

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

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
22. März 2018 (22.03.2018)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2018/050749 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation: **G01N 33/50** (2006.01)
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2017/073144
- (22) Internationales Anmeldedatum: 14. September 2017 (14.09.2017)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität: 10 2016 117 421.1
15. September 2016 (15.09.2016) DE
- (71) Anmelder: UNIVERSITÄT BREMEN [DE/DE]; Bibliothekstr. 1, 28359 Bremen (DE). MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT WIEN [—/AT]; Spitalgasse 23, 1090 Wien (AT).
- (72) Erfinder: VAN DEN DRIESCHE, Sander; Gartenallee 39a, 28359 Bremen (DE). VELLEKOOP, Michael; Riensberger Str. 60, 28359 Bremen (DE). FALLDORF, Claas; Henriettenstr. 1, 28205 Bremen (DE). HAFNER, Christiane; Heumühlgasse 12/10, 1040 Wien (AT). BREITENDER, Heimo; Kandlgasse 9/23, 1070 Wien (AT).
- (74) Anwalt: ZACCO DR. PETERS & PARTNER; Am Wall 187 - 189, 28195 Bremen (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT,

(54) Title: METHOD FOR CARRYING OUT AN ALLERGY TEST, METHOD FOR DETERMINING DEGRANULATION IN CELLS, DEVICE FOR CARRYING OUT AN ALLERGY TEST AND MICROFLUIDIC CHIP

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM DURCHFÜHREN EINES ALLERGIE TESTES, VERFAHREN ZUM BESTIMMEN EINER DEGRANULATION BEI ZELLEN, VORRICHTUNG ZUM DURCHFÜHREN EINES ALLERGIE TESTES UND MIKROFLUIDISCHER CHIP

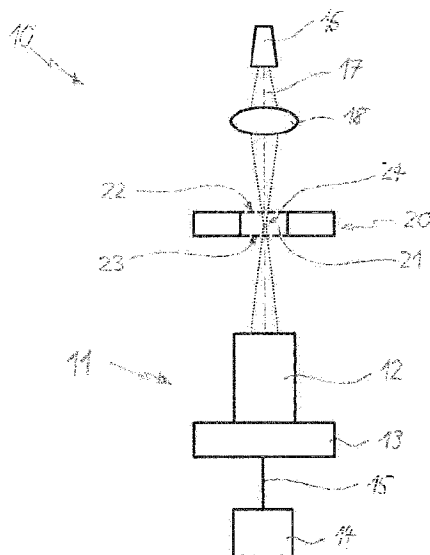


Fig. 1

(57) Abstract: The invention relates to a method for carrying out an allergy test in which a blood sample is taken, the blood sample being brought into in vitro contact with at least one allergen and in which at least one allergic reaction or an absence of the at least one allergic reaction is directly and/or optically observed by means of a microscopic device (11). In order to be able to carry out an allergy test with higher conclusive evidence and/or improved accuracy, the method is characterized in that the position of the granules is observed using the microscopic device (11), the granules being observed in different planes or height planes.

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

WO 2018/050749 A1

LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI,
SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN,
GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- *mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)*
- *vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eingehen (Regel 48 Absatz 2 Buchstabe h)*

Verfahren zum Durchführen eines Allergietests, Verfahren zum Bestimmen einer Degranulation bei Zellen, Vorrichtung zum Durchführen eines Allergietestes und mikrofluidischer Chip

B e s c h r e i b u n g :

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Durchführen eines Allergietests, bei dem eine Blutprobe entnommen wird, bei dem die Blutprobe mit mindestens einem Allergen in vitro kontaktiert wird, und bei dem mindestens eine allergische Reaktion oder ein Ausbleiben der mindestens einen allergischen Reaktion mittels einer

5 Mikroskopiereinrichtung direkt und/oder optisch beobachtet 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

10 mit einem mindestens teilweise transparenten mikrofluidischen Chip zum direkten und/oder optischen Beobachten einer allergischen Reaktion oder zum Beobachten des Ausbleibens einer allergischen Reaktion sowie einen mikrofluidischen Chip.

Im Rahmen der vorliegenden Anmeldung wird der Begriff Blutprobe synonym verwendet für eine direkte Blutprobe oder ein Serum aus einer direkten Blutprobe, das mit Zellen von speziellen Zelllinien versetzt oder in Kontakt gebracht wurde. Die speziellen Zelllinien können vor allem humanisierte, insbesondere Rattenzellen und/oder Meerschweinchenzellen sein.

Entsprechende Verfahren zum Durchführen eines Allergietests sind als Blutttests 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. 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.

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.

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.

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.

Es ist daher die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe, ein Verfahren, eine
5 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.

10 Die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe wird mit einem Verfahren der eingangs genannten Art zum Durchführen eines Allergietests gelöst, bei dem mittels der Mikroskopiereinrichtung die Position von Granula beobachtet wird, wobei die Granula in verschiedenen Ebenen oder Höhenebenen beobachtet werden. Bei dem Verfahren
15 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 die Mikroskopiereinrichtung zum Erzeugen eines
20 holographischen Bildes ausgebildet ist.

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
25 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
30 einer Allergie verzichtet werden. Zudem kann eine direkte und/oder optische Beobachtung einer allergischen Reaktion die Realisierung eines genaueren, schnelleren und/oder kostengünstigeren Allergietests ermöglichen.

Vorzugsweise ist im Rahmen der vorliegenden Anmeldung unter einem direkten
35 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,
40 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
5 und/oder kostengünstiger realisierbar.

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.
10 Hierbei sind die Immunzellen Bestandteile der Blutprobe. Die Blutprobe kann dabei eine direkte Blutprobe sein oder ein Serum aus einer direkten Blutprobe, das mit Zellen von speziellen Zelllinien versetzt oder in Kontakt gebracht wurde. Vorzugsweise handelt es sich bei den Immunzellen um Granulozyten, basophile Zellen, basophile Granulozyten und/oder Mastzellen. Insbesondere werden Granula von Zellen
15 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
20 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.
25 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.

30 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
35 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
40 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.

Vorzugsweise wird im Rahmen der Präparation der Blutprobe der Anteil an roten
5 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
10 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
15 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
20 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.

Nach einer weiteren Ausführungsform wird ein mikrofluidischer Chip zum Kontaktieren
25 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
30 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,
35 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
40 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 ein 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.

- 5 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
- 10 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
- 15 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
- 20 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
- 25 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.

- Vorzugsweise werden die Immunzellen der Blutprobe mittels eines geeigneten
- 30 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,
- 35 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
- 40 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.
- 5
- 10 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
- 15 derart gesteuert werden, dass der Bereich des Referenzraumes zellfrei wird und/oder bleibt. Auf diese Weise kann der Immunzellen-freie Referenzraum mit dem Immunzellen enthaltenden mindestens einen Reaktionsraum optisch überlagert werden. Hierdurch kann ein quantitativer Phasenkontrast der Immunzellen interferometrisch gemessen werden. Insbesondere überlagert sich das Licht, das mindestens teilweise
- 20 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
- 25 Schwingungsisolierung verzichtet werden.

- 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
- 30 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
- 35 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
- 40 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.

Die Mikroskopiereinrichtung kann insbesondere zum Erzeugen eines holographischen Bildes ausgebildet sein. 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.

5 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

10 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

15 ermöglicht die Mikroskopiereinrichtung die Ermittlung eines quantitativen Phasenkontrastes.

Nach einer weiteren, auch eigenständig und unabhängig von der vorliegenden Erfindung denkbaren, Ausführungsform werden mittels der Mikroskopiereinrichtung

20 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

25 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.

30 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

35 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.

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

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.

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 Licht kann durch einen Reaktionsraum mit der mindestens einen Zelle und ein weiterer Teil des sich überlagernden Lichts kann durch einen Referenzraum ohne Zellen hindurchlaufen.

Die Mikroskopiereinrichtung kann zum Erzeugen eines holographischen Bildes ausgebildet sein.

5 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 und die Mikroskopiereinrichtung zum Erzeugen eines holographischen Bildes ausgebildet ist. Gegebenenfalls kann die Mikroskopiereinrichtung nur relevante Teile, insbesondere
10 eine Objektivereinrichtung, eine Sensoreinrichtung und/oder eine Linseneinrichtung, einer üblichen Mikroskopiereinrichtung aufweisen. Hierdurch kann eine besonders kompakte Ausbildung oder Gestaltung der Vorrichtung realisierbar sein. Insbesondere ist mittels der Vorrichtung eine allergische Reaktion oder ein Ausbleiben einer allergischen Reaktion beobachtbar.

15 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
20 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
25 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
30 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
35 Referenzraumes. Die Fensterflächen können jeweils mittels einer Glasschicht gebildet sein. Hierbei kann eine einzige oder einzelne Glasschicht eine Seite des mikrofluidischen Chips abdecken.

40 Vorzugsweise hat der mindestens eine 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 eine Reaktionsraum und/oder der Referenzraum eine Höhe von weniger als 1 mm und/oder
5 weniger als $100 \mu\text{m}$.

Nach einer weiteren Ausführungsform weist die Mikroskopiereinrichtung ein, insbesondere digitales, holographisches Mikroskop oder ein Shearographie-Mikroskop auf. Vorzugsweise hat die Mikroskopiereinrichtung ein quantitatives
10 Phasenkontrastmikroskop. Insbesondere ist der mikrofluidische Chip zwischen einer Lichtquelle und einer Objektivereinrichtung angeordnet. Die Lichtquelle kann als eine LED oder ein Laser ausgebildet sein. Der mikrofluidische Chip kann an einer Trageinrichtung befestigt sein. Die Lichtquelle einerseits und die Objektivereinrichtung und/oder die Mikroskopiereinrichtung andererseits können, ausgehend von dem
15 mikrofluidischen Chip, in zwei voneinander abgewandten Bereichen angeordnet sein. Des Weiteren kann die Objektivereinrichtung 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
20 und/oder Auswerten von Bildern und/oder Daten ausgebildet sein. Insbesondere lässt sich mittels eines Computers eine automatisierte Beobachtung und/oder Auswertung realisieren.

Von besonderem Vorteil und auch unabhängig sowie eigenständig zu der vorliegenden
25 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.
30 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
35 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
40 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.

Von besonderem Vorteil ist eine Verwendung eines erfindungsgemäßen Verfahrens, einer erfindungsgemäßen 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.

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

Fig. 1 eine schematische Seitenansicht einer erfindungsgemäßen Vorrichtung,

Fig. 2 einen schematischen Ausschnitt einer Draufsicht auf einen erfindungsgemäße mikrofluidischen Chip, und

Fig. 3 ein schematisches Ablaufdiagramm für ein erfindungsgemäßes Verfahren.

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. Insbesondere kann die Mikroskopiereinrichtung 11 dabei zum Erzeugen eines holographischen Bildes ausgebildet sein. Des Weiteren weist die Mikroskopiereinrichtung 11 bei diesem Ausführungsbeispiel eine Objektivereinrichtung 12 und eine Sensoreinrichtung 13 auf. Die Sensoreinrichtung 13 kann als ein Detektor und/oder als ein Bildsensor, insbesondere ein CCD-Sensor, ausgebildet sein.

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.

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.

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.

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 Objektiveneinrichtung 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.

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.

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
5 werden.

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
10 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.

15 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. Dabei kann der Begriff Blutprobe für eine direkte Blutprobe stehen oder für ein Serum aus einer direkten Blutprobe, das mit Zellen von
20 speziellen Zelllinien versetzt oder in Kontakt gebracht wurde.

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
25 Allergen in den Reaktionsraum 21 führbar. Bei diesem Ausführungsbeispiel sind die Zugangsöffnungen 26 und der Mikrokanal 27 an voneinander abgewandt liegenden 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
30 angeordneter Trennelemente 25 ausgebildet.

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
35 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
40 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 Ausführungsbeispiel 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.

10

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.

Der Reaktionsraum 21 und der Referenzraum 33 sind mittels Fensterflächen 22, 23, wie in Figur 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.

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 Figuren 1 und 2 näher erläutert.

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.

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
5 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.

10

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 Kapilarkräften in den mikrofluidischen Chip 20 geführt werden. Alternativ kann die Blutprobe bzw.
15 können die Immunzellen mittels einer geeigneten Einrichtung in den mikrofluidischen Chip 20 gepumpt werden.

Sodann erfolgt ein Positionieren von Immunzellen in mindestens einem Reaktionsraum 21 gemäß Schritt S 14. Hierbei kann das Positionieren mittels geeignet ausgebildeter
20 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
25 Positioniereinrichtung 28 gehalten.

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
30 Referenzraum 33 geführt.

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
35 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
40 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. Dazu kann die

5 Mikroskopiereinrichtung 11 insbesondere zum Erzeugen eines holographischen Bildes ausgebildet sein.

Anschließend erfolgt gemäß Schritt S 17 eine Auswertung der optischen Beobachtung bzw. Überwachung. Sofern nach dem Kontaktieren der Immunzellen mit dem

10 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.

Sodann endet das Verfahren gemäß Schritt S 18.

15

Bezugszeichenliste:

- 10 Vorrichtung
- 11 Mikroskopiereinrichtung
- 12 Objektivereinrichtung
- 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, bei dem die Blutprobe mit mindestens einem Allergen in vitro kontaktiert wird, und bei dem mindestens eine allergische Reaktion oder ein Ausbleiben der mindestens einen allergischen Reaktion mittels einer
5 Mikroskopiereinrichtung (11) direkt und/oder optisch beobachtet wird, dadurch gekennzeichnet, dass mittels der Mikroskopiereinrichtung (11) die Position von Granula beobachtet wird, wobei die Granula in verschiedenen Ebenen oder Höhenebenen beobachtet werden.
- 10 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
15 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.
- 20 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
25 Granulozyten, basophilen Zellen, basophilen Granulozyten und/oder Mastzellen, verschiedenen weißen Blutzellen reduziert.
- 30 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.
35
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.

- 5
10
15
20
25
30
35
40
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 mindestens 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, 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.

- 5 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, 10 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) 15 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, dadurch gekennzeichnet, dass die Mikroskopiereinrichtung (11) zum Erzeugen eines holographischen Bildes ausgebildet ist.
- 20 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 25 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.
- 30 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 35 Höhe von weniger als 1 mm und/oder weniger als 100 µm.
- 40 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 Objektivereinrichtung (12) angeordnet, vorzugsweise ist die Mikroskopiereinrichtung (11) mit einem

Computer (14) zum Darstellen, Aufzeichnen und/oder Auswerten von Bildern und/oder Daten verbunden.

- 5 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.
- 10
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.
- 15

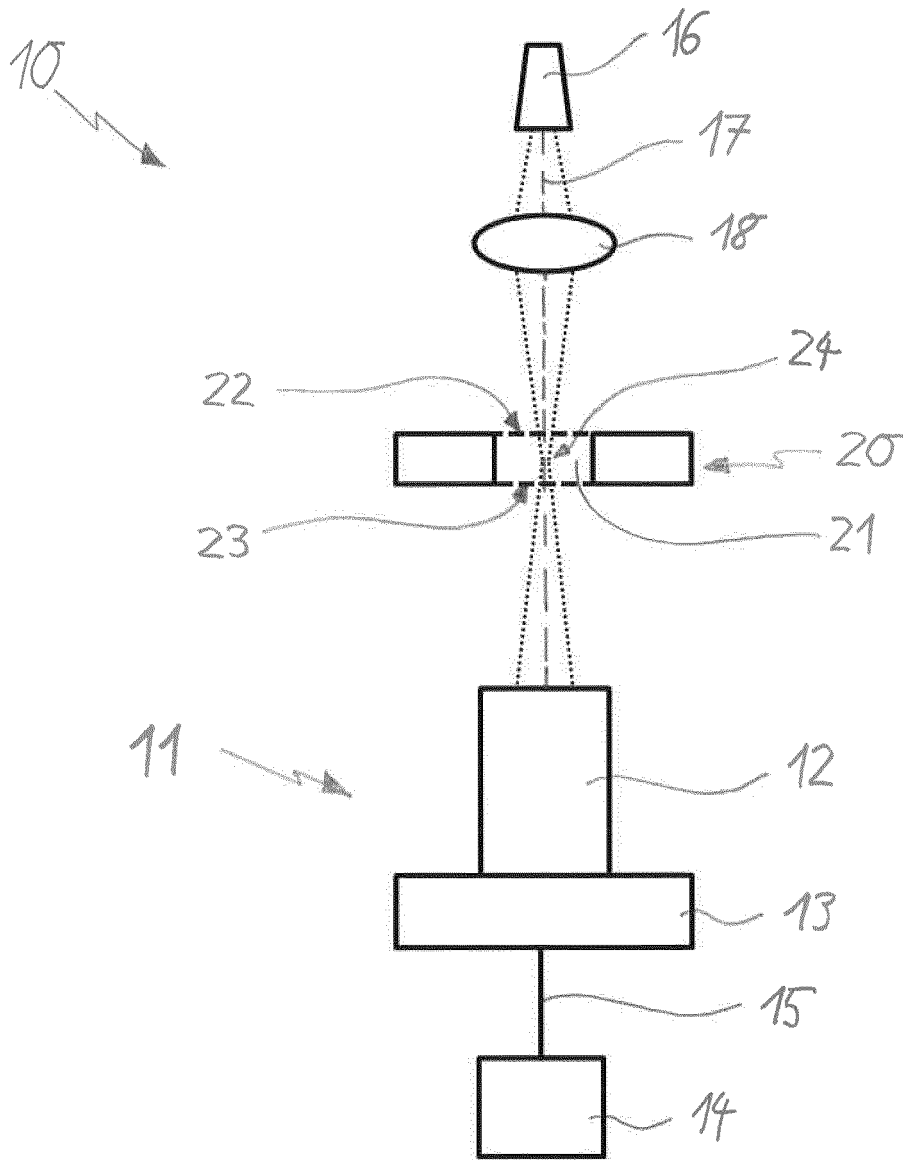


Fig. 1

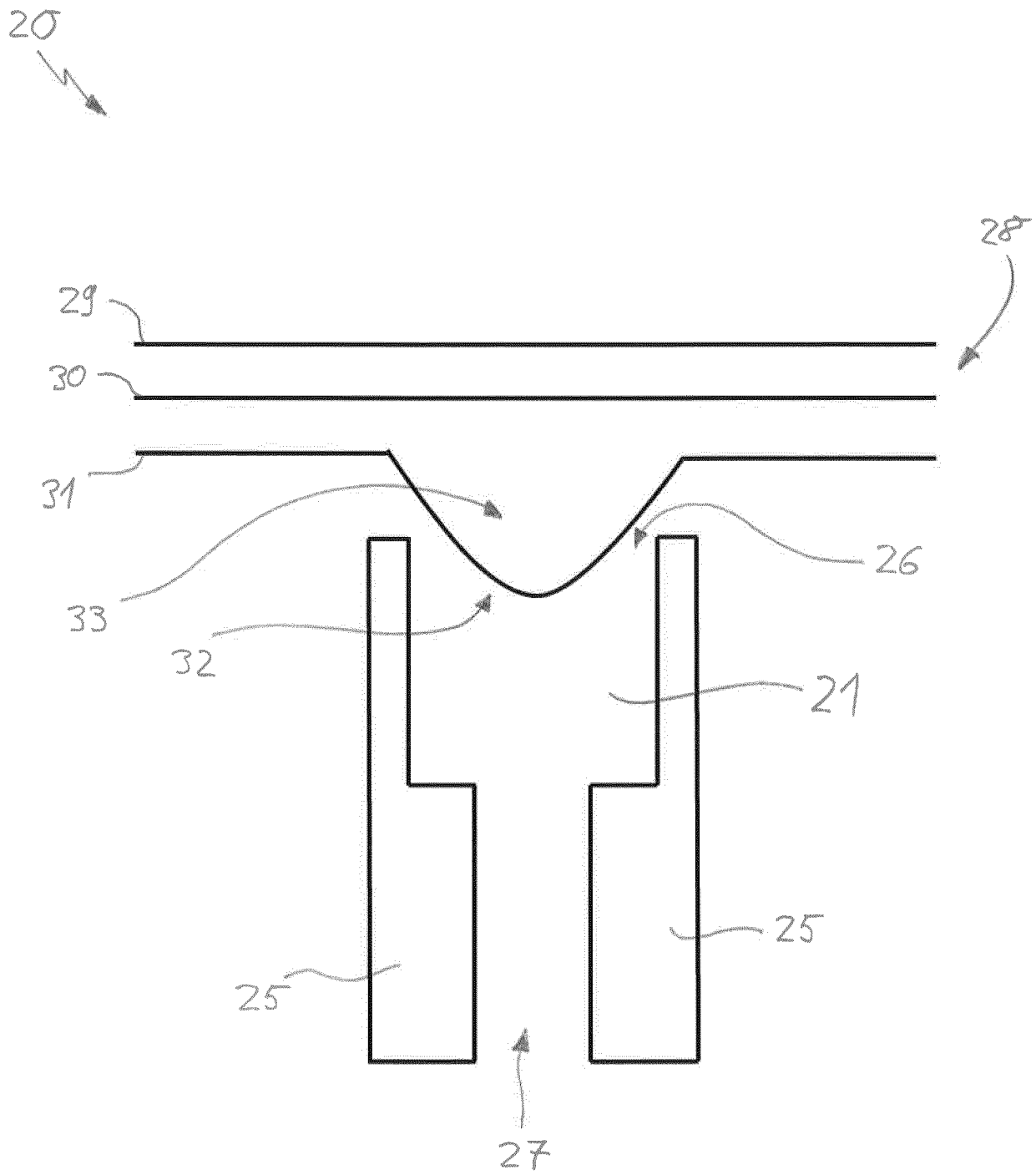


Fig. 2

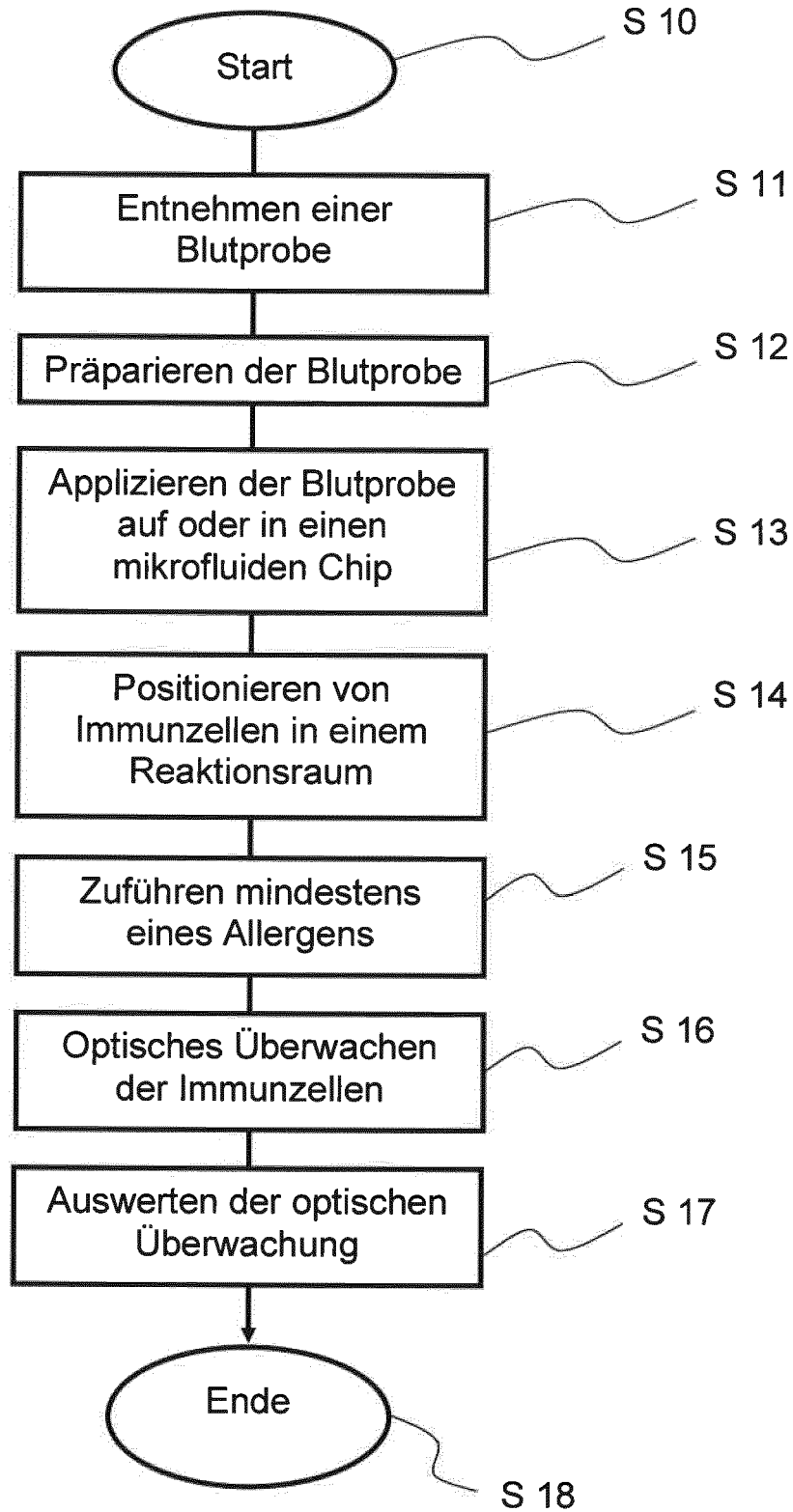


Fig. 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2017/073144

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. G01N33/50
ADD.
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
G01N B01L G02B

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| X | R Hastie: "The antigen-induced degranulation of basophil leucocytes from atopic subjects, studied by phase-contrast microscopy", Clinical and experimental immunology, vol. 8 1 January 1971 (1971-01-01), pages 45-61, XP055429915, Retrieved from the Internet: URL:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1712904/pdf/clinexpimmuno100374-0053.pdf | 11,17 |
| Y | das ganze Dokument, insbesondere Zusammenfassung; Seite 46, Absätze "Antigen" und "Blood donors"; Seite 54, Zeilen 15-23; Abbildungen 1, 2, 4 ----- -/-- | 1-5,7-10 |

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

| | |
|---|--|
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance | "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention |
| "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date | "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone |
| "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art |
| "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means | "&" document member of the same patent family |
| "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | |

| | |
|---|---|
| Date of the actual completion of the international search 1 December 2017 | Date of mailing of the international search report 12/02/2018 |
|---|---|

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2017/073144

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|--|-----------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | L. A. S. CARMO ET AL: "CD63 is tightly associated with intracellular, secretory events chaperoning piecemeal degranulation and compound exocytosis in human eosinophils", JOURNAL OF LEUKOCYTE BIOLOGY, vol. 100, no. 2, 10 March 2016 (2016-03-10), pages 391-401, XP055428147, US ISSN: 0741-5400, DOI: 10.1189/jlb.3A1015-480R das ganze Dokument, insbesondere Seite 392, Spalte 2, Zeilen 3-4; Abbildungen 2-5 ----- | 11 |
| X | M KUROSAWA ET AL: "Phase-contrast microscopic studies using cinematographic techniques and scanning electron microscopy on IgE-mediated degranulation of cultured human mast cells", CLINICAL & EXPERIMENTAL ALLERGY, vol. 28, no. 8, 1 August 1998 (1998-08-01) , pages 1007-1012, XP055429964, das ganze Dokument, insbesondere Zusammenfassung; Seite 1008, Spalte 1, Zeilen 23-28; Seite 1009, Spalte 2, Zeilen 25-35; Seite 1011, letzter Absatz der Diskussion; Abbildung 1 ----- | 11 |
| X | R. SHER ET AL: "Eosinophil degranulation : Monitoring by interference contrast microscopy", INFLAMMATION., vol. 5, no. 1, 1 March 1981 (1981-03-01), pages 37-53, XP055428794, US ISSN: 0360-3997, DOI: 10.1007/BF00910778 das ganze Dokument, insbesondere Zusammenfassung; Abbildungen 1, 2 ----- | 11 |
| Y | DE 10 2014 200911 A1 (SIEMENS AG [DE]) 9 April 2015 (2015-04-09) das ganze Dokument, insbesondere Absatz [0064]; Ansprüche 1, 11 ----- | 1-5,7-10 |
| A | WO 93/25904 A1 (NUTRON LIMITED; PRICE THOMAS GAIRDNER [GB]; STOAKES IAN [GB]) 23 December 1993 (1993-12-23) Ansprüche 1-4 ----- | 1-5,7-10 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2017/073144

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

- 1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

- 2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

- 3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see supplemental sheet

- 1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
- 2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
- 3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

- 4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-5, 7-11 (in full); 17 (in part)

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

The International Searching Authority has found that the international application contains multiple (groups of) inventions, as follows:

1. Claims 1-5, 7-11 (in full); 17 (in part)

Method for carrying out an allergy test, in which a blood sample is taken, the blood sample being brought into in vitro contact with at least one allergen and in which at least one allergic reaction or an absence of the at least one allergic reaction is directly and/or optically observed by means of a microscopic device (11), characterized in that the position of the granules is observed using the microscopic device (11), the granules being observed in different planes or height planes. Corresponding general method for determining a degranulation in cells.

2. Claims 12-15 (in full); 17 (in part)

Device comprising a microscopic device (11) and an at least partially transparent microfluidic chip (20), characterized in that the microscopic device (11) is designed to generate a holographic image. The device should be suitable to carry out an allergy test, in which the position of the granules within the cells can be observed, i.e. the microscopic device merely has to have an appropriate resolution and the chip has to have the corresponding dimensions. Use for carrying out an allergy test.

3. Claims 6, 16 (in full); 17 (in part)

Microfluidic chip having electrodes (29, 30, 31) for the electrophoretic and/or dielectrophoretic positioning of immune cells in at least one reaction space (21). Use for carrying out an allergy test.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2017/073144

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|--|------------------|-------------------------|------------------|
| DE 102014200911 A1 | 09-04-2015 | CN 105659068 A | 08-06-2016 |
| | | DE 102014200911 A1 | 09-04-2015 |
| | | EP 3042177 A1 | 13-07-2016 |
| | | US 2016231225 A1 | 11-08-2016 |
| | | WO 2015052046 A1 | 16-04-2015 |
| ----- | | | |
| WO 9325904 A1 | 23-12-1993 | AU 4341693 A | 04-01-1994 |
| | | BR 9306499 A | 15-09-1998 |
| | | CA 2137160 A1 | 23-12-1993 |
| | | EP 0643831 A1 | 22-03-1995 |
| | | JP H08500437 A | 16-01-1996 |
| | | WO 9325904 A1 | 23-12-1993 |
| ----- | | | |

| | | |
|---|---|--------------------|
| A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES INV. G01N33/50 ADD. | | |
| Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC | | |
| B. RECHERCHIERTER GEBIETE | | |
| Recherchiertes Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) G01N B01L G02B | | |
| Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen | | |
| Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data | | |
| C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN | | |
| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
| X | R Hastie: "The antigen-induced degranulation of basophil leucocytes from atopic subjects, studied by phase-contrast microscopy", Clinical and experimental immunology, Bd. 8 1. Januar 1971 (1971-01-01), Seiten 45-61, XP055429915, Gefunden im Internet: URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1712904/pdf/clinexpimmuno100374-0053.pdf | 11,17 |
| Y | das ganze Dokument, insbesondere Zusammenfassung; Seite 46, Absätze "Antigen" und "Blood donors"; Seite 54, Zeilen 15-23; Abbildungen 1, 2, 4 ----- -/-- | 1-5,7-10 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie | | |
| * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" frühere Anmeldung oder Patent, die bzw. das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist | | |
| Datum des Abschlusses der internationalen Recherche | Absendedatum des internationalen Recherchenberichts | |
| 1. Dezember 2017 | 12/02/2018 | |
| Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016 | Bevollmächtigter Bediensteter Weber, Peter | |

| C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN | | |
|---|---|--------------------|
| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
| X | L. A. S. CARMO ET AL: "CD63 is tightly associated with intracellular, secretory events chaperoning piecemeal degranulation and compound exocytosis in human eosinophils", JOURNAL OF LEUKOCYTE BIOLOGY, Bd. 100, Nr. 2, 10. März 2016 (2016-03-10) , Seiten 391-401, XP055428147, US ISSN: 0741-5400, DOI: 10.1189/jlb.3A1015-480R das ganze Dokument, insbesondere Seite 392, Spalte 2, Zeilen 3-4; Abbildungen 2-5 ----- | 11 |
| X | M KUROSAWA ET AL: "Phase-contrast microscopic studies using cinematographic techniques and scanning electron microscopy on IgE-mediated degranulation of cultured human mast cells", CLINICAL & EXPERIMENTAL ALLERGY, Bd. 28, Nr. 8, 1. August 1998 (1998-08-01) , Seiten 1007-1012, XP055429964, das ganze Dokument, insbesondere Zusammenfassung; Seite 1008, Spalte 1, Zeilen 23-28; Seite 1009, Spalte 2, Zeilen 25-35; Seite 1011, letzter Absatz der Diskussion; Abbildung 1 ----- | 11 |
| X | R. SHER ET AL: "Eosinophil degranulation : Monitoring by interference contrast microscopy", INFLAMMATION., Bd. 5, Nr. 1, 1. März 1981 (1981-03-01), Seiten 37-53, XP055428794, US ISSN: 0360-3997, DOI: 10.1007/BF00910778 das ganze Dokument, insbesondere Zusammenfassung; Abbildungen 1, 2 ----- | 11 |
| Y | DE 10 2014 200911 A1 (SIEMENS AG [DE]) 9. April 2015 (2015-04-09) das ganze Dokument, insbesondere Absatz [0064]; Ansprüche 1, 11 ----- | 1-5,7-10 |
| A | WO 93/25904 A1 (NUTRON LIMITED; PRICE THOMAS GAIRDNER [GB]; STOAKES IAN [GB]) 23. Dezember 1993 (1993-12-23) Ansprüche 1-4 ----- | 1-5,7-10 |

Feld Nr. II Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein internationaler Recherchenbericht erstellt:

1. Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche diese Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich

2. Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, dass eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich

3. Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefasst sind.

Feld Nr. III Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Diese Internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, dass diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1. Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.

2. Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung solcher Gebühren aufgefordert.

3. Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.

4. Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Dieser internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfasst:
1-5, 7-11(vollständig); 17(teilweise)

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- Der Anmelder hat die zusätzlichen Recherchegebühren unter Widerspruch entrichtet und die gegebenenfalls erforderliche Widerspruchsgebühr gezahlt.
- Die zusätzlichen Recherchegebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt, jedoch wurde die entsprechende Widerspruchsgebühr nicht innerhalb der in der Aufforderung angegebenen Frist entrichtet.
- Die Zahlung der zusätzlichen Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, dass diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: 1-5, 7-11(vollständig); 17(teilweise)

Verfahren zum Durchführen eines Allergietests, bei dem eine Blutprobe entnommen wird, bei dem die Blutprobe mit mindestens einem Allergen in vitro kontaktiert wird, und bei dem mindestens eine allergische Reaktion oder ein Ausbleiben der mindestens einen allergischen Reaktion mittels einer Mikroskopiereinrichtung (11) direkt und/oder optisch beobachtet wird, dadurch gekennzeichnet, dass mittels der Mikroskopiereinrichtung (11) die Position von Granula beobachtet wird, wobei die Granula in verschiedenen Ebenen oder Höhenebenen beobachtet werden. Entsprechendes allgemeines Verfahren zum Bestimmen einer Degranulation bei Zellen.

2. Ansprüche: 12-15(vollständig); 17(teilweise)

Vorrichtung umfassend eine Mikroskopiereinrichtung (11) und einen mindestens teilweise transparenten mikrofluidischen Chip (20), dadurch gekennzeichnet, dass die Mikroskopiereinrichtung (11) zum Erzeugen eines holographischen Bildes ausgebildet ist. Die Vorrichtung sollte geeignet sein einen Allergietest durchzuführen, bei dem die die Position von Granula innerhalb von Zellen beobachtbar sind, d.h. die Mikroskopiereinrichtung muss lediglich eine entsprechende Auflösung besitzen und der Chip entsprechende Ausmaße. Verwendung zur Durchführung eines Allergietests.

3. Ansprüche: 6, 16(vollständig); 17(teilweise)

Mikrofluidischer Chip mit Elektroden (29, 30, 31) zum elektrophoretischen und/oder dielektrophoretischen Positionieren von Immunzellen in mindestens einem Reaktionsraum (21). Verwendung zur Durchführung eines Allergietests.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2017/073144

| Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument | Datum der Veröffentlichung | Mitglied(er) der Patentfamilie | Datum der Veröffentlichung |
|--|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| DE 102014200911 A1 | 09-04-2015 | CN 105659068 A | 08-06-2016 |
| | | DE 102014200911 A1 | 09-04-2015 |
| | | EP 3042177 A1 | 13-07-2016 |
| | | US 2016231225 A1 | 11-08-2016 |
| | | WO 2015052046 A1 | 16-04-2015 |
| ----- | | | |
| WO 9325904 A1 | 23-12-1993 | AU 4341693 A | 04-01-1994 |
| | | BR 9306499 A | 15-09-1998 |
| | | CA 2137160 A1 | 23-12-1993 |
| | | EP 0643831 A1 | 22-03-1995 |
| | | JP H08500437 A | 16-01-1996 |
| | | WO 9325904 A1 | 23-12-1993 |
| ----- | | | |