



(10) DE 10 2016 117 421 A1 2018.03.15

(12) **Offenlegungsschrift**

(21) Aktenzeichen: 10 2016 117 421.1

(22) Anmeldetag: 15.09.2016

(43) Offenlegungstag: 15.03.2018

(51) Int Cl.: **G01N 33/50** (2006.01)

G01N 27/327 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

C12M 1/34 (2006.01)

(71) Anmelder:

**Medizinische Universität Wien, Wien, AT;
Universität Bremen, 28359 Bremen, DE**

(74) Vertreter:

**ZACCO Patent- und Rechtsanwalts GmbH, 28195
Bremen, DE**

(72) Erfinder:

**van den Driesche, Sander, 28359 Bremen, DE;
Vellekoop, Michael, Prof. Dr., 28359 Bremen, DE;
Falldorf, Claas, Dr., 28205 Bremen, DE; Hafner,
Christine, Dr., Wien, AT; Breiteneder, Heimo, Prof.
Dr., Wien, AT**

(56) Ermittelter Stand der Technik:

**DE 10 2008 018 170 B4
WO 2014/ 019 603 A1**

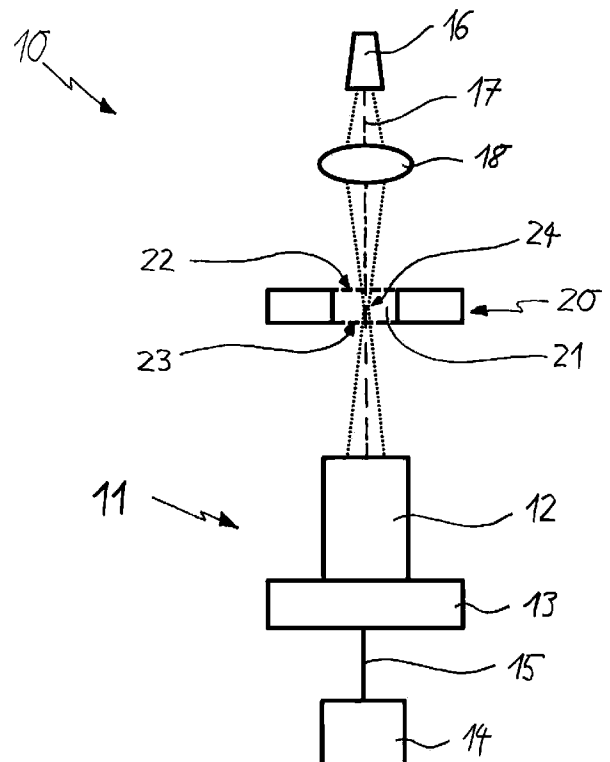
**HASTIE, R. The antigen-induced degranulation
of basophil leucocytes from atopic subjects,
studied by phase-contrast microscopy. Clinical
and experimental immunology, 1971, 8. Jg., Nr. 1,
S. 45.**

Rechercheantrag gemäß § 43 PatG ist gestellt.

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen.

(54) Bezeichnung: **Verfahren zum Durchführen eines Allergietests, Verfahren zum Bestimmen einer Degranulation bei Zellen, Vorrichtung zum Durchführen eines Allergietestes und mikrofluidischer Chip**

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Durchführen eines Allergietests, bei dem eine Blutprobe entnommen wird, und bei dem die Blutprobe mit mindestens einem Allergen in vitro kontaktiert wird. Um einen Allergietest mit einer höheren Aussagekraft und/oder besserer Genauigkeit durchführen zu können, ist das Verfahren dadurch gekennzeichnet, dass mindestens eine allergische Reaktion oder ein Ausbleiben der mindestens einen allergischen Reaktion mittels einer Mikroskopiereinrichtung (11) direkt und/oder optisch beobachtet wird



Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Durchführen eines Allergietests, bei dem eine Blutprobe entnommen wird, und bei dem die Blutprobe mit mindestens einem Allergen in vitro kontaktiert wird. Des Weiteren betrifft die Erfindung ein Verfahren zum Bestimmen einer Degranulation bei Zellen, bei dem eine Blutprobe entnommen wird, und bei dem die Blutprobe mit mindestens einem Reaktionspartner in vitro kontaktiert wird. Darüber hinaus betrifft die Erfindung eine Vorrichtung zum Durchführen eines Allergietests sowie einen mikrofluidischen Chip.

[0002] Entsprechende Verfahren zum Durchführen eines Allergietests sind als Bluttests bekannt, bei denen ein Immunglobulin-Antikörper-Spiegel, insbesondere ein Immunglobulin-E-Spiegel, bestimmt wird. Zellen der körpereigenen Immunabwehr enthalten Granula mit beispielsweise Histamin, das sie bei Aktivierung ausschütten.

[0003] Insbesondere erfolgt ein Aktivierungsprozess über das Immunglobulin E (IgE), welches bei einer Sensibilisierung an die Zellmembran einer Immunzelle gebunden ist. Bei einer vorhandenen Sensibilisierung für ein bestimmtes Allergen kann ein Degranulationsprozess veranlasst werden, bei dem Granula aus der Immunzelle ausgeschüttet werden. Hierbei stellt die Degranulation bzw. das Ausschütten der Granula aus der Immunzelle eine Initiierung einer allergischen Entzündungsreaktion dar.

[0004] Hierbei ist von Nachteil, dass die Feststellung einer Allergie auf dem antikörper-basierten Nachweis von IgE basiert. IgE ist ein Marker für eine allergische Sensibilisierung, eine Allergie, eine Entzündung und/oder bestimmte Bluterkrankungen. Dies bedeutet, dass bei einem antikörper-basierten Nachweis einer Allergie auf der Basis der Auswertung von IgE-Antikörpern nicht zwingend eine Allergie vorliegen muss, auch wenn der Test selbst positiv ist. Hierdurch besteht das Risiko einer hohen Anzahl an Fehlinterpretationen der Testergebnisse. So kann beispielsweise der Anteil von falschen positiven Interpretationen der Testergebnisse zum Feststellen einer Allergie im Bereich von 50 bis 60% liegen. Der Anteil von falschen negativen Testergebnissen kann im Bereich von 15 bis 20% liegen.

[0005] Um falsche Testergebnisse zu identifizieren bzw. eine Allergie zu bestätigen ist es bekannt, einen sogenannten Provokationstest durchzuführen. Beispielsweise kann ein oraler Provokationstest durchgeführt werden. Hierbei ist jedoch von Nachteil, dass dies für die jeweils getestete Person bzw. den Patienten aufgrund der provozierten allergischen Reaktion sehr unangenehm sein kann. Insbesondere besteht bei einem Provokationstest die Gefahr eines lebensbedrohlichen anaphylaktischen Schocks.

[0006] Darüber hinaus ist von Nachteil, dass es sich bei einem Allergietest auf der Basis eines antikörper-basierten Nachweises von IgE um eine indirekte Methode handelt. insbesondere erfolgt der Nachweis der in einer Blutprobe ermittelten IgE-Moleküle mittels Enzym-markierter Antikörper gegen IgE. Ein entsprechender Komplex kann mit einer zweiten Entwicklungsreaktion, insbesondere mittels Fluoreszenz, nachgewiesen werden. Somit kann eine allergische Reaktion lediglich indirekt mittels indirekten Allergieindikatoren, insbesondere IgE-Antikörpern oder Fluoreszenz, nachgewiesen werden.

[0007] Es ist daher die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe, ein Verfahren, eine Vorrichtung und einen mikrofluidischen Chip der eingangs genannten Art derart weiterzuentwickeln, dass ein Allergietest mit einer erhöhten Aussagekraft und/oder besseren Genauigkeit durchgeführt werden kann. Insbesondere soll ein schnellerer und/oder kostengünstigerer Allergietest zur Verfügung gestellt werden. Des Weiteren soll mindestens eine alternative Ausführungsform bereitgestellt werden.

[0008] Die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe wird mit einem Verfahren der eingangs genannten Art zum Durchführen eines Allergietests gelöst, bei dem mindestens eine allergische Reaktion oder ein Ausbleiben der mindestens einen allergischen Reaktion mittels einer Mikroskopiereinrichtung direkt und/oder optisch beobachtet wird. Bei dem Verfahren zum Bestimmen einer Degranulation bei Zellen ist zur Lösung der Aufgabe vorgesehen, dass eine Degranulation oder ein Ausbleiben der Degranulation mittels einer Mikroskopiereinrichtung direkt und/oder optisch beobachtet wird. Des Weiteren wird die Aufgabe mit einer Vorrichtung zum Durchführen eines Allergietests der eingangs genannten Art gelöst, dass eine Mikroskopiereinrichtung und mindestens einen teilweise transparenten mikrofluidischen Chip zum direkten und/oder optischen Beobachten einer allergischen Reaktion oder zum Beobachten des Ausbleibens einer allergischen Reaktion aufweist.

[0009] Hierbei ist von Vorteil, dass eine allergische Reaktion unmittelbar bzw. direkt bestimmbar ist. Insbesondere ist eine Degranulation von, vorzugsweise bestimmten oder vorgegeben, Immunzellen unmittelbar beobachtbar. Hierbei kann eine Degranulation als ein relevanter Parameter zum Feststellen einer allergischen Reaktion aufgefasst werden. Aufgrund einer Visualisierung eines Degranulationsprozesses kann somit eine direkte Methode zum Feststellen einer Allergie bereitgestellt werden. Dies ermöglicht eine verbesserte und zuverlässigere Bestimmung von Allergien. Hierdurch kann auf indirekte Methoden zum Feststellen einer Allergie verzichtet werden. Zudem kann eine direkte und/oder optische Beobachtung einer allergischen Reaktion die Realisierung eines genauere

ren, schnelleren und/oder kostengünstigeren Allergietests ermöglichen.

[0010] Vorzugsweise ist im Rahmen der vorliegenden Anmeldung unter einem direkten und/oder optischen Beobachten ein Bestimmen, Überwachen, Detektieren und/oder Messen zu verstehen. Insbesondere ist unter einem direkten und/oder optischen Beobachten ein Aufnehmen und/oder Auswerten von Daten und/oder Bildern zu verstehen. Ein direktes und/oder optisches Beobachten kann als ein quantitatives Mikroskopieren, insbesondere ein quantitatives Phasenkontrastmikroskopieren, ausgebildet sein. Im Unterschied zu einem indirekten Bestimmen einer allergischen Reaktion mittels eines Markers oder indirekten Allergieindikators kann mittels der Erfindung eine allergische Reaktion direkt bzw. unmittelbar bestimmt, beobachtet und/oder gemessen werden. Somit kann bei einem direkten Beobachten, Bestimmen, Überwachen, Detektieren und/oder Messen einer allergischen Reaktion auf eine aufwändigere Auswertung eines Markers oder indirekten Allergieindikators verzichtet werden. Hierdurch ist eine Allergie genauer, mit höherer Zuverlässigkeit, schneller und/oder kostengünstiger realisierbar.

[0011] Nach einer weiteren Ausführungsform wird bei einer allergischen Reaktion eine Degranulation von, insbesondere bestimmten und/oder vorgegebenen, Immunzellen der Blutprobe mit der Mikroskopiereinrichtung, insbesondere quantitativ, beobachtet. Hierbei sind die Immunzellen Bestandteile der Blutprobe. Vorzugsweise handelt es sich bei den Immunzellen um Granulozyten, basophile Zellen, basophile Granulozyten und/oder Mastzellen. Insbesondere werden Granula von Zellen beobachtet, überwacht, vermessen und/oder aufgenommen. Insbesondere wird ein Bewegungsweg der Granula für eine vorgegebene Zeit beobachtet, vermessen und/oder aufgenommen. Vorzugsweise wird beobachtet, ob Granula einer Zelle nach einer Kontaktierung der Zelle mit dem mindestens einen Allergen innerhalb einer vorgegebenen Zeit aus der Zelle austreten bzw. ausgeschüttet werden. Vorzugsweise sind im Rahmen der vorliegenden Anmeldung unter Immunzellen derartige Zelltypen einer Blutprobe zu verstehen, die potentiell eine Sensibilisierung für eine allergische Reaktion aufweisen können. Aufgrund der direkten und/oder optischen Beobachtung der Immunzellen bei Kontaktierung der Zellen mit dem mindestens einen Allergen kann ein Ausbleiben der Degranulation als nicht-allergische Reaktion klassifiziert werden. Bei einem Stattfinden der Degranulation kann dies als eine allergische Reaktion klassifiziert werden. Somit kann aufgrund der Beobachtung der Granula-Bewegung auf direkte Art und Weise und/oder in Echtzeit festgestellt werden, ob eine allergische Sensibilisierung bzw. Allergie vorliegt oder nicht.

[0012] Gemäß einer Weiterbildung wird nach der Entnahme der Blutprobe und vor dem Kontaktieren mit dem mindestens einen Allergen die Blutprobe zum Erhöhen des Anteils an Immunzellen präpariert. Hierbei kann die Entnahme der Blutprobe in an sich bekannter Weise erfolgen. Beispielsweise wird die Blutprobe einer Person bzw. einem Patienten mittels einer Nadel oder einer Spritze entnommen. Hierbei kann eine vergleichsweise geringe Menge an Blut als Blutprobe ausreichen. Vorzugsweise ist eine Blutmenge von weniger als 100 ml, weniger als 10 ml oder weniger als 1 ml ausreichend. Im Rahmen der Präparation der Blutprobe kann die Blutprobe mit Zusätzen versehen werden. Hierbei kann es sich beispielsweise um Natriumcitrat und/oder um Herapin handeln. Aufgrund einer geeigneten Präparation der Blutprobe kann eine Gerinnung des Blutes vermieden oder verzögert werden. Insbesondere wird der prozentuale Anteil von Immunzellen in der Blutprobe erhöht. Beispielsweise kann der prozentuale Anteil von Immunzellen in der Blutprobe auf mehr als 5%, mehr als 10%, mehr als 20% oder größer erhöht werden.

[0013] Vorzugsweise wird im Rahmen der Präparation der Blutprobe der Anteil an roten Blutzellen reduziert. Die Reduzierung oder eine Entfernung von roten Blutzellen aus der Blutprobe kann mittels üblicher, insbesondere chemischer, elektrischer und/oder mechanischer, Methoden realisiert werden. Insbesondere wird der Anteil an von den zu untersuchenden Immunzellen verschiedenen weißen Blutzellen reduziert. Der Anteil an den zu untersuchenden Immunzellen, insbesondere von Granulozyten, basophilen Zellen, basophilen Granulozyten und/oder Mastzellen, kann durch die Entfernung hiervon abweichenden weißen Blutzellen erhöht werden. Insbesondere können basophile Zellen aufgrund einer Entfernung aller anderen weißen Blutzellen isoliert werden. Hierzu können an sich bekannte und/oder übliche Verfahren, Methoden oder Techniken eingesetzt werden. Aufgrund der Präparation der Blutprobe ist eine Erhöhung des Anteils von zu untersuchenden Immunzellen in der Blutprobe auf mehr als 5%, mehr als 10%, mehr als 20% oder höher erreichbar. Insbesondere ist ein Anteil in einen Bereich von 10% bis 20% oder höher realisierbar. Für das Bestimmen einer Degranulation der zu untersuchenden Zellen und/oder dem Beobachten einer allergischen Reaktion ist es somit nicht notwendig, die zu untersuchenden Zellen vollständig von sämtlichen anderen Bestandteilen der Blutprobe zu isolieren. Die präparierte Blutprobe kann zum Verbessern der Lagerfähigkeit, insbesondere für eine Zeit von mehreren Stunden, in ein geeignetes Medium suspendiert werden.

[0014] Nach einer weiteren Ausführungsform wird ein mikrofluidischer Chip zum Kontaktieren der Blutprobe mit dem mindestens einen Allergen verwendet. Mittels eines mikrofluidischen Chips kann bereits eine vergleichsweise geringe Menge der Blutprobe,

insbesondere im Bereich eines Tropfens oder mehrerer Tropfen, für eine Untersuchung bereitgestellt werden. Ein mikrofluidischer Chip kann einen Mikrokanal oder mehrere Mikrokanäle aufweisen. Des Weiteren kann ein mikrofluidischer Chip aus mehreren Schichten aufgebaut sein. Eine, mindestens einen Mikrokanal und/oder mindestens einen Reaktionsraum aufweisende Schicht, kann aus Silizium gebildet sein. Eine obere und/oder untere Deckschicht oder Trägerschicht kann aus einem transparenten Material, insbesondere Glas oder Kunststoff, gebildet sein. Vorzugsweise ist eine Siliziumschicht zwischen zwei transparenten Schichten, vorzugsweise Glasschichten, angeordnet. Insbesondere werden Immunzellen der Blutprobe in mindestens einem Reaktionsraum des Chips angeordnet. Der mikrofluidische Chip kann mehrere Reaktionsräume zum Aufnehmen von Immunzellen der Blutprobe aufweisen. Hierbei können die mehreren Reaktionsräume voneinander getrennt und/oder mittels eines oder mehrerer Mikrokanäle miteinander verbunden sein. Vorzugsweise ist der Reaktionsraum und/oder mindestens ein Referenzraum des mikrofluidischen Chips mindestens teilweise transparent ausgebildet. Der mindestens eine Reaktionsraum und/oder der mindestens eine Referenzraum kann mindestens einseitig transparent ausgebildet und/oder abgedeckt sein. Insbesondere ist unter Transparenz eine Durchlässigkeit in Bezug auf elektromagnetische Wellen und/oder Licht unterschiedlicher Wellenlängen zu verstehen.

[0015] Vorzugsweise wird mindestens ein Allergen in den mindestens einen Reaktionsraum geführt. Insbesondere nachdem mehrere Immunzellen in den mindestens einen Reaktionsraum angeordnet wurden, wird mindestens ein Allergen hinzugefügt. Hierbei kann ein vorgegebenes, einzelnes Allergen in einen bestimmten, vorgegebenen Reaktionsraum geführt werden. Alternativ können mehrere Allergene, insbesondere eine bestimmte Anzahl vorgegebener Allergentypen, in den Reaktionsraum geführt werden. Insbesondere wird das mindestens eine Allergen sowohl in den mindestens einen Reaktionsraum mit den Immunzellen als auch in einen Referenzraum ohne Immunzellen geführt. Der Referenzraum kann ebenfalls mittels der Mikroskopiereinrichtung direkt und/oder optisch beobachtet werden. Insbesondere erfolgt die Beobachtung des mindestens einen Reaktionsraumes und des zugeordneten Referenzraumes gemeinsam und/oder zeitgleich. Hierbei kann die Beobachtung des Referenzraumes ohne Immunzellen im Vergleich mit der Beobachtung des zugehörigen Reaktionsraumes mit den Immunzellen die Auswertung und/oder die Qualität der Beobachtungsergebnisse verbessern. Insbesondere wird mittels der Beobachtung des mindestens eines Reaktionsraumes und des zugeordneten Referenzraumes ein quantitativer Phasenkontrast interferometrisch gemessen. Vorzugsweise ist jedem Reaktionsraum jeweils ein Referenzraum zugeordnet.

Bei einem mikrofluidischen Chip mit mehreren Reaktionsräumen ist somit eine gleiche Anzahl von Referenzräumen vorhanden. Die Immunzellen einerseits und das mindestens eine Allergen andererseits können mittels desselben Mikrokanals oder mittels unterschiedlicher Mikrokanäle in den mindestens einen Reaktionsraum und/oder in den mindestens einen Referenzraum geführt werden.

[0016] Vorzugsweise werden die Immunzellen der Blutprobe mittels eines geeigneten Verfahrens und/oder einer geeigneten Vorrichtung auf oder in dem mikrofluidischen Chip angeordnet oder positioniert. Insbesondere werden Immunzellen der Blutprobe mittels einer mikrofluidischen Zellenfalle, einer Elektrophorese, einer Dielektrophorese und/oder mechanischen Methoden auf oder in dem mikrofluidischen Chip angeordnet. Bei der Dielektrophorese kann ein inhomogenes elektrisches Feld zum Bewegen, Trennen, Anordnen und/oder Positionieren von Zellen bzw. Immunzellen genutzt werden. Aufgrund des inhomogenen elektrischen Feldes kann in den Zellen ein Dipolmoment induziert werden, das sodann in Wechselwirkung mit dem angelegten elektrischen Feld tritt. Hierbei erfahren die Zellen eine Kraft und bewegen sich, je nach Feld und Dipolmoment, in Bereiche hoher oder niedriger Feldstärke. Die Kraftwirkung kann proportional zum Volumen der Zellen sein. Somit können die Zellen, insbesondere die Immunzellen, in einer Art „Feldkäfig“ eingefangen werden. Insbesondere werden Immunzellen mittels der Elektrophorese und/oder Dielektrophorese in mindestens einem Reaktionsraum positioniert und/oder gehalten. Vorzugsweise lassen sich Immunzellen der Blutprobe mittels Dielektrophorese aufteilen und in mehreren Reaktionsräumen anordnen. Aufgrund der Trennung der Immunzellen in mehrere Reaktionsräume können zeitgleich unterschiedliche Allergene mit Immunzellen in voneinander getrennten Reaktionsräumen kontaktiert werden. In Abhängigkeit von der gewählten Anzahl an Reaktionsräumen und/oder verwendeten Allergenen können somit zeitgleich mehrere allergische Sensibilisierungen bzw. Allergien getestet werden.

[0017] Vorzugsweise wird mindestens ein Referenzraum mittels der Elektrophorese und/oder Dielektrophorese ohne bzw. frei von Immunzellen bereitgestellt. Somit kann mittels der Elektrophorese und/oder Dielektrophorese ein Referenzraum zur Verfügung gestellt werden, in dem sich keine Immunzellen befinden. Die Immunzellen können innerhalb des mikrofluidischen Chips mittels der Elektrophorese und/oder Dielektrophorese derart gesteuert werden, dass der Bereich des Referenzraumes zellfrei wird und/oder bleibt. Auf diese Weise kann der Immunzellenfreie Referenzraum mit dem Immunzellen enthaltenden mindestens einen Reaktionsraum optisch überlagert werden. Hierdurch kann ein quantitativer Phasenkontrast der Immunzellen interferometrisch ge-

messen werden. Insbesondere überlagert sich das Licht, das mindestens teilweise durch den Reaktionsraum und mindestens teilweise durch den Referenzraum verläuft. Das sich überlagernde Licht kann einen im Wesentlichen oder annähernd identischen Weg, insbesondere durch den mikrofluidischen Chip, aufweisen. Hierdurch kann eine Empfindlichkeit gegenüber äußeren mechanischen Einflüssen reduziert werden. Insbesondere kann auf eine aufwendige und/oder kostenintensive Schwingungsisolation verzichtet werden.

[0018] Gemäß einer Weiterbildung wird mittels der Mikroskopiereinrichtung die Position und/oder eine Positionsveränderung von Granula der Immunzellen direkt und/oder optisch beobachtet. Insbesondere sind Granula mittels der Mikroskopiereinrichtung sichtbare, körnchenförmige Einlagerungen in biologischen Zellen, insbesondere Immunzellen. Die Freisetzung von Granula aus den Zellen, insbesondere Immunzellen, nennt man Degranulation. Insbesondere werden Granula in verschiedenen Ebenen oder Höhenebenen beobachtet. In dem mindestens einen Reaktionsraum können sich mehrere Immunzellen aufhalten. Die Immunzellen können in unterschiedlichen Höhen oder Höhenebenen angeordnet sein. Um eine allergische Reaktion einer Vielzahl von Granula, insbesondere unterschiedlicher Immunzellen, in demselben Reaktionsraum beobachten zu können, wird der Reaktionsraum in vorgegebenen, unterschiedlichen Höhenebenen mittels der Mikroskopiereinrichtung beobachtet. Hierbei kann die Beobachtung in den unterschiedlichen Höhenebenen in einer vorgegebenen zeitlichen Abfolge durchgeführt werden. Hierzu kann eine hoch auflösende Mikroskopie eingesetzt werden. Vorzugsweise wird mit der Mikroskopiereinrichtung eine, insbesondere digitale, holographische Mikroskopie oder eine Shearographie realisiert. Hierbei kann Shearographie eine Kurzbezeichnung für eine Shearing Interferometrie und/oder eine Laser Speckle Shearing Interferometrie sein. Hierbei handelt es sich um ein an sich bekanntes kohärent optisches Messverfahren. Insbesondere ist anstelle eines Lasers eine LED (LED: Licht-Emitierende-Diode) einsetzbar. Die digitale holographische Mikroskopie nutzt das Prinzip der Holographie, um ein Bild zu erzeugen. Hierbei kann mittels einer Lichtquelle, insbesondere einer LED oder eines Lasers, die zu untersuchende Blutprobe bzw. die zu untersuchenden Immunzellen beleuchtet werden. Das hierbei gestreute Licht kann mit Licht einer Referenzquelle derselben Lichtquelle, insbesondere derselben LED oder desselben Lasers, interferieren. Hier kann die Referenzquelle mittels des Referenzraumes bereitgestellt sein. Das hierbei gebildete Interferenzmuster kann die direkte und/oder optische Beobachtung ermöglichen. Insbesondere kann das Interferenzmuster mittels eines, vorzugsweise digitalen, Sensors aufgenommen werden. Vorzugsweise

ermöglicht die Mikroskopiereinrichtung die Ermittlung eines quantitativen Phasenkontrastes.

[0019] Nach einer weiteren, auch eigenständig und unabhängig von der vorliegenden Erfindung denkbaren, Ausführungsform werden mittels der Mikroskopiereinrichtung lebende Immunzellen der Blutprobe identifiziert. Somit kann zwischen lebenden und toten Zellen unterschieden werden. Hierbei kann die Identifizierung lebender Immunzellen automatisiert durchgeführt werden. Eine automatisierte Identifizierung lebender Immunzellen ermöglicht eine erhebliche Zeit- und/oder Kostenreduktion. Vorzugsweise werden ausschließlich als lebend identifizierte Immunzellen bei der Beobachtung und/oder der Auswertung eine Reaktion der Immunzellen bei einer Kontaktierung mit dem mindestens einen Allergen berücksichtigt. Hierdurch lassen sich Fehler bei der Auswertung der Beobachtung reduzieren. Insbesondere wird vermieden, dass eine nicht beobachtete allergische Reaktion bei einer toten Immunzelle als eine nicht vorhandene allergische Sensibilisierung bzw. Allergie interpretiert wird. Vorzugsweise wird ein Anregungszustand von Immunzellen, insbesondere Basophilzellen, festgestellt. Hierzu kann die Mikroskopiereinrichtung als ein quantitatives Phasenkontrastmikroskop ausgebildet sein. Ein optischer Weg des Lichts durch mindestens eine Immunzelle und/oder eine Lichtabsorption mindestens einer Immunzelle kann gemessen und/oder ausgewertet werden. Insbesondere sind tote Immunzellen von lebenden Immunzellen aufgrund einer Messung des optischen Weges bzw. des Lichtweges unterscheidbar, da tote Immunzellen beim Sterben platzen und sich hierdurch eine Veränderung des optischen Weges bzw. des Lichtweges ergibt.

[0020] Gemäß einer Weiterbildung wird eine Position von Granula in Immunzellen, eine Bewegung der Granula und/oder eine Degranulation für eine Beobachtungszeit von bis zu 10 Minuten oder länger beobachtet. Insbesondere liegt die Beobachtungszeit in einem Bereich von 60 Sekunden bis 300 Sekunden. Die Beobachtungszeit kann mit dem Kontaktieren der Blutprobe mit dem mindestens einen Allergen oder dem Zuführen des mindestens eines Allergens in den mikrofluidischen Chip in Gang gesetzt werden. Während der Beobachtungszeit können mehrere Reaktionsräume eines mikrofluidischen Chips in vorgegebenen Zeitabständen mehrfach aufeinanderfolgend beobachtet werden. Insbesondere können während der Beobachtungszeit mehrere Ebenen oder Höhenebenen in jeweils einem Reaktionsraum in vorgegebenen Zeitabständen mehrfach aufeinanderfolgend beobachtet werden. Somit ist es nicht notwendig, dass ein einzelner Reaktionsraum und/oder eine einzelne Ebene innerhalb eines einzelnen Reaktionsraumes ununterbrochen über die gesamte Beobachtungszeit beobachtet wird. Stattdessen kann es ausreichen, innerhalb der Beobachtungszeit mehre-

re Beobachtungen und/oder Aufnahmen zu machen, um auf der Basis einer Folge von Beobachtungen und/oder Aufnahmen eine Auswertung durchführen zu können.

[0021] Vorzugsweise wird die Beobachtung und/oder Auswertung automatisiert durchgeführt. Hierdurch lässt sich der Zeit- und/oder Kostenaufwand reduzieren. Insbesondere wird eine digitale Bildaufzeichnung und/oder Bildaufnahme zum Beobachten einer Reaktion der Blutprobe, insbesondere der Immunzellen, auf das Kontaktieren mit dem mindestens einen Allergen eingesetzt. Beispielsweise kann eine Bildverarbeitungssoftware zum Bereitstellen und/oder Auswerten von Bildaufnahmen verwendet werden. Hierdurch lässt sich eine möglicherweise vorhandene allergische Sensibilisierung bzw. Allergie in Bezug zu verschiedenen Allergenen innerhalb einer vergleichsweise kurzen Zeit testen. Ein entsprechender Allergietest kann in einer Zeit von weniger als 6 Stunden, weniger als 3 Stunden, weniger als 1 Stunde oder weniger als 10 Minuten durchgeführt werden.

[0022] Von besonderem Vorteil und auch als eine eigenständige und unabhängig von der vorliegenden Anmeldung denkbare Ausführungsform ist ein Verfahren zum Bestimmen einer Degranulation bei Zellen, insbesondere mit Merkmalen des hier beschriebenen Verfahrens zum Durchführen eines Allergietests. Hierbei kann eine Degranulation oder ein Ausbleiben der Degranulation mittels einer Mikroskopiereinrichtung direkt und/oder optisch beobachtet werden. Mittels der Mikroskopiereinrichtung kann die Position und/oder eine Positionsveränderung von Granula der beobachteten Zellen direkt und/oder optisch bestimmt werden. Insbesondere erfolgt die Bestimmung einer Degranulation aufgrund einer Beobachtung und/oder Messung eines quantitativen Phasenkontrastes. Hierbei kann ein quantitativer Phasenkontrast von mindestens einer Zelle mittels einer interferometrischen Messung von sich überlagerndem Licht bestimmt oder gemessen werden. Ein erster Teil des sich überlagernden Lichts kann durch einen Reaktionsraum mit der mindestens einen Zelle und ein weiterer Teil des sich überlagernden Lichts kann durch einen Referenzraum ohne Zellen hindurchlaufen.

[0023] Des Weiteren ist eine Vorrichtung zum Durchführen eines Allergietests mit einem erfindungsgemäßen Verfahren von Vorteil, wobei die Vorrichtung eine Mikroskopiereinrichtung und einen mindestens teilweise transparenten mikrofluidischen Chip zum direkten und/oder optischen Beobachten einer Degranulation aufweist. Gegebenenfalls kann die Mikroskopiereinrichtung nur relevante Teile, insbesondere eine Objektivereinrichtung, eine Sensoreinrichtung und/oder eine Linseneinrichtung, einer üblichen Mikroskopiereinrichtung aufweisen. Hierdurch kann ei-

ne besonders kompakte Ausbildung oder Gestaltung der Vorrichtung realisierbar sein. Insbesondere ist mittels der Vorrichtung eine allergische Reaktion oder ein Ausbleiben einer allergischen Reaktion beobachtbar.

[0024] Gemäß einer Weiterbildung hat der mikrofluidische Chip mindestens einen Reaktionsraum, insbesondere mehrere Reaktionsräume. Mindestens ein, zwei oder mehrere Mikrokanäle können in den Reaktionsraum münden. Mehrere Reaktionsräume können mittels Trennelementen oder Wänden voneinander getrennt sein. Insbesondere weist der mikrofluidische Chip im Bereich des mindestens einen Reaktionsraumes transparente Fensterflächen auf. Die transparenten Fensterflächen können auf zwei voneinander abgewandten Seiten des mikrofluidischen Chips angeordnet sein. Die transparenten Fensterflächen können quer oder rechtwinklig zu einer optischen Achse, einem optischen Weg und/oder einem Lichtweg der Vorrichtung und/oder der Mikroskopiereinrichtung ausgerichtet sein. Insbesondere sind die transparenten Fensterflächen derart zueinander angeordnet, dass ein optischer Weg, ein Lichtweg, eine Lichtwelle und/oder eine elektromagnetische Welle durch eine erste Fensterfläche hindurch in den Reaktionsraum und durch eine zweite Fensterfläche hindurch aus dem Reaktionsraum heraustreten kann. Vorzugsweise ist jedem Reaktionsraum ein Referenzraum zugeordnet. Der Referenzraum kann transparente Fensterflächen aufweisen. Insbesondere sind transparente Fensterflächen des Referenzraumes auf zwei voneinander abgewandten Seiten des mikrofluidischen Chips angeordnet. Vorzugsweise sind die transparenten Fensterflächen des Reaktionsraumes zugleich auch die transparenten Fensterflächen des zugehörigen Referenzraumes. Die Fensterflächen können jeweils mittels einer Glasschicht gebildet sein. Hierbei kann eine einzige oder einzelne Glasschicht eine Seite des mikrofluidischen Chips abdecken.

[0025] Vorzugsweise hat der mindestens einen Reaktionsraum und/oder ein Referenzraum eine Grundfläche oder auf zwei voneinander abgewandten Seiten jeweils eine transparente Fensterfläche im Bereich von etwa $100\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m}$. Insbesondere beträgt die Grundfläche des mindestens einen Reaktionsraumes und/oder des Referenzraumes oder die transparente Fensterfläche im Bereich des mindestens einen Reaktionsraumes und/oder im Bereich des Referenzraumes weniger als $50.000\ \mu\text{m}^2$, weniger als $20.000\ \mu\text{m}^2$ oder etwa $10.000\ \mu\text{m}^2$. Insbesondere hat der mindestens einen Reaktionsraum und/oder der Referenzraum eine Höhe von weniger als 1 mm und/oder weniger als $100\ \mu\text{m}$.

[0026] Nach einer weiteren Ausführungsform weist die Mikroskopiereinrichtung ein, insbesondere digitales, holographisches Mikroskop oder ein Shearo-

graphie-Mikroskop auf. Vorzugsweise hat die Mikroskopiereinrichtung ein quantitatives Phasenkontrastmikroskop. Insbesondere ist der mikrofluidische Chip zwischen einer Lichtquelle und einer Objektivierung angeordnet. Die Lichtquelle kann als eine LED oder ein Laser ausgebildet sein. Der mikrofluidische Chip kann an einer Trageeinrichtung befestigt sein. Die Lichtquelle einerseits und die Objektivierung und/oder die Mikroskopiereinrichtung andererseits können, ausgehend von dem mikrofluidischen Chip, in zwei voneinander abgewandten Bereichen angeordnet sein.

[0027] Des Weiteren kann die Objektivierung ein Bestandteil der Mikroskopiereinrichtung und/oder zwischen der Mikroskopiereinrichtung und dem mikrofluidischen Chip angeordnet sein. Vorzugsweise ist die Mikroskopiereinrichtung mit einem Computer verbunden. Hierbei kann der Computer zum Darstellen, Aufzeichnen, Speichern und/oder Auswerten von Bildern und/oder Daten ausgebildet sein. Insbesondere lässt sich mittels eines Computers eine automatisierte Beobachtung und/oder Auswertung realisieren.

[0028] Von besonderem Vorteil und auch unabhängig sowie eigenständig zu der vorliegenden Anmeldung denkbar ist ein mikrofluidischer Chip, insbesondere für eine erfindungsgemäße Vorrichtung. Der mikrofluidische Chip kann Elektroden zum elektrophoretischen und/oder dielektrophoretischen Positionieren von Zellen, insbesondere Immunzellen, aufweisen. Hierbei kann das Positionieren der Zellen bzw. Immunzellen in mindestens einem Reaktionsraum des mikrofluidischen Chips erfolgen. Der mikrofluidische Chip kann mindestens einen Referenzraum aufweisen. Insbesondere ist jedem Reaktionsraum jeweils ein Referenzraum zugeordnet. Insbesondere ist aufgrund einer Gestalt und/oder Ausrichtung mindestens einer Elektrode benachbart zu dem Reaktionsraum ein Referenzraum gebildet. Vorzugsweise weist die, insbesondere strangförmige, Elektrode zum Ausbilden des mindestens einen Referenzraumes eine Umlenkung und/oder einen Bogen auf. Somit ist mittels mindestens einer Elektrode eine Doppelfunktion realisierbar. Hierbei bewirkt die mindestens eine Elektrode zum einen ein zuverlässiges Positionieren und/oder Halten von Zellen bzw. Immunzellen in dem Reaktionsraum. Zugleich ist aufgrund der geeigneten Ausbildung oder Gestalt der mindestens einen Elektrode der mindestens eine Referenzraum gebildet. Hierbei gewährleistet die Elektrode, dass keine Zellen bzw. Immunzellen, insbesondere nach dem Positionieren der Zellen in dem Reaktionsraum, in den Referenzraum gelangen. Vorzugsweise ist der Referenzraum zwischen einer ersten Elektrode und mindestens einer weiteren Elektrode gebildet.

[0029] Von besonderem Vorteil ist eine Verwendung eines erfindungsgemäßen Verfahrens, einer er-

findungsgemäßen Vorrichtung und/oder eines erfindungsgemäßen mikrofluidischen Chips zum Durchführen eines Allergietests. Insbesondere stellt die Visualisierung bzw. die quantitative Erfassung der Degranulation als einen allergieauslösenden Prozess im Gegensatz zu bekannten Allergietests eine direkte Methode dar. Hierdurch kann die Anzahl fehlerhafter Auswertungen erheblich reduziert werden. Des Weiteren ist der zeitliche Aufwand erheblich reduzierbar, da bei einem Vorliegen einer allergischen Sensibilität eine entsprechende allergische Reaktion in einem Zeitraum von wenigen Minuten, insbesondere innerhalb von 60 Sekunden bis 300 Sekunden, beobachtbar ist. Schließlich können mittels einer vergleichsweise geringen Blutprobenmenge umfangreiche Tests mit den bisher verwendeten, bekannten und üblichen Allergenen durchgeführt werden.

[0030] Nachfolgend wird die Erfindung anhand der Figuren näher erläutert. Es zeigen:

[0031] Fig. 1 eine schematische Seitenansicht einer erfindungsgemäßen Vorrichtung,

[0032] Fig. 2 einen schematischen Ausschnitt einer Draufsicht auf einen erfindungsgemäßen mikrofluidischen Chip, und

[0033] Fig. 3 ein schematisches Ablaufdiagramm für ein erfindungsgemäßes Verfahren.

[0034] Fig. 1 zeigt eine schematische Seitenansicht einer erfindungsgemäßen Vorrichtung **10**. Die Vorrichtung **10** weist eine Mikroskopiereinrichtung **11** auf. Bei diesem Ausführungsbeispiel ist die Mikroskopiereinrichtung **11** als ein digitales holographisches Mikroskop ausgebildet. Des Weiteren weist die Mikroskopiereinrichtung **11** bei diesem Ausführungsbeispiel eine Objektivierung **12** und eine Sensoreinrichtung **13** auf. Die Sensoreinrichtung **13** kann als ein Detektor und/oder als ein Bildsensor, insbesondere ein CCD-Sensor, ausgebildet sein.

[0035] Die Mikroskopiereinrichtung **11** ist mit einem Computer **14** verbunden. Hierdurch sind Daten der Mikroskopiereinrichtung **11** bzw. der Sensoreinrichtung **13** mittels einer Datenleitung **15** an den Computer **14** übermittelbar. Des Weiteren kann mittels des Computers **14** die Mikroskopiereinrichtung **11** gesteuert werden.

[0036] Die Vorrichtung **10** weist eine Lichtquelle **16** auf. Die Lichtquelle **16** ist bei diesem Ausführungsbeispiel als eine LED ausgebildet. Alternativ kann die Lichtquelle **16** ein Laser sein. Bei dieser schematischen Darstellung ist die Lichtquelle **16** derart angeordnet, dass eine optische Achse **17** in Richtung der Mikroskopiereinrichtung **11** ausgerichtet ist. Hier ist die optische Achse **17** als eine gestrichelte Linie dargestellt. Des Weiteren kann ein hier nicht näher

dargestellter räumlicher Modulator, insbesondere ein sogenannter SLM (Spatial Light Modulator), für das Licht der Lichtquelle **16** vorhanden sein.

[0037] Die Vorrichtung **10** hat eine Linseneinrichtung **18**. Bei diesem Ausführungsbeispiel ist die Linseneinrichtung als eine Linsen-Filtereinrichtung ausgebildet. Die Linseneinrichtung **18** ist zum Fokussieren und/oder Filtern eines Lichtstrahls **19** ausgebildet. Hier ist der Lichtstrahl **19** mittels punktierter Linien schematisch dargestellt. Die Linseneinrichtung **18** kann eine oder mehrere Linsen aufweisen. Des Weiteren ist die Linseneinrichtung **18** zwischen der Lichtquelle **16** und der Mikroskopiereinrichtung **11** auf der optischen Achse **17** angeordnet. Bei diesem Ausführungsbeispiel ist die Linseneinrichtung **18** zum Einstellen bzw. Verändern des Fokus steuerbar. Beispielsweise kann die Linseneinstellung **18** mittels des Computers **14** gesteuert werden.

[0038] Schließlich weist die Vorrichtung **10** einen mikrofluidischen Chip **20** auf. Der mikrofluidische Chip **20** kann mittels einer hier nicht näher dargestellten Trageinrichtung positioniert und/oder gehalten sein. Der mikrofluidische Chip **20** ist zwischen der Lichtquelle **16** und der Mikroskopiereinrichtung **11** angeordnet. Hier ist der mikrofluidische Chip **20** auf der optischen Achse **17** zwischen der Linseneinrichtung **18** und der Objektivereinrichtung **12** positioniert. Der mikrofluidische Chip **20** ist mindestens teilweise transparent ausgebildet. Hierdurch kann der Lichtstrahl **19**, ausgehend von der Lichtquelle **16**, durch den mikrofluidischen Chip **20** zu der Mikroskopiereinrichtung **11** geführt werden. Alternativ kann der mikrofluidische Chip **20** lediglich einseitig transparent ausgebildet sein, wobei die dann die Bestrahlung und die Beobachtung bzw. Messung von derselben Seite aus erfolgt.

[0039] Der mikrofluidische Chip **20** weist mindestens einen Reaktionsraum **21** auf. Mindestens im Bereich des mindestens einen Reaktionsraumes **21** hat der mikrofluidische Chip **20** transparente Fensterflächen **22**, **23**. Die Fensterflächen **22**, **23** sind an zwei voneinander abgewandten Seiten des mikrofluidischen Chips **20** angeordnet. Die Ebene des mikrofluidischen Chips **20** bzw. der Fensterflächen **22**, **23** ist quer, bei diesem Ausführungsbeispiel im Wesentlichen rechtwinklig, zur optischen Achse **17** ausgerichtet.

[0040] Ein Fokus **24** des Lichtstrahls **19** ist innerhalb des Reaktionsraumes **21** positioniert. Mittels einer geeigneten Steuerung, insbesondere des Computers **14**, kann die Lage des Fokus **24** innerhalb des mindestens einen Reaktionsraumes **21** verändert werden. Beispielsweise kann der Fokus **24** im Wesentlichen in Längsrichtung der optischen Achse **17** verschoben werden. Hierdurch können unterschiedliche

Ebenen bzw. Höhenebenen innerhalb des mindestens einen Reaktionsraumes **21** beobachtet werden.

[0041] Fig. 2 zeigt einen schematischen Ausschnitt eines erfindungsgemäßen mikrofluidischen Chips **20**. Hierbei ist der schematische Ausschnitt als eine Draufsicht dargestellt. Der mikrofluidische Chip **20** weist mehrere Reaktionsräume **21** auf, wobei hier jedoch nur ein einzelner Reaktionsraum **21** gezeigt ist. Der mikrofluidische Chip **20** hat mehrere Trennelemente **25**. Mittels der Trennelemente **25** ist die Position und/oder Größe des mindestens einen Reaktionsraumes **21** definierbar. Insbesondere dienen die Trennelemente **25** zum Separieren von mehreren Reaktionsräumen **21**. Bei diesem Ausführungsbeispiel sind die Trennelemente **25** als Trennwände ausgebildet.

[0042] Der Reaktionsraum **21** weist eine Zugangsöffnung **26** auf. Mittels der Zugangsöffnung **26** können hier nicht näher dargestellte Zellen oder Immunzellen einer Blutprobe in den Reaktionsraum **21** gelangen.

[0043] Des Weiteren weist der mikrofluidische Chip **20** mindestens einen Mikrokanal **27** auf. Insbesondere ist jeder Reaktionsraum **21** mit mindestens einem Mikrokanal **27** verbunden. Mittels des Mikrokanals **27** ist mindestens ein hier nicht näher dargestelltes Allergen in den Reaktionsraum **21** führbar. Bei diesem Ausführungsbeispiel sind die Zugangsöffnungen **26** und der Mikrokanal **27** an voneinander abgewandten Seiten des Reaktionsraumes **21** angeordnet. Des Weiteren sind bei diesem Ausführungsbeispiel sowohl die Zugangsöffnung **26** als auch der Mikrokanal **27** mittels zweier parallel zueinander angeordneter und spiegelsymmetrisch zueinander angeordneter Trennelemente **25** ausgebildet.

[0044] Der mikrofluidische Chip **20** weist eine dielektrophoretische Positioniereinrichtung **28** auf. Die dielektrophoretische Positioniereinrichtung **28** hat mehrere Elektroden **29**, **30**, **31**. Die Elektroden **29**, **30**, **31** sind im Wesentlichen strangförmig ausgebildet. Des Weiteren sind die Elektroden **29**, **30**, **31** im Wesentlichen parallel zueinander ausgerichtet. Die dielektrophoretische Positioniereinrichtung **28** bzw. die Elektroden **29**, **30**, **31** sind derart angeordnet oder ausgebildet, dass Zellen bzw. Immunzellen dielektrophoretisch in dem mindestens einen Reaktionsraum **21** positionierbar sind. Hierbei weist die zu dem Reaktionsraum **21** nächstliegende Elektrode **31** im Bereich des Reaktionsraumes **21** bzw. der Zugangsöffnung **26** eine Umlenkung **32** auf. Die Umlenkung **32** ist in Richtung des Reaktionsraumes **21** bzw. der Zugangsöffnung **26** ausgebildet. Bei diesem Ausführungsbeispiel ist die Umlenkung **32** als eine Art Auswölbung der Elektrode **31** realisiert. Alternativ kann die Umlenkung **32** eine im Wesentlichen C-, U- oder V-förmige Ausbildung aufweisen. Bei diesem Ausführungs-

rungsbeispiel ragt die Umlenkung **32** teilweise in den Bereich der Zugangsöffnung **26** hinein. Bei mehreren nebeneinander angeordneten Reaktionsräumen **21** kann die am nächsten zu den Reaktionsräumen **21** angeordnete Elektrode mäanderartig ausgebildet sein. Hierbei ergibt sich jeweils im Bereich der Reaktionsräume **21** eine Wölbung in Richtung des Reaktionsraumes **21** und in Bereichen der Trennelemente **25** jeweils eine Wölbung von den Trennelementen **25** weg.

[0045] Aufgrund der Umlenkung **32** ist zwischen der die Umlenkung **32** aufweisenden Elektrode **31** und der hierzu nächst benachbarten Elektrode **30** ein Referenzraum **33** gebildet. Aufgrund der dielektrophoretischen Wirkung der Positioniereinrichtung **28** ist realisierbar, dass keine Zellen bzw. Immunzellen innerhalb des Referenzraumes **33** und nur in dem Reaktionsraum **21** positionierbar sind. Zugleich kann mindestens ein Allergen mittels des Mikrokanals **27** sowohl in den Reaktionsraum **21** als auch in den Referenzraum **33** geführt werden. Alternativ kann das mindestens eine Allergen nur in den Reaktionsraum **21** und nicht in den Referenzraum **33** geleitet werden.

[0046] Der Reaktionsraum **21** und der Referenzraum **33** sind mittels Fensterflächen **22**, **23**, wie in **Fig. 1** gezeigt, direkt und/oder optisch beobachtbar. Der Referenzraum **33** ermöglicht eine Beobachtung von sich überlagerndem Licht, das durch den Reaktionsraum **21** bzw. durch den Referenzraum **33** hindurch läuft. Ein erster Teil des sich überlagernden Licht kann durch den Reaktionsraum **21** und ein weiterer Teil des sich überlagernden Lichts kann durch den Referenzraum **33** hindurchlaufen. Hierdurch ist eine quantitative Phasenkontrastmikroskopie ermöglicht.

[0047] **Fig. 3** zeigt ein schematisches Ablaufdiagramm für ein erfindungsgemäßes Verfahren. Nachfolgend wird das Verfahren unter Berücksichtigung der Vorrichtung **10** und des mikrofluidischen Chips **20** gemäß **Fig. 1** und **Fig. 2** näher erläutert.

[0048] Nach einem Start des Verfahrens gemäß Schritt S 10 wird mit Schritt S 11 eine Blutprobe entnommen. Beispielsweise kann eine Blutprobe von einer Person bzw. einem Patienten in üblicher Weise mittels einer Nadel bzw. Spritze entnommen werden. Hierbei reichen jedoch für das erfindungsgemäße Verfahren vergleichsweise geringe Blutmengen aus. Insbesondere ist eine Blutprobenmenge von weniger als 50 ml, weniger als 20 ml oder weniger als 1 ml ausreichend.

[0049] Anschließend wird die Blutprobe gemäß Schritt S 12 präpariert. Bei diesem Ausführungsbeispiel wird im Rahmen der Präparation der Blutprobe ein Zusatzmittel der Blutprobe zugeführt, um eine Blutgerinnung zu vermeiden. Des Weiteren wird

im Rahmen der Präparation der Blutprobe der prozentuale Anteil der zu untersuchenden Immunzellen in der Blutprobe erhöht. Bei diesem Ausführungsbeispiel werden hierzu rote Blutkörperzellen mittels an sich bekannter Verfahren aus der Blutprobe entfernt. Des Weiteren können nicht relevante weiße Blutkörperzellen ebenfalls mit an sich bekannten Verfahren entfernt werden. Bei diesem Ausführungsbeispiel erfolgt eine Isolierung oder Erhöhung des Anteils von basophilen Zellen in der Blutprobe. Vorliegend ist eine Erhöhung des Anteils von basophilen Zellen in der Blutprobe in einem Bereich von 10% bis 20% ausreichend. Anschließend wird die Blutprobe bzw. werden die Zellen in einem geeigneten Medium suspendiert, um die Zellen für eine vorgegebene Zeit, insbesondere bis zu 24 Stunden, am Leben zu erhalten.

[0050] Anschließend wird die Blutprobe gemäß Schritt S 13 auf oder in einen mikrofluiden Chip **20** appliziert. Hierbei kann der mikrofluidische Chip **20** derart ausgebildet sein, dass die Blutprobe bzw. die zu untersuchenden Immunzellen mittels Kapillarkräften in den mikrofluidischen Chip **20** geführt werden. Alternativ kann die Blutprobe bzw. können die Immunzellen mittels einer geeigneten Einrichtung in den mikrofluidischen Chip **20** gepumpt werden.

[0051] Sodann erfolgt ein Positionieren von Immunzellen in mindestens einem Reaktionsraum **21** gemäß Schritt S 14. Hierbei kann das Positionieren mittels geeignet ausgebildeter Zellenfallen, Mikrokanäle, einer elektrophoretischen oder dielektrophoretischen Positioniereinrichtung **28** erfolgen. Bei diesem Ausführungsbeispiel werden jeweils mehrere Immunzellen in einem Reaktionsraum **21** mittels der dielektrophoretischen Positioniereinrichtung **28** angeordnet. Des Weiteren werden Immunzellen in mehrere Reaktionsräume **21** geführt und dort mittels der dielektrophoretischen Positioniereinrichtung **28** gehalten.

[0052] Anschließend wird gemäß Schritt S 15 mindestens ein Allergen zugeführt. Bei diesem Ausführungsbeispiel wird mindestens ein Allergen, insbesondere in flüssiger Form, mittels des Mikrokanals **27** in den Reaktionsraum **21** und den zugehörigen Referenzraum **33** geführt.

[0053] Gemäß Schritt S 16 wird ein optisches Überwachen der Immunzellen durchgeführt. Hierbei kann das optische Überwachen bereits vor dem Zuführen des mindestens einen Allergens, zusammen mit dem Zuführen des mindestens einen Allergens oder unmittelbar nach dem Zuführen des mindestens einen Allergens, gestartet werden. Bei diesem Ausführungsbeispiel erfolgt ein optisches Überwachen mittels der Mikroskopiereinrichtung **11**. Bei diesem Ausführungsbeispiel ist die optische Überwachung als eine quantitative Phasenkontrastmikroskopie realisiert. Hierbei werden mittels der Mikroskopiereinrichtung **11** Granula der Immunzellen direkt und/oder optisch

beobachtet. Insbesondere wird für eine vorgegebene Zeit von 60 Sekunden bis 300 Sekunden oder länger beobachtet, ob nach einer Kontaktierung der Immunzellen mit dem mindestens einen Allergen eine Degranulation erfolgt. Hierzu kann die Mikroskopiereinrichtung **11** eine digitale Bildaufzeichnung bzw. eine digitale Bildaufnahme ermöglichen. Im Rahmen der durchgeführten Beobachtung bzw. Überwachung werden mehrere Immunzellen in unterschiedlichen Ebenen bzw. Höhenebenen des mindestens einen Reaktionsraumes **21** beobachtet.

[0054] Anschließend erfolgt gemäß Schritt S 17 eine Auswertung der optischen Beobachtung bzw. Überwachung. Sofern nach dem Kontaktieren der Immunzellen mit dem mindestens einen Allergen eine Degranulation beobachtet wird, wird dies als eine allergische Reaktion klassifiziert. Findet dagegen keine beobachtbare Degranulation statt, wird dies als eine nicht-allergische Reaktion aufgefasst.

[0055] Sodann endet das Verfahren gemäß Schritt S 18.

Bezugszeichenliste

10	Vorrichtung
11	Mikroskopiereinrichtung
12	Objektiveinrichtung
13	Sensoreinrichtung
14	Computer
15	Datenleitung
16	Lichtquelle
17	optische Achse
18	Linseneinrichtung
19	Lichtstrahl
20	mikrofluidischer Chip
21	Reaktionsraum
22	Fensterfläche
23	Fensterfläche
24	Fokus
25	Trennelement
26	Zugangsöffnung
27	Mikrokanal
28	dielektrophoretische Positioniereinrichtung
29	Elektrode
30	Elektrode
31	Elektrode
32	Umlenkung
33	Referenzraum

Patentansprüche

1. Verfahren zum Durchführen eines Allergietests, bei dem eine Blutprobe entnommen wird, und bei dem die Blutprobe mit mindestens einem Allergen in vitro kontaktiert wird, **dadurch gekennzeichnet**, dass mindestens eine allergische Reaktion oder ein Ausbleiben der mindestens einen allergischen Reak-

tion mittels einer Mikroskopiereinrichtung (**11**) direkt und/oder optisch beobachtet wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass bei einer allergischen Reaktion eine Degranulation von Immunzellen, insbesondere Granulozyten, basophilen Zellen, basophilen Granulozyten und/oder Mastzellen, der Blutprobe mit der Mikroskopiereinrichtung (**11**) beobachtet wird, vorzugsweise wird aufgrund der direkten und/oder optischen Beobachtung der Immunzellen bei Kontaktierung mit dem mindestens einen Allergen ein Ausbleiben der Degranulation als nicht-allergische Reaktion und ein Stattfinden der Degranulation als eine allergische Reaktion klassifiziert.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass nach der Entnahme der Blutprobe und vor dem Kontaktieren mit dem mindestens einen Allergen die Blutprobe zum Erhöhen des Anteils an Immunzellen präpariert wird, insbesondere wird der prozentuale Anteil von Immunzellen in der Blutprobe auf mehr als 5%, mehr als 20% oder höher erhöht, vorzugsweise wird der Anteil an roten Blutzellen und/oder an von Immunzellen, insbesondere von Granulozyten, basophilen Zellen, basophilen Granulozyten und/oder Mastzellen, verschiedenen weißen Blutzellen reduziert.

4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass ein mikrofluidischer Chip (**20**) zum Kontaktieren der Blutprobe mit dem mindestens einen Allergen verwendet wird, insbesondere werden Immunzellen der Blutprobe in mindestens einem Reaktionsraum (**21**) des mikrofluidischen Chips (**20**) angeordnet, vorzugsweise ist der mindestens eine Reaktionsraum (**21**) und/oder mindestens ein Referenzraum (**33**) des mikrofluidischen Chips (**20**) mindestens teilweise transparent ausgebildet.

5. Verfahren nach Anspruch 4, **dadurch gekennzeichnet**, dass mindestens ein Allergen in den mindestens einen Reaktionsraum (**21**) geführt wird, insbesondere wird das mindestens eine Allergen sowohl in den mindestens einen Reaktionsraum (**21**) mit den Immunzellen als auch in einen Referenzraum (**33**) ohne Immunzellen geführt, vorzugsweise ist jedem Reaktionsraum (**21**) jeweils ein Referenzraum (**33**) zugeordnet.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 4 oder 5, **dadurch gekennzeichnet**, dass Immunzellen der Blutprobe mittels einer mikrofluidischen Zellenfalle, einer Elektrophorese und/oder einer Dielektrophorese auf oder in dem mikrofluidischen Chip (**20**) angeordnet werden, insbesondere werden Immunzellen mittels der Elektrophorese und/oder Dielektrophorese in mindestens einem Reaktionsraum (**21**) positioniert und/oder gehalten, vorzugsweise wird mindes-

tens ein Referenzraum (33) mittels der Elektrophorese und/oder Dielektrophorese frei von Immunzellen bereit gestellt.

7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass mittels der Mikroskopiereinrichtung (11) die Position und/oder eine Positionsveränderung von Granula von Immunzellen direkt und/oder optisch beobachtet wird, insbesondere werden Granula in verschiedenen Ebenen oder Höhenebenen beobachtet, vorzugsweise wird mit der Mikroskopiereinrichtung (11) eine, insbesondere digitale, holografische Mikroskopie, eine Shearografie und/oder eine quantitative Phasenkontrastmikroskopie realisiert.

8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass mittels der Mikroskopiereinrichtung (11) lebende Immunzellen der Blutprobe identifiziert werden, insbesondere wird die Identifizierung lebender Immunzellen automatisiert durchgeführt, vorzugsweise werden ausschließlich als lebend identifizierte Immunzellen bei der Beobachtung und/oder der Auswertung einer Reaktion der Immunzellen bei einer Kontaktierung mit dem mindestens einen Allergen berücksichtigt.

9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass eine Position von Granula in Immunzellen, eine Bewegung der Granula und/oder eine Degranulation für eine Beobachtungszeit von bis zu 10 Minuten oder für eine Beobachtungszeit von 60 Sekunden bis 300 Sekunden beobachten wird, insbesondere wird die Beobachtungszeit mit dem Kontaktieren der Blutprobe mit dem mindestens einen Allergen in Gang gesetzt, vorzugsweise werden während der Beobachtungszeit mehrere Reaktionsräume (21) eines mikrofluidischen Chips (20) in vorgegeben Zeitabständen mehrfach aufeinander folgend beobachtet.

10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Beobachtung und/oder Auswertung automatisiert durchgeführt wird, insbesondere wird eine digitale Bildaufzeichnung zum Beobachten einer Reaktion der Blutprobe auf das Kontaktieren mit dem mindestens einen Allergen und/oder eine Bildverarbeitungssoftware zum Bereitstellen und/oder Auswerten von Bildaufnahmen eingesetzt.

11. Verfahren zum Bestimmen einer Degranulation bei Zellen, insbesondere mit einem Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem eine Blutprobe entnommen wird, und bei dem die Blutprobe mit mindestens einem Reaktionspartner in vitro kontaktiert wird, **dadurch gekennzeichnet**, dass eine Degranulation oder ein Ausbleiben der Degranulation mittels einer Mikroskopiereinrichtung (11) direkt und/oder optisch beobachtet wird, insbesondere

erfolgt die Bestimmung der Degranulation aufgrund einer Beobachtung und/oder Messung eines quantitativen Phasenkontrastes.

12. Vorrichtung zum Durchführen eines Allergietests mit einem Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, mit einer Mikroskopiereinrichtung (11) und mit einem mindestens teilweise transparenten mikrofluidischen Chip (20) zum direkten und/oder optischen Beobachten einer allergischen Reaktion oder zum Beobachten des Ausbleibens einer allergischen Reaktion.

13. Vorrichtung nach Anspruch 12, **dadurch gekennzeichnet**, dass der mikrofluidische Chip (20) mindestens einen Reaktionsraum (21), insbesondere mehrere Reaktionsräume (21), hat, insbesondere weist der mikrofluidische Chip (20) im Bereich des mindestens einen Reaktionsraumes (21) transparente Fensterflächen (22, 23) auf zwei voneinander abgewandten Seiten auf, vorzugsweise ist jedem Reaktionsraum (21) ein Referenzraum (33), insbesondere mit transparenten Fensterflächen (22, 23) auf zwei voneinander abgewandten Seiten, zugeordnet.

14. Vorrichtung nach Anspruch 13, **dadurch gekennzeichnet**, dass der mindestens eine Reaktionsraum (21) und/oder ein Referenzraum (33) eine Grundfläche oder auf zwei voneinander abgewandten Seiten jeweils eine transparente Fensterfläche (22, 23) von 100 µm mal 100 µm hat, insbesondere hat der mindestens eine Reaktionsraum (21) und/oder der Referenzraum (33) eine Höhe von weniger als 1 mm und/oder weniger als 100 µm.

15. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 12 bis 14, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Mikroskopiereinrichtung (11) ein, insbesondere digitales, holografisches Mikroskop, ein Shearografie-Mikroskop und/oder ein Phasenkontrastmikroskop aufweist, insbesondere ist der mikrofluidische Chip (20) zwischen einer Lichtquelle (16) und einer Objektivierung (12) angeordnet, vorzugsweise ist die Mikroskopiereinrichtung (11) mit einem Computer (14) zum Darstellen, Aufzeichnen und/oder Auswerten von Bildern und/oder Daten verbunden.

16. Mikrofluidischer Chip, insbesondere für eine Vorrichtung (10) nach einem der Ansprüche 12 bis 15, mit Elektroden (29, 30, 31) zum elektrophoretischen und/oder dielektrophoretischen Positionieren von Immunzellen in mindestens einem Reaktionsraum (21), insbesondere ist aufgrund einer Gestalt und/oder Ausrichtung mindestens einer Elektrode (31) benachbart zu dem Reaktionsraum (21) ein Referenzraum (33) gebildet, vorzugsweise weist die strangförmige Elektrode (31) zum Ausbilden des Referenzraumes (33) eine Umlenkung (32) und/oder einen Bogen auf.

17. Verwendung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 11 und/oder einer Vorrichtung (**10**) nach einem der Ansprüche 12 bis 16 zum Durchführen eines Allergietests.

Es folgen 3 Seiten Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

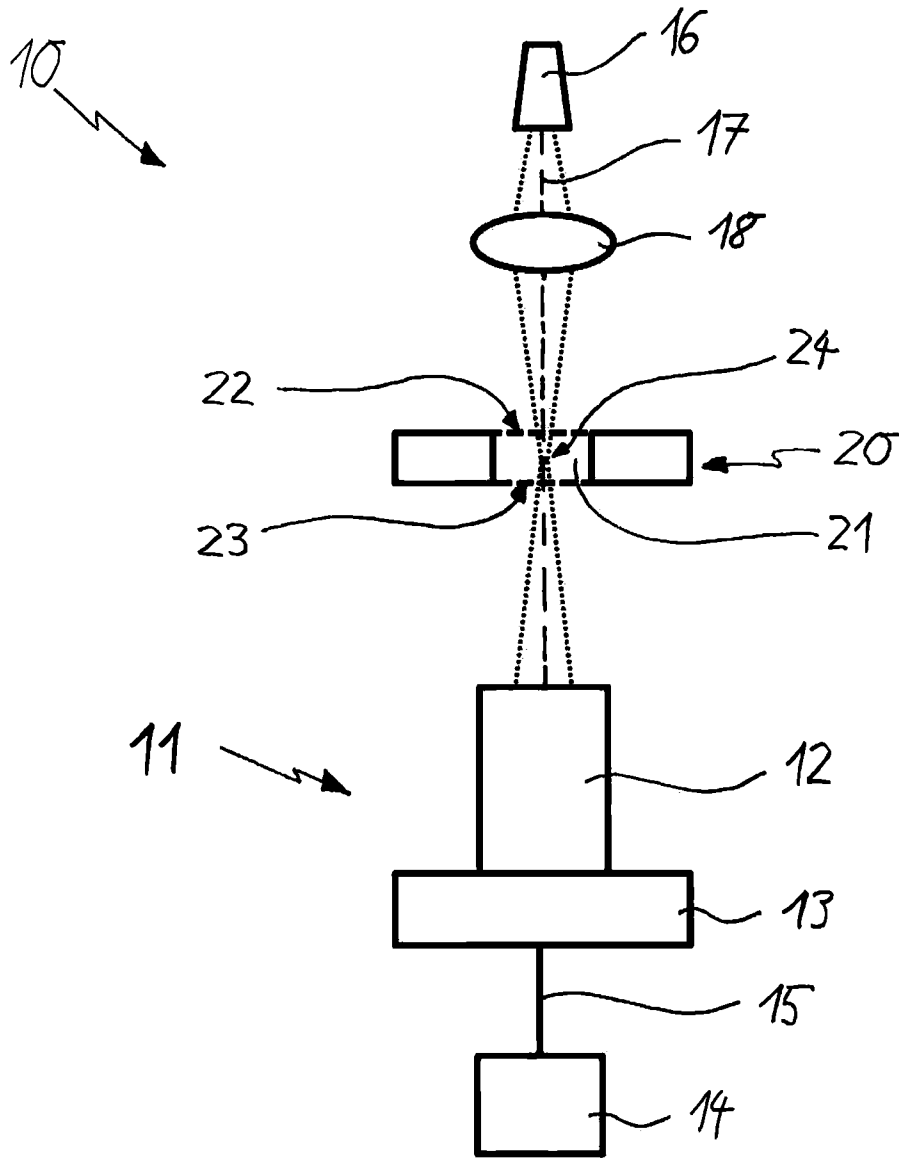


Fig. 1

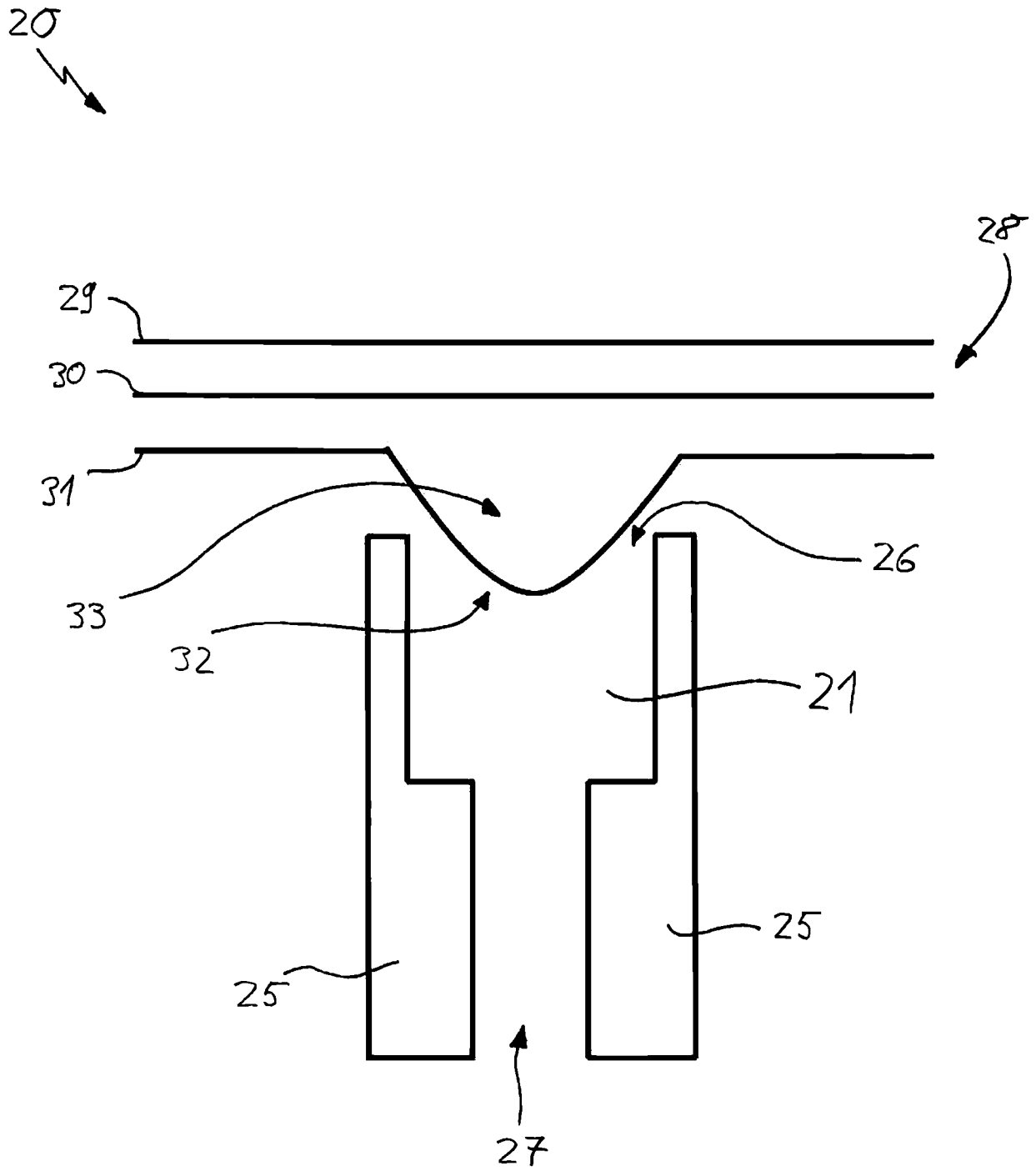


Fig. 2

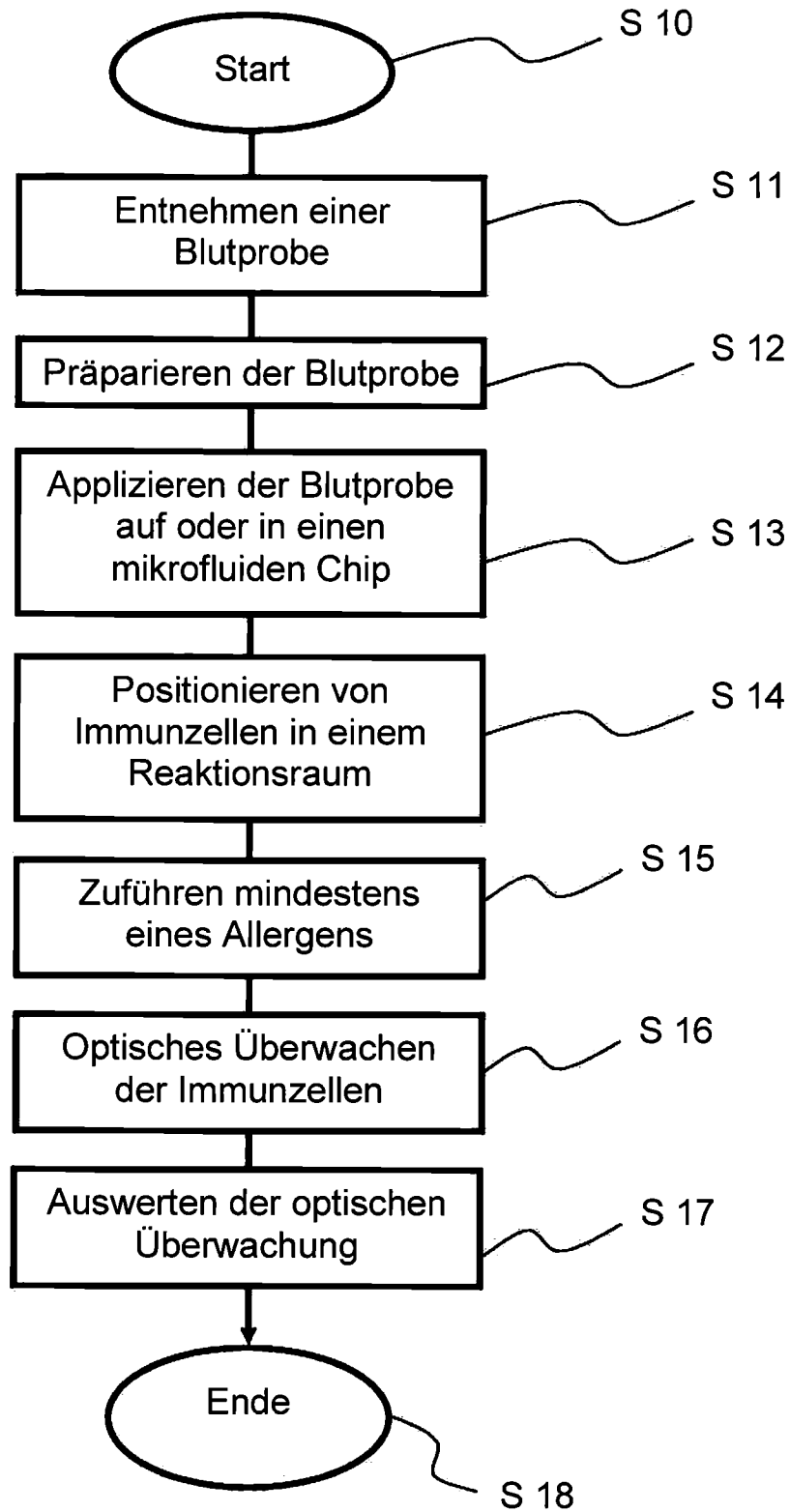


Fig. 3