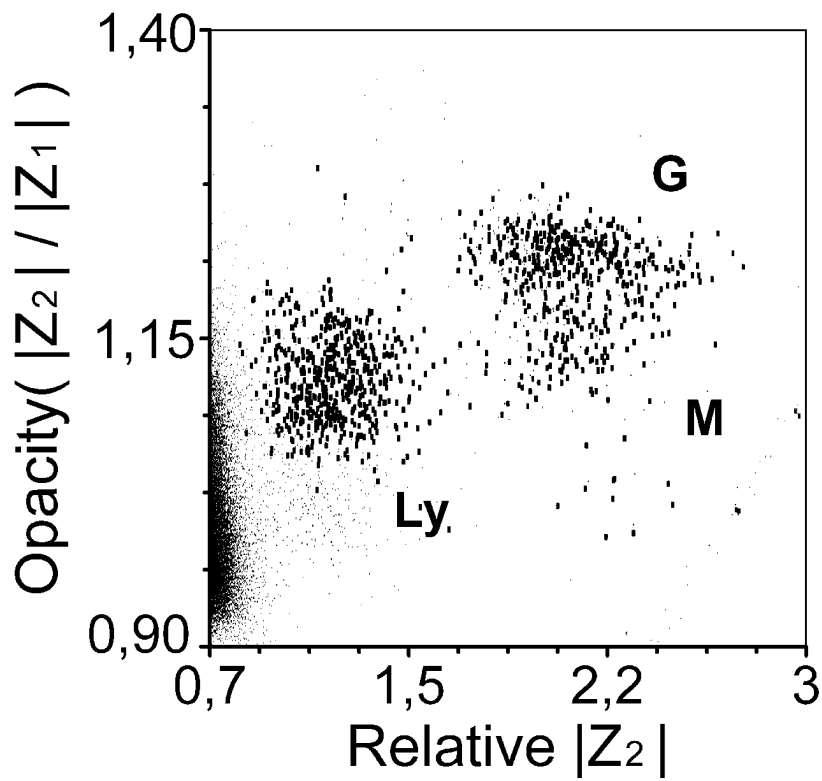


Fig. 6