

Diagnostik mit dem Dunkelfeldmikroskop

Teil 1: Grundlagen der mikroskopischen Abbildung

Was macht ein für die Diagnostik geeignetes Dunkelfeldmikroskop aus? Diese Artikelreihe soll Anwendern von Dunkelfeldmikroskopen einen Leitfaden zum Verständnis der dem Gerät zugrunde liegenden optischen Prinzipien geben und den Heilpraktikern, die die Anschaffung eines solchen Mikroskops in Erwägung ziehen, Hilfestellung bei der Kaufentscheidung geben.

Welche Parameter sind entscheidend? Kaum ein anderer Mikroskoptyp wird in seinen optischen Spezifikationen derart ausgereizt wie das Dunkelfeldmikroskop zur Nativblut-Analyse. Der erfahrene Diagnostiker erwartet hohe Vergrößerung und Auflösung, einen hohen Kontrast und leichte Bedienbarkeit. Gleichzeitig muss er neben Gestalt, Anzahl und Anordnung der Blutzellen Strukturen im Blutplasma erkennen und identifizieren, um eine möglichst umfassende Diagnose stellen zu können.

Aber keine Angst: Die Darstellungen werden sich auf ein Mindestmaß an physikalisch-optischen Formalismen beschränken. Zunächst werden diejenigen Parameter erklärt, die für die Abbildungsleistung eines Mikroskops grundsätzlich entscheidend sind. Im 2. Teil werden die Besonderheiten der Dunkelfeldmikroskopie erläutert und erreichbare Abbildungsleistungen anhand von Beispielen demonstriert.

Ein Mikroskop ist ein optisches Gerät, das mit extrem hohen Vergrößerungen mikroskopisch kleine Gegenstände für das Auge beobachtbar macht. Die Abbildung erfolgt zweistufig über das Mikroskopobjektiv und das Okular: Das Objektiv entwirft im ersten Schritt ein reelles Bild des Objektes. Die Mikroskopoptiken sind nach international gültigen Normen so konstruiert, dass sich dieses Zwischenbild in einer Ebene 10 mm unterhalb des oberen Randes der Okularstutzen befindet. Mit einer Mattscheibe in dieser Ebene könnte das Zwischenbild sichtbar gemacht werden. Sein Durchmesser beträgt z.B. 18 mm und wird als Sehfeldzahl bezeichnet.

Das Zwischenbild wird dann mit dem Okular wie mit einer Lupe weiter vergrößert und mit dem Auge betrachtet. Die Gesamtvergrößerung M_{ges} des Mikroskops ergibt sich damit als das Produkt aus Objektivvergrößerung M_{obj} und Okularvergrößerung M_{ok} :

$$M_{\text{ges}} = M_{\text{obj}} \cdot M_{\text{ok}}$$

Beispiel:

Mit einem 10x-Okular entsteht mit einem 40x-Objektiv eine Gesamtvergrößerung von $10 \cdot 40 = 400$.

Über die Vergrößerung hinaus ist die numerische Apertur (NA) der entscheidende Parameter für die Qualität einer mikroskopischen Abbildung. Die numerische Apertur beschreibt zunächst das Lichtsammelvermögen des Objektivs, denn der zugehörige Formel Ausdruck enthält den (halben) Öffnungswinkel des Lichtkegels, den das Objektiv aufnehmen kann. (Abb. 1)

$$NA = n \cdot \sin \alpha$$

n steht für den Brechungsindex des Mediums zwischen Präparat und Objektiv. Da der Sinus höchstens 1 werden kann, ist für Luft ($n=1$) der Höchstwert der NA ebenfalls 1. Er wird allerdings nicht erreicht, da dann die Randstrahlen des Lichtkegels senkrecht zur optischen Achse verlaufen ($\alpha=90^\circ$).

Beispiel:

Befindet sich Luft zwischen Objektiv und Präparat, also $n=1$, und hat der Lichtkegel, den das Objektiv »sieht«, einen Öffnungswinkel von 60° , d.h. $\alpha=30^\circ$, dann ist $NA=0,5$.

Grundsätzlich gilt, dass um so mehr Licht aufgenommen werden kann, je größer die NA ist. Große numerische Aperturen bringen jedoch ein Problem mit sich: Wenn der Einfallswinkel der Lichtstrahlen in das Objektiv zu groß wird, kommt es für stark geneigte Randstrahlen an der Grenzfläche der ersten Linse zur Totalreflexion. Das Licht wird dann vollständig aus dem Strahlengang herausreflektiert, und diese Strahlen wären mikroskopisch

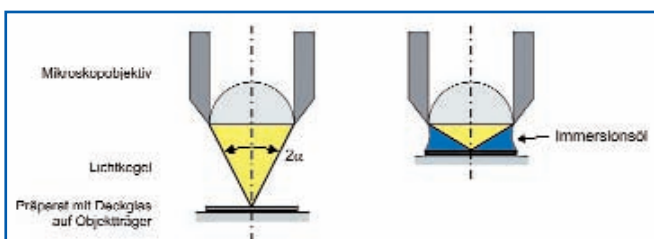


Abb. 1: Die numerische Apertur beschreibt den Lichtkegel, den das Objektiv aufnehmen kann. Nimmt sie zu (rechts), steigt das Auflösungsvermögen des Objektivs. Große numerische Aperturen erfordern den Einsatz von Immersionsöl.



Abb. 2: Planachromatische Objektivreihe

nicht nutzbar. Das kann dadurch verhindert werden, dass zwischen Objektiv und Präparat ein Medium mit einem Brechungsindex größer als 1 eingebracht wird. Damit ist der Brechungsindexsprung geringer, und die Randstrahlen können weiter in Richtung Okular laufen. Man spricht von einer Immersion des Objektivs, die gewöhnlich mit einem speziellen Öl mit einem Brechungsindex von $n = 1,5$ erfolgt.

Beispiel:

Befindet sich Immersionsöl zwischen Objektiv und Präparat ($n=1,5$) entspricht eine Objektivapertur $NA=1,25$ einem Winkel α von 56° , so dass der Öffnungswinkel des Lichtkegels 112° erreicht.

Wenn aber nun das mikroskopische Bild dadurch entstanden ist, dass ein größerer Lichtkegel durch das Objektiv aufgenommen wurde, muss es auch eine größere Bildinformation enthalten. Die Auflösung des Bildes steigt also ebenfalls mit der NA des Objektivs.

Hinzu kommt, dass die Eigenschaften des durch die Mikroskopbeleuchtung zur Verfügung gestellten Lichtes durch den Kondensor bestimmt werden. Da er ursächlich den Lichtkegel formt, aus dem das Objektiv einen Teil aufnimmt, wird auch seine numerische Apertur das Auflösungsvermögen des Mikroskops bestimmen.

Um noch einen Formelausdruck zu bemühen: Das Auflösungsvermögen wird charakterisiert durch den kleinsten Abstand Δx zweier Punkte, in dem sie noch aufgelöst, d.h. getrennt wahrgenommen werden können. Ist weiterhin λ die (mittlere) Wellenlänge des im Mikroskop verwendeten Lichts, dann gilt mit NA_{Obj} , der numerischen Apertur des Objektivs, und mit NA_{Kond} , der numerischen Apertur des Kondensors:

$$\Delta x = \lambda / (NA_{Obj} + NA_{Kond})$$

Das ist die berühmte Formel für das Auflösungsvermögen eines Mikroskops nach Ernst Abbe (1840-1905), durch die erst eine industrielle Fertigung von Mikroskopen gleichbleibender Qualität möglich geworden ist. Für den Kondensor gilt wie für das Objektiv, dass numerische Aperturen > 1 nur

mit einer Ölimmersion erreicht werden können.

Beispiel:

Bei Verwendung von (weißem) Halogenlampenlicht wird als mittlere Wellenlänge $\lambda = 0,55 \mu\text{m}$ angenommen. Mit einem 100x-Objektiv mit $NA_{Obj} = 1,25$ und mit einem (Dunkelfeld-) Kondensor mit $NA_{Kond} = 1,4$ wird $\Delta x = 0,21 \mu\text{m}$.

Vergrößerungen

Doch wie hängen diese Größen zusammen? Wäre es zum Beispiel möglich, mehr Details eines Objekts zu erkennen, wenn die Vergrößerung weiter gesteigert wird? Die Situation ist vergleichbar mit einem Fernsehgerät, dessen Bild aus einzelnen Bildelementen (Pixeln) zusammengesetzt ist. Aus einiger Entfernung können diese Strukturen nicht erkannt werden, und mit abnehmendem Abstand zum Fernsehschirm werden tatsächlich mehr Details sichtbar. Wird allerdings eine bestimmte Grenze unterschritten, fällt die Pixelstruktur deutlich auf, die bisher sichtbaren Details werden dann zwar größer, jedoch nicht zahlreicher. Für das Mikroskop bedeutet das, dass Vergrößerungen, die größer als die »förderliche« Vergrößerung sind, nicht mehr zu größerem Detailreichtum des Bildes führen: Sie werden als »leere« Vergrößerungen bezeichnet. Für den Bereich der förderlichen Vergrößerung eines Mikroskops gibt es eine Faustregel: Ist NA_{Obj} wieder die numerische Apertur des Objektivs, ist der Bereich der förderlichen Vergrößerung $M_{förd}$:

$$M_{förd} = (500 \dots 1000) \cdot NA_{Obj}$$

Beispiel:

Für ein 100x-Objektiv mit $NA_{Obj} = 1,25$ liegt die maximale förderliche Vergrößerung bei $1000 \cdot 1,25 = 1250$. Die maximale Vergrößerung der Okulare darf dann $1250/100 = 12,5$ nicht überschreiten, wenn der Bereich der förderlichen Vergrößerung nicht verlassen werden soll.

Immer wieder werden Mikroskope mit Gesamtvergrößerungen von bis zu 18000 angeboten. Dabei kann es sich nur um leere Vergrößerungen handeln,

die etwa dadurch zustandekommen, dass das Bild auf einem möglichst großen Monitor dargestellt wird.

Aufdrucke auf den Mikroskop-Objektiven

Die beschriebenen Parameter finden sich als Aufdruck auf den Mikroskop-Objektiven wieder. (**Abb. 2**)

Der erste Aufdruck bezeichnet den Korrektionszustand. Üblicherweise handelt es sich bei den Objektiven um Achromate, bei denen unerwünschte Farbfehler aufgrund der für rotes und blaues Licht unterschiedlichen Brechungsindizes, die chromatische Aberration, auskorrigiert sind. Wird zusätzlich noch eine dritte Wellenlänge im grünen Spektralbereich hinzugenommen, werden diese Objektive als »Aplanachromate« bezeichnet. Diese (sehr teuren) Objektive garantieren geringste Verfälschungen der Präparatfarben.

Der Aufdruck »Plan« bedeutet, dass zusätzlich zur chromatischen Korrektur die Bildfeldwölbung korrigiert ist. Bei Achromaten ist üblicherweise ein begrenzter Bereich um die Bildmitte herum scharf, während es zum Rand des Bildes hin allmählich unscharf wird.

Da man häufig ohnehin den interessanten Präparatausschnitt in die Mitte bewegt, reichen diese Objektive oft aus. Soll das Bild allerdings über seinen gesamten Durchmesser scharf sein, ist eine Korrektur durch zusätzliche optische Elemente notwendig, die zu den »Planachromaten« führt. Diese Objektive sind allgemein teurer als Achromate mit ansonsten gleichen optischen Parametern.

Daneben gibt es auch noch Semiplanachromate, bei denen der Durchmesser des scharfen Bildbereiches zwischen dem der Achromate und dem der Planachromate liegt.

Die folgende Zahl bezeichnet die Objektivvergrößerung. Sie ist zusätzlich durch einen farbigen Ring kodiert, dessen Farbe – genauso wie die gesamte Bedruckung des Objektivs – nach DIN ISO 8578 genormt ist. Die Zahl hinter dem Schrägstrich bezeichnet die NA.

In der Zeile darunter steht zunächst

die Tubuslänge, die – nach DIN ISO 9345-1 – 160 mm beträgt. Bei ihr handelt es sich um den Abstand zwischen der Anschraubfläche der Objektive am Objektivrevolver und der Anlagefläche des Okulars. DIN ISO 9345-2 beschreibt daneben Mikroskope mit der häufig erhältlichen Tubuslänge »unendlich« (Symbol ∞). Sie kommt dadurch zustande, dass die Lichtstrahlen das Objektiv (nahezu) parallel verlassen, so dass das Zwischenbild (fast) im Unendlichen liegt. Zur Betrachtung mit den Okularen muss das Zwischenbild allerdings wieder mit einer Tubuslinse aus dem Unendlichen zurückgeholt werden, damit überhaupt ein Zwischenbild entsteht.

Vorteil des parallelen Strahlenganges ist seine Unempfindlichkeit gegenüber weiteren, dort eingebrachten optischen Elementen, die optische Bildqualität ist aber prinzipiell mit der eines Mikroskops mit 160 mm Tubuslänge vergleichbar.

Die Zahlenangabe hinter der Tubuslänge ist die Deckglaskorrektur: Üblicherweise werden mikroskopische Präparate mit Deckgläsern mit einer Stärke von 0,17 mm abgedeckt. Diese Deckgläser müssen in den optischen Strahlengang eingerechnet werden, damit sich keine optischen Verzerrungen ergeben. Der Einfluss des Deckglases wird um so stärker, je größer die numerischen Aperturen werden, also je steiler die Lichtstrahlen durch das Präparat verlaufen. In der Regel kann davon ausgegangen werden, dass Objektive mit Vergrößerungen 4x und 10x auch ohne Deckglas verwendet werden können, für höhere Vergrößerungen werden für das Arbeiten ohne Deckglas spezielle Objektivkonstruktionen notwendig.



Verfasser:

Dr. Jörg Haus
 Wilhelm-Will-Str. 7
 35580 Wetzlar
 Tel.: (06441) 2004-28
 Fax: (06441) 2004-44