

(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
1. Oktober 2015 (01.10.2015)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2015/144608 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation:
B01L 3/00 (2006.01) **G01N 15/14** (2006.01)
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2015/056040
- (22) Internationales Anmeldedatum:
23. März 2015 (23.03.2015)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
10 2014 205 535.0 25. März 2014 (25.03.2014) DE
- (71) Anmelder: **SIEMENS AKTIENGESELLSCHAFT**
[DE/DE]; Wittelsbacherplatz 2, 80333 München (DE).
- (72) Erfinder: **HAYDEN, Oliver**; Dachsweg 4 a, 91074
Herzogenaurach (DE). **KAPPEL, Andreas**; Königsteiner
Str. 10a, 61479 Glashütten (DE). **SCHMIDT, Oliver**;
Petra-Kelly-Weg 32, 91052 Erlangen (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,

AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW,
BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME,
MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ,
OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA,
SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM,
ZW.

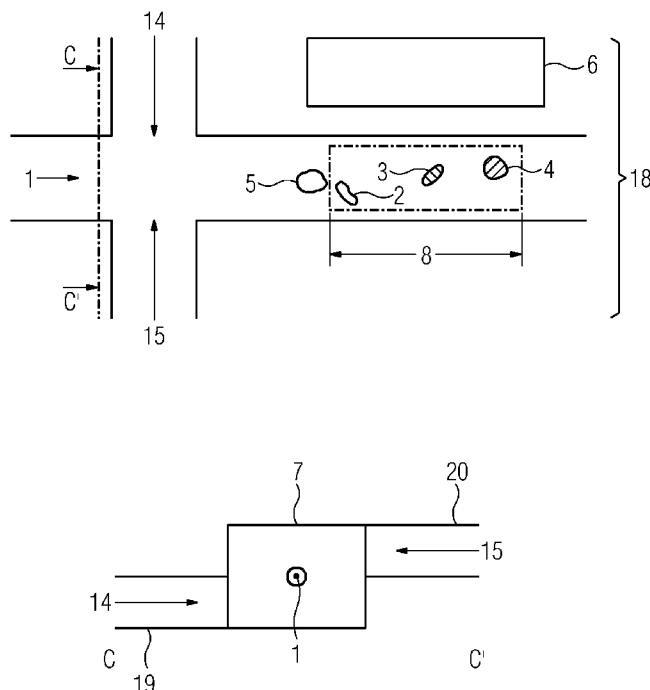
(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST,
SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG,
KZ, RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH,
CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR,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

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: DEVICE AND IN VITRO METHOD FOR THE MARKING-FREE IMAGING AND ANALYSIS OF CELLS AND CRYSTALS IN A BIOLOGICAL SAMPLE

(54) Bezeichnung : VORRICHTUNG UND IN-VITRO VERFAHREN ZUR MARKIERUNGSFREIEN DARSTELLUNG UND ANALYSE VON ZELLEN UND KRISTALLEN IN EINER BIOLOGISCHEN PROBE

FIG 2



(57) Abstract: The invention relates to an in vitro method and to a cell imaging device for imaging cells, in particular cell topographies, or crystals in a biological sample. A biological sample solution having at least one cell or at least one crystal is conducted into a microfluidic channel. The cell or the crystal is caused to rotate in the microfluidic channel. Then two images of the same cell or the same crystal following one another in time are produced from different orientations by means of a microscopy device.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein in-vitro-Verfahren und eine Zelldarstellungsvorrichtung zur Darstellung von Zellen, insbesondere von Zelltopographien, oder von Kristallen in einer biologischen Probe. Eine biologische Probelösung mit wenigstens einer Zelle oder wenigstens einem Kristall wird in einen mikrofluidischen Kanal geführt. Die Zelle oder der Kristall wird im mikrofluidischen Kanal zum Rotieren gebracht. Es werden dann zwei zeitlich aufeinander folgende Bilder derselben Zelle oder desselben Kristalls aus unterschiedlichen Orientierungen mittels einer Mikroskopiervorrichtung erzeugt.



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)

Beschreibung

Vorrichtung und in-vitro Verfahren zur markierungsfreien Darstellung und Analyse von Zellen und Kristallen in einer biologischen Probe

Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung und ein in-vitro Verfahren zur markierungsfreien Darstellung und Analyse von Zelltopographien und Zelltypen unter Verwendung einer Mikroskopiervorrichtung.

Die Darstellung von biologischen Proben, insbesondere von Zellen, Bakterien oder Partikeln in Suspension ist von besonderer Bedeutung, wenn diese Proben identifiziert, klassifiziert und ggf. sortiert werden müssen.

Insbesondere das Bestimmen von Zellen und deren Zuordnung zu einem Zelltyp ist in der Zytologie von großer Bedeutung. In hämatologischen Untersuchungen werden beispielsweise zelluläre Blutkomponenten, wie Erythrozyten, Thrombozyten und weiße Blutzellen bestimmt und quantifiziert. Die weißen Blutzellen werden nach granulären Zellen, wie beispielsweise Neutrophile, Eosinophile und Basophile, und nach nicht granulären Zellen, beispielsweise Lymphozyten oder Monozyten differenziert. Rote Blutkörperchen werden je nach Reife in Reticulozyten und reife Erythrozyten eingeteilt.

Für die Differenzierung von granulären Zellen, insbesondere von Eosinophilen und Basophilen, wird eine Färbung eingesetzt. Die Auswertung der Zellpopulationen erfolgt üblicherweise durch vollautomatisierte Hämatologie-Analysatoren oder durch Mikroskopie. Die Analyse in vollautomatisierten Analysatoren erfolgt nach festgesetzten Algorithmen. Dies führt jedoch dazu, dass in Proben mit pathologischen Populationen Fehlermeldungen angezeigt werden. Daher werden im nächsten Schritt üblicherweise Mikroskopaufnahmen der Zellen als Validierungsmethode ausgewertet. Dieser Schritt ist aufwendig und kostenintensiv, da er in der Probenvorbereitung, Mikroskopie

und weiteren Bearbeitungsschritten manuelle Bewertung erfordert.

Eine Analyse von unterschiedlichen Zelltypen ist ebenfalls in
5 der Urinanalyse nötig. Die Urinsedimentanalyse ist eine etablierte in-vitro Diagnostikmethode zur Bestimmung von Nierenstörungen und Störungen des Urogenitaltraktes. Die Urinprobe wird typischerweise zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment wieder resuspendiert. Anschließend wird die
10 Probe mittels eines Phasenkontrastmikroskops untersucht. Weiterhin können zelluläre Elemente mittels der Sternheimer-Malvin-Färbung dargestellt werden. Mit polarisiertem Licht ist es möglich, doppelbrechende Elemente, wie beispielsweise Harnsäurekristalle, Lipidtröpfchen oder ovale Fettkörnchen
15 nachzuweisen. Auch hier müssen die Probenvorbereitung, Mikroskopie und weitere Arbeitsschritte inklusive der Auswertung manuell erfolgen. Dies ist aufwendig und kostenintensiv.

Auch in der quantitativen Blutzellldiagnostik kann auf ein Hämatologie-Analysator verzichtet werden und stattdessen jede
20 Einzelzelle mikroskopiert werden. Dann ist es möglich, das Blutbild unabhängig von festen Algorithmen quantitativ zu bestimmen. Von Nachteil ist allerdings, dass der Probendurchsatz deutlich geringer als bei einem Hämatologie-Analysator
25 ist. Weiterhin bleibt der Aufwand, die Zellen auf Objektträgern zu immobilisieren und zu färben weiterhin bestehen.

Die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe ist folglich das Bereitstellen eines effizienten und zeitsparenden Verfahrens
30 zum Darstellen von Zellen und Kristallen in biologischen Proben.

Diese Aufgabe wird von dem erfindungsgemäßen Verfahren und der erfindungsgemäßen Zelldarstellungsvorrichtung gemäß den
35 unabhängigen Patentansprüchen gelöst. Vorteilhafte Weiterbildungen der Erfindung sind durch die Unteransprüche gegeben.

Das erfindungsgemäße in-vitro-Verfahren zur Darstellung von Zellen, insbesondere von Zelltopographien, oder von Kristallen in einer biologischen Probe erfolgt in mehreren Schritten. Eine biologische Probelösung mit wenigstens einer Zelle und/oder wenigstens einem Kristall wird in einen mikrofluidischen Kanal geführt. Die Zelle und/oder der Kristall wird im mikrofluidischen Kanal mittels einer ersten Vorrichtung zum Rotieren gebracht. Es werden dann zwei zeitlich aufeinander folgende Bilder derselben Zelle und/oder des Kristalls mittels einer Mikroskopiervorrichtung erzeugt.

Die Erfindung umfasst weiterhin eine Zelldarstellungsvorrichtung zur Analyse von Zellen und/oder Kristallen in einer biologischen Probe. Diese Zelldarstellungsvorrichtung umfasst einen mikrofluidischen Kanal zum Aufnehmen der biologischen Probe, eine erste Vorrichtung zur Initiierung einer Rotation einer biologischen Zelle und/oder eines Kristalls im mikrofluidischen Kanal, und eine Mikroskopiervorrichtung zum Abbilden der Zelle und/oder des Kristalls. Die Mikroskopiervorrichtung ist derart ausgebildet, dass sie wenigstens zwei Bilder derselben Zelle und/oder desselben Kristalls erzeugen kann.

Vorteilhaft ist es mittels des erfindungsgemäßen Verfahrens und der Zelldarstellungsvorrichtung möglich, die Zelle und/oder Kristalle aus unterschiedlichen Perspektiven darzustellen, insbesondere zu fotografieren. Somit können Kristalle und Zellen, insbesondere pathologisch veränderte Zellen, analysiert und klassifiziert werden. Urinproben umfassen typischerweise Kristalle. Es ist bei Urinproben ebenso möglich, dass sowohl Zellen, wie beispielsweise rote oder weiße Blutkörperchen, als auch Kristalle in einer biologischen Probe auftreten. In Blutproben sind typischerweise ausschließlich Zellen unterschiedlicher Zelltypen enthalten, welche analysiert werden. Ein Zell- oder Kristallnachweis ist ausschließlich aufgrund der morphologischen Beschaffenheit der Zelle oder des Kristalls möglich. Die Rotation insbesondere der Zelle in Kombination mit einer Mikroskopiervorrichtung ermög-

licht das Abbilden der Zelle mit dem optischen System aus verschiedenen Orientierungen. Die Zellen sind somit gut differenzierbar, insbesondere nach einer Rekonstruktion. Insbesondere Zellen mit optisch auffälligen dreidimensionalen

5 Strukturen, wie beispielsweise ausgeprägten Organellen, Granulae oder spezielle Zellformen wie Erythrozyten und Megakariozyten, lassen sich aus verschiedenen Winkeln darstellen, wobei die Mikroskopiervorrichtung fixiert ist.

10 Die Zellen oder Kristalle verbleiben in ihrer nativen Umgebung, wodurch vorteilhaft Artefakte von beispielsweise Trocknung und Färbung verhindert werden. Dies ermöglicht eine schnelle und wenig aufwendige Probenpräparation, die idealerweise für Point-of-Care-Anwendungen einsetzbar ist. Für die

15 Analyse von Urin ist keine Sedimentationsanalyse notwendig. Bereits mit einem geringen Probenvolumen können Zellen und/oder Kristalle im Urin in ihrer nativen Umgebung analysiert werden, da sie aus verschiedenen Richtungen abgebildet werden.

20 In einer vorteilhaften Ausgestaltung und Weiterbildung der Erfindung wird eine dreidimensionale Abbildung einer Zelloberfläche, d. h. der Zelltopographie der Zelle, oder eine Kristalloberfläche aus den wenigstens zwei Bildern der Zelle

25 mittels einer Prozessoreinheit berechnet. Vorteilhaft ermöglicht das dreidimensionale Modell der Zelle eine Klassifizierung in beispielsweise pathologische und nicht-pathologische Zelltypen. Weiterhin ist die Unterscheidung reifer Erythrozyten und Reticulozyten möglich.

30 In einer weiteren vorteilhaften Ausgestaltung und Weiterbildung der Erfindung wird die Rotation der Zelle hydrodynamisch mittels einer gezielten Strömung initiiert. Diese gezielte Strömung ist insbesondere eine Wirbelströmung, die die Zelle

35 in Relation zur Mikroskopiervorrichtung rotiert, derart, dass die Mikroskopiervorrichtung die Zelle oder den Kristall aus unterschiedlichen Perspektiven aufnehmen kann ohne ihre eigene Position zu verändern. Die Zellen oder im Fall der Urinana-

lyse auch die Kristalle, werden berührungslos manipuliert und können somit vorteilhaft in ihrer nativen Umgebung verbleiben. Die Rotation ist insbesondere durch die Strömungsgeschwindigkeit der biologischen Probe durch den mikrofluidischen Kanal einzustellen. Vorteilhaft werden weiterhin Zentrifugationsaggregate, insbesondere von Kristallen, bei der Urinsedimentationsanalyse vermieden. Durch das kontinuierliche Führen von biologischer Probe durch den mikrofluidischen Kanal, kann die Analyse vorteilhafterweise solange dauern, bis eine minimale Anzahl von partikulären Komponenten des Urins oder Bluts analysiert ist. In Abhängigkeit der Durchflussgeschwindigkeit kann anschließend auf insbesondere die Erythrozytenzahl zur Klassifizierung zurückgeschlossen werden.

In einer weiteren vorteilhaften Ausgestaltung der Erfindung wird die Strömung mittels wenigstens eines Strömungshinders im mikrofluidischen Kanal erzeugt. Ebenso kann die Strömung mithilfe der Zufuhr einer Trägerflüssigkeit in einem bestimmten Winkel zu der Längsachse des mikrofluidischen Kanals erzeugt werden. Dieser Winkel ist insbesondere ein rechter Winkel.

In einer weiteren vorteilhaften Ausgestaltung und Weiterbildung der Erfindung werden die Zellen ungefärbt analysiert. Sie können somit vorteilhaft in ihrer nativen Umgebung ohne Artefakte von Trocknung und Färbung analysiert werden. Daher ist vorteilhaft eine kontinuierliche Analyse von Probelösung im mikrofluidischen Kanal möglich.

In einer weiteren vorteilhaften Ausgestaltung und Weiterbildung der Erfindung ist die Mikroskopiervorrichtung ein digital-holographisches Mikroskop. Der Einsatz eines digital-holographischen Mikroskops erlaubt es, die Phaseninformation des Objekts quantitativ zu erfassen. Diese Mikroskopiemethode ermöglicht eine besonders hohe axiale Auflösung. Axial bedeutet in der Richtung der optischen Achse des Mikroskops. Eine digital-holographische Mikroskopie ermöglicht ei-

ne Auflösung von bis zu einem Nanometer in z-Richtung. Dies entspricht einer Präzision, die um einen Faktor 100 bis 1000 höher liegt als mit anderen bekannten lichtmikroskopischen Verfahren. Aufgrund der präzisen Ermittlung eines Dickenpro-

5 fils der Zelle gegenüber dem umgebenden Medium ist eine genauere Bestimmung des Zelltyps möglich. Als umgebendes Medium wird hier insbesondere die Trägerflüssigkeit im mikrofluidischen Kanal bezeichnet.

10 Der Einsatz des digital-holographischen Mikroskops ist weiterhin besonders für das Fokussieren von sich in Rotation befindlichen Objekten von großem Vorteil. Da die Position der Zelle oder des Kristalls in z-Richtung, d.h. entlang der optischen Achse des Mikroskops, nicht genau bekannt ist, kann

15 die Zelle nachträglich durch Computer-Rekonstruktion des aufgenommenen Hologramms fokussiert werden. Dadurch wird ein aufwändiger Autofokus wie er bei einem herkömmlichen Mikroskop nötig wäre, vermieden. Weiterhin ermöglicht das nachträgliche, digitale Fokussieren das Berechnen unterschiedli-

20 cher Foki für unterschiedliche laterale Positionen im Bildfeld. Das bedeutet, es können sich mehrere Zellen und/oder Kristalle gleichzeitig im Bildfeld des Mikroskops befinden und zeitgleich abgebildet werden. Insbesondere können sie auch dann abgebildet werden, wenn sich die Zellen nicht in

25 einer Fokusebene befinden. Der Einsatz eines Konfokal-Mikroskops zur Rekonstruktion der Zellen wird somit vermieden. Ebenso wird vorteilhaft der Einsatz eines Polarisierers vermieden.

30 Das digital-holographische Mikroskop kann optional mit Leuchtdioden (LEDs) oder Laserdioden verschiedener Wellenlänge ausgerüstet sein. Dann können die Parameter Brechungsindex und physikalische Dicke der Objekte, insbesondere der Zellen, voneinander getrennt werden.

35 In einer weiteren vorteilhaften Ausgestaltung und Weiterbildung der Erfindung ist das digital-holographische Mikroskop ein linsenfreies Mikroskop. Auf vorteilhafte Weise können

dann mehrere mikrofluidische Kanäle auf einer Analyseeinheit, beispielsweise einem Chip, ausgewertet werden. Somit ist ein hoher Durchsatz von biologischen Proben zur Analyse möglich. Diese mehreren Mikrofluid-Kanäle können beispielsweise parallel auf einem Chip angeordnet sein.

In einer weiteren vorteilhaften Ausgestaltung und Weiterbildung der Erfindung umfasst die Zelldarstellungsvorrichtung eine zweite Vorrichtung zum Erfassen von Mie- und/oder Rayleigh-Streuung. Diese Daten können vorteilhaft zusätzlich zur Differenzierung der Objekte, insbesondere der Zellen, herangezogen werden.

In einer weiteren vorteilhaften Ausgestaltung und Weiterbildung der Erfindung sind die Zelle und/oder der Kristall mit einem Farbstoff eingefärbt. Bereits die erste Mikroskopiereinrichtung kann zur Abbildung des Farbstoffs, insbesondere des Fluoreszenzfarbstoffs ausgebildet sein. Alternativ umfasst die Zelldarstellungsvorrichtung eine zweite Mikroskopiervorrichtung als Fluoreszenzmikroskop. Das Einfärben, bzw. Markieren mit spezifischen Markierungen, insbesondere mit Fluorophor oder Streulichtmarkern, insbesondere Gold, und anschließende Analysieren der Zellen ermöglicht ein Differenzieren über die reine Morphologie hinaus. Das Markieren erfolgt insbesondere mittels Antikörpern, welche an spezifische Epitope der Zelle binden. Diese Epitope korrelieren wiederum mit einer Zellfunktionalität. Die Zelldarstellungsvorrichtung mit genau einem ersten Mikroskop zur Abbildung von Farbstoffen kann einen Farbstoff in einer Zelle von verschiedenen Seiten abbilden. Eine Zelldarstellungsvorrichtung mit der ersten und der zweiten Mikroskopiervorrichtung kann insbesondere die Morphologie einer Zelle mit hoher Auflösung in z-Richtung bestimmen und den Farbstoff nachweisen.

Die Erfindung wird nachfolgend anhand eines Ausführungsbeispiels unter Bezugnahme auf die Zeichnungen noch weiter erläutert. Es zeigen schematisch:

- Figur 1 eine schematische Darstellung des mikrofluidischen Kanals mit Mikroskopiervorrichtung und zwei Schnittbilder des mikrofluidischen Kanals,
- 5 Figur 2 ein weiteres schematisches Bild des fluidischen Kanals mit Mikroskopiervorrichtung und einen zweiten Querschnitt des Fluidkanals,
- 10 Figur 3 einen Querschnitt durch den mikrofluidischen Kanal im Bildfeld der mikroskopischen Vorrichtung zum Zeitpunkt t1,
- 15 Figur 4 einen Querschnitt durch den mikrofluidischen Kanal im Bildfeld der Mikroskopiervorrichtung zum Zeitpunkt t2,
- Figur 5 zwei Mikroskopaufnahmen zu den Zeitpunkten t1 und t2.
- 20 Mithilfe des in-vitro-Verfahrens und der Zelldarstellungsvorrichtung zur Analyse von Zellen und Kristallen kann ein markierungsfreies Bestimmen der biologischen Probe erfolgen. Markierungsfrei bedeutet hier, dass die Zellen nicht durch beispielsweise Fluoreszenzfarbstoffe oder radioaktive Partikel markiert werden müssen. Eine biologische Probe kann daher beispielsweise eine Probe tierischer oder pflanzlicher Zellen, bakterieller Zellen und/oder Einzeller umfassen. Weiterhin kann die biologische Probe tierische oder menschliche Urinproben umfassen. In der Blutanalyse handelt es sich vorzugsweise um Vollblutproben, die beispielsweise Blutzellen wie Leukozyten, eosinophile Granulozyten oder basophile Granulozyten umfasst.
- 25
- 30

In diesen Ausführungsbeispielen umfasst die biologische Probe 35 1, hier Blut, einen ersten reifen Erythrozyten 2, einen dysmorphen Erythrozyten 3, einen Leukozyten 4 und einen zweiten Erythrozyten 5. Die biologische Probe 1 wird in den Mikrofluidkanal 7 geführt. Die Zelldarstellungsvorrichtung 18

dieses Beispiels umfasst weiterhin ein digitalholographisches Mikroskop 6. Das Bildfeld 8 des digitalholographischen Mikroskops 6 zeigen die Figuren 3 bis 5.

5 In allen Ausführungsbeispielen wird die biologische Probe 1 mittels des Mikrofluidkanals 7 an dem digitalholographischen Mikroskop 6 vorbeigeführt. Die Zufuhr der biologischen Probe 1 erfolgt somit kontinuierlich in den Mikrofluidkanal 7. Die Figuren 1 und 2 zeigen jeweils Vorrichtungen 10, 11, 19, 20,
10 welche die Zellen in Rotation versetzen.

Figur 1 zeigt ein erstes Strömungshindernis 10 und ein zweites Strömungshindernis 11. Diese sind in einem definierten Abstand zum Bildfeld 8 des Mikroskops 6 angeordnet. Der Abstand ist derart, dass die Rotation der Zellen 2,3,4,5 im
15 Bildfeld 8 erfolgt. Die Schnittbilder AA' und BB' zeigen zwei typische Strömungshindernisse 10 und 11 in dem Mikrofluidkanal 7. Sie sind versetzt zueinander im Mikrofluidkanal 7 angeordnet, um die eine Wirbelströmung der biologischen Probe 1
20 zu erzeugen.

Das erste Strömungshindernis 10, das zweite Strömungshindernis 11 und der mikrofluidische Kanal 7 werden typischerweise aus demselben Material hergestellt. Insbesondere
25 werden die Hindernisse 10, 11 und der mikrofluidische Kanal 7 in demselben Prozessschritt hergestellt. Die Herstellung erfolgt mittels Heiß-Stempeln (engl. „hot embossing“) oder alternativ mittels Spritzgießen. Als Materialien werden transparente Polymere verwendet. Diese Polymere sind typischerweise
30 Polymethylmethacrylat (PMMA), Polyethylen, Polyethylenglycol, Polydimethylsiloxan, Polycarbonate, Polyethylenterephthalat (PET), Polystyrol oder Glas.

Die Dimension der Strömungshindernisse 10, 11 wird derart gewählt, dass sie 20%-50% des Querschnitts des Mikrofluidkanals
35 7 ausfüllen. Die Breite 21 und Höhe 22 der einzelnen Strömungshindernisse 10, 11 beträgt typischerweise wenigstens 10% der Mikrofluidkanalbreite 23. Die typische Mikrofluidkanal-

breite 23 beträgt 50 bis 500 μm . In diesem Beispiel beträgt die Mikrofluidkanalbreite 23 100 μm . Der Abstand der beiden Strömungshindernisse 10, 11 zueinander ist abhängig von der Mikrofluidkanalbreite 23 und liegt typischerweise in einem Bereich von halber bis doppelter Mikrofluidkanalbreite 23. Die Anzahl der Strömungshindernisse kann variieren, beträgt aber wenigstens eins.

Figur 2 zeigt ein zweites Ausführungsbeispiel für die Initiierung der Rotation der Zellen 2,3,4,5. In diesem Ausführungsbeispiel werden eine erste Trägerflüssigkeit 14 mittels des ersten Zuflusskanals 19 und eine zweite Trägerflüssigkeit 15 mittels des zweiten Zuflusskanals 20 in den Mikrofluidkanal 7 geführt. Die Zuflusskanäle sind dabei orthogonal zur Längsachse des Mikrofluidkanals 7 angeordnet. Das Schnittbild CC' des Fluidkanals 7 zeigt, dass die erste Trägerflüssigkeit unterhalb der zweiten Trägerflüssigkeit zugeführt wird. Hierdurch wird eine Verwirbelung der biologischen Probe 1 im Mikrofluidkanal 7 erzeugt. Wiederum ist diese Vorrichtung zur Rotation der Zellen derart im Mikrofluidkanal 7 angeordnet, dass die Zellen besonders im Bildfeld 8 rotieren. Auch hier erfolgt die Zufuhr der biologischen Probe 1 kontinuierlich.

Als Trägerflüssigkeit wird typischerweise Wasser mit isotonischem Salzgehalt verwendet. Das Verhältnis vom Volumen der ersten oder zweiten Trägerflüssigkeit 14, 15 zu dem Volumen der biologischen Probe beträgt wenigstens eins. Alternativ kann auch die biologische Probe selber als Trägerflüssigkeit 14, 15 fungieren. Typischerweise erfolgt das Verfahren unter physiologischen Bedingungen, das heißt die Temperatur beträgt 37°C. Es können aber ebenso Temperaturen in einem Bereich von 1°C bis 99°C, insbesondere von 20°C bis 40°C, für die Analyse der Zellen gewählt werden. Die Strömungsgeschwindigkeiten der Trägerflüssigkeiten 14, 15 und der biologischen Probe 1 betragen in diesem Beispiel 100 $\mu\text{m/s}$. Typischerweise betragen die Strömungsgeschwindigkeiten wenigsten 0,1 $\mu\text{m/s}$ und liegen insbesondere in einem Bereich zwischen 10 $\mu\text{m/s}$ bis 1000 $\mu\text{m/s}$.

Die Figuren 3 und 4 zeigen jeweils das Bildfeld 8 des digitalholographischen Mikroskops 6. Es sind beispielhaft vier Bildebenen 9 des digitalholographischen Mikroskops 6 dargestellt. Eine erste Bildebene 9 soll hier als Beispiel für das
5 Analysieren eines ersten reifen Erythrozyten 2 dienen. Jede beliebige Bildebene ist durch das digitale Fokussieren mit dem digital-holographischen Mikroskop 6 frei wählbar. Dies bedeutet insbesondere, dass eine Zelle 2, 3, 4, 5 nicht in derselben Bildebene bleiben muss. Sie kann durch die rotie-
10 rende Bewegung zu unterschiedlichen Zeiten in unterschiedlichen Bildebenen 9 positioniert sein. Weiterhin können in demselben Bild unterschiedliche Zellen 2,3,4,5 analysiert werden.

15 Die Belichtungszeit der einzelnen Bilder ist typischerweise sehr kurz, um Bewegungsunschärfe zu vermeiden. Der Abstand zweier Bilder sollte derart gewählt sein, dass wenigstens zwei Bilder aufgenommen werden, während die Zelle 2,3,4,5 das Bildfeld 8 passiert. In diesem Beispiel beträgt die Strö-
20 mungsgeschwindigkeit $100\mu\text{m/s}$, die Bildfeldgröße beträgt $200\mu\text{m}$, typisch für ein 40fach Objektiv.

Die Belichtungszeit ist insbesondere kürzer als 1 ms, damit die Bewegungsunschärfe kleiner $1\mu\text{m}$ ist. Der zeitliche Ab-
25 stand zwischen zwei Bildern beträgt weniger als 100ms, insbesondere weniger als 10ms, um mehr als zwei Bilder, d.h. Mikroskopieaufnahmen machen zu können.

Figur 4 zeigt die Position des reifen Erythrozyten 2 zum
30 Zeitpunkt t_2 im Bildfeld 8. Figur 5 zeigt beispielhaft eine erste und eine zweite Mikroskopieaufnahme 16, 17 zu den Zeitpunkten t_1 und t_2 des reifen Erythrozyten 2. Die Bildebene 9 wurde hier also auf den reifen Erythrozyten 2 fokussiert. Mittels einer weiteren Bildebene können in diesem Beispiel
35 auch der dysmorphen Erythrozyt 3 und der Leukozyt 4 abgebildet werden.

Patentansprüche

1. In-vitro Verfahren zur Darstellung von Zellen (2,3,4,5) oder Kristallen in einer biologischen Probe 1 mit folgenden
5 Schritten:

- Führen der biologischen Probe (1) mit wenigstens einer Zelle (2,3,4,5) und/oder einem Kristall in einen mikrofluidischen Kanal (7),
- 10 - Initiieren einer Rotation der Zelle (2,3,4,5) und/oder des Kristalls im mikrofluidischen Kanal (7) mittels einer ersten Vorrichtung (10, 11, 19, 20),
- Erzeugen wenigstens zweier zeitlich aufeinander folgender Bilder (16, 17) derselben Zelle (2, 3, 4, 5) und/oder desselben
15 Kristalls mittels einer Mikroskopiervorrichtung (6).

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei eine dreidimensionale Abbildung einer Zelloberfläche der Zelle (2, 3, 4, 5) oder einer Kristalloberfläche aus den wenigstens zwei Bildern (16,
20 17) der Zelle (2) mittels einer Prozessoreinheit berechnet wird.

3. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei anhand der Bilder ein Zelltyp, insbesondere ein dysmorpher
25 Zelltyp, ermittelt wird.

4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Rotation der Zelle (2, 3, 4, 5) oder des Kristalls hydrodynamisch mittels einer gezielten Strömung, insbesondere Wirbelströmung, der biologischen Probe (1) initiiert wird.
30

5. Verfahren nach Anspruch 4, wobei die Strömung mittels wenigstens eines Strömungshindernisses (10, 11) im mikrofluidischen Kanal (7) erzeugt wird.
35

6. Verfahren nach Anspruch 4 oder 5, wobei die Strömung mit Hilfe der Zufuhr einer Trägerflüssigkeit (14, 15) in einem

bestimmten Winkel, insbesondere rechtwinklig, zu einer Längsachse des mikrofluidischen Kanals (7) erzeugt wird.

7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Zelle (2, 3, 4, 5) und/oder der Kristall ungefärbt analysiert werden.

8. Zelldarstellungsvorrichtung (18) zur Analyse von Zellen (2,3,4,5) und Kristallen in einer biologischen Probe (1), umfassend:

- einen mikrofluidischen Kanal (7) zum Aufnehmen einer biologischen Probe (1) mit wenigstens einer Zelle (2,3,4,5) und/oder einem Kristall,
- eine erste Vorrichtung zur Initiierung einer Rotation (10, 11, 19, 20) der Zelle (2,3,4,5) und/oder des Kristalls im mikrofluidischen Kanal (7),
- eine Mikroskopiervorrichtung zum Abbilden der Zelle (2,3,4,5) und/oder des Kristalls, wobei die Mikroskopiervorrichtung (6) derart ausgebildet ist, wenigstens zwei Bilder (16, 17) derselben Zelle (2) zu erzeugen.

9. Zelldarstellungsvorrichtung (18) nach Anspruch 8 mit einer Prozessoreinheit zum Berechnen einer dreidimensionalen Abbildung einer Zelloberfläche der Zelle (2, 3, 4, 5) oder einer Kristalloberfläche aus den wenigstens zwei Bildern (16, 17) der Zelle (2).

10. Zelldarstellungsvorrichtung (18) nach Anspruch 8 oder 9, wobei die Mikroskopiervorrichtung ein digitalholographisches Mikroskop (6) ist.

11. Zelldarstellungsvorrichtung nach Anspruch 10, wobei das digitalholographische Mikroskop (6) ein linsenfreies Mikroskop ist.

12. Zelldarstellungsvorrichtung (18) nach einem der Ansprüche 8 bis 11 mit einer zweiten Vorrichtung zum Erfassen von Mie- und /oder Rayleigh-Streuung.

13. Zelldarstellungsvorrichtung (18) nach einem der Ansprüche 8 bis 12, wobei die Zelle (2,3,4,5) und/oder der Kristall mit einem Farbstoff eingefärbt ist.

5

14. Zelldarstellungsvorrichtung (18) nach einem der Ansprüche 8 bis 13 mit einem Fluoreszenzmikroskop als einer zweiten Mikroskopiervorrichtung .

10

FIG 1

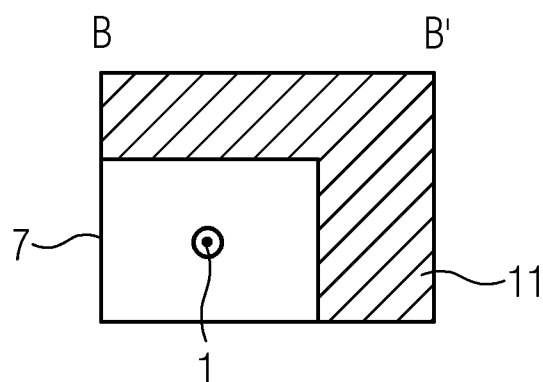
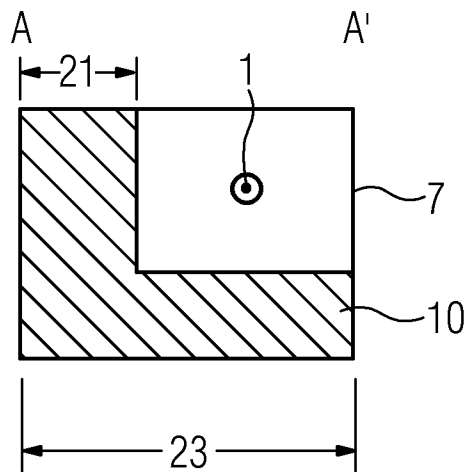
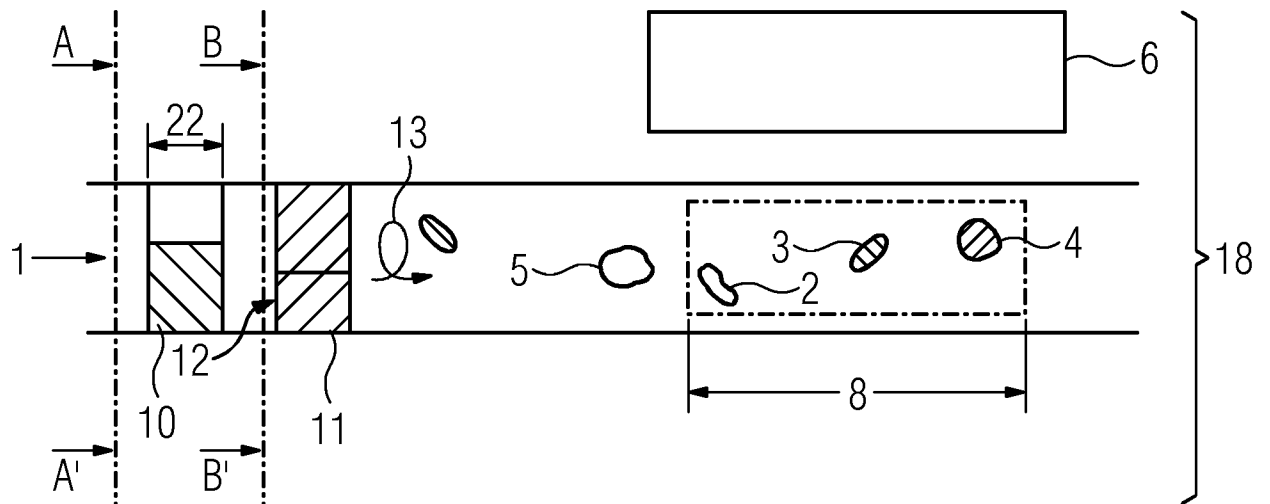


FIG 2

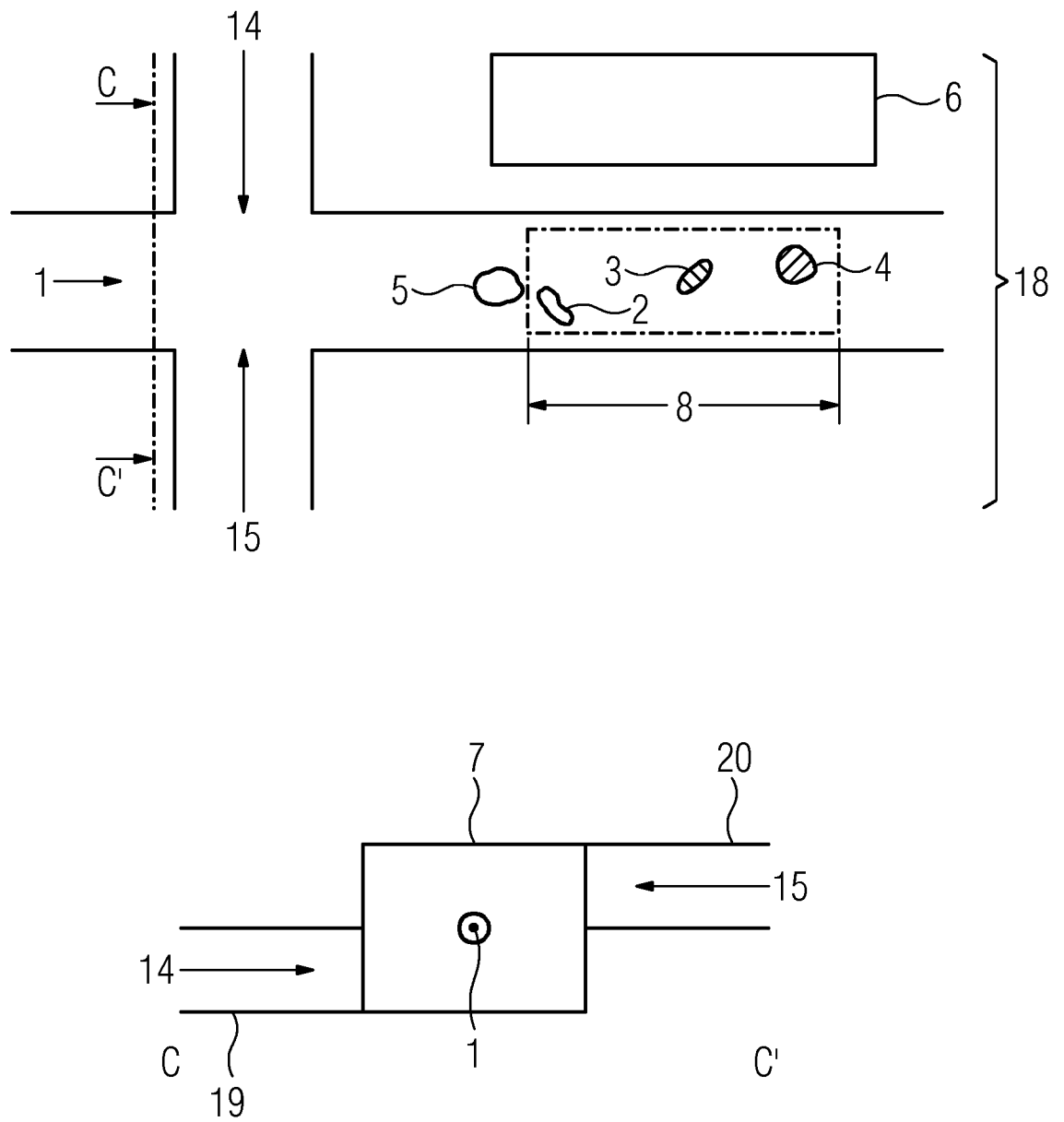


FIG 3

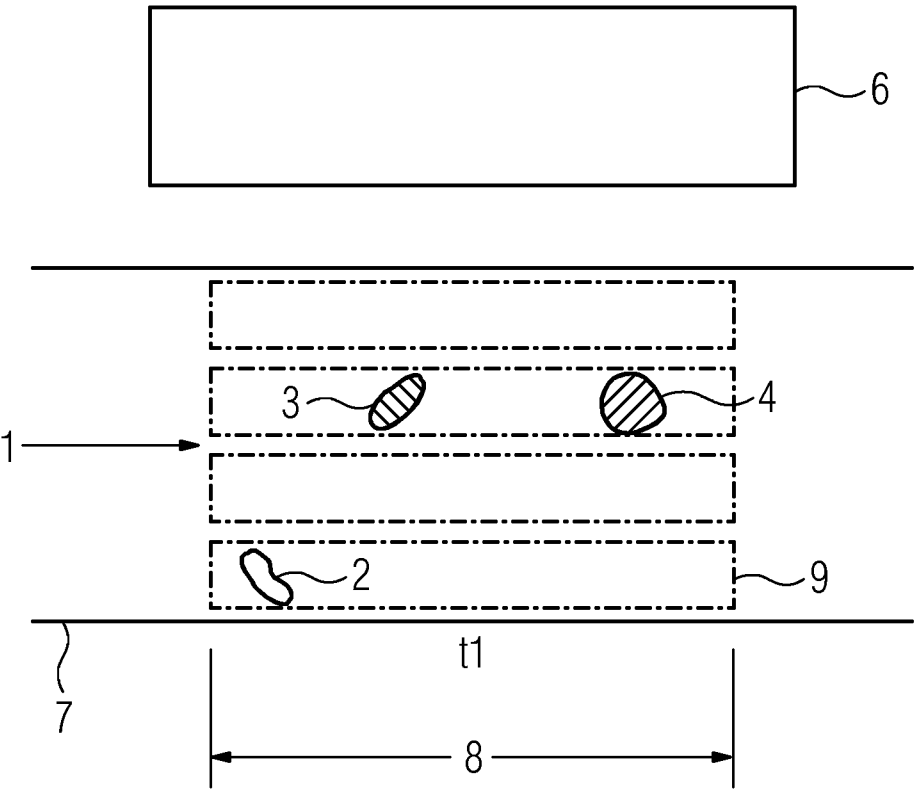


FIG 4

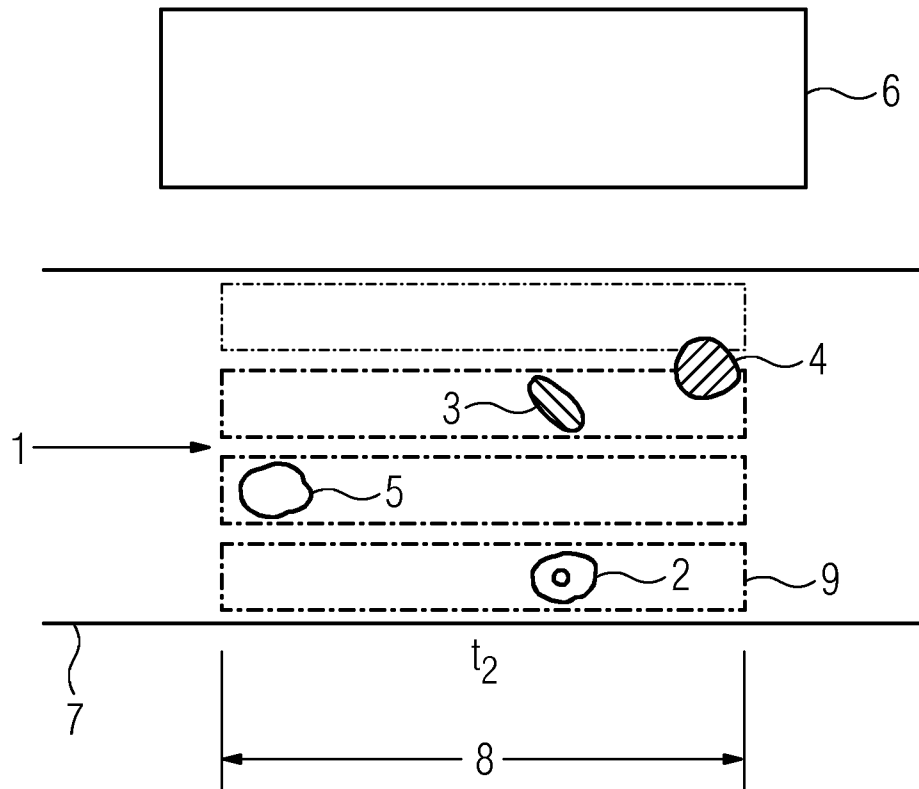
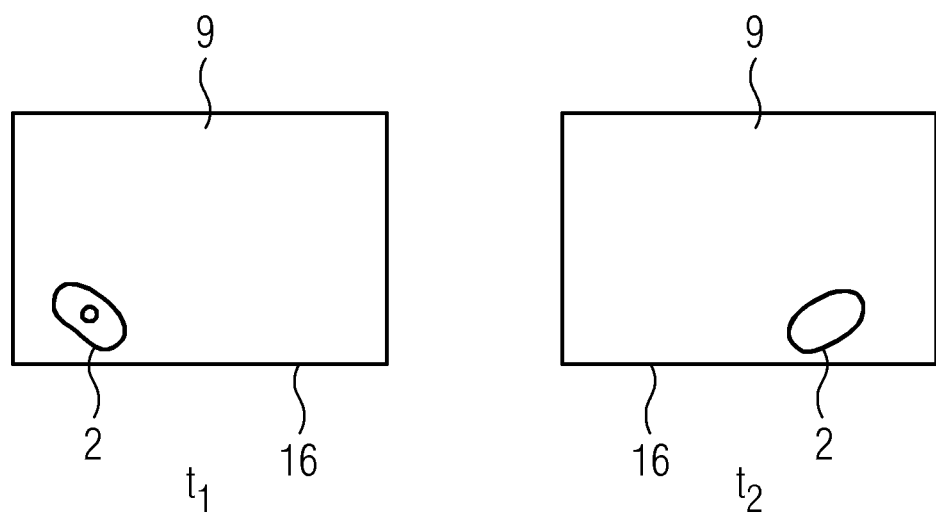


FIG 5



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2015/056040

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. B01L3/00 G01N15/14
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)
B01L G01N

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, 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	ALBERT SAHRADHA ET AL: "Optofluidic Single-Cell Rotation", BIOPHYSICAL JOURNAL, vol. 106, no. 2, 16 February 2014 (2014-02-16), XP028825079, ISSN: 0006-3495, DOI: 10.1016/J.BPJ.2013.11.1195 abstract ----- -/--	1-4,7-9



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 August 2015

Date of mailing of the international search report

20/08/2015

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

Gundlach, Björn

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2015/056040

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KOLB T ET AL: "Dynamically reconfigurable fibre optical spanner", LAB ON A CHIP - MINIATURISATION FOR CHEMISTRY AND BIOLOGY 20140321 ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY GBR, vol. 14, no. 6, 21 March 2014 (2014-03-21), pages 1186-1190, XP55207687, ISSN: 1473-0197 page 1186, column 2, paragraph 2 page 1187, column 1, paragraph 3 - paragraph 4 page 1188, column 1, paragraph 3; figure 2 -----	1-4,7-9
X	BRYAN J BLACK AND SAMARENDRA K MOHANTY: "Fiber-optic spanner", OPTICS LETTERS, OPTICAL SOCIETY OF AMERICA, US, vol. 37, no. 24, 15 December 2012 (2012-12-15), pages 5030-5032, XP001579590, ISSN: 0146-9592, DOI: 10.1364/OL.37.005030 [retrieved on 2012-12-04] page 5031, column 1, paragraphs 2,3 page 5032, paragraph 1 -----	1-3,7,8
X	WO 2012/057878 A1 (UNIV YALE) 3 May 2012 (2012-05-03) paragraph [0145]; figures 1A-D -----	1,8
X	US 2014/071452 A1 (FLEISCHER JASON W [US]) 13 March 2014 (2014-03-13) paragraph [0034] - paragraph [0038]; claims 1,2,16; figures 4A,4B -----	1-11,13, 14
Y		1,12
Y	US 2011/077496 A1 (CHAIKEN JOSEPH [US]) 31 March 2011 (2011-03-31) abstract; claim 1 -----	1,12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2015/056040

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2012057878 A1	03-05-2012	AU 2011320908 A1	23-05-2013
		CN 103403557 A	20-11-2013
		CN 104535783 A	22-04-2015
		EP 2633330 A1	04-09-2013
		JP 2014500949 A	16-01-2014
		US 2013313113 A1	28-11-2013
		WO 2012057878 A1	03-05-2012

US 2014071452 A1	13-03-2014	NONE	

US 2011077496 A1	31-03-2011	NONE	

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 INV. B01L3/00 G01N15/14
 ADD.

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

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
 B01L G01N

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

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

EPO-Internal, 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	ALBERT SAHRADHA ET AL: "Optofluidic Single-Cell Rotation", BIOPHYSICAL JOURNAL, Bd. 106, Nr. 2, 16. Februar 2014 (2014-02-16), XP028825079, ISSN: 0006-3495, DOI: 10.1016/J.BPJ.2013.11.1195 Zusammenfassung ----- -/--	1-4,7-9



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

13. August 2015

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

20/08/2015

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

Gundlach, Björn

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	KOLB T ET AL: "Dynamically reconfigurable fibre optical spanner", LAB ON A CHIP - MINIATURISATION FOR CHEMISTRY AND BIOLOGY 20140321 ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY GBR, Bd. 14, Nr. 6, 21. März 2014 (2014-03-21), Seiten 1186-1190, XP55207687, ISSN: 1473-0197 Seite 1186, Spalte 2, Absatz 2 Seite 1187, Spalte 1, Absatz 3 - Absatz 4 Seite 1188, Spalte 1, Absatz 3; Abbildung 2 -----	1-4,7-9
X	BRYAN J BLACK AND SAMARENDRA K MOHANTY: "Fiber-optic spanner", OPTICS LETTERS, OPTICAL SOCIETY OF AMERICA, US, Bd. 37, Nr. 24, 15. Dezember 2012 (2012-12-15), Seiten 5030-5032, XP001579590, ISSN: 0146-9592, DOI: 10.1364/OL.37.005030 [gefunden am 2012-12-04] Seite 5031, Spalte 1, Absätze 2,3 Seite 5032, Absatz 1 -----	1-3,7,8
X	WO 2012/057878 A1 (UNIV YALE) 3. Mai 2012 (2012-05-03) Absatz [0145]; Abbildungen 1A-D -----	1,8
X	US 2014/071452 A1 (FLEISCHER JASON W [US]) 13. März 2014 (2014-03-13) Absatz [0034] - Absatz [0038]; Ansprüche 1,2,16; Abbildungen 4A,4B -----	1-11,13,14
Y		1,12
Y	US 2011/077496 A1 (CHAIKEN JOSEPH [US]) 31. März 2011 (2011-03-31) Zusammenfassung; Anspruch 1 -----	1,12

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2015/056040

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung		Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 2012057878	A1	03-05-2012	AU	2011320908 A1		23-05-2013
			CN	103403557 A		20-11-2013
			CN	104535783 A		22-04-2015
			EP	2633330 A1		04-09-2013
			JP	2014500949 A		16-01-2014
			US	2013313113 A1		28-11-2013
			WO	2012057878 A1		03-05-2012

US 2014071452	A1	13-03-2014	KEINE			

US 2011077496	A1	31-03-2011	KEINE			
