

## Schlussbericht zum Vorhaben

# Schneller Pathogennachweis mit Resistenztest im Mikroflusssystem - SeptoSurvive

Teilvorhaben:

**Erforschung eines mikrofluidischen Bakteriensorters zur schnellen  
Isolation von Erregern aus Vollblut**

## Teil I: Kurzdarstellung

**Zuwendungsempfänger:**

Fraunhofer-Gesellschaft zur Förderung der  
angewandten Forschung e.V.  
Fraunhofer-Institut für Lasertechnik (ILT)

**Förderkennzeichen:**

13GW0431C

**Vorhabenbezeichnung:**

SeptoSurvive

**Laufzeit des Vorhabens:**

01.01.2021 – 31.12.2024

**Autor:**

Dr. rer. nat. Georg Meineke

## Aufgabenstellung

Im Teilvorhaben „Mikrofluidischer Bakteriensorter“ sollen die Grundlagen für eine schnelle und hochselektive Sortiertechnologie erarbeitet werden, die eine Schlüsseltechnologie des im Verbund zu entwickelnden Verfahrens für die Schnelldiagnostik von Antibiotikaresistenzen von aus Vollblutproben gewonnenen Sepsiserregern. Hierzu sollen im Teilvorhaben des ILT zunächst die Grundlagen für eine passive Sortiertechnik unter Ausnutzung des Dean-Flows erforscht werden. Für eine weitere Aufkonzentration sollen die Grundlagen für ein zweites aktives Sortierverfahren erforscht werden, das hochselektiv einzelne Bakterienzellen aus der hochverdünnten Blutprobe separiert. Dieses Verfahren basiert auf einer schnell bewegten optischen Falle, in einer mikrofluidischen Sortierkammer, die ausgelöst durch einen Streulichtsensor ein Bakterium in seinem Fokus einfängt.

Die technischen wissenschaftlichen Ziele des Teilvorhabens sind im Folgenden aufgelistet:

- Passive Sortierung mit DF-Sorter von 10 ml Vollblut in 1h
- Abtrennung von Leukozyten, Erythrozyten und Thrombozyten-Bead-Konjugaten
- Verdünnungsrate fluidisch seriell geschalteter DF-Sorter  $10^{-6}$
- Aktive Sortierung verdünnter Blutproben mit Bakterien in opto-fluidischem Sorter in 1h
- Diskriminierung der Bakterien der Größen  $0,5 \mu\text{m} \leq D_{\text{Bakterium}} \leq 5 \mu\text{m}$  von Blutzellen und Thrombozyten-Bead-Konjugaten
- Pinzettenkraft für die Bewegung der Bakterien quer zum Fluss  $F_{\text{max}} \geq 0,25 \text{ nN}$
- Gesamtsortierdauer 2 h

## Planung und Ablauf des Vorhabens

Im Teilvorhaben „Mikrofluidischer Bakteriensorter“ wurden die Grundlagen für eine schnelle und hochselektive Sortiertechnologie erarbeitet. Die Technologie umfasst eine passive Sortiertechnik, die darauf basiert, dass in spiralförmigen Mikrokanälen geschwindigkeitsabhängige Querströmungen (DeanFlow) Kräfte auf die mitgeführten Teilchen ausüben. Der DeanFlow und die damit verbundene Kraft auf das Teilchen  $F_{\text{DD}}$  (DeanFlow Drag Force) erlauben eine räumliche Trennung der größeren Blutbestandteile (Erythrozyten, Leukozyten, 7 - 20  $\mu\text{m}$ ) von den kleineren Bakterien (0,5 - 5  $\mu\text{m}$ ), vgl. Bild 1.

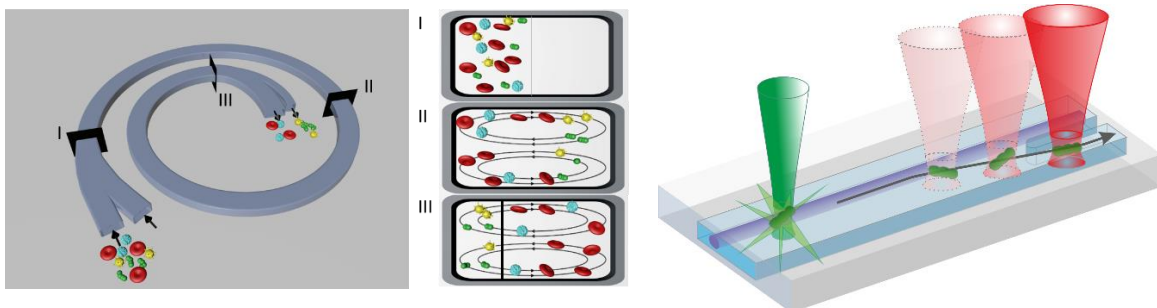


Bild 1: Dean Flow Fractionation, rechts sind Querschnitte durch den Kanal bei verschiedenen Positionen gezeigt. Bakterien sammeln sich an der Innenwand, Blutzellen an der Außenwand.

Bild 2: Zellen werden durch ein Vorwärts-streusignal detektiert (grün) und mit einem Pinzettenlaser (rot) aussortiert.

In einem zweiten aktiven Sortierverfahren sollen die Bakterien von den verbleibenden Blutzellen separiert werden. Dieses Verfahren basiert auf einer schnell bewegten optischen Falle, in einer mikrofluidischen Sortierkammer, die ausgelöst durch einen Streulichtsensor ein Bakterium in seinem Fokus einfängt, vgl. Bild 2. Der Fokus wird durch zwei orthogonal angeordnete Akusto-Optische Deflektoren (AOD) abgelenkt und bewegt das eingefangene Bakterium in der Sortierkammer zum Sammelkanal der Sortierkammer. Das aktive Sortierverfahren des opto-fluidischen  $\mu$ Sorters wurde bezüglich der optischen Fallenkraft numerisch simuliert, in einem Laboraufbau umgesetzt und die prinzipielle Funktion des

Sorters systematisch in Abhängigkeit der relevanten Prozessparameter erforscht. Der gesamte Prozess aus aktiver und passiver Sortierung wurde mit dem SLE-Verfahren auf Glaschips abgebildet, im Labor mit Blutproben und Bakteriensuspensionen grundlegend erforscht und in Bezug auf die Anwendung evaluiert.

### Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Das Fraunhofer ILT hat zusammen mit dem Lehrstuhl für Lasertechnik LLT der RWTH Aachen das Verfahren Selective Laser-induced Etching (SLE) zum subtraktiven 3D-Druck von feinen Strukturen in Quarzglas entwickelt. SLE ist geeignet, um Mikrofluidik-Kanäle mit einer Präzision von kleiner 1  $\mu\text{m}$  und Strukturgrößen von bis unter 10  $\mu\text{m}$  zu erzeugen [1].

Das ILT hat sich bereits mit einem lasergestützten Verfahren zur Abtrennung von Partikeln aus Fluidströmen beschäftigt, dem opto-kalorischen Schalten. Bei diesem Verfahren wird durch Absorption von NIR-Laserstrahlung das Fluid in einem kleinen Bereich eines mikrofluidischen Kanalsystems erwärmt, wodurch aufgrund von thermischer Ausdehnung und Änderung der dynamischen Viskosität die Strömung so verändert wird, dass ein Schaltvorgang zum Aussortieren von Partikeln in einen separaten Strom möglich ist [2].

Zum Abtrennen von Partikeln mit Hilfe optischer Gradientenkräfte (optische Falle) bestehen Arbeiten zur Methodenentwicklung für die Charakterisierung von optischen Gradientenkräften auf Partikel in mikrofluidischen Systemen [3] und nicht veröffentlichte Vorarbeiten, in welchen in der Mikrofluidik wässrige Tröpfchen mit Durchmessern zwischen 5  $\mu\text{m}$  und 10  $\mu\text{m}$  in einem fließenden Hydrofluoroether manipuliert werden.

### Zusammenarbeit mit anderen Stellen

**ibidi** erforschte die grundlegenden Eigenschaften des Mikrokultursystem für die Vorkultivierung der aussortierten Erreger sowie die Mikrokulturgefäße für die Resistenztestung. Zur Wachstums-beobachtung an Mikrokulturen erforschte ibidi das Potenzial der phasenfluorimetrischen Sauerstoffmessung, mit der die Hemmkonzentration von Antibiotika ermittelt werden soll.

**Solectrix** evaluierte das Gesamtkonzept in einem Labordemonstrator, in dem die Technologien von ILT und ibidi zusammengeführt werden. Solectrix erforschte die Grundlagen für ein Konzept einer echtzeitfähigen Steuerung des Sorters und Algorithmen und Modelle für die Wachstumsanalyse auf der Basis phasenfluorimetrischer Sauerstoffmessungen.

**Virion\Serion** erforschte die Prozesse und den Einsatz von Mikropartikeln zum selektiven Abreichern von Thrombozyten aus Vollblutproben sowie die dafür benötigten Bindungseigenschaften von Fängermolekülen zum Agglomerieren von Thrombozyten.

**Das Labordiagnostische Zentrum (LDZ)** des UK Aachen ist der Endanwender des zu entwickelnden In-vitro-Diagnostikums und des Assays. Das LDZ erforschte die Grundlagen für den Resistenztest im Mikrosystem und die Methode mit dem den Demonstrator präklinisch im Sinne eines Proof of Concept zu evaluieren.

---

[1] Jens Gottmann, Martin Hermans, and Nikolai Repiev and Jürgen Ortmann, "Selective Laser-Induced Etching of 3D Precision Quartz Glass Components for Microfluidic Applications—Up-Scaling of Complexity and Speed," *Micromachines* 8 (4), 110 (2017).

[2] G. Meineke, M. Hermans, J. Klos, A. Lenenbach, and R. Noll, "A microfluidic opto-caloric switch for sorting of particles by using 3D-hydrodynamic focusing based on SLE fabrication capabilities," *Lab Chip* 16 (5), 820–828 (2016).

[3] A. Fedorov, Dynamic optical tweezers for droplet separation in microfluidics, Master Thesis, Carl von Ossietzky Universität Oldenburg, 2017.

## Schlussbericht zum Vorhaben

# Schneller Pathogennachweis mit Resistenztest im Mikroflusssystem - SeptoSurvive

Teilvorhaben:

**Erforschung eines mikrofluidischen Bakteriensorters zur schnellen  
Isolation von Erregern aus Vollblut**

## Teil II: Eingehende Darstellung

**Zuwendungsempfänger:**

Fraunhofer-Gesellschaft zur Förderung der  
angewandten Forschung e.V.  
Fraunhofer-Institut für Lasertechnik (ILT)

**Förderkennzeichen:**

13GW0431C

**Vorhabenbezeichnung:**

SeptoSurvive

**Laufzeit des Vorhabens:**

01.01.2021 – 31.12.2024

**Autor:**

Dr. rer. nat. Georg Meineke

### 1. Verwendung der Zuwendungen und des erzielten Ergebnisses

#### Simulation von DeanFlow Sorterstrukturen

Die Strömungsfelder und Partikeltrajektorien für 6 Kanalquerschnitte (2x rechteckig, 1x trapezförmig, 3x hantelförmig) und verschiedene Krümmungsradien ( $0,2 \text{ mm} < R < 0,5 \text{ mm}$ ) wurden für verschiedene Volumenströme und Partikel mit den Durchmessern  $3 \mu\text{m}$ ,  $5 \mu\text{m}$ ,  $7,5 \mu\text{m}$  und  $10 \mu\text{m}$  simuliert, siehe Bild 1. Die Parameter wurden hierbei so gewählt, dass Reynoldszahlen zwischen  $7,5 < Re < 60$  und Dean-Zahlen von  $1 < De < 23$  vorliegen.

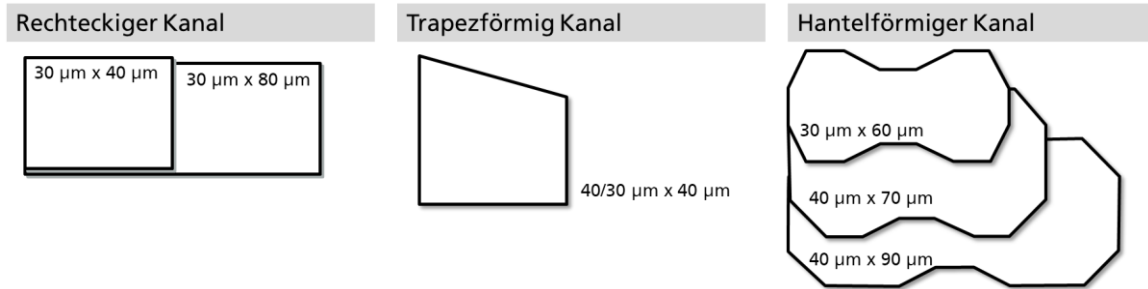


Bild 1 In den Simulationen verwendete Kanalquerschnitte zur Bestimmung geeigneter Kanalgeometrien

Ausgehend von verschiedenen Positionen im Kanalquerschnitt wurden Partikeltrajektorien über den Kanalverlauf hinweg errechnet und ausgewertet. Führen alle Trajektorien einer Partikelgröße an den inneren Rand und bleiben dort, gilt diese Größenfraktion als erfolgreich sortiert. Die Kanalstrecke die hierfür benötigt wird, ist ein wichtiges Ergebnis zur Auslegung der Kanalstruktur bei der Fertigung. In Bild 2 sind die ermittelten Trajektorien für den rechteckigen Kanal im Querschnitt und im Kanalverlauf dargestellt. In dem dargestellten Beispiel werden nur die Partikel mit einem Durchmesser von  $7,5 \mu\text{m}$  und  $10 \mu\text{m}$  stabil fokussiert. Partikel mit einem kleineren Durchmesser von  $3 \mu\text{m}$  oder  $5 \mu\text{m}$  könnten unter Ausnutzung des periodischen Positionsverlaufs von den größeren Partikeln, welche an der inneren Kanalseite fokussiert werden, getrennt werden.

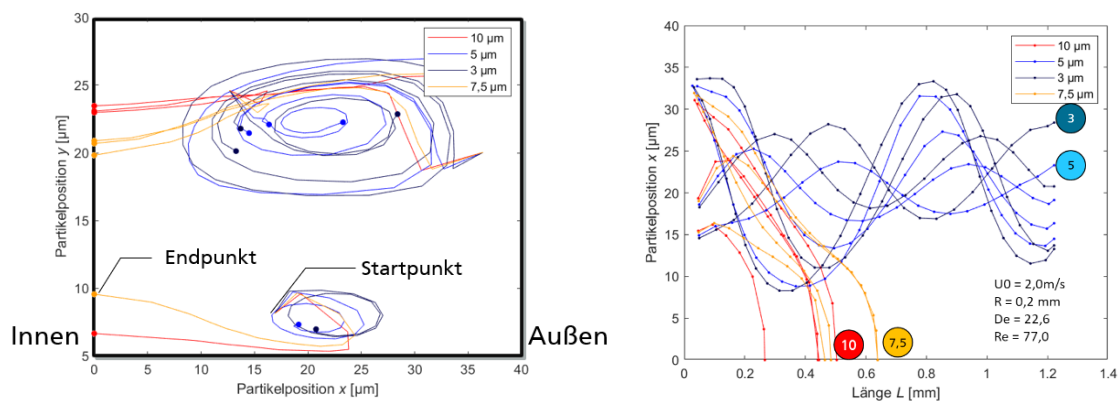


Bild 2 Beispiel einer Partikelspursimulation für die Partikelgrößen  $3 \mu\text{m}$ ,  $5 \mu\text{m}$ ,  $7,5 \mu\text{m}$  und  $10 \mu\text{m}$ . Links sind die auf den Kanalquerschnitt projizierten Partikelspuren dargestellt. Die Kreisflächen markieren die Position der Teilchen am Ende der Simulation. Rechts sind die x-Komponenten der Position (Innen-Außen) entlang der Kanalstrecke aufgetragen. Hier wird eine Sortierung für die Teilchen mit  $3$  und  $5 \mu\text{m}$  erreicht.

Die ermittelten Mindeststrecken für die Fokussierung in Abhängigkeit zu den verwendeten Dean-Zahlen wurden genutzt, um die Kanalstrukturen für die Fertigung auszuwählen. In Bild 3 ist ein typischer Verlauf der Mindeststrecken zu Fokussierung für das Beispiel eines

trapezförmigen Kanalquerschnitts dargestellt.

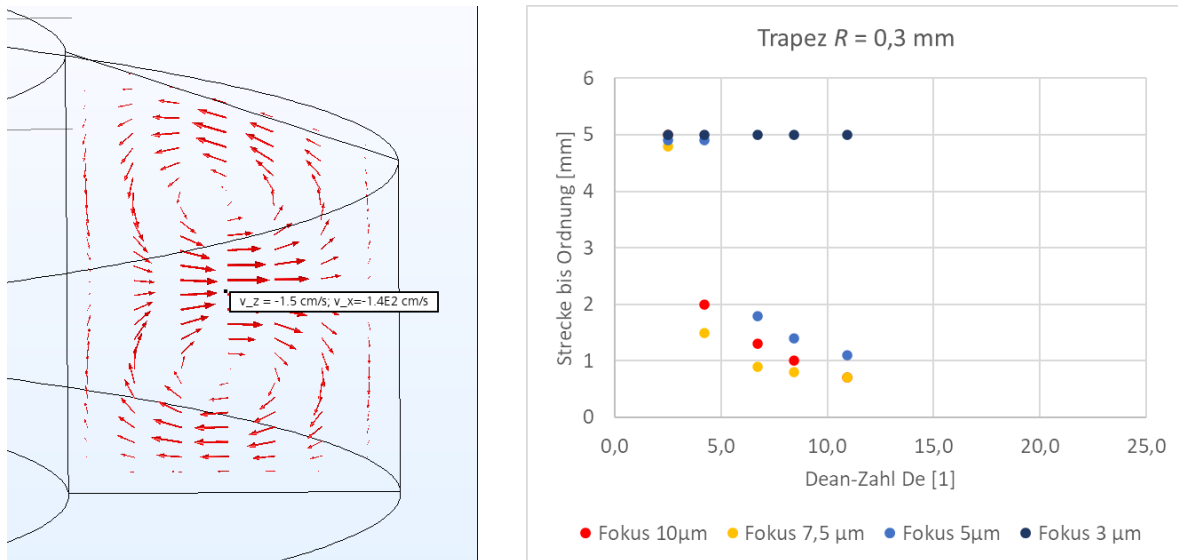


Bild 3 Links: Strömungsprofil im trapezförmigen Kanalquerschnitt 40 µm x 40/30 µm (B x H). Rechts: Wegstrecken bis sich Partikel bestimmter Größe angeordnet haben, abhängig von der Flussgeschwindigkeit (Dean-Zahl)

Die Simulationen ergeben, dass bei einem Krümmungsradius des Kanalverlaufs von 300 µm oder kleiner eine DeanFlow Trennung in weniger als einer Umdrehung bei folgenden Querschnitten zu erzielen ist:

- rechteckige Kanalquerschnitte von 40µm x 30 µm (B x H),
- trapezförmige Kanalquerschnitte 40 µm x 40/30 µm (B x H) und
- hantelförmigen Kanalquerschnitten 60 µm x 30 µm (B x H).

### Realisierung von DeanFlow Sorterstrukturen

Ausgehend von den Simulationsergebnissen wurden sechs Kanalgeometrien gefertigt, siehe Bild 4.

Kanalquerschnitt (B x H)	Krümmungsradius
Rechteckig 40 µm x 30 µm	- 250 µm
	- 300 µm
Trapezförmig 40 µm x 30/40 µm	- 250 µm
	- 300 µm
Hantelförmig 60 µm x 30 µm	- 250 µm
	- 300 µm

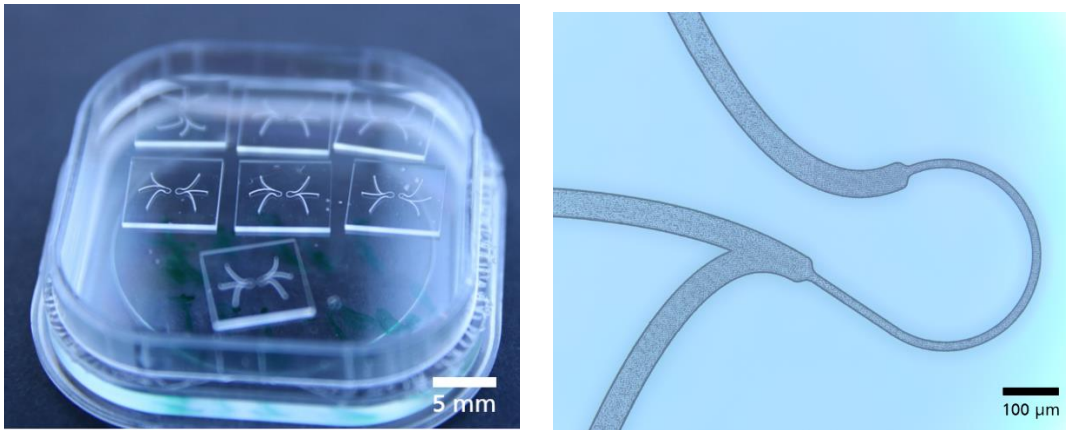


Bild 4 Links: SLE gefertigte DF-Chips. Rechts: Detailbild eines DF-Chips mit Kanalquerschnitt 40 µm x 30 µm

Diese Dean Flow Chips wurden mit verschiedenen Partikeln (Polystyrol, Durchmesser 5µm, 10 µm) und defibriniertem Pferdeblut erprobt. Eine fokussierende Wirkung wurde ermittelt, welche jedoch bei Weitem nicht für die Separation ausreichend ist. Die stärkste Fokussierung wurde bei dem rechteckigen Kanalquerschnitt 40 µm x 30 µm beobachtet.

Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde ein neuer Chip entworfen, welcher durch einen spiralförmigen Aufbau eine längere Interaktionsstrecke der Partikel/Zellen mit dem Dean-Flow ermöglicht, siehe Bild 5.

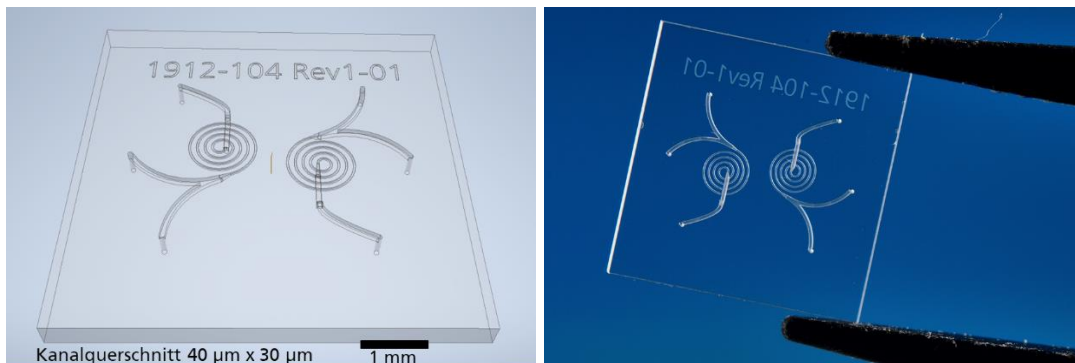


Bild 5 Links: CAD-Design des DF-Chips mit spiralförmigem Kanal. Rechts: Foto des gefertigten DF-Chips

Dieser DF-Chip wurde mit Partikel unterschiedlicher Durchmesser (Polystyrol, Durchmesser 5µm, 10 µm) und defibriniertem Pferdeblut erprobt. Es wurden feine Fokussierungen erzielt, welche für Partikel und Zellen von 5 µm Durchmesser und größer maßgeblich von der Partikelkonzentration begrenzt wird, siehe Bild 7. Es wurde eine Verdünnung der Probe von bis zu 1:1081 erzielt.

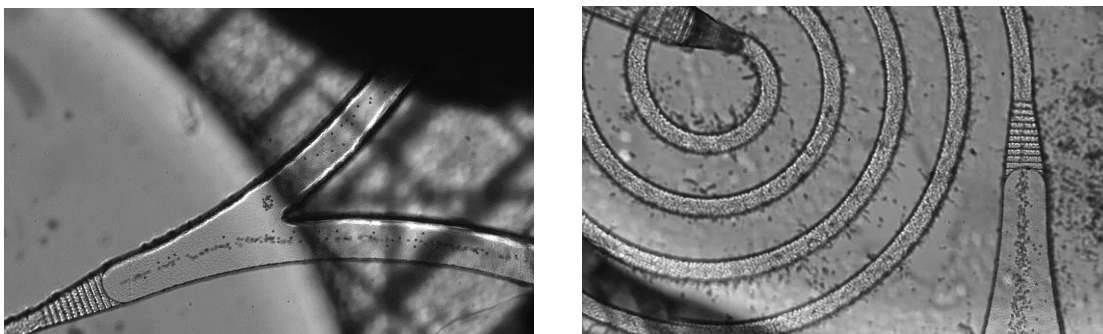


Bild 6 Links: DF-Chip in der Erprobung mit 5 µm Polystyrol Partikeln bei einem Gesamtfluss von 45 µl/min. Rechts: DF-Chip in der Erprobung mit defibriniertem Pferdeblut, 1:100 verdünnt bei einem Betriebsdruck von 1250 mBar

Um die Sortierergebnisse zu verfeinern, wurden die gewonnenen Ergebnisse genutzt, um die Sortierchips weiter auf die Anwendung anzupassen. Zum besseren Abtrennen der Zellen wurde ein mittig liegender dritter Kanal bei der Verzweigung eingeführt. Dieser erlaubt das gezielte Einstellen der Teilungsverhältnisse in den Abläufen (siehe Bild 7).

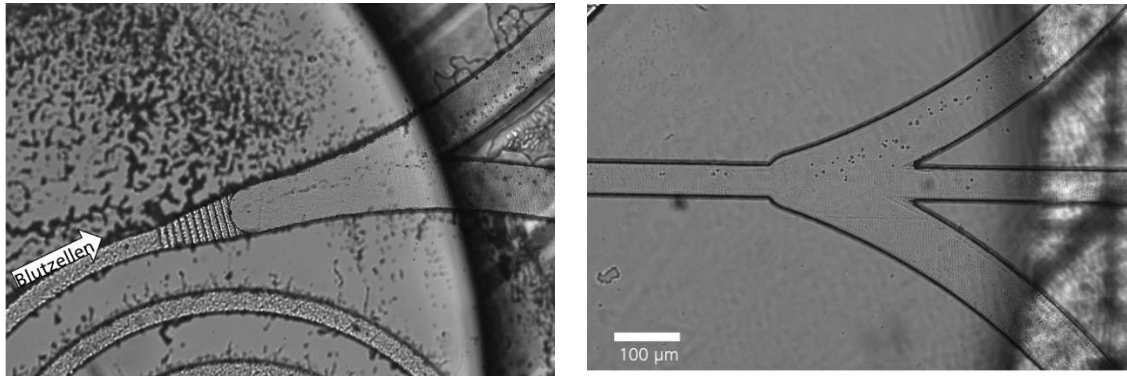


Bild 7 Links: DF-Chip mit defibriniertem Pferdeblut, Chip zu Beginn des Berichtszeitraums. Rechts: Überarbeiteter DF-Chip mit defibriniertem Pferdeblut

Eine systematische Parameterstudie zur fokussierenden Wirkung des DeanFlows auf unterschiedlich große Partikel und Zellen wurde durchgeführt. Hierfür wurde zunächst eine Bewertungs-Metrik aufgestellt, um die Fokussierung bei einem gewählten Parametersatz zu quantifizieren. Diese Metrik basiert auf einer automatischen Bildauswertung eines Partikelstroms. Die Einzelpositionen der Partikel werden erfasst und ihre Position relativ zur Kanalbreite ausgewertet. Hierbei wird die Positionsverteilung statistisch ausgewertet und die 0,05 und 0,95 Quantile bestimmt, siehe Bild 8. Der Abstand der Quantile bezeichnet die Breite, auf welcher 90% der Partikel wiedergefunden werden und wird genutzt, um die erreichte Fokussierung in vier Klassen einzuteilen:

- Sehr gute Fokussierung: < 10%,
- Gute Fokussierung: 10 – 20%,
- Mittlere Fokussierung: 20-30%,
- Schwache Fokussierung: > 30%.

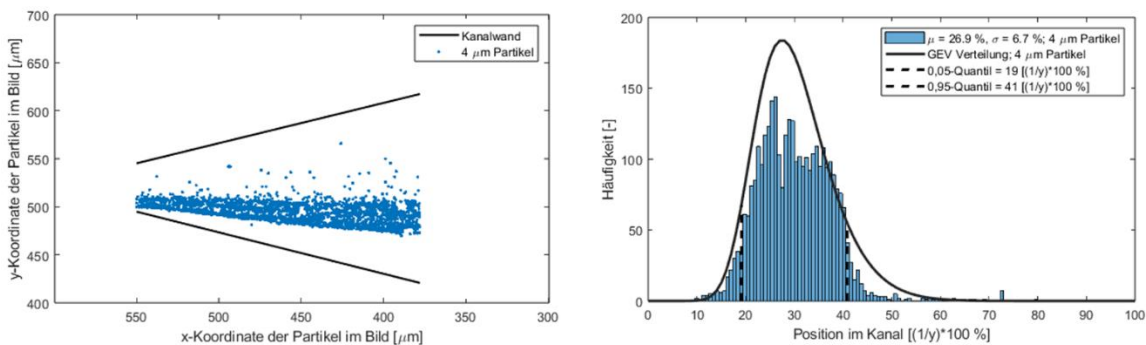


Bild 8 Links: Im Videobild erkannte Partikel, eingezeichnet an ihrer Position in der Verzweigung. Rechts: Darstellung der Positionsverteilung der Partikel, bezogen auf die Kanalbreite. Eingezeichnet sind die 0,05 und 0,95 Quantile.

In der Literatur wird auch z.B. anhand der Fokussierung, der Anzahl der Partikelstrahlen und

deren Anordnung klassifiziert<sup>1</sup>.

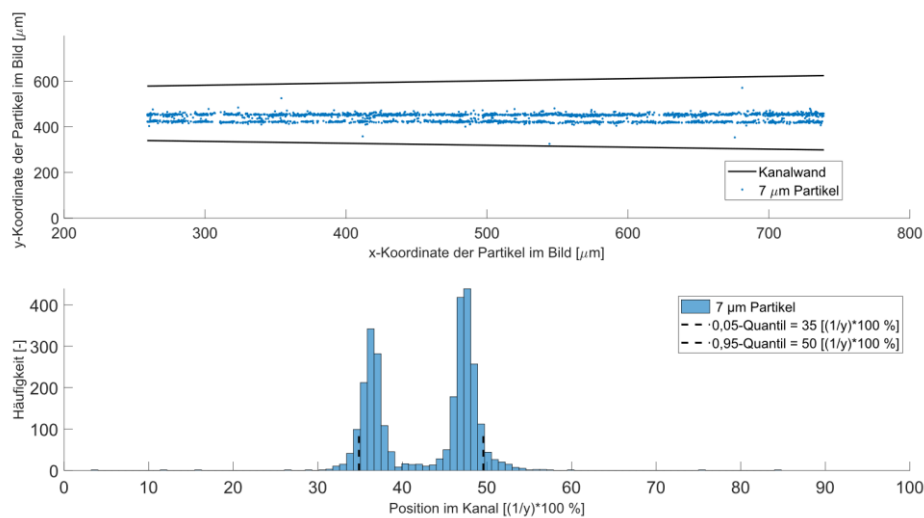


Bild 9 Beispiel für die Fokussierung in zwei Partikelstrahlen, Partikelgröße 7 µm bei einem Volumenstrom von 125 µl/min. Beide Strahlen weisen eine geringe Streubreite auf und sind auch insgesamt mit einem Quantilabstand von 15% der Kanalbreite gut fokussiert. Oben: Im Videobild erkannte Partikel, eingezeichnet an ihrer Position in der Verzweigung. Eingezeichnet sind die Verläufe der Kanalwände Unten: Darstellung der Positionsverteilung der Partikel, bezogen auf die Kanalbreite. Eingezeichnet sind die 0,05 und 0,95 Quantile.

In einer Parameterstudie wurde diese Klassifizierung für verschieden große Polystyrol-Partikel (3 µm, 4 µm, 5 µm und 10 µm) sowie defibriniertem Pferdeblut durchgeführt. Defibriniertem Pferdeblut wurden die Thrombozyten entfernt, wodurch ein mittlerer Zelldurchmesser von ca. 8 µm zu erwarten ist. Zusätzlich zu den Partikel- und Zellgrößen wurde die Dean-Zahl variiert, diese ist neben der Kanalgeometrie abhängig von der Strömungsgeschwindigkeit bzw. dem eingestellten Volumenstrom.

In Bild 10 sind die Ergebnisse der Parameterstudie aufgetragen. Auf der y-Achse ist der Partikeldurchmesser  $a$  auf den hydraulischen Durchmesser des Kanals  $D_h$  normiert aufgetragen und auf der x-Achse die Dean-Zahl  $De$ . Im linken Teil ist die Klassifizierung der Ergebnisse anhand der Fokussierung und im rechten Teil anhand der Streubreite, quantifiziert durch die Quantile, dargestellt. Ein geeigneter Arbeitspunkt ist dann gegeben, wenn für eine Dean-Zahl für Partikel größer 4 µm eine ausreichende Fokussierung auftritt. Dies ist im rechten Bild als rotes Rechteck eingezeichnet.

<sup>1</sup> D. Di Carlo, D. Irimia, R. G. Tompkins, and M. Toner, “Continuous inertial focusing, ordering, and separation of particles in microchannels,” Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **104** (48), 18892–18897 (2007).

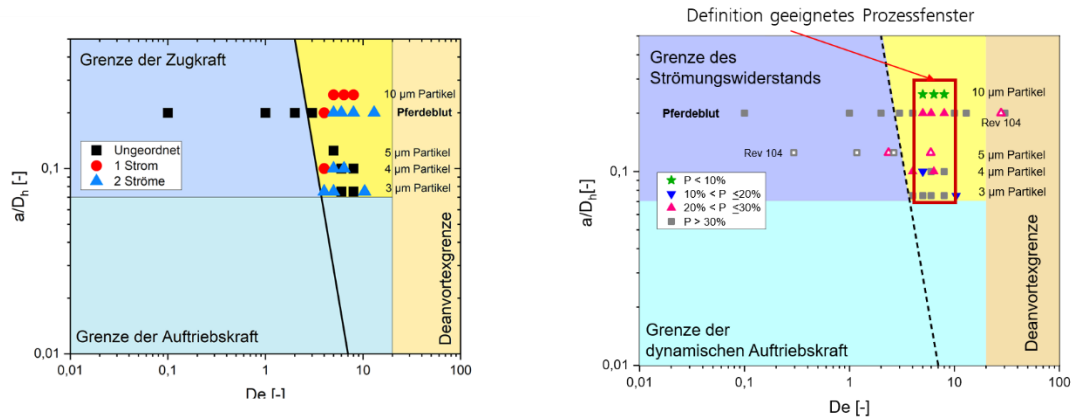


Bild 10 Parameterstudie zur Fokussierung von Partikeln und Blutzellen im DeanFlow Sorter. Links: Klassifizierung gemäß der Art der Fokussierung. Rechts: Klassifizierung gemäß der Streubreite mit geeignetem Prozessfenster (rotes Rechteck).

Eine genauere Analyse der realisierten Dean-Flow Sorter, Sorter 104 und 105, ist in Bild 11 dargestellt. Zu sehen ist, dass die Ergebnisse mit dem neueren Design 105 für die anvisierten Blutzellen ein stabileres Prozessfenster im geeigneten Dean-Zahl-Bereich von ca.  $4 < De < 8$  zeigen.

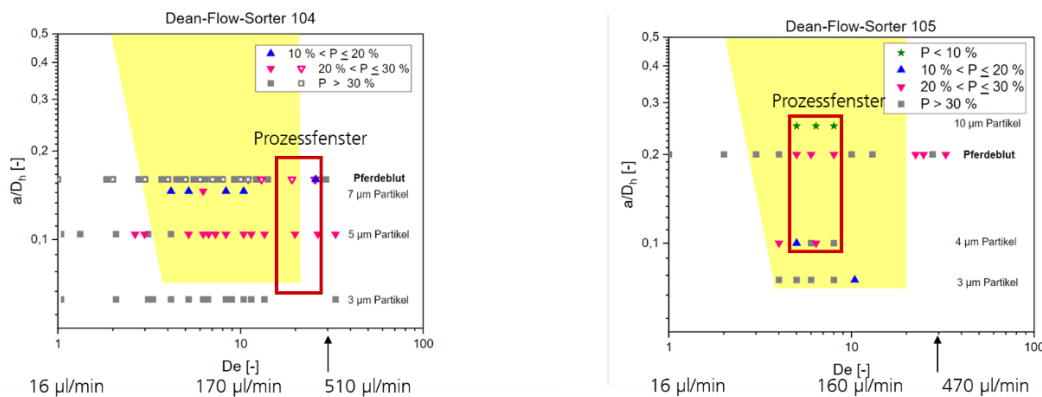


Bild 11 Parameterstudie zur Fokussierung von Partikeln und Blutzellen im Dean-Flow Sorter. Links: Ergebnisse mit dem Sortierchip 104. Rechts: Ergebnisse mit dem Sortierchip 105.

Auf Basis dieser Ergebnisse wurden weitere Entwürfe ausgearbeitet und gefertigt. Ziel war die Verstärkung des Dean-Flows und der damit verbundenen Kraftwirkung, um eine stärkere Fokussierung bei gleicher Flussgeschwindigkeit zu erzielen. Dies wurde durch eine engere Windung der Spirale, beginnend bei einem Radius von  $187 \mu\text{m}$  und einer Spirallänge von  $7,2 \text{ mm}$  umgesetzt (Sorter 108, vergleiche Bild 12b) und einer planaren Mäanderstruktur. Beim Mäander ist die Dean-Flow Wechselwirkung auf 12 identische Kanalabschnitte mit inem Radius von  $187 \mu\text{m}$  und einer addierten Gesamtlänge von ebenfalls  $7,2 \text{ mm}$  verteilt (Sorter 107, vergleiche Bild 12c).

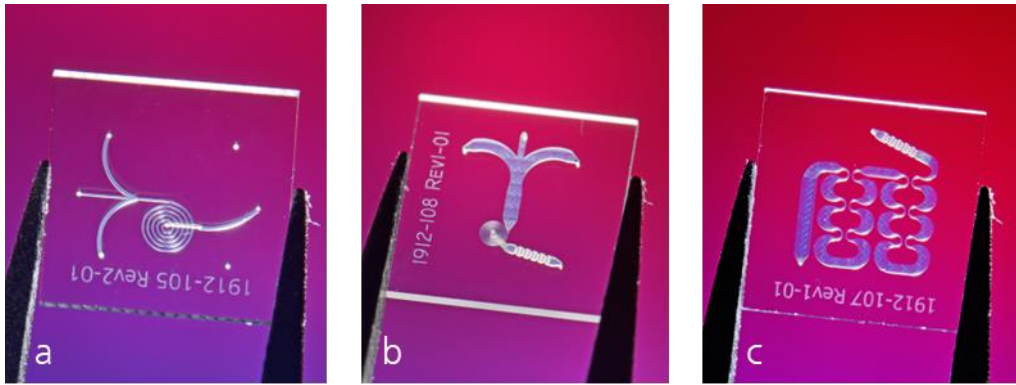


Bild 12 Designvariationen für den Deanflow-Sorter. In a) ist das Ausgangsdesign dargestellt, in b) ist durch eine engere Wicklung der Spirale und in c) ein planares „Mäander“-Design mit 12 identischen Kreisbögen umgesetzt.

Die Variante 108 mit der engeren Spirale erzielte im Experiment eine Fokussierung von  $P_{90} = 40\%$  und brachte somit keine Verbesserung. Die Mäander-Variante 107 hingegen erzielte gute Fokussierungen von  $P_{90} = 9\%$  ( $Q = 130\mu\text{l}/\text{min}$ ,  $De = 17$ ).

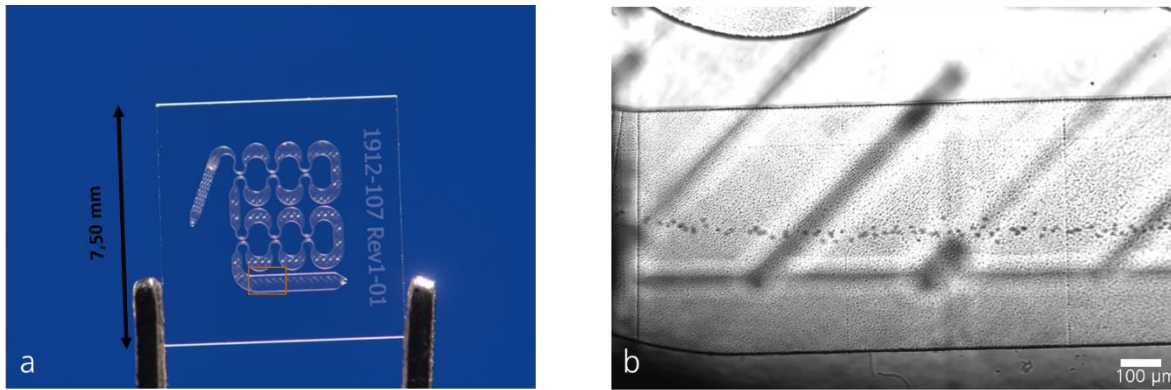


Bild 13 Mäanderdesign in a) der Gesamtansicht und dem eingezeichneten Bildfeld, welches in b) vergrößert bei einem Volumenstrom von  $130\mu\text{l}/\text{min}$  mit  $7\mu\text{m}$  Partikeln und einer Fokussierung von  $P_{90} = 9\%$  dargestellt ist.

### Sortieralgorithmus DF-Sorter

In verketteten mikrofluidischen Funktionsgruppen sollen die größeren Blutbestandteile (Erythrozyten) direkt durch Dean-Flow abgetrennt, die kleineren Blutbestandteile (Thrombozyten) zunächst durch Capture Beads gebunden und dann ebenso durch Dean-Flow abgetrennt werden. Die hierfür notwendige effektive Kopplung von Thrombozyten an Capture-Beads erfordert eine gute Durchmischung der Bead-Lösung mit der (bereits verdünnten) Blutprobe. Hierfür wurde eine Mischerstruktur entworfen und gefertigt, siehe Bild 14.

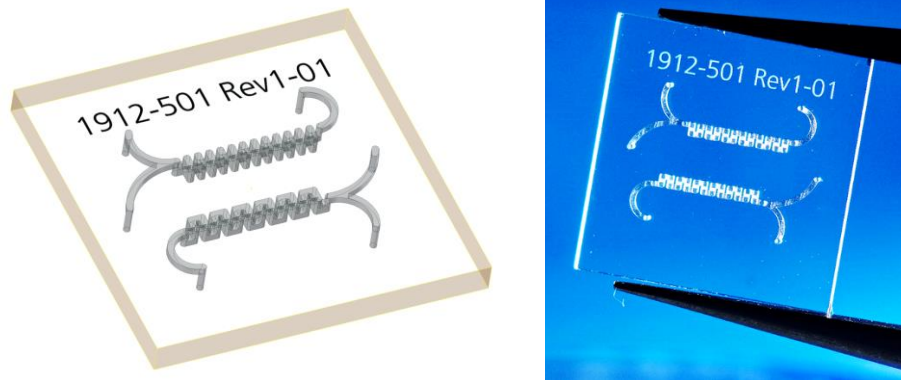


Bild 14 Links: CAD-Modell des Mikro-Mischer. Rechts: Foto des gefertigten Mikro-Mischer.

Dieser Mikro-Mischer wurde durch den Projektpartner Virion\Serion erprobt. Hierbei wurde festgestellt, dass die benötigte Bindezeit der bisher entwickelten Capture-Beads mit den Thrombozyten im Reaktionsgefäß und in der Mikrofluidik zu groß für eine sinnvolle technische Umsetzung in einem mikrofluidischen System ist. Ein Erklärungsansatz hierfür sind die Partikelgrößen der Capture Beads, welche mit wenigen Mikrometern eine schnelle Partikel-Diffusion verhindern und somit die Anzahl an Stößen bzw. Kontakten von Partikeln mit den Thrombozyten limitieren.

Aufgrund der zu langsamen und ineffektiven Bindung der Capture-Beads an die Thrombozyten, sehr wahrscheinlich aufgrund der Größe der Capture Beads im  $\mu\text{m}$ -Bereich, wurde eine alternative Technologie untersucht. Diese basiert auf der Kopplung von magnetischen Nanopartikeln an die Thrombozyten, welche sodann in einer Mikrofluidik magnetisch abgetrennt werden sollen. In Bild 15 ist der Entwurf und der fertige Mikrofluidik-Chip hierzu dargestellt.

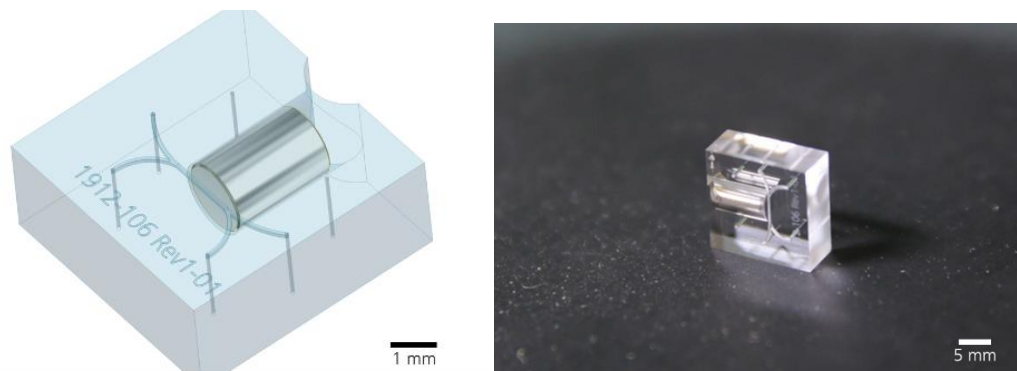


Bild 15 Magnetsorter, links als CAD-Modell und rechts der gefertigte Chip. Ein NdFeB-Permanentmagnet ist für die Separation dicht an den Kanal herangeführt.

Eine Untersuchung mit magnetischen Partikeln in der Größe der Thrombozyten hat ergeben, dass die magnetische Separationskraft ausreichend ist, diese abzutrennen. Ein optimierter zweiter Chip für die magnetische Abtrennung wurde entworfen und gefertigt. Dieser reduziert die Länge der Zuführungskanäle und berücksichtigt weitere Details für eine bessere Fertigung mit dem SLE-Verfahren. In Bild 16 sind Ergebnisse zu Versuchen dargestellt mit magnetischen Partikeln mit einem Durchmesser von  $4\ \mu\text{m}$ . Untersuchungen zu der Abtrennwirkung mit magnetisch markierten Thrombozyten werden durch Virion\Serion durchgeführt.

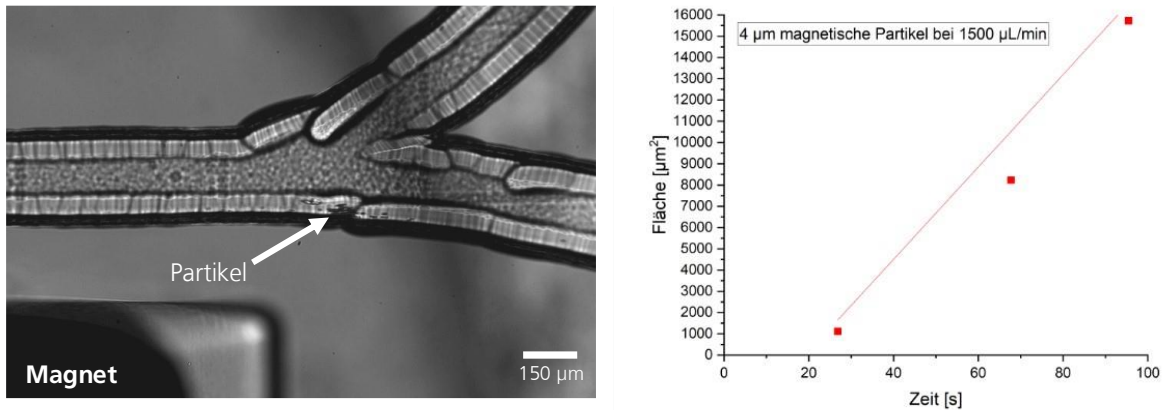


Bild 16 Abtrennen magnetischer Partikel im Magnetsorter. Links: Durch magnetische Kraftwirkung eingefangene Partikel mit 4µm Durchmesser. Rechts: Analyse der Partikel-Fanggrate anhand des Flächenzuwachs der Partikel im Videobild.

### Simulation optische Falle

Die Krafteinwirkung auf Polystyrol-Partikel und Zellen in wässriger Umgebung durch einen fokussierten Laserstrahl wurden ausgehend vom Lorentz-Mie-Modell für kugelförmige Teilchen mit Durchmessern von 0,5 µm bis 10 µm simuliert. Dazu wurde die Kraftkomponente in axialer und transversaler Richtung zum Laserstrahl in Abhängigkeit zum Abstand vom Strahlfokus zum Mittelpunkt des Teilchens separat berechnet. Die Kraft steigt an, wenn der Laserstrahl das Teilchen im Randbereich trifft und ist maximal, wenn sich das Teilchen in der Fokusebene der optischen Falle befindet. In Bild 17 ist dieser Verlauf zu sehen, hier ist die Krafteffizienz dargestellt, eine einheitenlose Größe die proportional zur Kraft und Laserstrahlungsleistung ist. Aufgrund der Ausdehnung des Laserstrahls ist der Einfangbereich der optischen Falle größer als der Durchmesser der Teilchen.

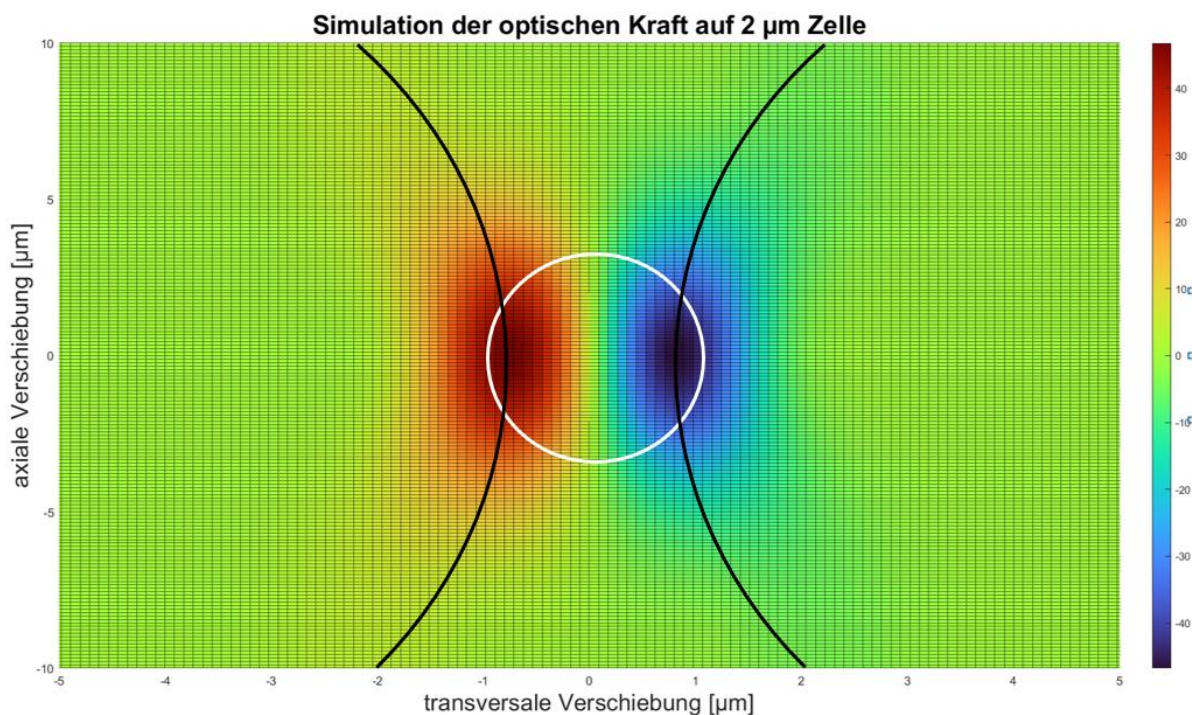


Bild 17 Simulationsergebnisse für die Kraftkomponente senkrecht zur Strahlrichtung auf eine Zelle mit einem Durchmesser von 2 µm in Abhängigkeit vom Abstand des Strahlfokus

zum Mittelpunkt der Zelle. Zusätzlich sind die Zelle (weiß) und der Strahlverlauf des Laserstrahls (schwarz) eingezeichnet. Dargestellt ist die einheitenlose Krafteffizienz der optischen Falle die linear mit der Strahlungsleistung und weiteren Konstanten in die Kraft der Falle umgerechnet wird.

Die Kraft ist hierbei linear zur Strahlungsleistung des Fallenlasers und erreicht ein Maximum in der Fokusebene und einem lateralen Abstand von etwa 70 % des Teilchenradius zwischen Strahlfokus und Teilchenmitte, hier beschrieben als transversale Verschiebung. Projekt-Ziel ist es, eine Kraft von > 0,25 nN auf die Zellen auszuüben, dies wird bei einer Strahlungsleistung von 3 W auf Zellen mit Durchmessern von > 2 µm erreicht (Bild 18). Bei kleineren Zellen muss eine höhere Strahlungsleistung (bspw. 5 W für den Durchmesser von 1 µm) eingesetzt werden.

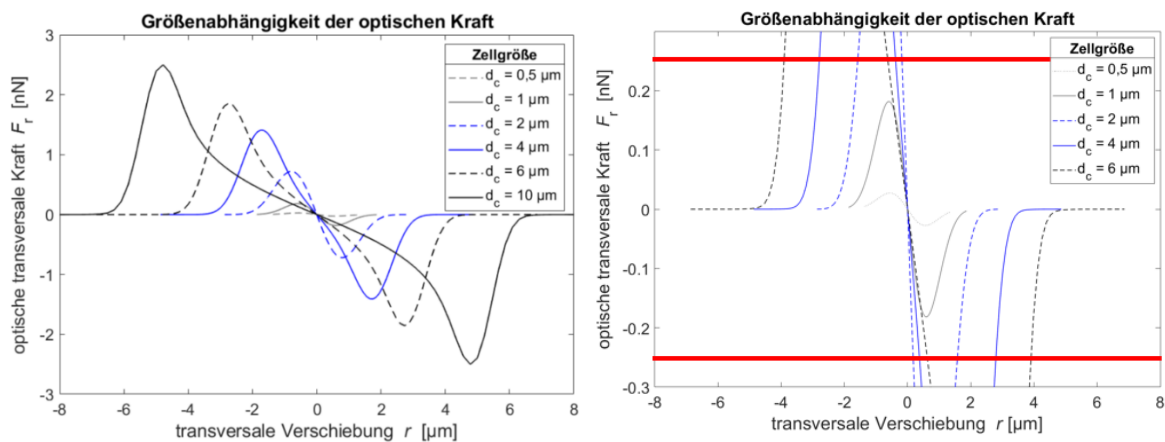


Bild 18 links: Profil der transversalen Kraftkomponente einer optischen Falle gegen den Abstand von Strahlmittelpunkt und Zentrum der Zelle auf Zellen in Wasser mit Durchmessern zwischen 0,5 µm und 10 µm. Hierbei wird eine Laserstrahlungsleistung von 3 W angenommen. Rechts: Wie Links für kleinere Kräfte. Das Projekt-Ziel von 0,25 nN ist in Rot eingezeichnet.

Aus der maximalen Kraft wird eine maximale Geschwindigkeit berechnet, mit der die Teilchen gegen die Stokes'sche Reibung in einer Flüssigkeit verschoben werden können und damit zur Sortierung aus dem Strom ausgelenkt werden. Ein erfolgreicher Sortiervorgang wird angenommen, wenn bei vorgegebener Sortiertrate eine Verschiebung der Zelle senkrecht zur Flussrichtung von 10 µm erreicht wird. Diese Verschiebung wird benötigt, um an einer folgenden Kanalverzweigung die Zelle vom Hauptstrom zu trennen und in einen anderen Kanalausgang zu leiten. Um möglichen Schaden der Zelle durch die Einstrahlung zu vermeiden, sollte eine möglichst geringe Strahlungsleistung verwendet werden. Im Experiment ist die Laserstrahlungsleistung im Bereich von 0,1 W bis 40 W realisierbar. Davon erreichen etwa 34% das Mikroflosssystem (Transmission AOD-Scanner und Objektiv). In Bild 19 sind die Simulationsergebnisse für eine Strahlungsleistung von 3 W dargestellt. Für Zellen mit einem Durchmesser von größer 1 µm werden für die Sortierung ausreichende Verschiebungen ermittelt. Bei einer erhöhten Strahlungsleistung von 5 W ist diese mit 9.8 µm ausreichend für Zellen mit einem Durchmesser von 0,5 µm.

Die Teilchen sollen bei einer Flussgeschwindigkeit von 500 mm/s sortiert werden. Das Sichtfeld der optischen Falle entspricht dazu mindestens 500 µm und es soll eine Sortiertrate von 1 kHz ermöglicht werden. Mit hinreichend großer Strahlungsleistung der optischen Falle (> 5 W) wird eine hinreichend große Kraft auf die Teilchen erwartet. Der Einfluss der Strahlung auf die Zellen bei der sehr kurzen Einwirkungszeit muss im Experiment untersucht werden. Weitere Parameter, die im Experiment untersucht werden können, sind die

Verfahrstrecke der optischen Falle (dies ändert die verwendete Numerische Apertur der Laserstrahl-Fokussierung), verschiedene Flussgeschwindigkeiten und gegebenenfalls reduzierte Sortierraten.

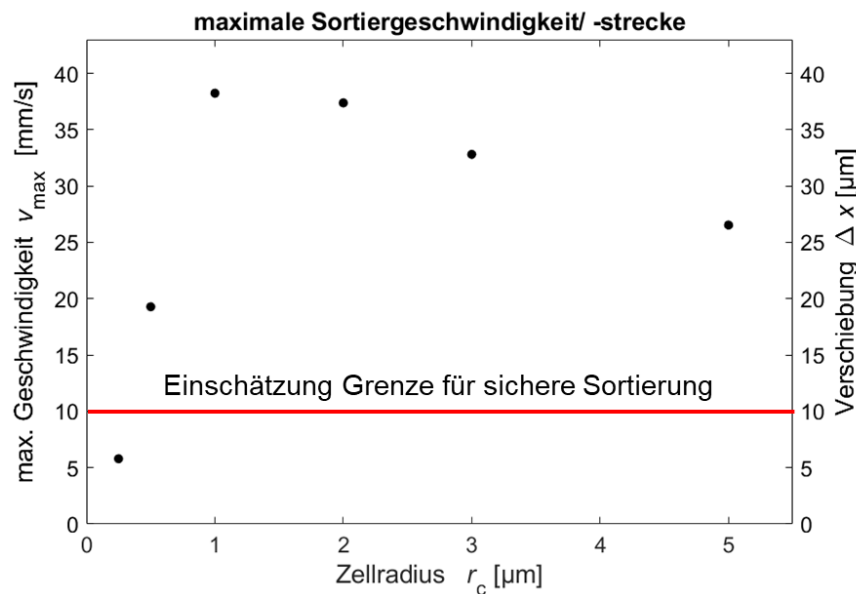


Bild 19 Errechnete Geschwindigkeit und Verschiebung gegen Stokes'sche Reibung von Zellen unterschiedlicher Durchmesser (0,5  $\mu\text{m}$  bis 5  $\mu\text{m}$ ) durch eine optische Falle mit einer Laserstrahlungsleistung von 3 W.

### Grundlagen optofluidischer Schalter

Für die Analyse des optofluidischen Schalters und die experimentelle Überprüfung der Simulationsergebnisse wurde ein Laboraufbau ausgelegt und aufgebaut. Dieser ist in Bild 20 dargestellt. Der Aufbau beinhaltet einen Faserlaser (0,1 W bis 10 W,  $\lambda = 1063,1 \text{ nm}$ ), der durch ein System zur Strahlformung in den Scanner (zwei gekreuzten akusto-optischen Deflektoren (AOD)) eingekoppelt wird, eine Laserstrahlquelle für die Fluoreszenzdetektion, ein Fluoreszenzdetektor, bestehend aus einer Single Photon Avalanche Diode (SPAD) mit spektralen Filtern und einer Mikroskop-Anordnung (Mikroskoptisch, Objektiv, Kamera). Die Fluoreszenzdetektion wird in ersten Experimenten zur Teilchendetektion genutzt. Die Laserstrahlen werden hier mit einem Immersionsobjektiv in die Mikrofluidik eingekoppelt. Der Laserstrahl der optischen Falle wird nach der Mikrofluidik auf eine Quadranten-Diode gelenkt, wodurch eine Positionsdetektion der Teilchen relativ zum Laserstrahl ermöglicht wird. SLE-gefertigte Teststrukturen mit hydrodynamischer Fokussierung, Sortierkammer und zwei Ausgangskanälen wurden ausgelegt und gefertigt. Hierbei ist die Kanalgeometrie der Sortierstruktur und im Speziellen die Geometrie der Verzweigung auf die veranschlagte Verschiebung der Zellen von minimal 10  $\mu\text{m}$  angepasst.

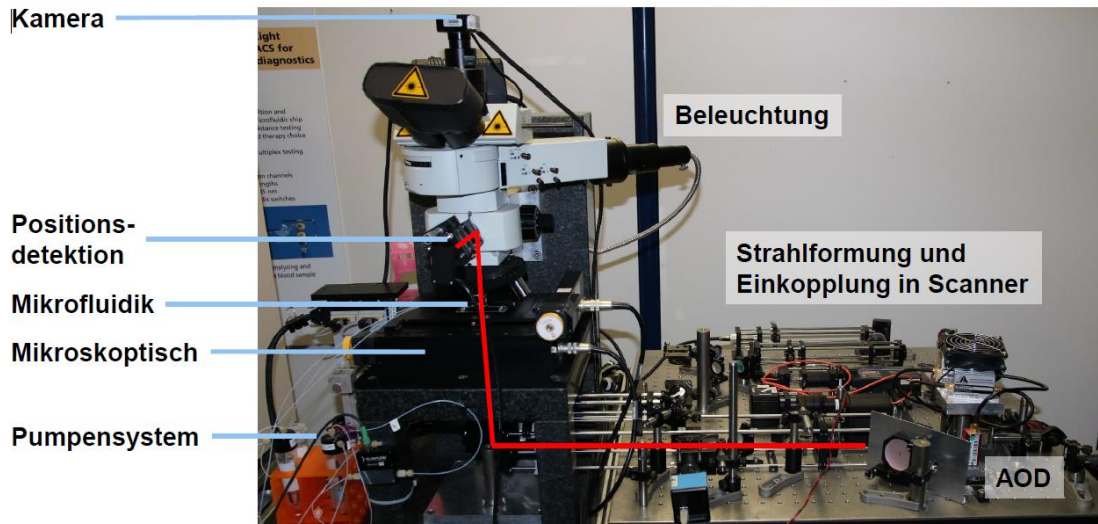


Bild 20 Laboraufbau der optischen Falle, eingezeichnet (rot) ist der Strahlengang des Fallenlasers in das Mikroskop bis zur Positionsdetektion. Der Laserstrahl wird durch ein Strahlformungssystem in den Scanner (AOD) eingekoppelt und mit einem Immersionsobjektiv von unten in die Mikrofluidik eingekoppelt. Der Fluidikchip ist in einem Mikroskop eingebaut und wird mit einer Kamera beobachtet. An der Seite stehen Spritzenpumpen zur Erzeugung des Flusses in der Mikrofluidik.

Zunächst wurden Experimenten mit geraden Kanalstrukturen und statischer (nicht bewegter) optischer Falle zum Halten von Polystyrol-Partikel gegen die Strömung durchgeführt, siehe Bild 21.

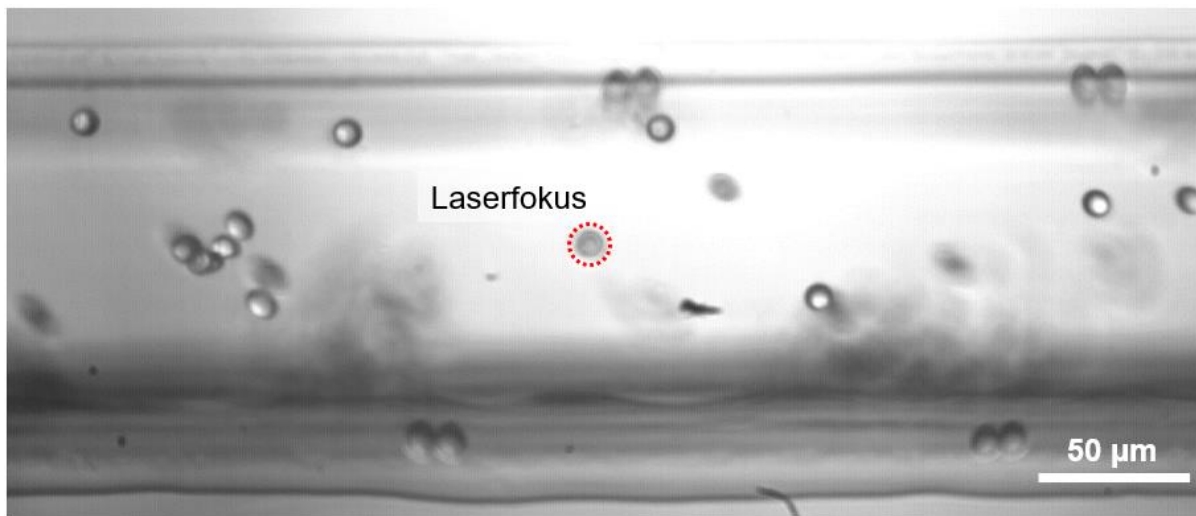


Bild 21 Ein von der optischen Falle gegen eine Strömung gehaltenes Polystyrol-Partikel. Das gehaltene Partikel mit einem Durchmesser von 10 µm ist rot umrandet. Die Strömung fließt von links nach rechts.

Im Folgenden wurde der Laboraufbau zur Untersuchung der Grundlagen zum optofluidischen Schalter erweitert und auf die Aufgabenstellung hin erweitert. In Bild 22 ist der schematische Aufbau dargestellt. Der gekreuzte AOD ermöglicht die trägheitsfreie Bewegung des Pinzettenlaser-Fokus innerhalb des mikrofluidischen Chips. Für die Quadranten Fotodiode für die Positionsdetektion wurde zunächst eine kommerziell erhältliche verwendet (Bandbreite 150 kHz, PDQ80A, Thorlabs) und danach durch eine Eigenentwicklung mit größerer zeitlicher Dynamik ausgetauscht (Bandbreite Verstärker > 10 MHz, Dynamik von 1:10.000, Sensorchip S5981, Hamamatsu), siehe Bild 28.

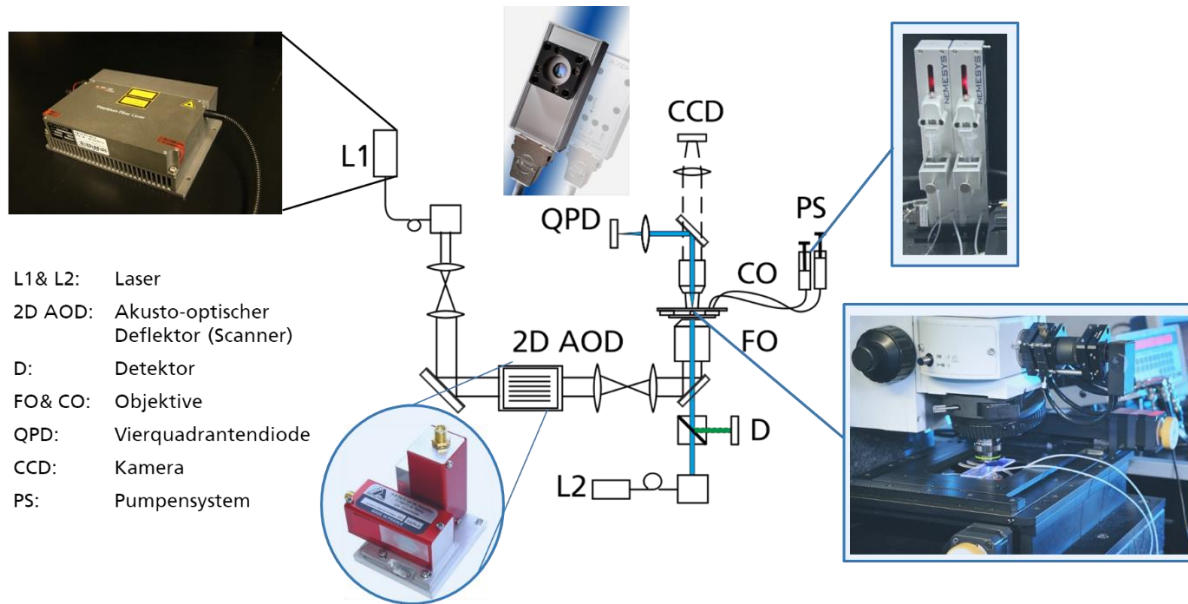


Bild 22 Schema der optischen und fluidischen Komponenten vom optofluidischen Schalter.

Zum Einsatz kommen zwei verschiedene mikrofluidische Chips. Ein Chip aus Kunststoff wurde vom Hersteller ChipShop (Fluidic 283) bezogen. Die schnelle Verfügbarkeit und guten optischen Qualitäten aufgrund der spritzguss-gefertigten Chips ermöglichten ein frühes Untersuchen des opto-fluidischen Schaltvorgangs.

Aufgrund der optischen und thermischen Eigenschaften der Kunststoffe (PMMA und Zeonor) ist dieser Chip jedoch nicht für den Dauereinsatz bei hohen optischen Leistungen geeignet. Bei hohen Schaltfrequenzen wird der Chip durch die absorbierte optische Leistung bis zur thermischen Zerstörung hin erwärmt, weshalb entweder die Wiederholfrequenz oder die verwendete optische Leistung bei der Untersuchung klein gehalten wird. Des Weiteren verhindert der räumliche Aufbau dieses Chips die optische Beobachtung der Kanalverzweigung, eine für das Experiment wichtige Position. Das Anfahren dieser Position wird durch die fluidischen Anschlüsse verhindert, welche nah an der fluidischen Verzweigung positioniert sind und mit den Objektiven kollidieren, die prinzipbedingt in diesem Aufbau beidseitig nah an der Mikrofluidik positioniert sind.

Eine Eigenentwicklung eines Sortierchips wurde entworfen und gefertigt. Dieser Chip ist aus Quarzglas gefertigt und besteht aus einem dreidimensional strukturierten Unterteil, welches durch ein laserverschweißtes Quarzglasfenster gedeckelt ist. Durch den Quarzglasdeckel erhält die Mikrofluidik einseitig eine sehr gute optische Qualität, was vorteilhaft bei der Verwendung der optischen Pinzette ist.

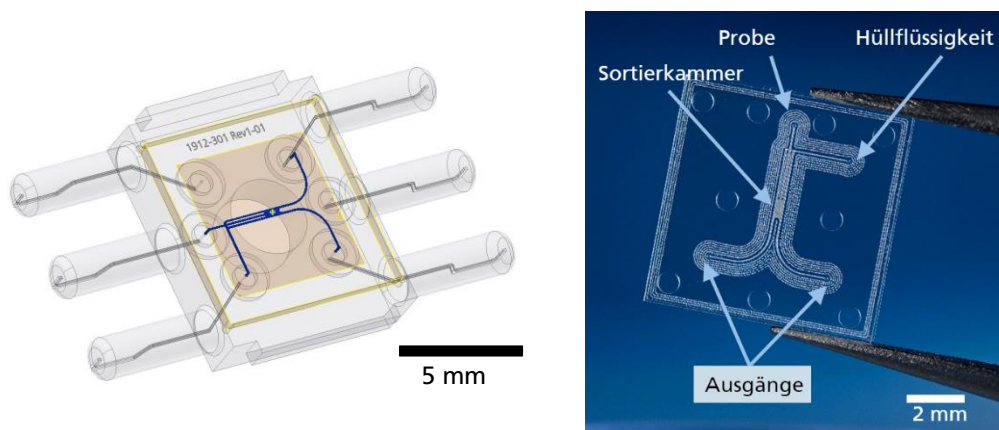


Bild 23 Sortierchip für das opto-fluidische Sortieren. Links: CAD-Darstellung mit Trägerchip. Rechts: Bild des SLE-gefertigten und lasergeschweißten Chips.

Mikrofluidik-Chips aus Quarzglas wurde mit dem SLE-Verfahren gefertigt und im System charakterisiert. In einer zweiten Revision des Chips wurden einzelne Geometrien für das Fertigungsverfahren und die Integration ins Gesamtsystem optimiert. In Bild 24 ist die Charakterisierung der hydrodynamischen Fokussierung dargestellt, welche Voraussetzung für eine zuverlässige und konstante Detektion der zu sortieren Bakterienzellen ist.

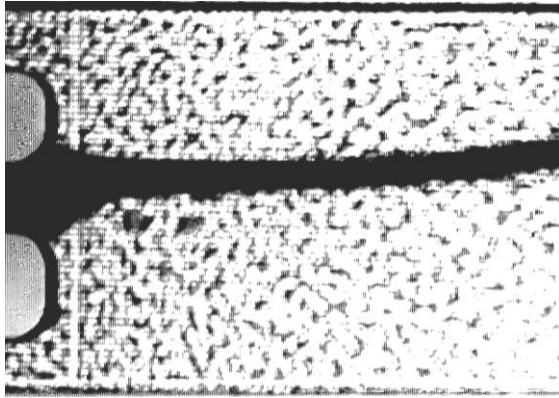


Bild 24 Integration und Charakterisierung SLE-gefertigter Sorter-Chips in Hinblick auf die hydrodynamische Fokussierung. Der später die Zellen führende Probestrom ist eingefärbt und im mittig im Bild als dunkler Verlauf zu erkennen.

Die Positionsdetektion wurde in Betrieb genommen und untersucht. Ausgenutzt wird die Brechung des Pinzettenlaserstrahls an dem Partikel bzw. der Zelle, siehe Bild 25 a). Diese sorgt für eine Winkeländerung des Pinzettenlaserstrahls. Diese Winkeländerung ist abhängig von dem getroffenen Bereich der Zelle. Der optische Strahlengang ist so ausgelegt, dass der Pinzettenlaser unabhängig von der Position des Fallenfokus (ohne Zelle) auf die Mitte der Quadranten-Photodiode fällt. Befindet sich eine Zelle im Fokus setzt sich die Winkeländerung an dieser in eine Verschiebung der Strahlposition auf der Quadranten-Photodiode um. Die Position der Zelle zum Laserstrahl wird somit messbar, siehe Bild 25 c).

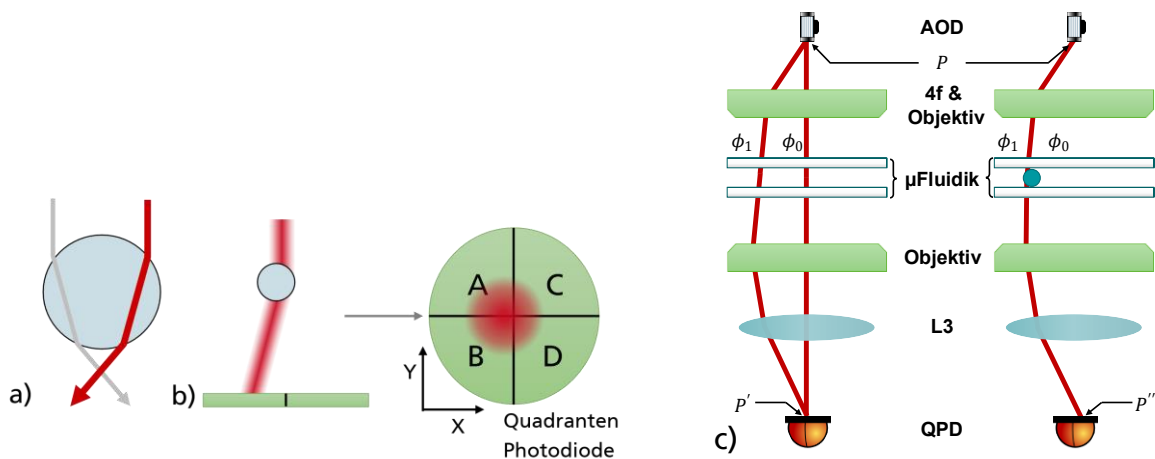


Bild 25 Funktion und Aufbau der Positionsdetektion. In a) ist die Ablenkung des Laserstrahls abhängig von dem getroffenen Bereich der Zelle dargestellt. In b) wird diese Ablenkung in eine Strahlposition auf einer Quadranten-Photodiode umgesetzt. In c) ist der gesamte optische Strahlengang dargestellt.

Neben der Position des Partikels wird gleichzeitig erfasst, ob sich überhaupt ein Partikel im Laserfokus befindet. In Bild 26 ist zu sehen, wie bei gefangenem Partikel bzw. Zelle sich das Positionssignal ändert. Dies kann für eine aktive Regelung der Fallenbahn oder zur Aktivierung des Lasers genutzt werden.

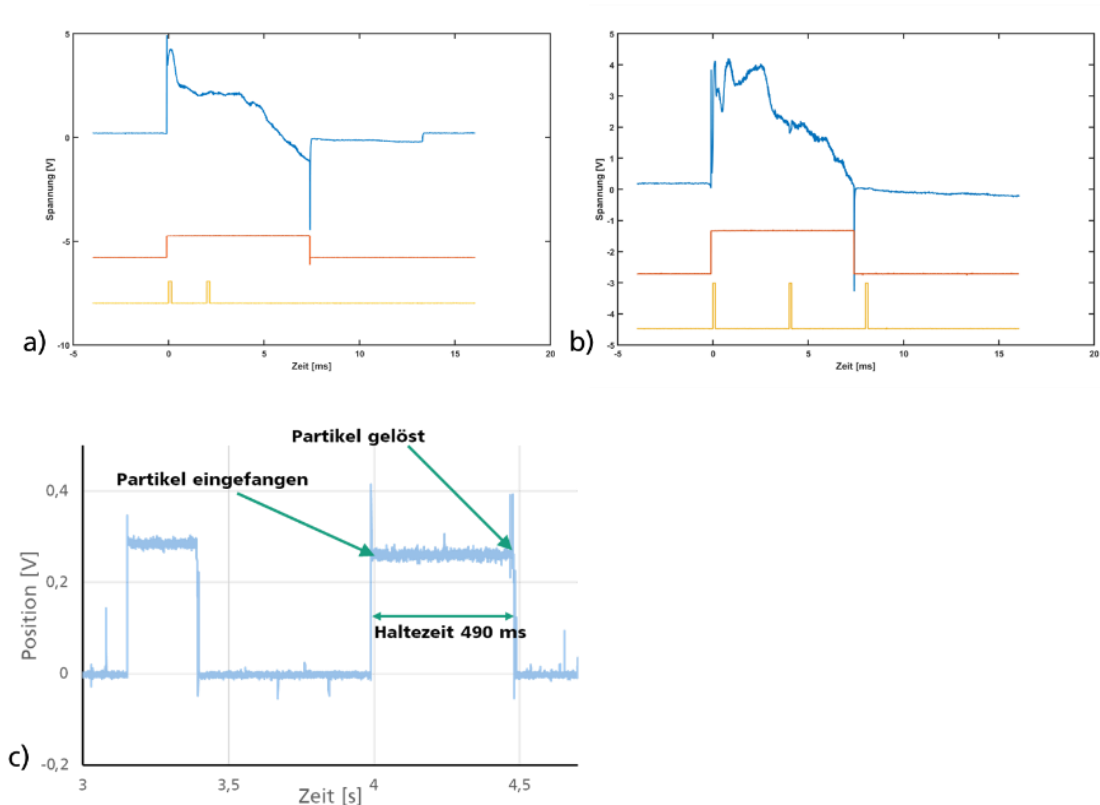


Bild 26 Signal der Positionsdetektion. In Blau ist das Positionssignal aufgezeichnet, in Rot der Zeitdauer in welcher die Falle an ist und verfahren wird und in Gelb die Zeitdauer, in denen für eine optische Kontrolle Bildaufnahmen erfolgen. In a) ist das y-Signal ohne Partikel dargestellt, in b) das Signal mit teilweise gefangenem Partikel. In c) ist das Summensignal der Positionsdetektion aufgetragen.

### Grundlagen $\mu$ Sorter

Aufbauend auf den Ergebnissen wird das Gesamtsystem für die Sortierung erweitert und diese untersucht. Eine echtzeitfähige Elektronik-Plattform wurde entwickelt, welche als zentrales Steuersystem ein FPGA-Modul (Arria10, Intel) besitzt, siehe Bild 27. Die zeitkritischen Datenerfassungs- und Regelungsschritte werden in dieser programmierbaren Logik ausgeführt, die Konfiguration und Kommunikation mit dem Benutzer übernimmt ein ebenso in diesem Modul integrierter ARM-Core-Prozessor auf welchem ein Embedded Linux (Yocto Linux) installiert ist. Dies System ist eine gemeinsame Entwicklung mit Projektpartner Solectrix, wobei z.B. die Platine mit sehr schnellen AD-Wandlern (bis zu 80 Mio. Samples pro Sekunde) für Streulicht-, Fluoreszenz- und Positionsdetektion und wesentliche Logikmodule für die FPGA-Programmierung von Solectrix stammen.



Bild 27 Echtzeitfähige Elektronikplattform und Detektionseinheit.



Bild 28 Quadrantdiode für die Positionsdetektion mit bis zu 1 MS/s

Durch das Streulicht-, Fluoreszenz- oder Positions-Signal kann der Sortiervorgang ausgelöst werden und der Laserfokus entlang einer vorgegebenen Bahn abgefahren werden. In Bild 29 ist dieser Vorgang durch eine Mehrfachbelichtung festgehalten. Zu sehen ist ein kleinerer dunkler Schatten, welcher sich in regelmäßigen Abständen wiederholt. Der Schatten wird durch ein E.coli Bakterium verursacht, welches zunächst von der bewegten optischen Pinzette diagonal im Kanal abgelenkt wird und dann die Falle verlässt und mit der Strömung weiter driftet. Anhand solcher Messungen konnte die Fallenkraft auf mindestens 0,15 nN bestimmt werden. Untersucht wurde der  $\mu$ Sorter anhand der Beispiel-Bakterien Escherichia coli und Staphylococcus aureus. Durch Messungen mit der statischen, d.h. nicht bewegten optischen Pinzette wurden Kräfte von größer 0,57 nN nachgewiesen.

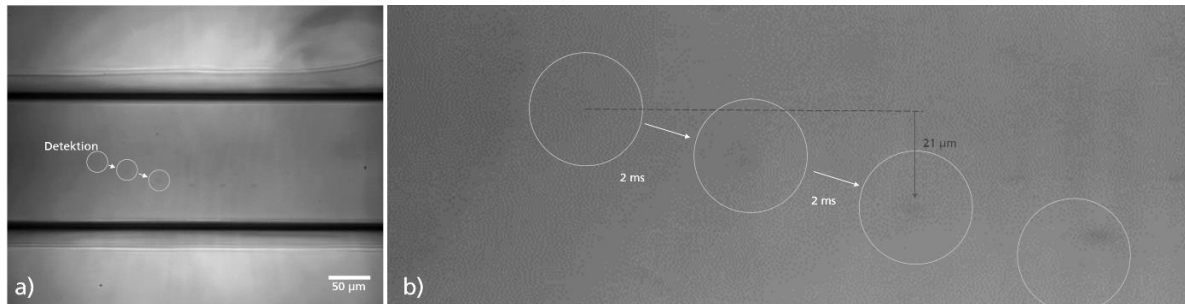


Bild 29 Mit der optischen Pinzette gefangenes und aussortiertes Bakterium (E.coli). Die Strömung ist von links nach rechts, in a) ist zu sehen, wie eine eingefangene E.coli Zelle entlang der Fallenbahn aus der Strömungsmittellinie in den unteren Kanalbereich verschoben wird. Durch eine Mehrfachbelichtung des Bildes in 2 ms Zeitintervallen ist die Zelle im Bild zu mehreren Zeitpunkten zu sehen. In b) ist der Bereich der mit dem Laser abgefahrenen Bahn vergrößert dargestellt.

In enger Abstimmung und Zusammenarbeit mit Solectrix wurden Steueralgorithmen, Firmware und Software für die echtzeitfähige Elektronik-Plattform entwickelt. Das erfolgreiche Abtrennen von Zellen mithilfe einer bewegten optischen Pinzette ist aufgrund der biologischen Variabilität der Zellen und der geringen optischen Kräfte technisch sehr herausfordernd. Zusammen mit Solectrix wurden daher Methoden implementiert, welche die Zellposition relativ zur bewegten optischen Pinzette detektiert. Diese Messung ist empfindlich auf lokale Eigenschaften der Mikrofluidik, wie variierende optische Wegstrecken des Pinzettenlasers und Oberflächenkrümmungen des Kanals. Um dieses zu kompensieren, wurde ein Verfahren entwickelt, bei welchem eine Korrekturmatrix vor dem Sortierprozess aufgenommen wird, um örtliche Änderungen des Signals zu korrigieren.

In Bild 30 ist die Benutzeroberfläche und das Videobild der Laserpinzette während der Bewegung in der Mikrofluidik zu sehen. Die Fallenbahn kann vielseitig durch eine Funktion 4. Ordnung oder durch Vorgabe einer Punktematrix konfiguriert werden.

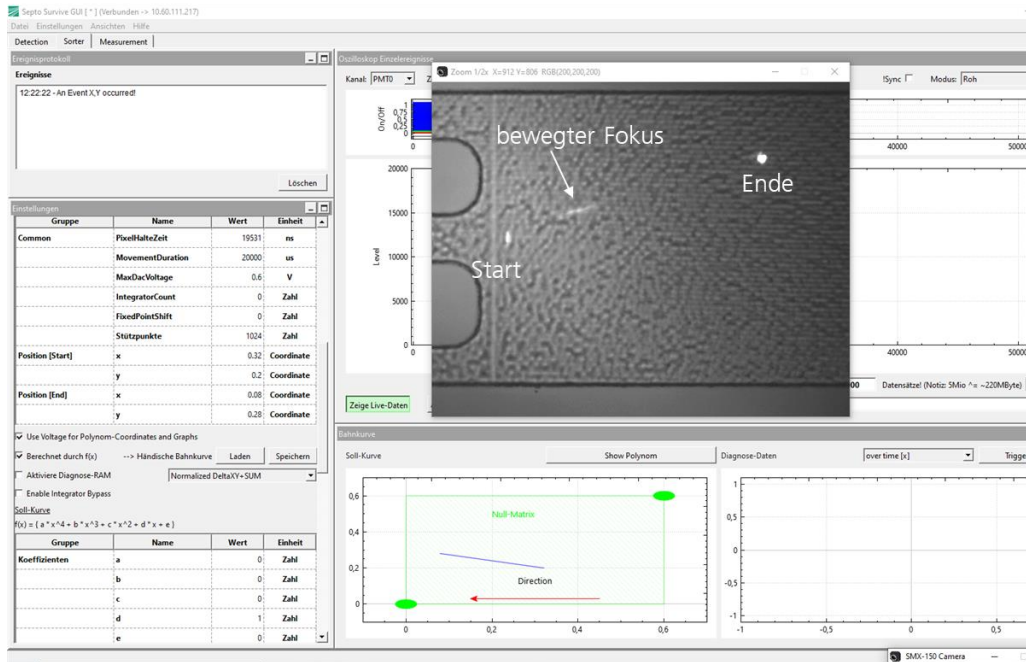


Bild 30 Funktionstest der Ablauf- und Gerätesteuerung mit Software- und Hardwarebestandteilen vom Projektpartner Solectrix. Auf dem kleineren Videobild ist der Start- und Endpunkt sowie der Pinzettenfokus beim Verfahren zu sehen.

In Bild 31 ist der Ablauf eines Sortiervorgangs dargestellt. Ein Partikel wird anhand des Streusignals erkannt, eine Fallenbahn abgefahren und an vier Zeitpunkten ein Bild belichtet, so dass bei erfolgreicher Auslenkung des Partikels an vier Orten ein Partikel erfasst wird. Diese Orte sind abhängig von Fluss- und Partikelgeschwindigkeit und sind bei optimalen Parametern stabil. Nachteil der Mehrfachbelichtung sind geringe Kontrastwerte des detektierten Partikels.

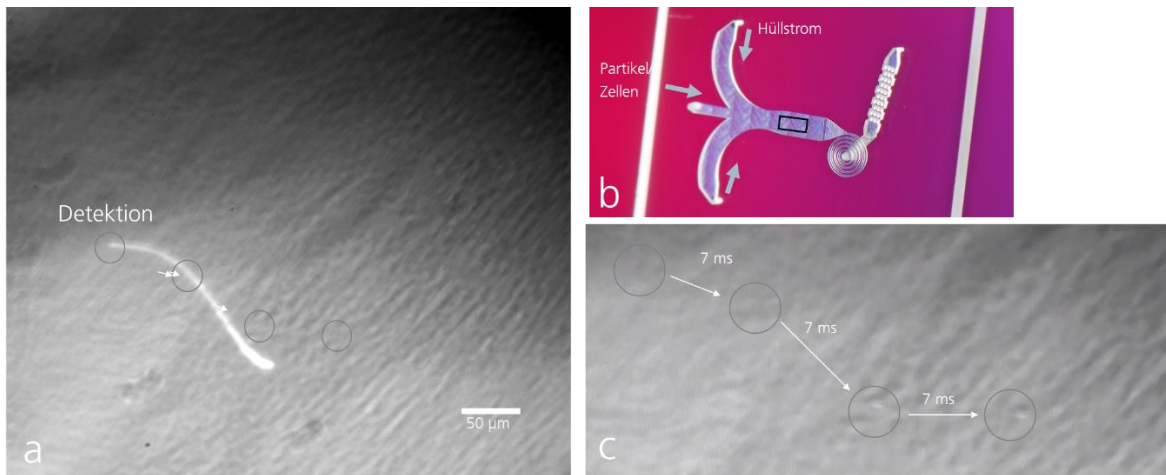


Bild 31 Aktiv sortierte Mikropartikel in der Mikrofluidik. In a) ist die abgefahrte Fallenbahn aufgenommen, mit Kreisen sind die mit der Kamera an vier aufeinander folgenden Aufnahmezeitpunkten Partikelorte gekennzeichnet. Der Partikel folgt nicht der kompletten Fallenbahn sondern verlässt vorzeitig die Bahn, weshalb Kreis 3 und 4 nicht auf der Bahn liegen. In b) ist die verwendete Mikrofluidik mit dem Ort der Bildaufnahme gezeigt und in c) eine Vergrößerung mit 7μm Partikel.

## Evaluierung Gesamtsortierkonzept

Die erfolversprechendste Verkettung der Einzeltechnologien zu einem Gesamtsortierkonzept berücksichtigt die unterschiedlichen Volumenströme indem ausreichend Puffergefäße die Ausgangsfluide der einzelnen Stufen aufnehmen und der nächsten Stufe zur Verfügung stellen. Diese Puffergefäße entkoppeln die Stufen, wodurch diese sich separat auf einen geeigneten Arbeitspunkt anpassen lassen. Diese Trennung erlaubt eine getrennte Betrachtung der Sortiervorgänge für die Evaluierung.

Das Sortieren mit dem DeanFlow-Sorter erreicht hohe Verdünnungsraten von 1:1081 und hohe Wiederfindungsraten für Bakterien von 90%. Durch den hohen Volumenstrom von 180  $\mu\text{l}/\text{min}$  können signifikante Volumina von mehr als 10 ml/h prozessiert werden. Allerdings funktioniert dieses Verfahren aufgrund von Partikel-Partikel-Stößen nur bei ausreichend verdünnten Proben (typ. 400 bis 1000-fache Verdünnung des Blutes). Durch Parallelisierung und ein hintergeschalteter Aufkonzentrationschritt durch z.B. Filtration könnte dieses Verfahren für die passive Vorverdünnung von Blutzellen und Aufkonzentration von Bakterienzellen genutzt werden.

Das Sortieren mit aktiv bewegter optischer Falle hat eine ausreichend starke Kraftwirkung für das Bewegen und Abtrennen von Bakterienzellen im Mikroflusssystem demonstriert. Die Systemtechnik bleibt jedoch herausfordernd und wurde nicht vollumfänglich gelöst innerhalb dieses Vorhabens. So stellt die Verwendung von Laserstrahlung im Leistungsbereich  $> 1\text{W}$  besondere Anforderungen an die Mikrofluidik, sie muss eine entsprechend geringe Absorption bei der verwendeten Laserwellenlänge und eine ausreichend thermische Stabilität zeigen. Die mit dem Verfahren SLE in Quarzglas gefertigten Mikroflusssysteme erfüllen diese Bedingungen, allerdings weisen die direkt bearbeiteten Oberflächen noch eine Oberflächenwelligkeit auf, welche die Verwendung und optische Überwachung erschweren. Ansätze zur Oberflächennachbearbeitung durch Laserpolieren innerhalb der Mikrostrukturen zeigten vielversprechende erste Ergebnisse, konnten jedoch nicht innerhalb der Projektlaufzeit weiterverfolgt werden. Die Steuerung und Regelung der Pinzettenbewegung beim Sortiervorgang konnte in der Projektlaufzeit nicht abschließend evaluiert werden und bleibt Gegenstand zukünftiger Forschungsvorhaben.

## 2. Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

### Personalkosten:

Ein wesentlicher Teil der Projektmittel entfiel auf Personalkosten. Ein Großteil der geleisteten Arbeitsstunden entfiel auf die Simulation und die Auslegung der verschiedenen mikrofluidischen Flusssysteme und der optischen Pinzette sowie der experimentellen Untersuchung von passivem DeanFlow-Sorter und aktivem  $\mu$ Sorter.

### Sachmittel:

Ein Großteil der Sachmittel wurde als Material für den Aufbau der Experimentierstände für die passive DeanFlow-Sortierung und den aktiven  $\mu$ Sorter mit bewegter optischer Pinzette aufgewandt. Neben der Fertigung der Mikrofluidiken sind insbesondere Optiken, Optomechaniken, elektronische Baugruppen, fluidische Systemtechnik, Mikropartikel und Komponenten für die echtzeitfähige Steuerung zu nennen.

Die beschafften Anlagen sind

- 1) Ein Pumpensystem für den Betrieb der mikrofluidischen Systeme
- 2) Ein System on Chip mit FPGA und ARM-Core Prozessor für die Realisierung der echtzeitfähigen Steuerungselektronik
- 3) Ein Computer für die Steuerung und Betrieb der Laboraufbauten und der Echtzeitsteuerung
- 4) Ein Flowboard für den Anschluss mehrerer Flusssensoren an das Pumpensystem (Pos. 1)

Die effiziente Nutzung der Zuwendung ermöglichte die erfolgreiche Realisierung des Projekts und trug maßgeblich zur Erreichung der Ziele bei.

### 3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Die im Rahmen des Vorhabens „SeptoSurvive“ geleistete Arbeit war sowohl notwendig als auch angemessen, um die gesetzten Ziele zu erreichen und einen mikrofluidischen Zell-Sorter für das Abtrennen von Bakterien aus Blutproben zu erforschen.

#### Notwendigkeit der Arbeiten

Das Abtrennen einzelner Fremdzellen aus Vollblut ist technologisch eine äußerst anspruchsvolle Aufgabe. Ein Blick in den aktuellen Forschungsstand zeigt, dass hier noch keine Lösung existiert, jedoch vielversprechende Teiltechnologien, wie die auf Zellgrößen basierende Separation durch Ausnutzung des Dean-Flows, untersucht werden, welche in Kombination eine Lösung darstellen können. So ist die Kombination aus DeanFlow Sorter und aktivem  $\mu$ Sorter mit bewegter optischer Pinzette eine vielversprechende technologische Lösung für dieses Problem. Die Untersuchung dieser Teiltechnologien und die Kombination dieser war daher ein notwendiger Schritt, um eine Isolation von Sepsis-Erregern aus Vollblut für eine Sepsis-Schnelldiagnostik mit Antibiogramm-Erstellung zu ermöglichen.

#### Angemessenheit der Arbeiten

Die durchgeführten Arbeiten waren sowohl im Umfang als auch in ihrer Tiefe angemessen, um die anspruchsvollen Projektziele effizient zu erreichen.

**Simulation von DeanFlow-Strukturen und optischer Falle.** Die Simulationen ermöglichten eine schnelle Identifizierung der wichtigsten Einflussgrößen und Erweiterung des Systemverständnisses, um schnell und ressourceneffizient Systeme für die experimentelle Untersuchung auszuarbeiten und zu realisieren.

**Experimentelle Untersuchung von DeanFlow-Sortierstrukturen und bewegter optischer Falle im Flusssystem.** Die Untersuchung der Partikel-Fluid- und Partikel-Laser-Interaktion im Experiment unter den Einflussgrößen der „realen“ Bedingungen im Flusssystem zeigte wichtige Abweichungen zu den Simulationsergebnissen auf und waren notwendig für die grundlegende Untersuchung und Prüfung dieser Technologien für die Eignung zum Isolieren von Sepsiserregern.

### 4. Nutzen und Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

#### Wissenschaftlicher und technologischer Nutzen

Das Forschungsprojekt „SeptoSurvive“ hat wertvolle Erkenntnisse für das passive Abtrennen von Partikeln bzw. Zellen im Größenbereich von 3  $\mu$ m bis 10  $\mu$ m geliefert. Dieses Verfahren ist aufgrund der passiven Wirkweise in der Lage große Mengen von Partikeln zu prozessieren und durch Parallelisierung kurze Verarbeitungszeiten zu erzielen. Dieser Fortschritt ist insbesondere für medizinische Applikationen wertvoll, welche Zellfraktionen aus Gemischen wie z.B. Blut benötigen.

Für den aktiven  $\mu$ Sorter wurde Systemtechnik entwickelt und Erkenntnisse der Laser-Partikel-Interaktion im Mikroflusssystem erarbeitet, welche wertvolle Fortschritte für das gezielte Manipulieren von Zellen im Mikroflusssystem darstellen. Die Ergebnisse im Bereich der Positionssensorik ermöglichen die notwendige Regelung und dadurch Kompensation von Variation in Fluss- und Partikel-Eigenschaften.

#### Wirtschaftliche Verwertbarkeit

Die durch „SeptoSurvive“ gewonnenen Erkenntnisse eröffnet die Möglichkeit Anfragen zu Drittmittelprojekten aus der Industrie zu Sortierverfahren für das Abtrennen von Mikropartikeln in Mikroflusssystemen zu bedienen, was vorher nicht möglich war.

Für eine Weiterentwicklung der Technologien zu einem oder mehreren Produkten im Bereich der klinischen Diagnostik oder Biotechnologie durch die Industriepartner wird die Kooperation in F&E-Projekten angestrebt.

## Erfolgte und geplante Veröffentlichungen

Ergebnisse aus dem Projekt „SeptoSurvive“ im Bereich der Partikelpositions-Detektion wurden der Fach-Community auf dem Kongress „International Symposium on Microscale Separation and Bioanalysis 2022“ MSB22 mit dem Vortrag „Real-Time Particle Position Detection for Dynamic Optical Tweezers“ vorgestellt und diskutiert.

Eine Veröffentlichung zur Methodologie für die Charakterisierung bewegter optischer Pinzetten zur Manipulation von Partikeln im Mikrometer-Bereich ist noch geplant.

Im Rahmen des Vorhabens wurden Ergebnisse erarbeitet, welche in folgenden Masterarbeiten einflossen und veröffentlicht wurden bzw. noch werden:

- „Untersuchung passiver mikrofluidischer Verfahren zum Trennen von Partikeln unterschiedlicher Größe oder Magnetisierbarkeit“, Aina-Emilie Mae, 18.07.2024
- „Untersuchung eines opto-kinetischen Verfahrens zum Abtrennen von Sepsis-Erregern im Mikroflusssystem“, Felix Klausmann, noch in Ausarbeitung.