

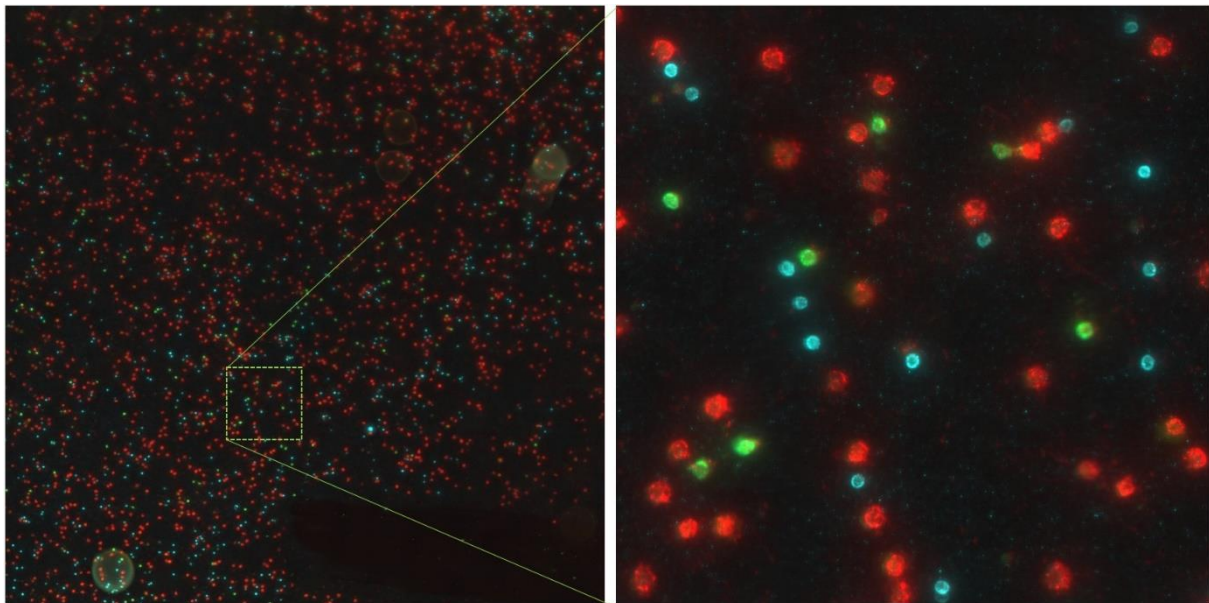
## QA RCMIA (Rare Cell Multiprobe Imaging Analyzer)

Teilprojekt im Verbundprojekt NADIM (Neurodegeneration and Alzheimer's Detection in Monocytes/Macrophages) - Förderkennzeichen 13GW0406B

- Abschlussbericht Teil I: Kurzbericht -

(2024-08/QA)

RCMIA (Rare Cell Multiprobe Imaging Analyzer) ist ein von Quantum Analysis (QA) entworfenes und untersuchtes innovatives biophotonisch-mikrofluidisches Instrument für die bildunterstützte Identifikation und statistische Analyse seltener biologischer Zellen, z.B. in Vollblut, und anderer mikroskopischer Partikel. Auf Basis einer kombinierbaren simultanen und sequenziellen biochemischen bzw. molekularbiologischen Vielfach-Fluoreszenzfärbung können z.B. Zellen mit einem Anteil  $< 0,5\%$  an anderen, ähnlichen Zellen oder kleinste Partikelkonzentrationen  $< 0,1/\text{ml}$  bildunterstützt und mit Hilfe einer großen Zahl von Fluoreszenzmarkern (z.B.  $>10\text{...}20$ ) großflächig ( $>10 \text{ mm} \times 10 \text{ mm}$ ) und mit optischen Auflösungen  $< 0,5 \mu\text{m}$  identifiziert und statistisch analysiert werden.



*RCMIA: Großflächige Multi-Color Fluoreszenzanalyse (Beispiel): 2 mm x 2 mm / 300 MPixel/  
Auflösung:  $< 0,5 \mu\text{m}$ . Probe (Invigate): 4-fach Färbung Vollblutprobe nach Präparation/Anreicherung:  
CD14-Atto488 + CD16-Pen + CD3-APC + DAPI (DNA/Kernfärbung). Falschfarben-Overlay.*

Zusammen mit der Expertise von Invigate und Immunotools und von ihnen entworfenen biochemischen Sonden (Antikörper/Fluoreszenzmarker), Methoden und Erprobungen wurde im Verbundprojekt NADIM (Neurodegeneration and Alzheimer's Detection in Monocytes/Macrophages) in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Erlangen die Anwendbarkeit von RCMIA für die Früherkennung neurodegenerativer Erkrankungen aus Vollblutproben erkundet.

Mit bisherigen Methoden ist eine analytische Abgrenzung und Analyse der hierfür relevanten seltenen Zellen nicht zuverlässig oder gar routinemäßig möglich: Mit Flow Cytometry (FCM) kann üblicherweise zwar eine große Zahl von Zellen innerhalb weniger Minuten sequenziell analysiert werden (typ.  $10.000\text{...}100.000/\text{s}$  in einem Volumen von  $0,1\text{...}1 \text{ ml}$ ). Mangels Bildunterstützung können charakteristische morphologische Zelleigenschaften (Größe, Form, Verteilung von Strukturen mit biochemischen Sonden identifizierbarer Stoffe) jedoch nur sehr indirekt (etwa über integrale Streulichteigenschaften) bzw. überhaupt nicht (integrale Fluoreszenzintensität pro Zelle) für eine robuste Abgrenzung ähnlicher Zellen untereinander herangezogen werden. Weiter kann mit FCM jede Zelle nur einmal untersucht werden, und die Anzahl der pro Zelle simultan verwendbaren Sonden ist limitiert (typisch in der Routine:  $\sim 4\text{-}6$ ).

Im Gegensatz dazu können mit bildgebender Fluoreszenzmikroskopie morphologische bzw. subzelluläre Zellstrukturen optisch aufgelöst werden. Dabei kann auch hier üblicherweise nur eine begrenzte Zahl von Fluoreszenzsonden (~4-5) simultan eingesetzt werden. Darüber hinaus ist wegen der optisch limitierten Objektfläche (z.B. bei einer Auflösung von 0,5 µm mit einem typischen Objektiv 40x und numerischer Apertur 0.8 etwa 0,25 mm x 0,25 mm pro Bild) die Gesamtzahl von (im Bild nicht überlappenden) Zellen für eine statistische Analyse seltener Zellen zu klein.

Um die Unzulänglichkeiten von FCM und herkömmlicher Fluoreszenzmikroskopie zu überwinden, verfolgte QA mit RCMIA ein Konzept und die instrumentelle Integration einer innovativen mikrofluidischen Analysekommer, die sich sowohl zur mehrfach sequenziellen Färbung und hochaufgelöst (< 0,5 µm) bildunterstützten Einzelpartikelanalyse einer hohen Zahl von an einer über 1000x größeren Oberfläche (> 10 mm x 10 mm) adhärerten/immobilisierten Zellen (Modus 1 „statisch“) als auch zur automatisierten bildunterstützten sequenziellen Analyse einer hohen Zahl von Zellen in Suspension (Modus 2 „dynamisch“) eignet.

Im Ergebnis liefert RCMIA in allen Modi neben integralen optischen Eigenschaften morphologisch weiter auswertbare Einzelbilder aller für weitere Betrachtungen relevanter Einzelzellen. In Modus 1 ist (bislang) die erzielbare optische Auflösung höher.

Zur Erkundung der Möglichkeiten wurden unter Verwendung speziell auf die Anforderungen von RCMIA abgestimmter und ausgerichteter neuartiger mikroskopoptischer Module von Cytecs und eigener Komponenten instrumentelle Demonstratoren realisiert. In mehreren Stufen wurden das Instrument und seine Analysemöglichkeiten mit mikroskopischen Modellpartikeln und biologischen Proben gemeinsam mit den Projektpartnern erprobt und sukzessive optimiert.

Für die Instrumentierung mussten von QA insbesondere folgende Komponenten entworfen, integriert, erprobt und sukzessive optimiert werden:

- Einfach als Verbrauchsmaterial herzustellende mikrofluidische Analysekommer (MSA Slide, modular, mit Wechseladapter) in Varianten für Modus 1 und 2
- Mikrofluidik-Steuerungsmodul für automatisierte sequenzielle Färbungen und Modus 2
- Ultrapräzisions-Dosier-Spritzenpumpe SMSP (Smart Mini Syringe Pump)
- Kompakte, steuerbare Fluoreszenz-Anregungslichtquellenmodule (Diodenlaser, LED)
- Empfindliche Fluoreszenz-Optik (optische Spektralfilterkombinationen, Kameramodul)
- Motorisierter XY-Stepper für großflächige, optisch hochaufgelöste Analysen
- Software zur Steuerung, Bilddatenakquisition und Bildanalyse (Vorverarbeitung)

Es konnte gezeigt werden, dass sich mit dem Instrument auf Glasträger adhärerte Zellen sequenziell mit biochemisch spezifischen Fluoreszenzmarkern (z.B. Antikörper) markieren und diese großflächig (> 10 mm x 10 mm), dennoch mit subzellulärer Auflösung (< 0,5...1 µm), und über mehrere spektrale Fluoreszenzkanäle und im Durchlicht (Modus 1) abbilden und statistisch weiter analysieren lassen. Damit wird es möglich, auch bei anteilmäßig seltenen Zellen (<0,5%) und kleinsten Partikelkonzentrationen (<< 1/ml) eine statistisch relevante Zahl nachzuweisen und zu analysieren.

Der dynamische Modus 2 wurde nur QA-intern realisiert und bislang mit Modellproben die grundsätzlichen Möglichkeiten sondiert.

Weitere spezifische Ergebnisse für das Verbundvorhaben lassen sich den Abschlussberichten der Kooperationspartner für das NADIM-Projekt entnehmen.

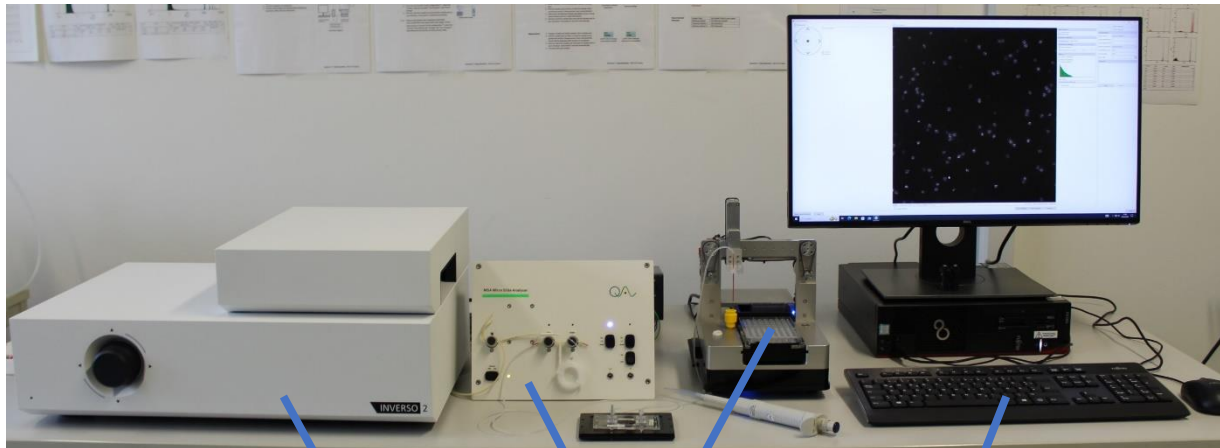
## QA RCMIA (Rare Cell Multiprobe Imaging Analyzer)

Teilprojekt im Verbundprojekt NADIM (Neurodegeneration and Alzheimer's Detection in Monocytes/Macrophages) - Förderkennzeichen 13GW0406B

- Abschlussbericht Teil II: Eingehende Darstellung -

(2024-08/QA)

RCMIA (Rare Cell Microscopic Imaging Analyzer, Abb. 1) ist das von QA im Teilprojekt für NADIM (Neurodegeneration and Alzheimer's Detection in Monocytes/Macrophages) entworfene Analyseinstrument zum Nachweis kleinster Anteile und Konzentrationen biologischer Zellen und anderer mikroskopischer Partikel (Übersicht vgl. zugehöriger Kurzbericht).



RCMIA/MSA Mikroskopische Einheit (abschließende Projektversion)  
(mit XY-Tisch für Mikrofluidik-Slide, Lichtquellen für Fluoreszenzanregung, Kameras, ...)

Mikrofluidik-Steuerung mit Reagenzien-Autoloader (hier ohne Gehäuse)

Workstation mit Software für Systemsteuerung, Automatisierung, Partikelanalyse

Abb. 1 RCMIA Demonstrator-Setup zum Projektabschluss

Für RCMIA (auch „MSA Analyzer“) und die auch den Projektpartnern zur Verfügung gestellten Demonstratoren wurden von QA eine Vielzahl von innovativen technischen Lösungen und Komponenten entworfen. Auf den technischen Aufbau und einzelne Lösungen und wichtige Komponenten wird detaillierter eingegangen, nachdem zunächst Eckdaten und Angaben zur technischen Leistungsfähigkeit auch im Vergleich zu den ursprünglich identifizierten Leistungsanforderungen zusammengestellt werden. Auch werden Ausblicke für erweiterte Anwendungsgebiete gegeben.

### Leistungsfähigkeit RCMIA / MSA

Zur Erprobung bei QA und Optimierung der technischen Leistungsfähigkeit wurden neben eigenen künstlichen und biologischen Modellpartikelproben (unterschiedliche mikroskopische Polymerbeads, Pflanzenzellkerne, Laktose-Bakterien, Hefezellen) biologische Proben (Vollblutpräparate) der Projektpartner Invigate (INV) und Immunotools (IMT) und Universitätsklinik Erlangen (UKE) eingesetzt. Den Projektpartnern INV und UKE wurden von QA auch Demonstratoren in mehreren Optimierungsstufen zur Verfügung gestellt und dort für anwendungsnähere Erprobungen, Feedback an QA und Optimierungen genutzt. Die Leistungsfähigkeit wird hier anhand einer exemplarischen Auswahl der Ergebnisse gezeigt. Gleichzeitig werden dabei zusätzliche Anwendungsmöglichkeiten deutlich.

### Abbildungsleistung: Analysefläche, Optische Auflösung / Fluoreszenzempfindlichkeit

Mit RCMIA lassen sich großflächig (>10 mm x 10 mm) adhärenzte Zellen mit mikroskopischer Auflösung (<0,5...1 µm) analysieren (Abb. 2 und 3). Damit kann eine große Zahl von räumlich sich nicht überlappenden Zellen analysiert werden mit dem Ziel, eine statistisch ausreichende Zahl anteilmäßig oder zahlenmäßig seltener Zellen zu identifizieren. Gleichzeitig lässt sich die morphologisch-räumliche Verteilung der Markierungen (intrazelluläre Marker) bzw. an den Zellmembranen (Oberflächenmarker) innerhalb der Einzelzell-Bildextrakte analysieren, um diese für eine bessere Identifikation relevanter Zellen heranzuziehen.

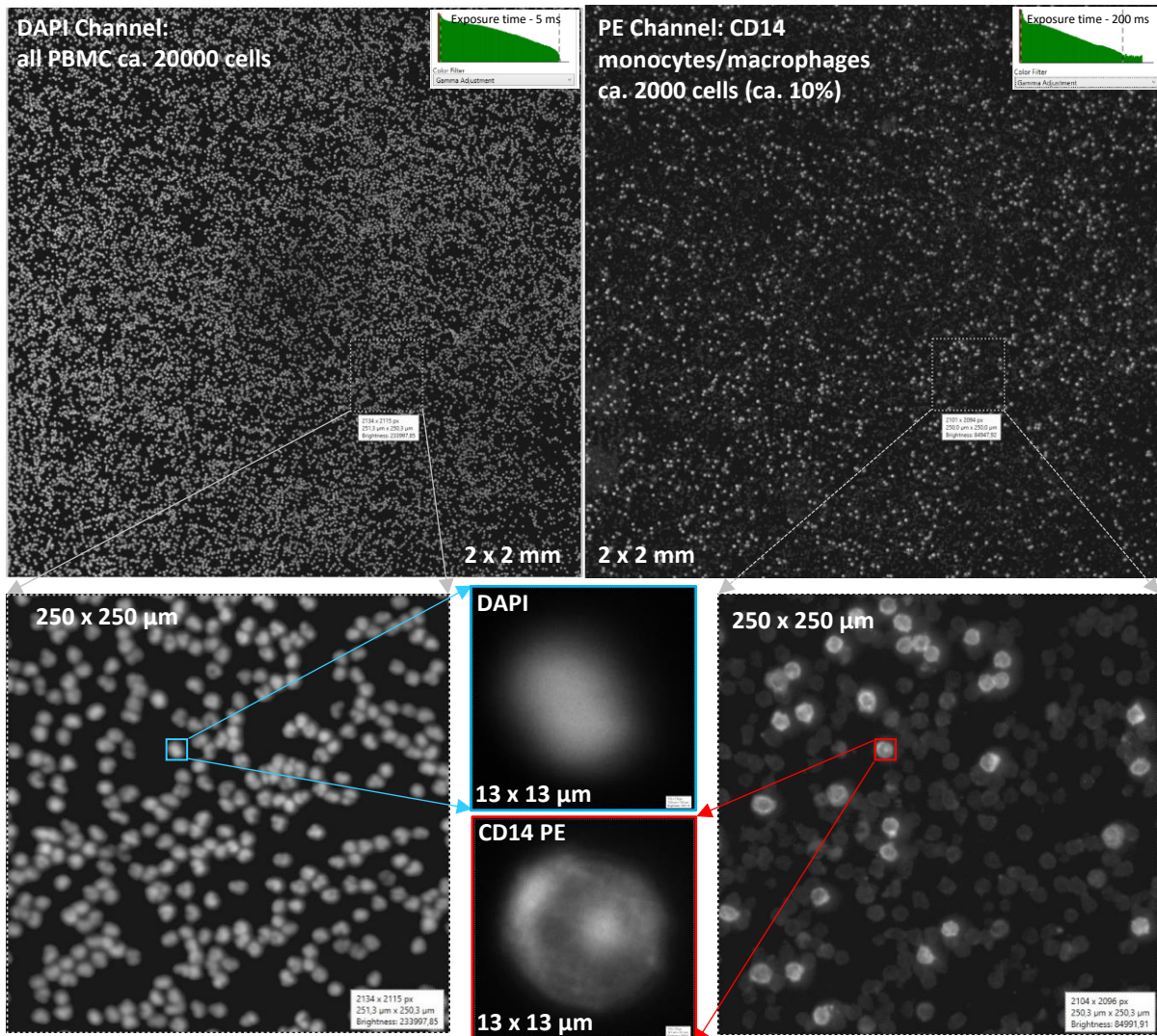


Abb. 2) Großflächige Analyse (digitale Zoomfolge) einer großen Zahl (~20000) an einer Glasoberfläche adhärenzter Leukozyten mit RCMIA / MSA (2 mm x 2 mm). Probe (PBMC Peripheral Blood Mononuclear Cells, Immunotools): Färbung/Analysekanäle: CD14-PE (Monozyten/Macrophagen ~ 2000) + DAPI (DNA). Anregung UV/blau (LED). In den aus der Aufnahme gewonnenen Einzelzellbildern lässt sich die unterschiedliche morphologisch-räumliche Verteilung der Oberflächenmarker (CD14) bzw. DAPI deutlich voneinander unterscheiden.

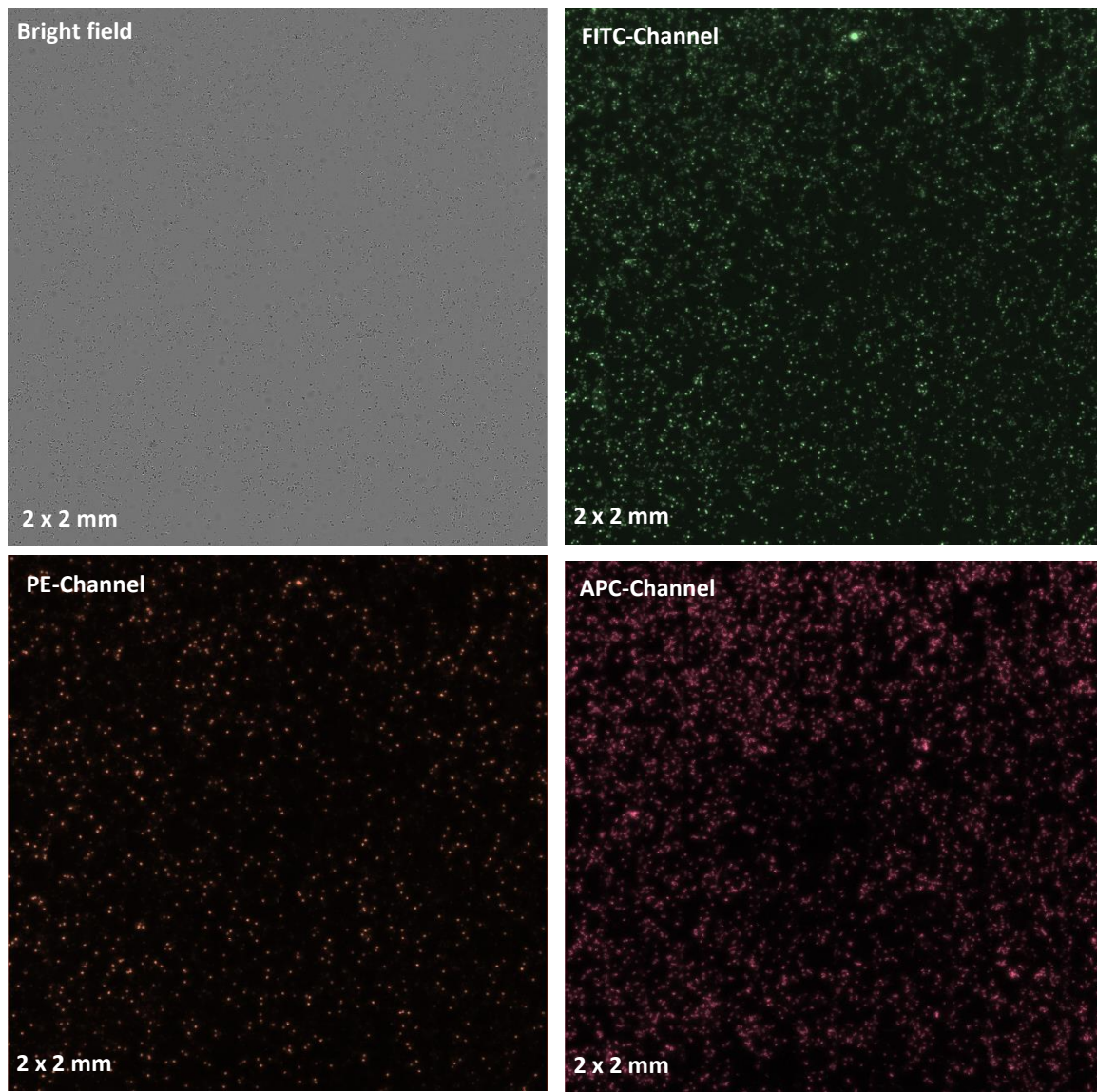


Abb. 3a) Analyse von Leukozyten nach Färbung mit CD14-PE, CD16-APC and LAMP1-AF488 Antikörpern. Durchlicht/Hellfeld und zugeordnete Fluoreszenzkanäle. Anregung sequenziell durch LED blau (PE, AF488 = Alexa Fluor 488) und rot (APC). Analysefläche 2 mm x 2 mm mit ca. 100.000 räumlich ausreichend voneinander separierten Zellen. Detailzoom s. Abb. 3b.

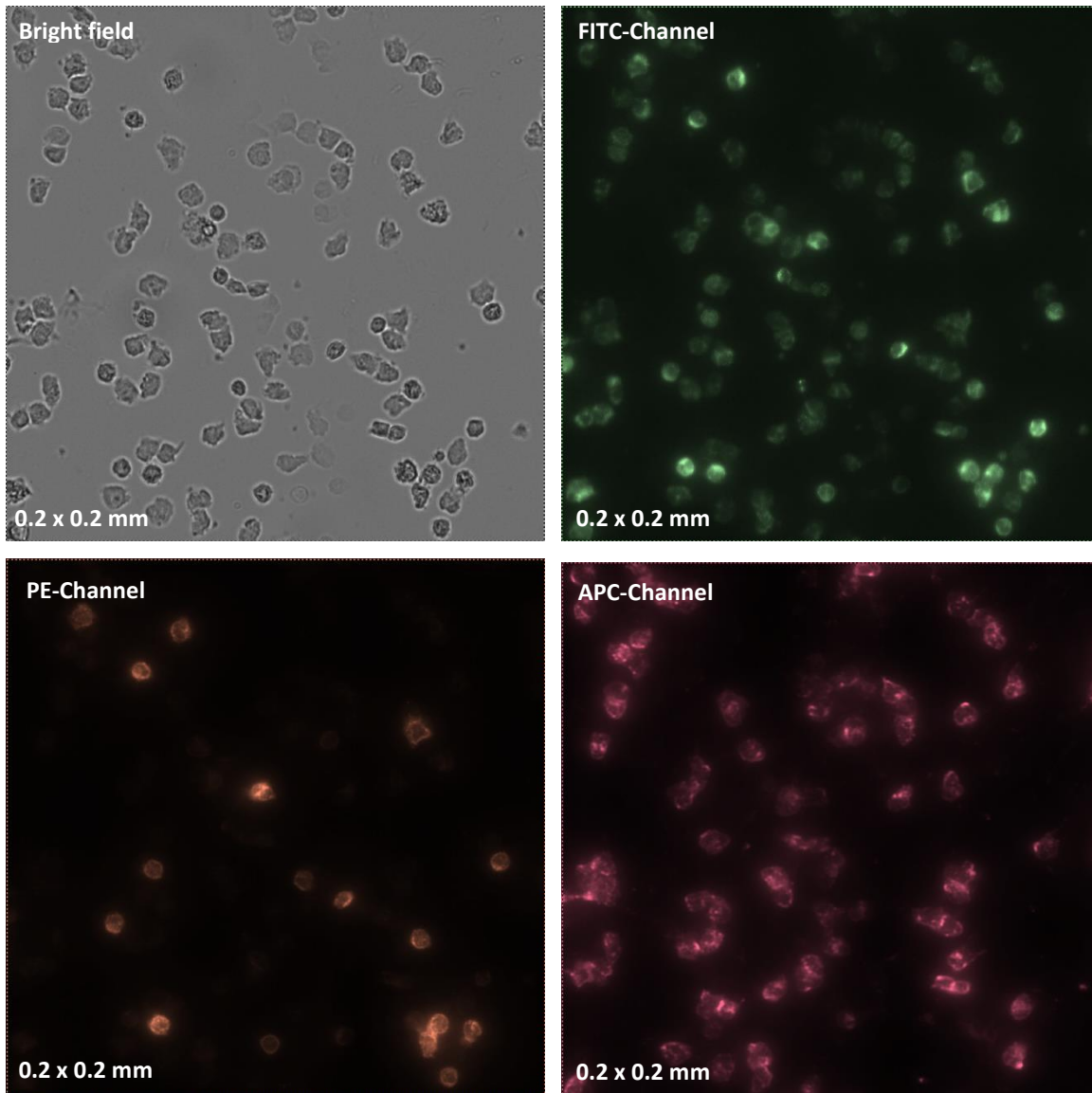


Abb. 3b) Digitaler Detailzoom von Abb. 3a mit subzellulärer optischer Auflösung. Auf einer Fläche von 0,2 mm x 0,2 mm befinden sich ca. 100 Zellen mit ausreichender räumlicher Separation.

Zu Projektbeginn stand die bildunterstützte Gewinnung zusätzlicher morphologischer Merkmale biologischer Zellen mit hinreichender optischer Auflösung im Fokus, nicht das Generieren möglichst hochauflöster qualitativ ansprechender Bilder. Im Projektverlauf ist jedoch deutlich geworden, dass gerade zur Erprobung dennoch eine darüber hinaus gehende, möglichst gute optische Abbildungsleistung, insbesondere Auflösung und Bildhomogenität, wünschenswert ist, die der darauf spezialisierter und teurer (Forschungs-)Fluoreszenzmikroskope entspricht. Um eine solche Auflösung und Bildhomogenität zu erreichen, musste erheblicher Aufwand in die Erprobung und sukzessive Optimierung des optischen Aufbaus und Auswahl geeigneter optischer Objektive mit den zugehörigen optischen Anpassungen von Lichtquellen und Kameraoptik investiert werden. Im Ergebnis lassen sich nicht nur die Gesamtintensität pro Zelle, sondern auch fluoreszenzmarkierte subzelluläre Strukturen (bei Verwendung eines hochwertigen Objektivs mit numerischer Apertur NA 0,8) mit einer optischen Auflösung von  $< 0,5 \mu\text{m}$  (Abstand voneinander unterscheidbarer Strukturen) und hoher Fluoreszenzempfindlichkeit abbilden (Abb. 4).

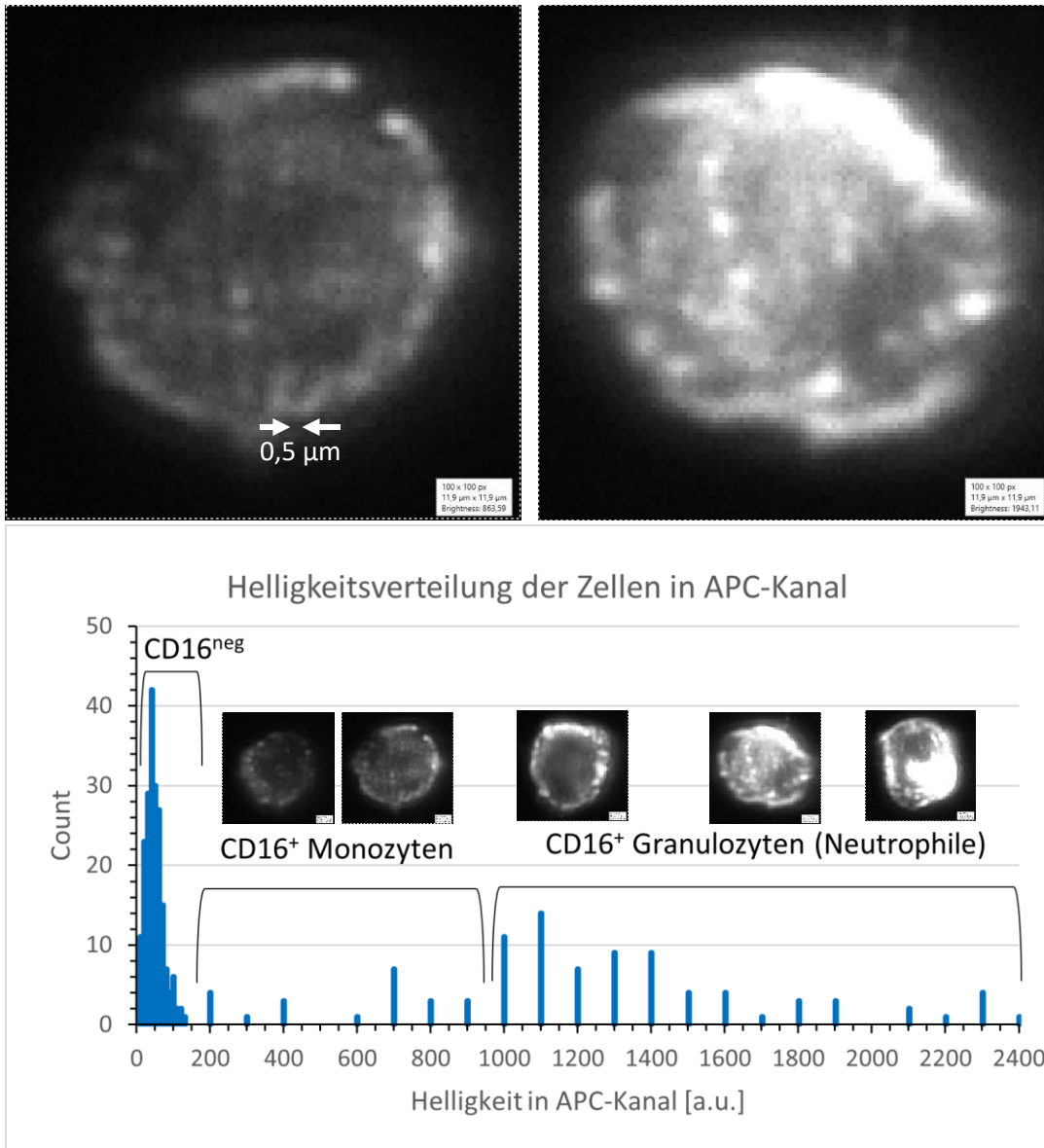


Abb. 4) CD16-APC Fluoreszenzintensitätsverteilung von Leukozyten einer Vollblutprobe (nach Präparation) in RCMA / MSA. Links: Monozyt (CD16+). Rechts: Granulozyt (Neutrophile) (CD16++), exemplarisch. Unten: Gesamtintensitätsverteilung APC-Fluoreszenzkanal (Anregung rot (LED) + roter Fluoreszenz-Spektralbereich) mit exemplarischen Einzelzellbildern. Die optische Auflösung (Objektiv 40, NA = 0,75) liegt bei etwa 0,5  $\mu\text{m}$ .

Abbildungsleistung: Homogenität / Differenzierbarkeit

Die mit mikroskopischen, in ihren Eigenschaften nahezu identischen Modelpartikeln erzielbare Homogenität (der gemessenen Intensitäten) - vor rechnerischen Korrekturen – erreicht 7% im Fall von schwachen Fluoreszenzsignalen (CV% der Partikel-Gesamtintensitäten): Abb. 5. Hintergrundintensität ist mit gutem Signal-Rauschabstand problemlos diskriminierbar.

Daraus ergibt sich eine Differenzierbarkeit von über große Probenbereiche verteilte Partikeln mit sich um >5...10% voneinander unterscheidenden Fluoreszenzintensitäten (pro Fluoreszenzkanal). Das liegt deutlich unter den typischen (biologisch bedingten) Varianzen (>30%) bei Intensitätsunterschieden für die Klassifizierung von Immunfärbungen (wie etwa im FCM analysiert) und sollte damit – für alle hier ins Auge gefassten Anwendungen – gut geeignet sein.

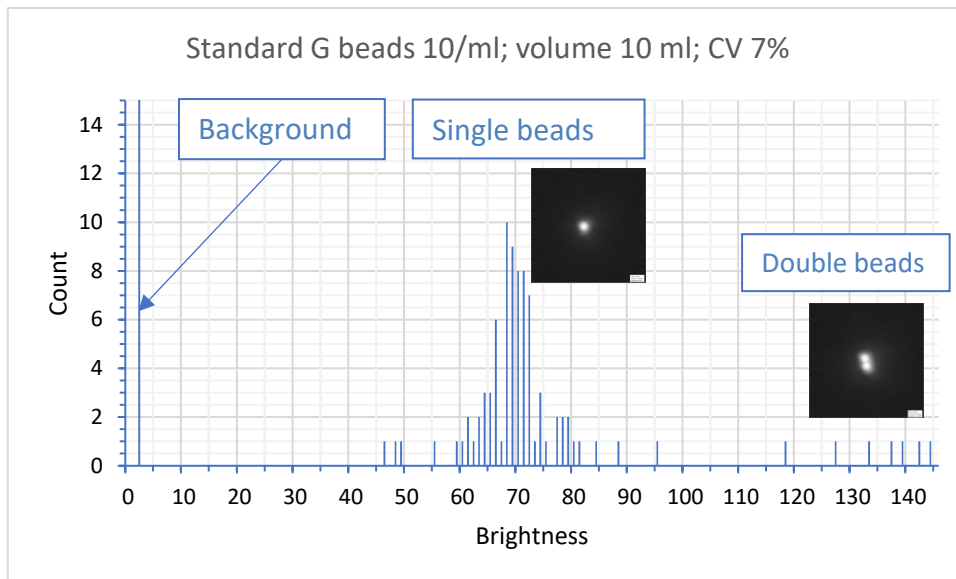


Abb. 5 Verteilung der aus Einzelpartikelbildern bestimmten Fluoreszenzintensitäten (grüner Spektralbereich) im MSA (Modellpartikel: „Standard G“ auf einer Fläche von 2,5 mm x 2,5 mm). Die Intensität der Modellpartikel entspricht etwa niedrigen bis mittleren typischen Fluoreszenzintensitäten immungefärbter Leukozyten. Hintergrundsignale sind problemlos diskriminierbar. Auch zur Identifikation stoffwechselaktiver Bakterien genutzter Fluoreszenzmarkierungen haben liegen auf einer vergleichbaren Intensitätsskala.

Zum Vergleich: in guten FCM und können bei vergleichbar niedrigen Intensitäten mit Unterschieden der Fluoreszenzintensität von <2% voneinander unterschieden werden, bei hohen Intensitäten <1%.

#### Differenzierbarkeit immungefärbter Zellen aus Vollblut (Plausibilität/Vergleich)

Tab.1 zeigt das Ergebnis der Identifikation und Zählung immungefärbter Zellen. Die gefundenen Anteile sind plausibel zu den für einen Normalspender zu erwartenden Werten.

Antibody	Fluorochrome	Intracellular	False Color	Cell Counting	Percentage of all positive (bright) Cells (measured)	Expected Percentage (normal donor)
CD14	Atto488	n	Green	250	6%	5-10%
CD16	PE	n	Red	2891	69%	70%
CD3	APC	n	Cyan	889	21%	30%
-	Brightfield	-	-	4188	100%	100%

Tab. 1) Vergleich gefundener und zu erwartender Anteile positiv (hell) gefärbter immungefärbter Zellen (CD14-Atto488/CD16-PE/CD3-APC).

#### Anzahl simultan (pro Durchgang analysierbarer Sonden)

RCMIA unterstützt zu Projektabschluss mehrere Lichtquellen und (Fluoreszenz-)Bildkanäle, mit denen Zellen pro (Färbe-)Durchgang mit mehreren Sonden analysiert werden können. Abb. 2 und 3 zeigen neben dem Hellfeldbild exemplarisch Simultanfärbungen mit 2-fach (CD14-PE/DNA-DAPI) und 3-fach Antikörper-Markierungen (CD14-PE, CD16-APC and LAMP1-AF488) bei zeitlich voneinander separierter Anregung mit blauer (465 nm) LED und roter LED (650 nm). Der Ablauf ist weiter automatisierbar und optimierbar. Z.B. ist bei Verwendung mehrerer Fluoreszenz-Anregungswellenlängen (z.B. blau + rot für PE + APC) und eine optimale Lichtausbeute bislang noch ein manueller Wechsel von Filtersatzblöcken erforderlich.

### Nachweis kleinster Partikelanteile (< 0,5%)

Um zu überprüfen, ob auch kleinste Anteile (z.B. <0,5%) von Subpopulationen mikroskopischer Partikel in statistisch relevanter Zahl identifiziert werden können, wurde eine Mischung von stark unterschiedlichen Anteilen von Polymer-Beads (10 µm Durchmesser) zweier unterschiedlicher Beladungen mit Fluorochromen angesetzt. Aus dieser Suspension wurden die Partikel per Filtration durch eine Mikroporen-Filtermembran auf einer Oberfläche adhärirt und großflächig untersucht (Abb. 6 und 7).

In den mit den Bilddaten berechneten Häufigkeitsverteilungen der Partikelintensitäten können die Subpopulationen voneinander differenziert werden. Histogramme und Anteile sind mit den per FCM gewonnenen vergleichbar, jedoch lassen sich in RCMIA zusätzlich die zugrundeliegenden Partikel-Bilder zuordnen und in diesen weitere morphologische Eigenschaften analysieren (etwa Partikelgröße/-form oder räumliche Verteilung der Fluoreszenz).

Auf einer Fläche von 5 mm x 5 mm wurden insgesamt 6448 Beads identifiziert, darunter 26 mit der deutlich selteneren hohen Fluoreszenzintensität. Der damit ermittelte Anteil von 0,40% der selteneren Partikel deckt sich mit den per FCM ermittelten Daten (im Rahmen des allein aufgrund der gegebenen kleinen Partikelzahlen statistisch zu erwartenden Fehlers).

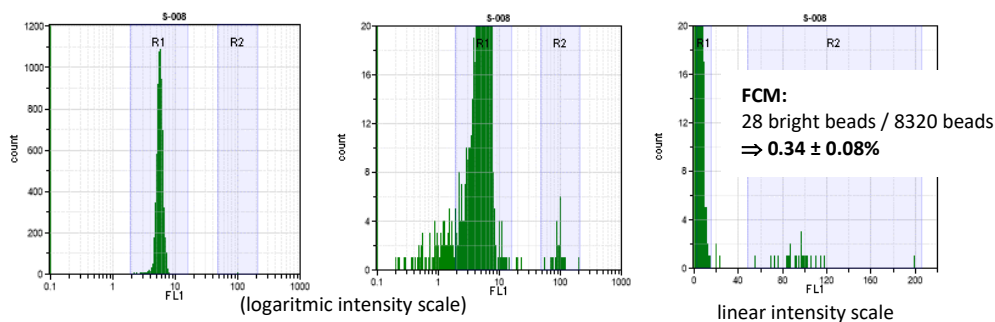
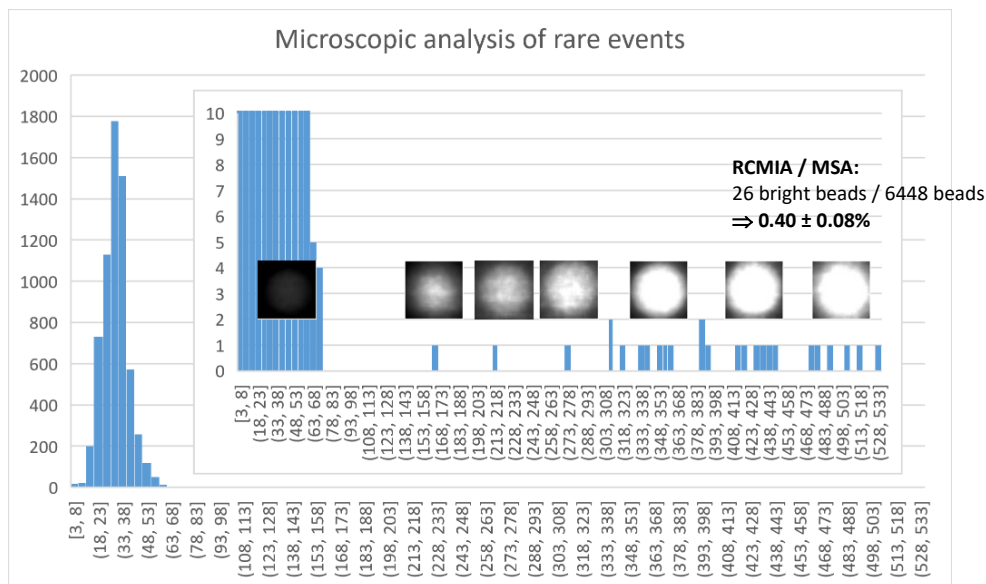


Abb. 6) Identifikation (anteilig und absolut) seltener Modellpartikel in einer Mischung von zwei unterschiedlich intensiv fluoreszierenden Intensitätsklassen (Polymerbeads, 10 µm) mit RCMIA / MSA. Analysefläche: 5 mm x 5 mm. Analysevolumen 10 µl (oben). Anteilsmäßig kleine Partikelzahlen < 0,5% lassen sich identifizieren.

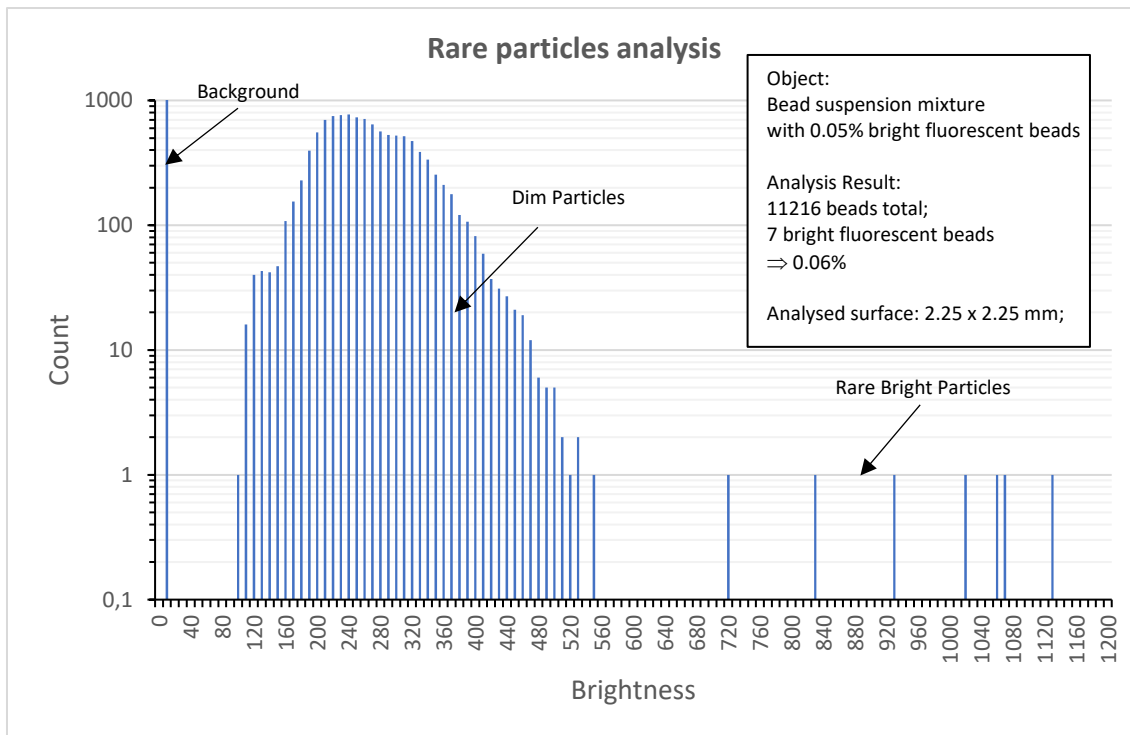


Abb. 7a): Nachweis von Partikel mit einem Anteil von 0,05% an einer Gesamtheit von rund 10.000 Modellpartikeln.

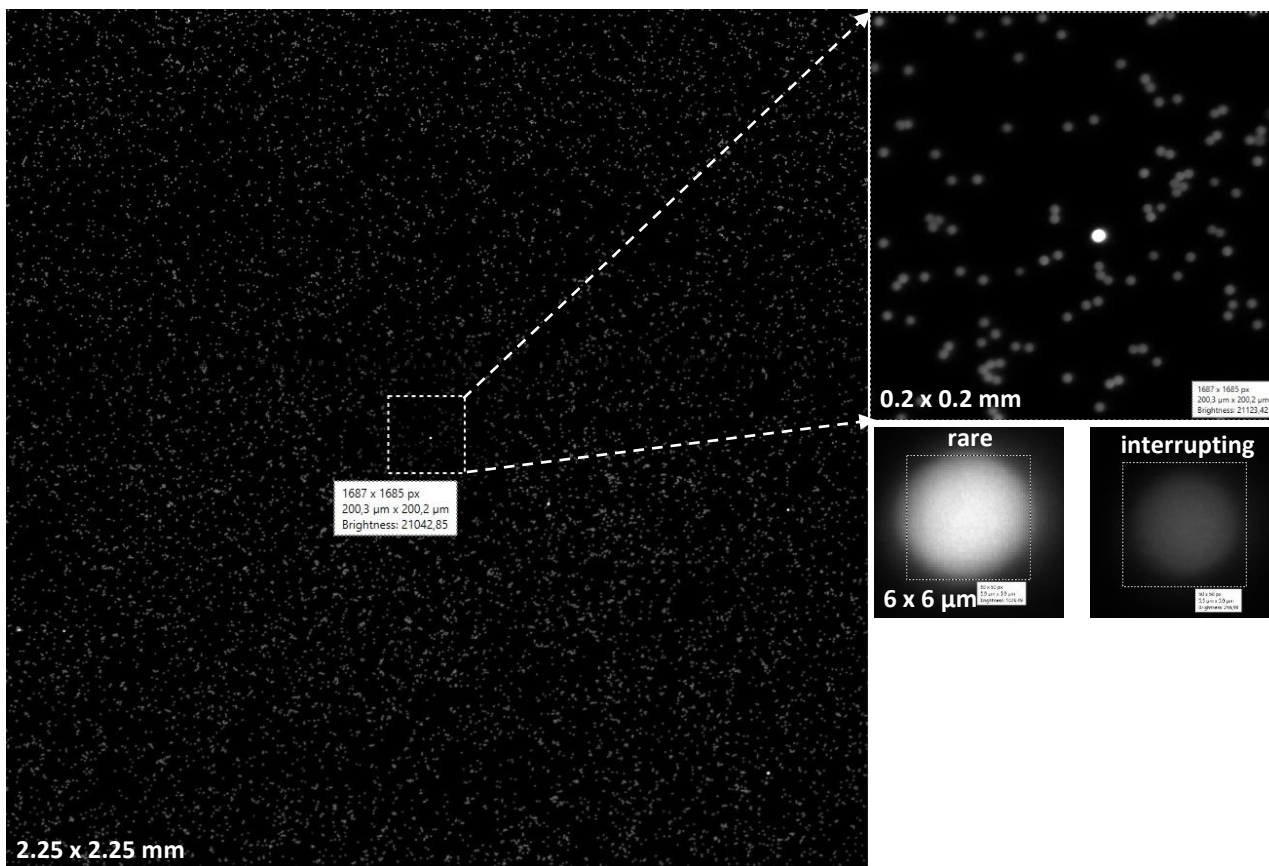


Abb. 7b) Identifikation kleinster Partikelzahlen. Fluoreszenzkanal: grün (FITC). (Digitale) Zoomfolge mit Einzelpartikelbildern (exemplarisch) seltener Partikel.

## Nachweis kleinster Partikelkonzentrationen

Um zu untersuchen, ob sich mit der Methode auch kleinste Partikelkonzentrationen nachweisen lassen in einer Empfindlichkeit, die mit FCM oder gar herkömmlicher Mikroskopie schwer zu erreichen ist, wurden in einer Verdünnungsreihe Polymer-Modellpartikel mit ähnlichen Größe (1  $\mu\text{m}$ ) und Fluoreszenzintensität wie Bakterien (entsprechend niedrig/mittlerer Fluoreszenz bei typischen Leukozyten-/Lymphozyten-Immurfärbungen) nach Färbung der enzymatischen Aktivität durch eine Filtermembran aus niedrigstkonzentrierter Suspension herausgefiltert und untersucht (Abb. 8).

Damit wurde gezeigt, dass sich mit RCMIA / MSA Partikel auch in kleinsten Konzentrationen von  $< 1/\text{ml}$  identifizieren und nachweisen lassen. Über die Möglichkeiten von FCM hinausgehend ist dabei, dass gleichzeitig über die Abbildung dieser seltenen Partikel mit hoher optischer Auflösung eine Verifikation von Größe und Form möglich wird. Das bei vielen Anwendungen für eine sicherere Identifikation hilfreich, etwa die Identifikation von Mikroorganismen (Abb. 9).

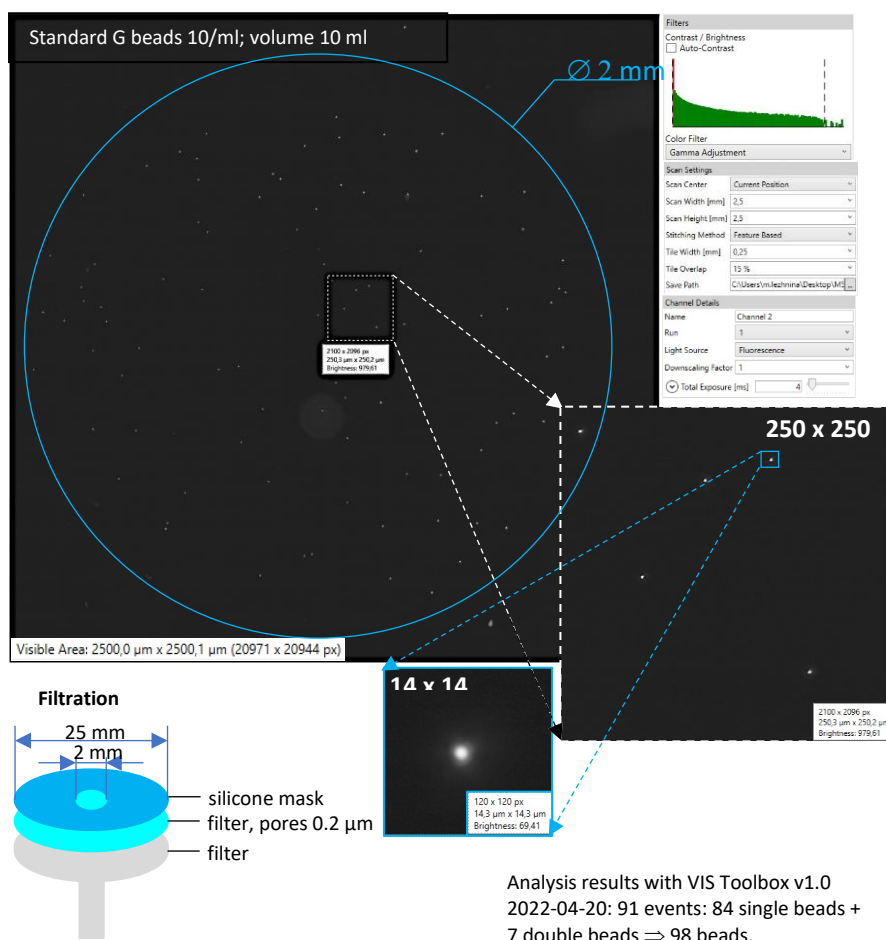


Abb. 8a) Zoomfolge bei großflächiger Analyse kleinster Partikelkonzentrationen auf Filtermembran (exemplarisch 10/ml).

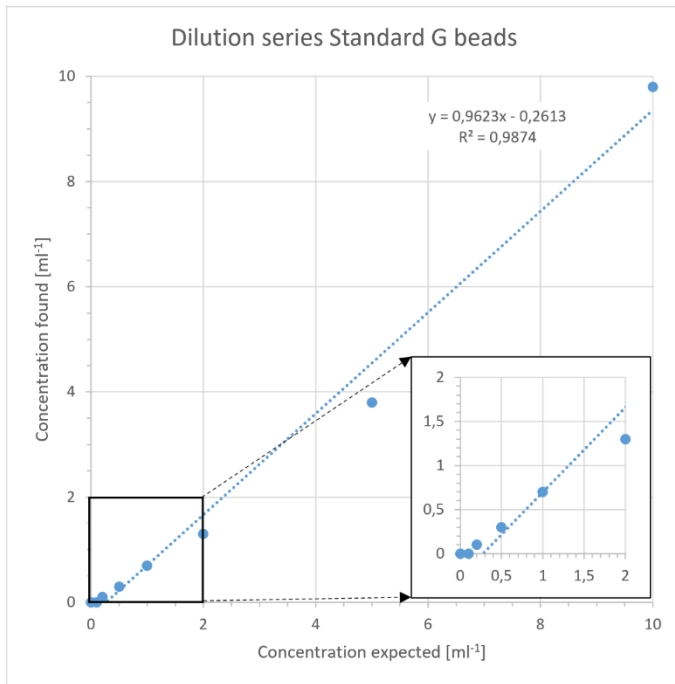


Abb. 8b): Ergebnis Verdünnungsreihe bis < 0,1/ml. Bestimmung der Grundkonzentration mit FCM.

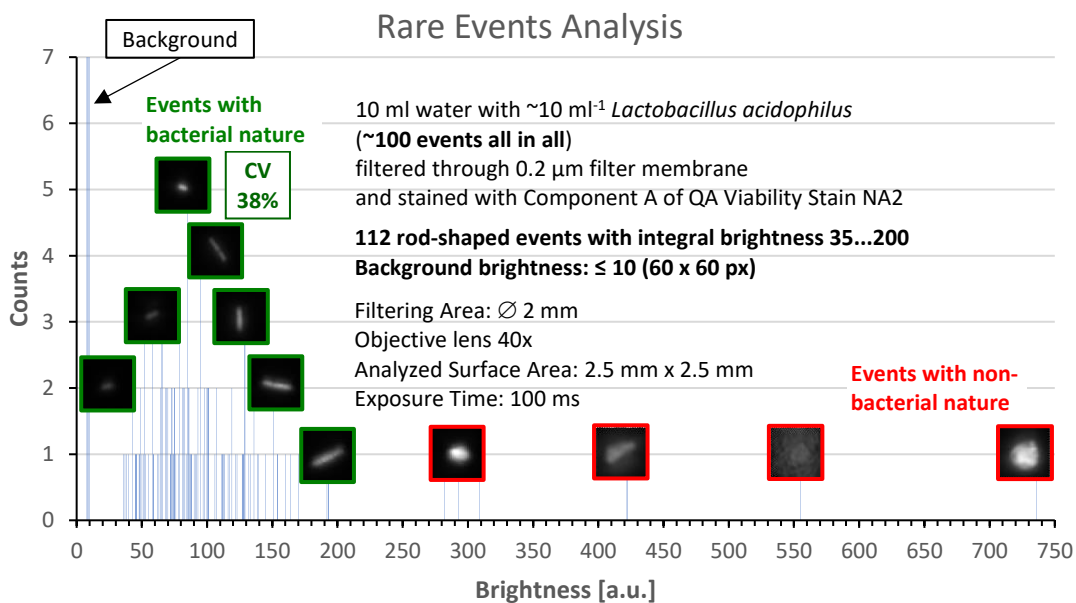


Abb. 9) Identifikation kleinster Bakterienkonzentrationen auf Filtermembran. Bildunterstützt lassen sich morphologische Eigenschaften analysieren und damit Bakterien von anderen Partikeln ähnlicher integraler optischer Eigenschaften zuverlässiger voneinander unterscheiden als mit FCM, wo diese als Hintergrund-Counts stören können. Durch die Abbildung lassen sich auch mögliche Bakteriendoubletten (z.B. im Teilungsprozess) oder Agglomerationen von einzelnen Bakterien unterscheiden und in der quantitativen Analyse berücksichtigen.

### Analysezeiten/Probendurchsatz

Analysezeiten und Probendurchsatz bei RCMIA hängen entscheidend von einer Reihe von anwendungsspezifischen Faktoren, wie etwa den nachzuweisenden Stoffmengen pro Zelle zusammen mit verwendeten Markern (z.B. Effizienz, Fluorochrome, Photostabilität). Diese Faktoren

wurden im Projektverlauf für NADIM nicht abschließend festgelegt. Ersatzweise werden hier für die Abschätzung in Untersuchungen mit üblichen immungefärbten biologischen Modell-Vollblutproben gewonnene und plausibilisierte Faktoren berücksichtigt.

Die Zeiten lassen sich aufteilen in:

- Belichtungszeit für Einzelbild („Kachel“) pro Anregungslichtquelle
- Größe der Analysefläche (Anzahl Kacheln)

Bei sequenzieller automatisierter Färbung zusätzlich:

- Inkubationszeit für Fluoreszenzmarker
- Bleichzeit (auf erforderliche Restintensität)

Dazu addieren sich z.T. rein instrumentelle Zeiten für das „Steppen“ (die Bewegung des motorisierten XY-Verstelltisches), den Datentransfer und -verarbeitung sowie (bei sequenzieller Färbung) den mikrofluidischen Transfer von Markierungs-Flüssigkeiten in die mikrofluidische Kammer (MSA Slide).

Typische geeignete Einzelbild-Aufnahmezeiten für Blutzellen mit immunologischen Marken lagen je nach Fluoreszenzintensität in einem Bereich von 100 ms...500 ms pro Fläche von 0,25 mm x 0,25 mm (pro Anregungsfarbe). Daraus ergibt sich im ungünstigsten Fall bei schwachen Fluoreszenzen und z.B. 2 Anregungsfarben für eine Gesamtfläche von z.B. 2 mm x 2 mm (rund 100 an den Flächenrändern etwas überlappenden Einzelbild-Kacheln) eine Gesamtzeit von etwa  $2 \times 100 \times 500 \text{ ms} = 100 \text{ s}$ , bei 5 mm x 5 mm (rund 500 Kacheln) etwa 10 Minuten.

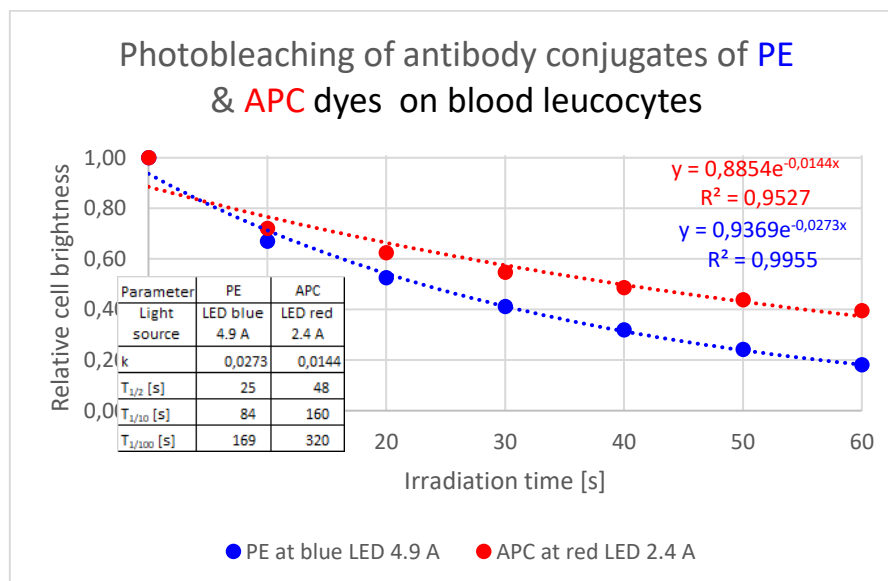


Abb. 10) Bleichkurven (exemplarisch) an mit PE- und APC-Antikörpern gefärbten Leukozyten in RCMIA / MSA bei typischen instrumentellen Parametern. Daraus ergeben sich Bleichzeiten auf <1% der anfänglichen Fluoreszenzintensität von >169 s = ~3 min (PE) bzw. >320 s = ~7 min (APC).

Pro (sequenziellem) Färbedurchlauf (= „Run“) sind vor der Bildaufnahme für die Inkubation inkl. mikrofluidischem Transfer des Markersatzes typische Zeiten von maximal 20 Minuten einzuplanen. Abschließend müssen die Fluorochrome durch die Anregungslichtquelle(n) gebleicht werden. So können im folgenden Run andere Sonden, wieder mit den gleichen Fluorochromen gekoppelt, verwendet werden. Bei den verwendeten Lichtquellen erfordert das Bleichen nach eigenen Untersuchungen eine Zeit von typischerweise (z.B. bei Verwendung der Fluorochrome PE + APC und blauer + roter Fluoreszenzanregung) 3 min + 7 min = 10 min pro Run, um auf ein Level von <1 % zu kommen (Abb. 10).

Insgesamt dominieren Inkubations- und Bleichzeit den Zeitaufwand für die Analyse bzw. bestimmen den Probendurchsatz.

Der gesamte Zeitaufwand pro Run (inkl. Bilddatenakquisition) liegt im betrachteten Szenario bei 0,5 h...1 h. Bei angenommen 5 Farbe-Sequenzen (bei 2...3 Markern pro Run mit insgesamt z.B. max. 10...15 Markern) läge die Gesamt-Analysezeit bei 2,5...5 h pro Probe. Das wäre bis zu doppelt so hoch wie die im ursprünglichen Konzept angesetzte Analysezeit (<2 h).

Bei entsprechend reduzierten anwendungsspezifischen Anforderungen kann die Analysezeit deutlich geringer ausfallen.

Weiter kann vor allem die Zeit Photobleichzeit auch bei gegebenen Fluorochromen durch Optimierungen im Bereich der Lichtquellen und Beleuchtung voraussichtlich auf <50% verringert werden. In der obigen Betrachtung wäre das eine Reduktion um 50% x 5 x 10 min = 25 min der gesamten Analysezeit. Insgesamt ist für Anwendungen wie NADIM (mit den geschätzten Annahmen oben) ein Probendurchsatz von 5...20 pro Tag denkbar.

### Ausblick/Andere Anwendungen (Beispiele)

Vor einer diagnostischen (IVD-?) Anwendung für die hier im Fokus stehende Frühdiagnose neurodegenerativer Erkrankungen werden trotz grundlegend geeignet erscheinender Leistungseigenschaften noch erhebliche Forschungs- und Entwicklungsanstrengungen erforderlich sein. Andererseits versprechen die Leistungsfähigkeit und zusätzlichen Möglichkeiten von RCMIA / MSA neben der Analyse seltener immungefärbter Vollblutzellen aber im Vergleich zu bisherigen Methoden (FCM, herkömmliche Mikroskopie) universeller auch signifikante Vorteile für eine Reihe weiterer Anwendungen bislang problematischer mikroskopischer Partikelanalysen, die auch zum Betätigungsfeld von QA passen. Ein erster Eindruck der Möglichkeiten ergibt sich aus den Untersuchungen mit Modellproben.

### Beispiele:

Robustere Identifikation kleinster Konzentrationen von Mikroorganismen (Abb. 9 und 11)

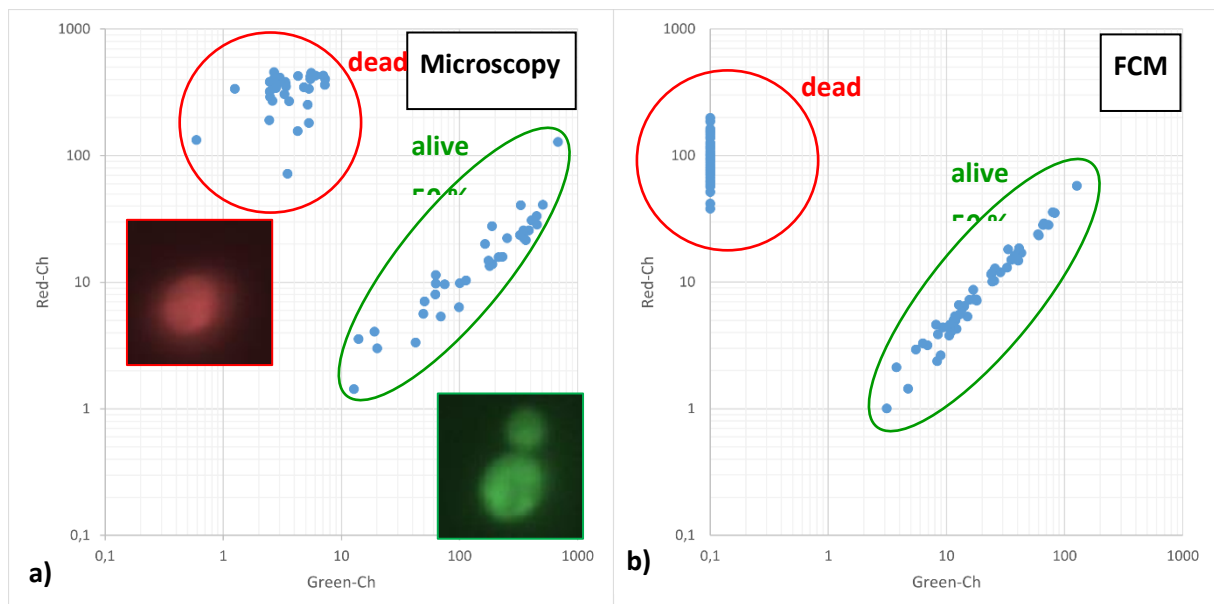


Abb. 11) Analyse von mikrobiellen Hefezellen (Mischung aus lebenden/stoffwechselaktiven und toten Zellen/mit Membrandefekten). Färbung: QA Viability Stain (FDA/PI). a) Fluoreszenzintensitätsverteilungen (Dotplots grün/rot) aus RCMIA/MSA mit hier möglichen zugehörigen Einzelbildern (exemplarisch). b) Entsprechende Dotplots QA FCM.

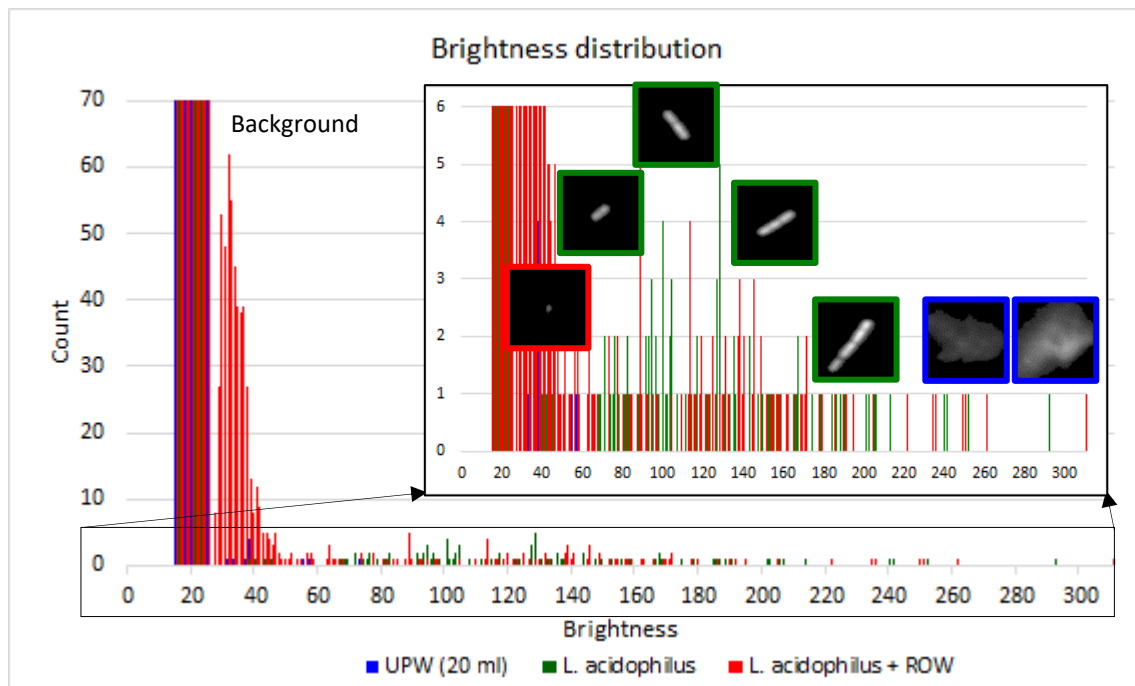


Abb. 12) Analyse kleinster Konzentration von Bakterien (vorhandene Bakterien (rote Rahmen) + zugesetzt *Lactobacillus acidophilus* (grüne Rahmen)) in Reverse Osmose Reinstwasser (ROW, Millipore RiOS) im Vergleich zu Ultra-Reinstwasser (UPW, Millipore Milli-Q) auf Filtermembran. Färbung mit QA Viability Stain NA2 (Component A). Nicht-bakterielle Partikel (blaue Rahmen) lassen sich anhand der aus Einzelbildern extrahierbaren morphologischen Information (bildunterstützt) von Bakterien unterscheiden.

### Hochaufgelöste großflächige Analyse von Zellverbänden/Dünnschnitte

Mit MSA lassen sich auch größere Bereiche von Zellverbänden in Ultramikrotom-Dünnschnitten in Gesamtheit abbilden analysieren. Abb. 13 und 14 zeigen exemplarisch Fluoreszenz- und Durchlichtaufnahmen von Bereichen bis 16 mm x 16 mm.

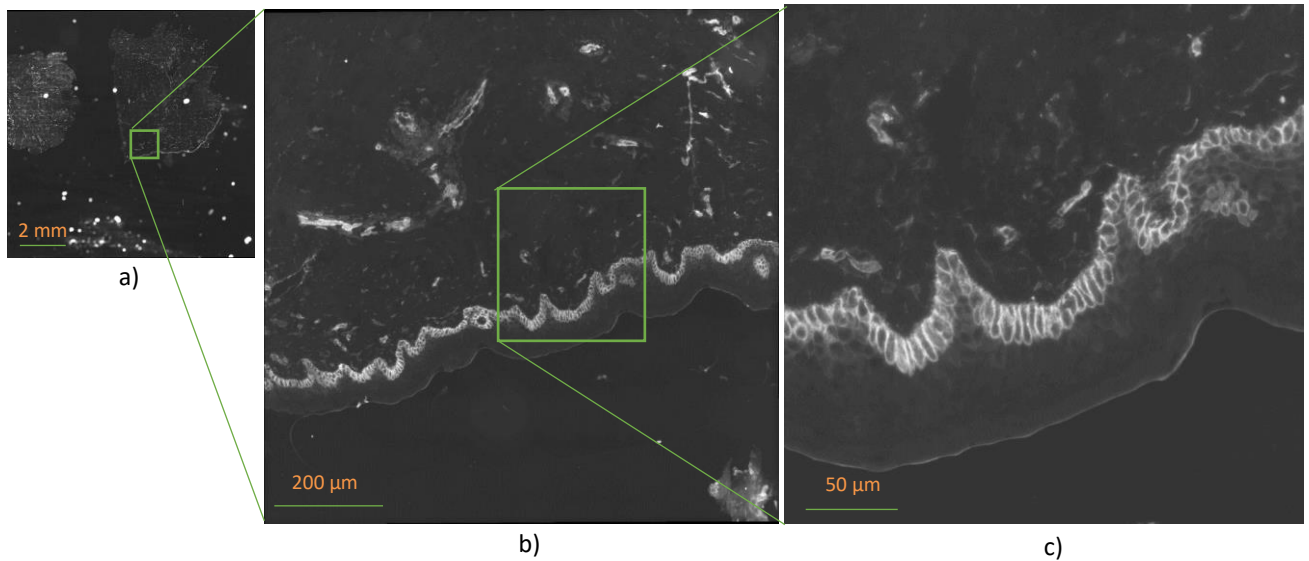


Abb. 13) Hochaufgelöste großflächige Fluoreszenzaufnahme eines Dünnschnitt-Präparats (UKE), Digitale Zoomfolge. a) Gesamtbild Objektfläche 10 mm x 10 mm, 1940 MPixel (44000 x 44000 px). b) Ausschnitt 1 mm x 1 mm. b) 0,3 mm x 0,3 mm. Objektiv 40x.

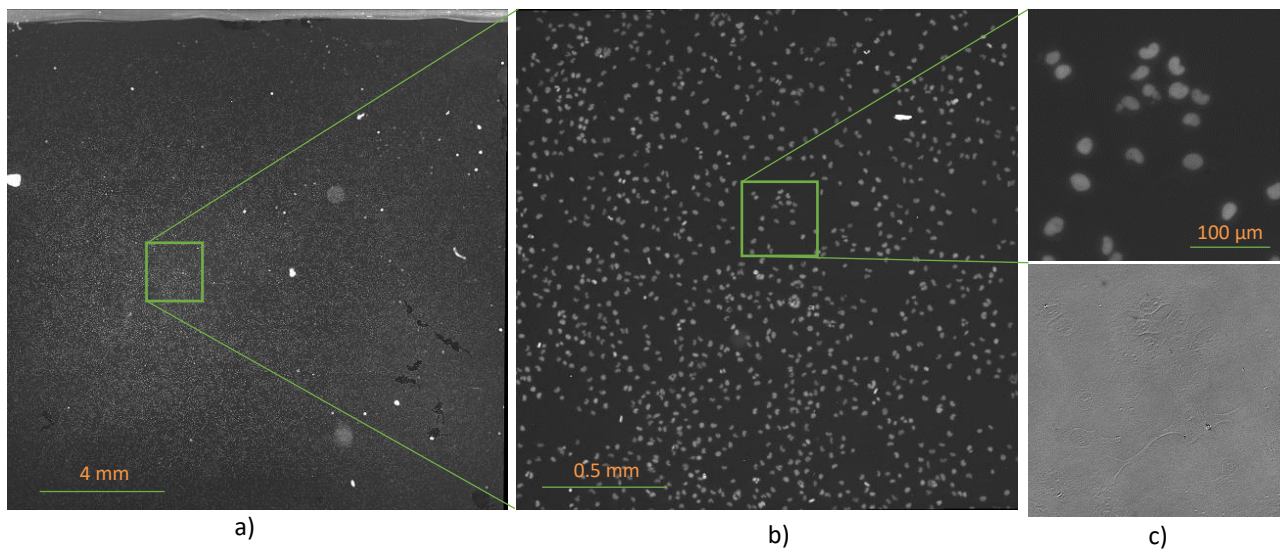


Abb. 14) Hochaufgelöste großflächige Fluoreszenzaufnahme (DNA-Färbung/PI) eines Dünnschnitt-Präparats (UKE), Digitale Zoomfolge. a) Gesamtbild Objektfläche 16 mm x 16 mm, 1340 MPixel (36600 x 36600 px). b) Ausschnitt 2,2 mm x 2,2 mm. c) 0,3 mm x 0,3 mm. Unten rechts: Hellfeld. Objektiv 20x.

## Statistische bildunterstützte Analyse von Pflanzenzell(-kernen)

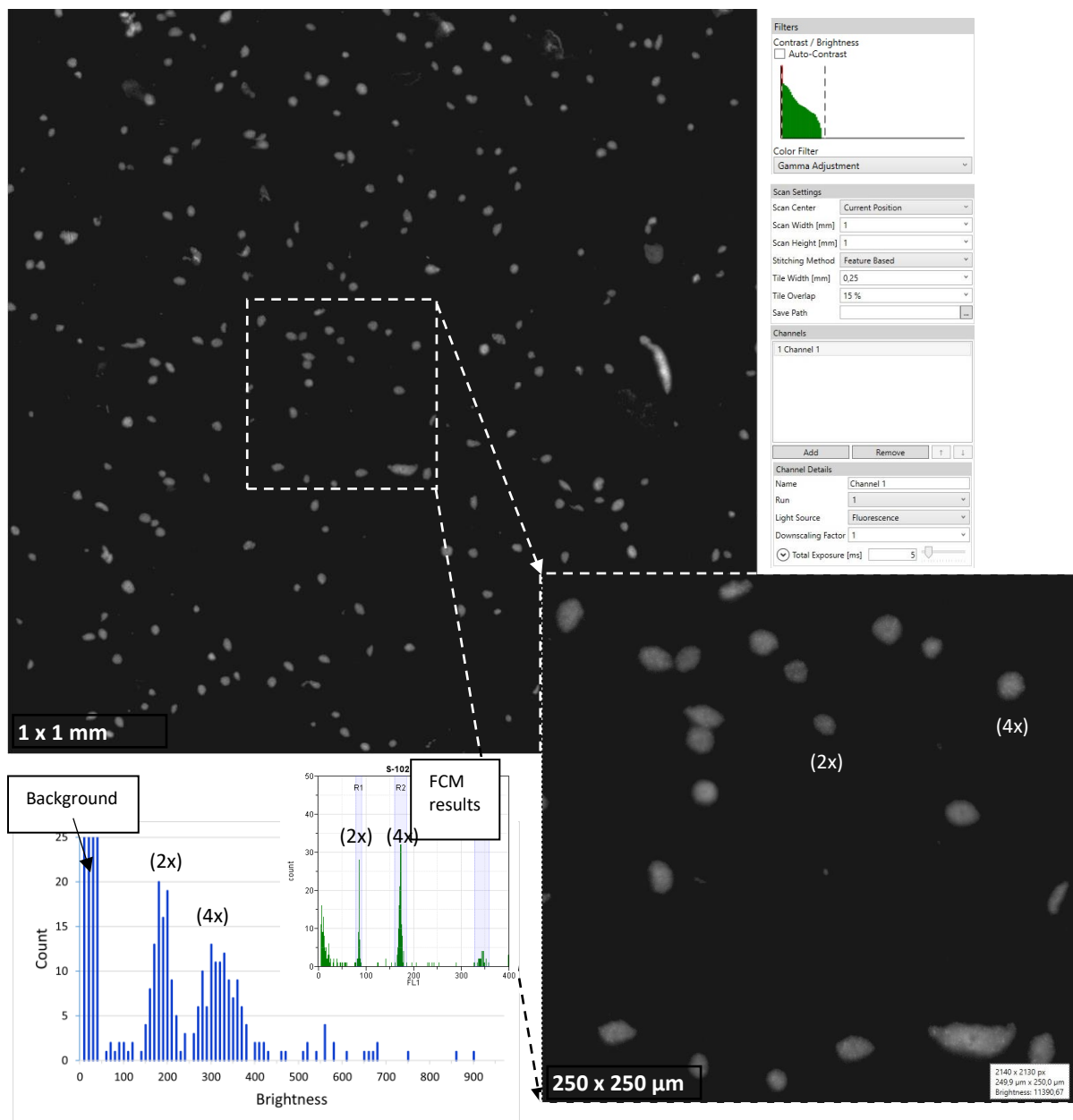


Abb. 15) Analyse DNA-Gehalt von Pflanzenzellkernen *Lepidium sativum* (Gartenkresse) in MSA mit zugehörigen Zellbildern mikroskopischer Auflösung und daraus gewonnenen Histogrammen. Färbung: Quantum Stain NA UV 2. Kleines Bild: Histogramme Analyse mit FCM. Die Ploidie-Grade lassen sich einzelnen heterogenen morphologischen Strukturen der Zellkerne (nach Präparation) zuordnen und so z.B. Präparationsprozesse und -effekte besser untersuchen.

Leistung: Vergleich Eckdaten zu ursprünglich geforderten/erwünschten Eigenschaften Statischer Modus

Tabelle 2 zeigt zusammenfassend einen Vergleich von Eckdaten der Leistungsfähigkeit von RCMIA im Vergleich zu Vorgaben/Wünschen.

Eigenschaft	Vorgabe/Wunsch	erreicht	Bemerkung
<b>Analysefläche</b>	10 mm x 10 mm	++	größere Fläche bis 50 mm x 50 mm möglich. Erfordert entsprechende Variation der Objektfläche.
<b>Optische Auflösung</b>	1 µm	++	~0,5 µm mit Objektiv 40x
<b>Digitalauflösung</b>	-	+	>1000 MPixel
<b>Anzahl pro Durchgang analysierbarer Zellen/Partikel</b>	100.000	+	Bei 2 mm x 2mm: Räumliche Separation ausreichend für 100.000 Leukozyten. Entspricht 2,5 Mio Zellen bei 10 mm x 10 mm.
<b>Anzahl Sonden pro Durchgang</b>	3-4	+	Gezeigt: 3 + Hellfeldbild. Für Anregung mit mehreren Wellenlängen noch nicht vollständig optimiert/automatisiert: Z.T. noch manueller Wechsel Filtersatzblock erforderlich.
<b>Identifikation seltener Zellen/Partikel</b>	Anteil < 0,5%	++	0,05% Detektion einzelner Partikel
<b>Nachweis von niedrigst-konzentrierten Partikeln</b>	< 1/ml	+	
<b>Bestimmung Anteile Zellklassenanteile (Vergleich mit FCM)</b>	Identifizierte Anteile stimmen mit FCM überein (z.B. CD45+)	+	Die gefundenen Anteile bei Modellproben stimmen gut mit per FCM ermittelten Referenzwerten überein. Gefundene Anteile z.B. CD45+ sind plausibel zu Daten FCM und zu in normalem Vollblut zu erwartenden Prozentzahlen.
<b>Gesamtanalysezeit (Probendurchsatz)</b>	<2 h (10 Proben/Tag)	(+)	Abhängig von Art und Anzahl zu analysierender Sonden/Fluorochromen

Tab. 2) Vergleich vorgegebener/gewünschter vs. erreichten instrumentellen Eigenschaften.

Dynamischer Modus

Bislang wurden die Eigenschaften des dynamischen Modus nur QA-intern mit Mischungen von Modellpartikelklassen untersucht. Die Anteile in Suspension entsprechen den erwarteten und mit FCM kontrollierten. Unterschiedliche Partikelgrößen (z.B. 6 µm von 3 µm Durchmesser) sowie Partikelfluoreszenzintensitäten lassen sich voneinander unterscheiden. Das optische Auflösungsvermögen (gewünscht: <2 µm) ist noch nicht systematisch nachgewiesen. Vor genaueren quantitativen Untersuchungen sind instrumentelle Optimierungen und eine Automatisierung der Bildanalyse der gewonnenen Einzelpartikelbilder notwendig.

## Aufbau RCMIA und Komponenten

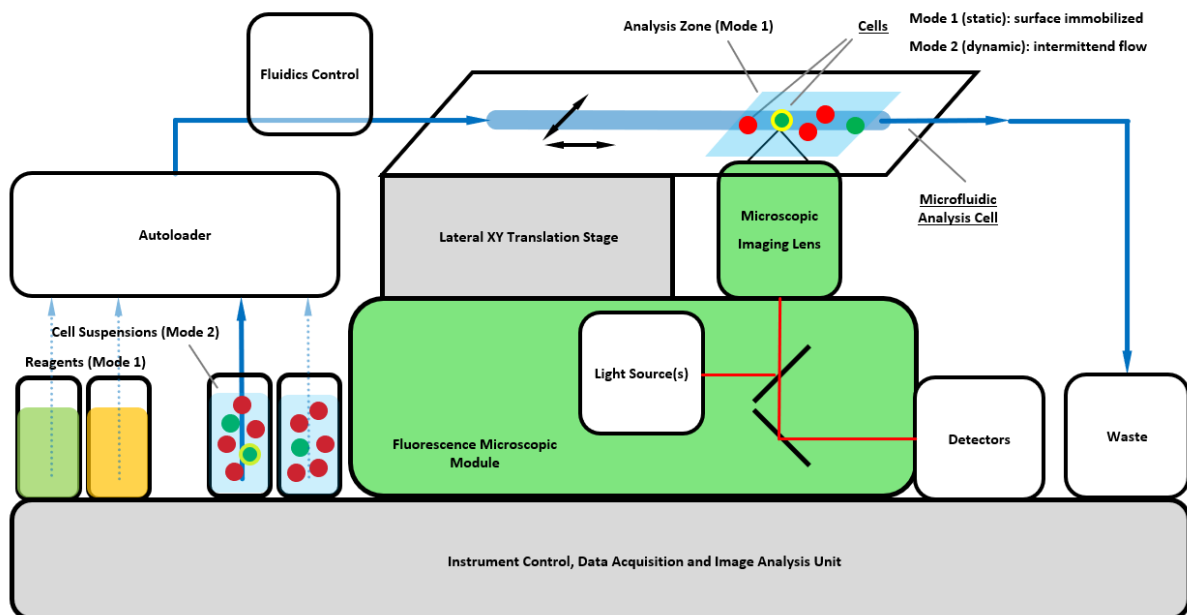
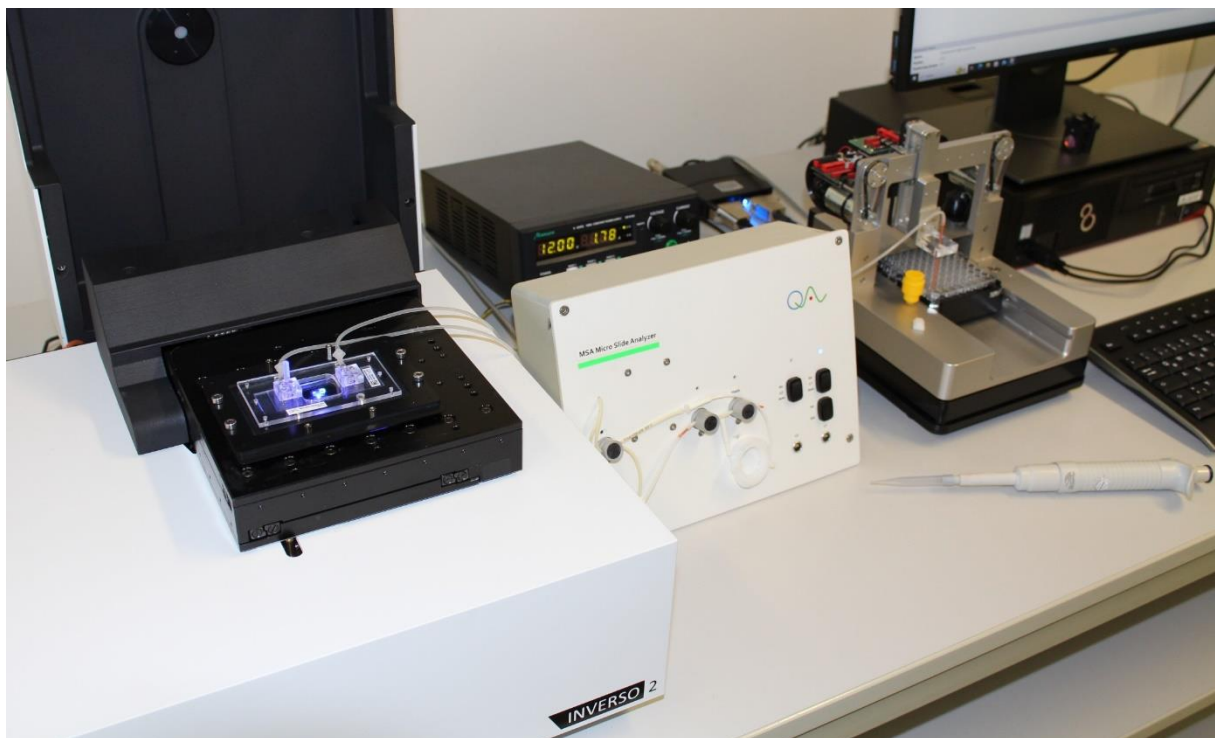


Abb. 17) QA Rare Cell Multiprobe Imaging Analyzer (RCMIA/MSA), Realisierung (oben) vs. Schema (unten). Anordnung von mikrofluidischer Färbe-/Analysekammer für Modus 1 und 2, fluoreszenzmikroskopischem Modul, Lichtquellen und Fotodetektoren, Fluidik, Autoloader und motorisiertem mikroskopischem Verschiebetisch.

Die von QA realisierten RCMIA Demonstratoren (bzw. Instrumente) wurden nach dem Schema in Abb. 17 (unten) aufgebaut. Vor dem abschließenden Setup (Abb. 17 oben) wurden im Projektverlauf insgesamt drei Demonstratoren (D1...D3) zunächst in einer Vorläuferversion realisiert (Abb. 18). Zwei der Demonstratoren wurden den Projektpartnern in mehreren aufeinander folgenden Optimierungsstufen zur Verfügung gestellt.

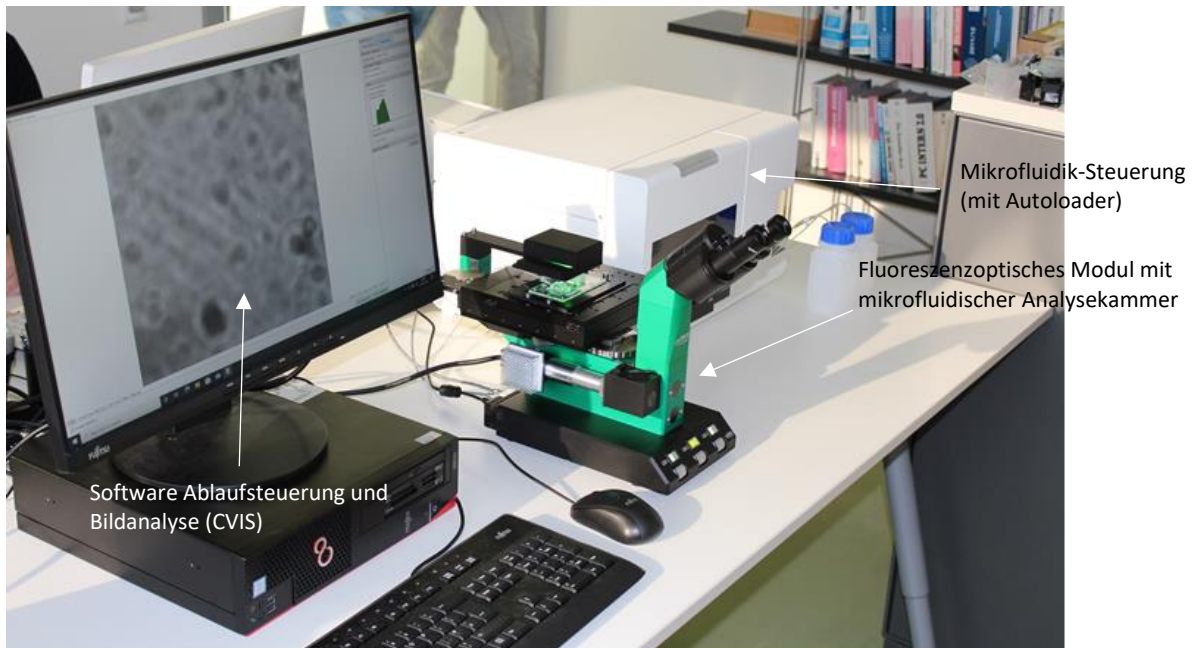


Abb. 18) Demonstrator-Setup im Projektverlauf.

Eine großflächige Lokalisierung und Analyse von an einer Oberfläche adhären oder immobilisierten Zellen mit mikroskopischer Auflösung wird durch einen motorisierten Verschiebetisch mit einem Verfahrweg von 50 mm ermöglicht. Damit lassen sich automatisch eine größere Zahl (z.B. >100) hochaufgelöste Einzelbilder (Kacheln) akquirieren. Diese können (bei Bedarf) auch zu einem Gesamtbild (z.B. mit >1000 MPixel) zusammengesetzt werden („stitching“). In jedem Fall können großflächig die räumlichen Koordinaten (Lokalisierung) jedes Partikels festgestellt werden, um dieses im Vergleich zu einem Referenzpunkt auf dem Slide oder Objektträger jederzeit re-analysieren zu können.

Um eine größere Anzahl von biochemischen Sonden (pro Zelle, z.B. 10) analysieren zu können, wird die Probe in sequenziellen Durchläufen („Run“) mit geeigneten Sätzen von Fluoreszenzmarkern mit wiederholt identischen Fluorochrom-Gruppen (z.B. 3-fach Färbung pro Run) gefärbt. Diese Reagenzien werden mit einem Autoloader automatisch adressiert und mit einer speziell entworfenen mikrofluidischen Steuereinheit präzise in die mikrofluidische Analysezelle (MSA Slide) transferiert. Nach Inkubation und Abschluss der mehrkanaligen Bildaufnahme in jedem Durchlauf werden die Fluorochrome durch ausreichend lange intensive Beleuchtung durch Photobleichen deaktiviert. Dadurch können die gleichen Fluorochrome im folgenden Durchlauf erneut (gekoppelt an andere biochemische Sonden/Antikörper) genutzt werden. Dadurch werden Limitationen bei der gleichzeitigen Verwendung einer Vielzahl von Sonden/Fluorochromen aufgrund der begrenzten spektralen Unterscheidbarkeit überwunden.

Das Instrument verwendet einen nach speziellen Anforderungen konstruierten mikroskopisch-fluoreszenzoptischen Grundaufbau des Projektpartners Cytecs (CYT). Softwaremodule für nachgelagerte spezielle statistische Analysen wurden auch vom Projektpartner Immunotools in enger Zusammenarbeit mit QA entwickelt.

## RCMIA / MSA: Wichtige innovative Komponenten

Für die Instrumentierung musste QA insbesondere folgende Komponenten entwerfen, realisieren studieren, in das Instrument integrieren und zum Teil iterativ optimieren. Auf die wichtigsten wird im Folgenden z.T. etwas näher eingegangen.

- Einfach als Verbrauchsmaterial in Stückzahlen von >100...1000 herzustellende mikrofluidische Farbe-/Analysekammer (MSA Slide)
- modulare, einfach handzuhabende magnetisch selbstpositionierende Wechseladapter für MSA Slide
- Mikrofluidik-Steuerungsmodul mit Autoloader
- Ultrapräzisions-Dosier-Spritzenpumpe (Smart Modular Syringe Pump SMSP)
- Anregungslichtquellenmodule (Diodenlaser-, LED-Module) mit Lichtquellen-Stuerelektronik
- Empfindliche Fluoreszenz-Optik (Spektralfilter, Kameramodul)
- Motorisierter XY-Stepper für großflächige, optisch hochaufgelöste Analysen
- Software zur Steuerung, Bilddatenakquisition und Bildanalyse (Vorverarbeitung)

### MSA Slide

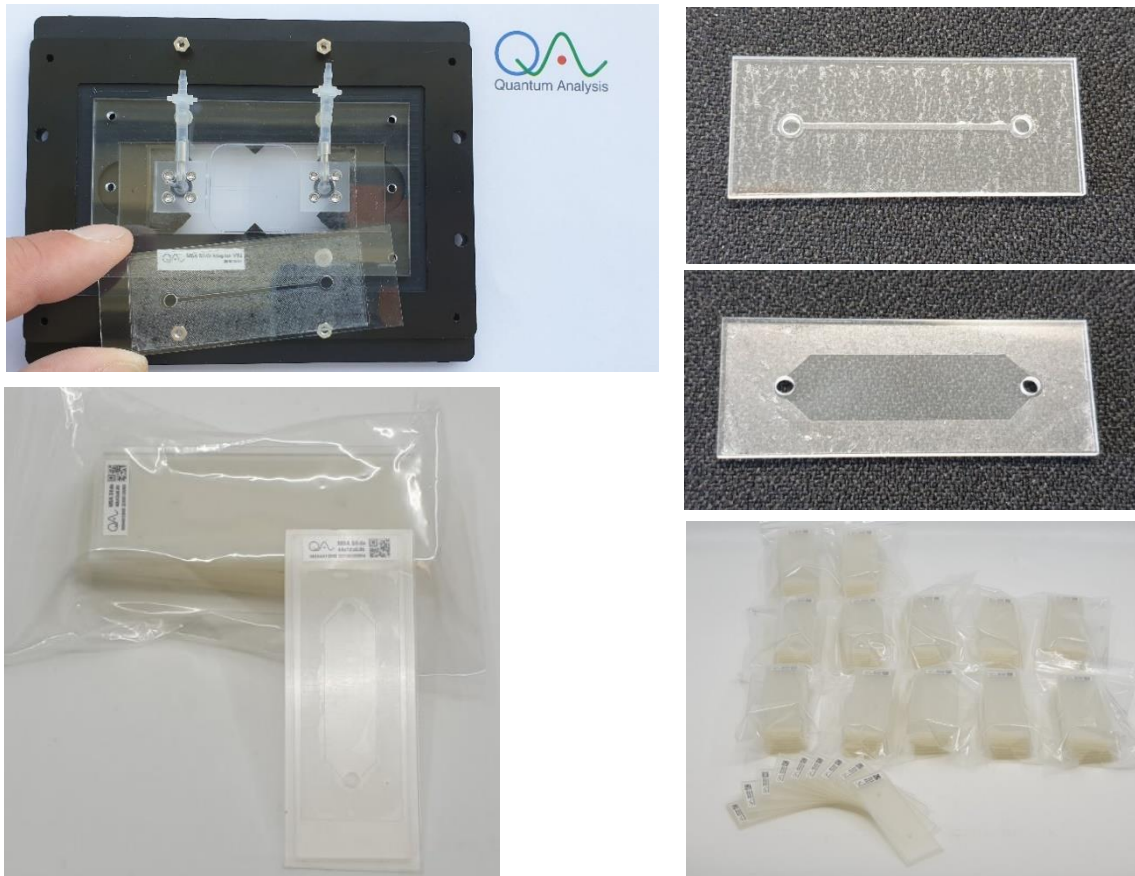


Abb. 19) MSA-Slides: Unten: Ein zentrales Element von RCMIA sind von QA entworfene und zuletzt in Chargen von mehr als 100 St. zu geringen Kosten (~10 €/St.) hergestellte und gut in sehr großen Stückzahlen (ggf. nach fertigungstechnischen Optimierungen 1...5 €/St.) herstellbare Acrylglsträger (Verbrauchsmaterial). Oben rechts: Mit bereits aufgebrachtem Adhäsions-Glsträger, Variante mit Kanalbreite für statischen Modus. Oben Mitte: Variante mit geringerer Mikrofluidik-Kanalbreite, z.B. für dynamischen Modus. Oben links: Platzierung des MSA Slide in Fluidik-Adapter.

Zur Nutzung der MSA-Slides für statische Analysen werden Zellen aus Suspension (z.B. Vollblut-Präparat) zunächst an einen separaten dünnen (einfachen oder ggf. biochemisch

oberflächenmodifizierten) Glasträger adhärirt. Die Oberfläche des Glasträgers kann auch biochemisch modifiziert sein und damit eine Anreicherung relevanter Zellen ermöglichen. Der Glasträger wird dann auf dem adhäsiven „Spacer“ der Slides aufgebracht und bildet so eine mikrofluidische Färbe- und Analysezelle (Abb. 19). Die mikrofluidische Geometrie (Kanalbreite, -dicke, -volumen) ergibt sich aus Dicke und Form des Ausschnitts im Spacer, die sich leicht und präzise je nach jeweiliger Anwendung variieren lässt. So wurden etwa unterschiedliche, für dynamische Analysen besser geeignete geringere Kanalbreiten realisiert.

Auch Varianten aus Glas und Quarzglas (zur Reduktion des Fluoreszenzhintergrunds bei UV-Anregung) wurden hergestellt. Vor allem bei letzterem liegen die Fertigungs- bzw. Materialkosten jedoch teilweise um ein Vielfaches höher (>50 €).

Für die MSA-Slides hat sich eine an gebräuchlichen Objektträgern orientierende „Standard“-Größe von 75 mm x 25 mm (etwa 3“ x 1“) als optimal erwiesen, da so leichter begleitende Untersuchungen z.B. zu Vergleichen mit üblichen Mikroskopen und vorhandenen Objektträger-Aufnahmen durchgeführt werden können. MSA-Slides könnten universeller auch für andere mikrofluidische Anwendungen geeignet sein.

#### Fluidikadapter für Mikrofluidische Analysekammer

Im Projektverlauf wurden in mehreren Stufen fluidische Objektträger und Adapter für die MSA-Slides entworfen und auch im Hinblick auf einfache und sichere Anwendbarkeit optimiert (Abb. 20). Die Slides (Verbrauchsmaterial) lassen sich so über eine magnetisch sich an korrekter Stelle selbst zentrierende Anschlussplättchen (mit Schläuchen) einfach wechseln und zuverlässig fluidisch anschließen.

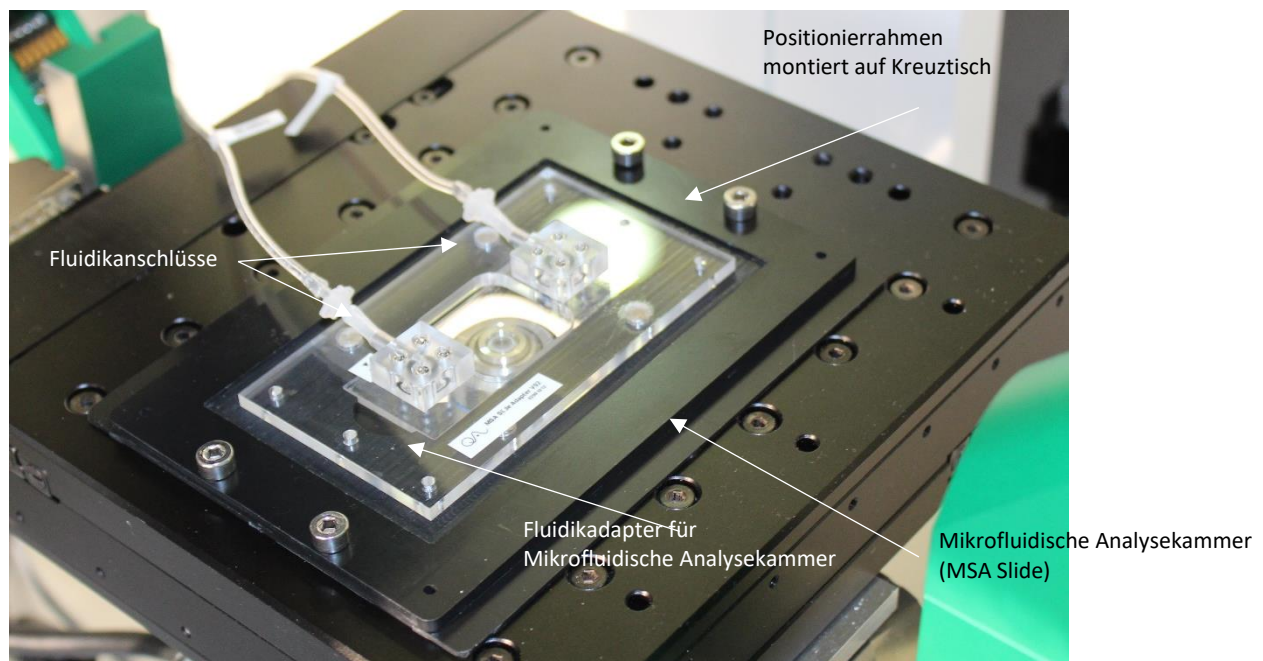


Abb. 20) Mikrofluidische Analysekammer (MSA Slide) mit Fluidikadapter, montiert auf motorisiertem XY-Kreuztisch des fluoreszenzoptischen Moduls (Demonstrator D1).

#### Mikrofluidik-Steuerungsmodul mit Autoloader

Für die sequenzielle spezifische biochemische Färbung der adhärirten Zellen mit Fluoreszenzmarkern (Antikörpern) müssen diese Reagenzien aus einem vorgelegten Behältnis (z.B. einer 96 Multi Well Plate) für die gesamte Zyklenfolge automatisiert in die mikrofluidischen Slides transferiert werden. Um mit den üblichen, möglichst kleinen Volumina (typ. 20...50 µl)

auszukommen, wird eine Trägerflüssigkeit als Transportmedium eingesetzt. Eine Vermischung oder Verdünnung der Marker untereinander oder mit dem Transportmedium wird weitestgehend verhindert, indem alle Flüssigkeiten beim Transport durch die Schläuche durch Luftblasen voneinander separiert werden. Für die Automatisierung des komplexe Fluidik-Handlings wurde ein spezielles, programmierbares Steuerungsmodul für Mikrofluidik mit Autoloader und zugehörigen Software-Modulen entworfen und als Teil der Demonstratoren realisiert (Abb. 21). Dieses besteht aus einer Mikropipettierplattform (Autoloader), mit der flexibel Multiwellplates und größere Behältnisse adressiert werden können, einem kontaminationsarmen Fluidiksystem mit geeignet dimensionierten Schläuchen und Ventilen sowie einem speziell für die Anforderungen entwickelten (Mechanik, Elektronik, Firmware) hochpräzisen mikroprozessorgesteuerten Spritzenpumpenmodul (SMSP, Smart Mini Syringe Pump).

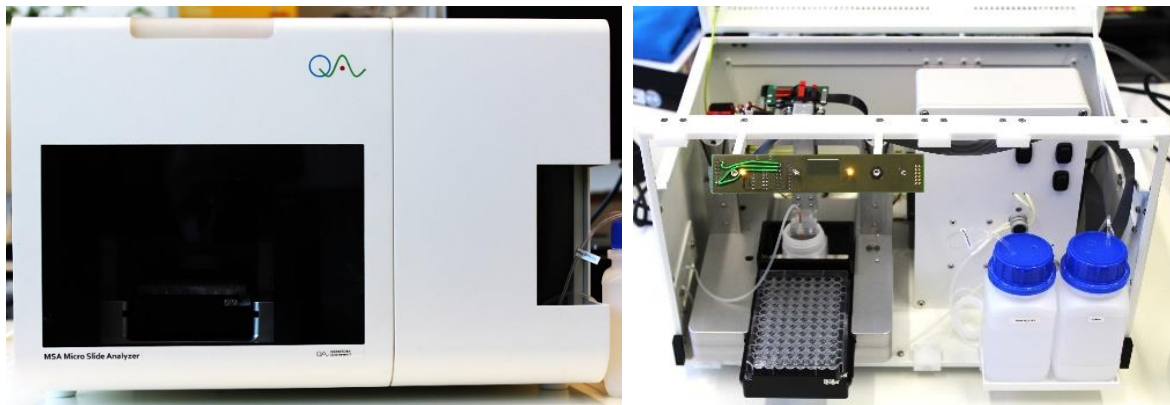


Abb. 21) RCMIA Steuermodul für Mikrofluidik mit Autoloader für Färbereagenzien (oder Proben).

#### SMSP Ultrapräzisions-Dosierpumpe

SMSP (Abb. 22) erlaubt einen pulsations- und schwebungsfreien Transport kleinster Flüssigkeitsvolumina (nl... $\mu$ l) in einem großen dynamischen Geschwindigkeitsbereich (nl/s...ml/s).

Die Eigenschaften von SMSP erlauben gemeinsam mit der Modularität z.B. in Bezug auf das Spritzenkolbenvolumen auch den flexiblen Einsatz auch für andere Anwendungen, z.B. für den dynamischen Mode mit anderen Geometrien und mikrofluidischen Anforderungen. Gleichzeitig sind sie optimal für die Präzisions-Flow Zytometrie ibs. Systeme von QA geeignet.

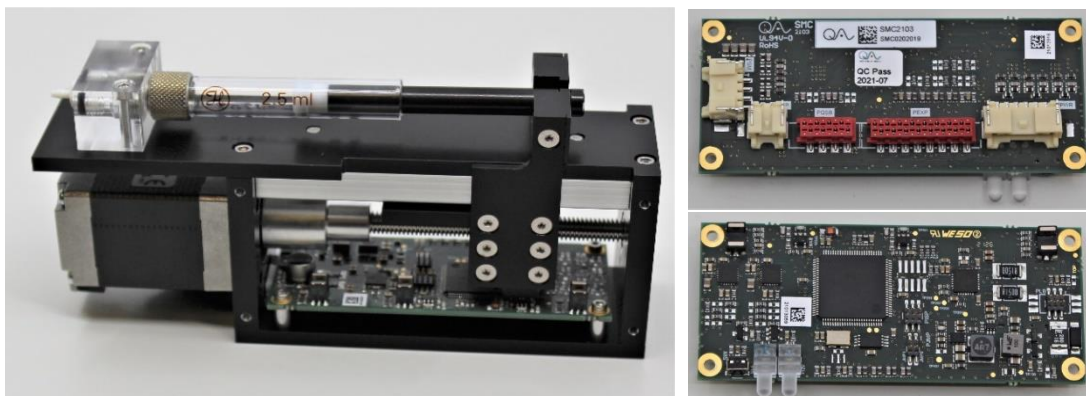


Abb. 22) SMSP (Smart Mini Syringe Pump) mit innovativer Elektronik. Abmessungen: Länge ca. 120 mm.

Mit der für RCMIA entworfenen, aber auch für andere anspruchsvolle Mikrofluidik-Anwendungen nutzbaren Spritzenpumpe lassen sich kleinste (nl... $\mu$ l) und mittlere Volumina (je nach Spritzenkolben

1...100 ml) pulsations- und schwebungsfrei, äußerst präzise und in einem großen dynamischen Geschwindigkeitsbereich (>1000:1) transportieren. Die Pumpe kann selbständig mögliche Verschleißeffekte analysieren und Fehler antizipieren, um einen lückenlosen Betrieb z.B. für Routineanwendungen zu ermöglichen.

### Lichtquellenmodule (LED/Laser)

Für eine effiziente Fluoreszenzanregung sind geeignete Lichtquellen essenziell. Speziell an die Anforderungen angepasste Lichtquellenmodule wurden im Rahmen von RCMIA von QA entwickelt (Abb. 23). Eine flächenhafte und homogene Beleuchtung im statischen Modus stellt dabei andere Anforderungen als die punktuellere Beleuchtung im dynamischen Modus (ähnlich FCM). Hierfür wurden eine Vielzahl geeignet erscheinender Kernelemente (Diodenlaser/LED) selektiert und mit geeigneter Optik und speziell entwickelter Elektronik für Steuerung und Stabilisierung kombiniert und erprobt. Auch ein (opto-) mechanisches Konzept für ein optimiertes und stark miniaturisiertes Lasermodul wurde entworfen. Die Ergebnisse lassen sich universeller nutzen und auch für andere Analyseanwendungen vorteilhaft einsetzen.

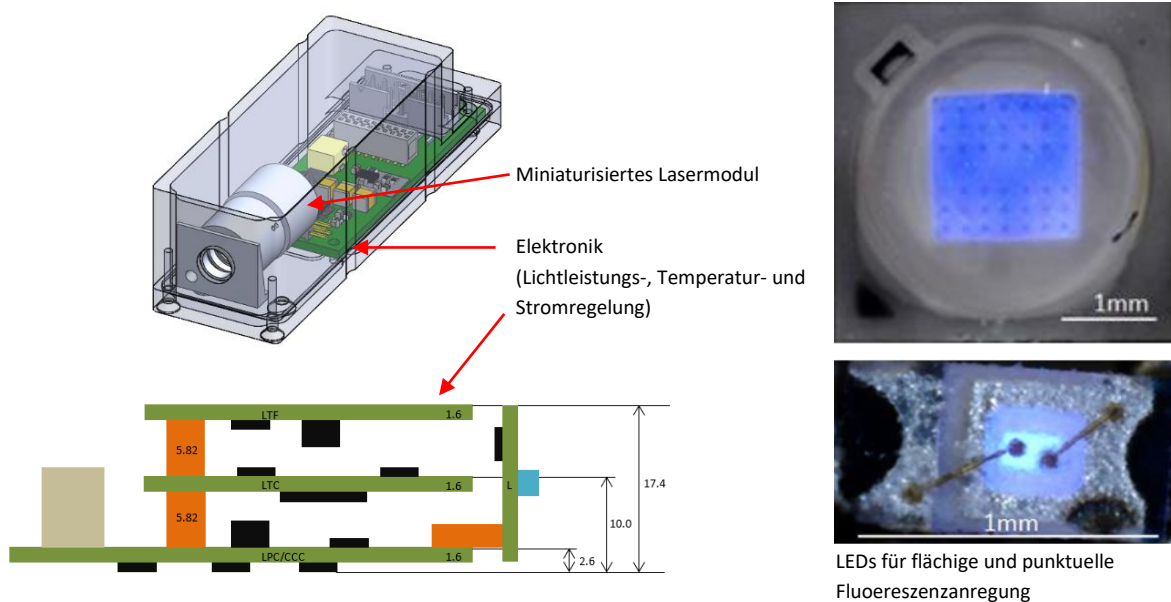


Abb. 23) Im Rahmen von RCMIA entwickelte und untersuchte Lichtquellenmodule (exemplarisch) auf Basis von Laserdioden (links) und LEDs mit unterschiedlichen Emissionsflächen für statischen und dynamischen Modus (rechts). Für den stabilen Betrieb ist jeweils eine angepasste Elektronik erforderlich, wie sie von QA konzipiert wurde.

## Dynamischer Modus: Demonstrator-Aufbau

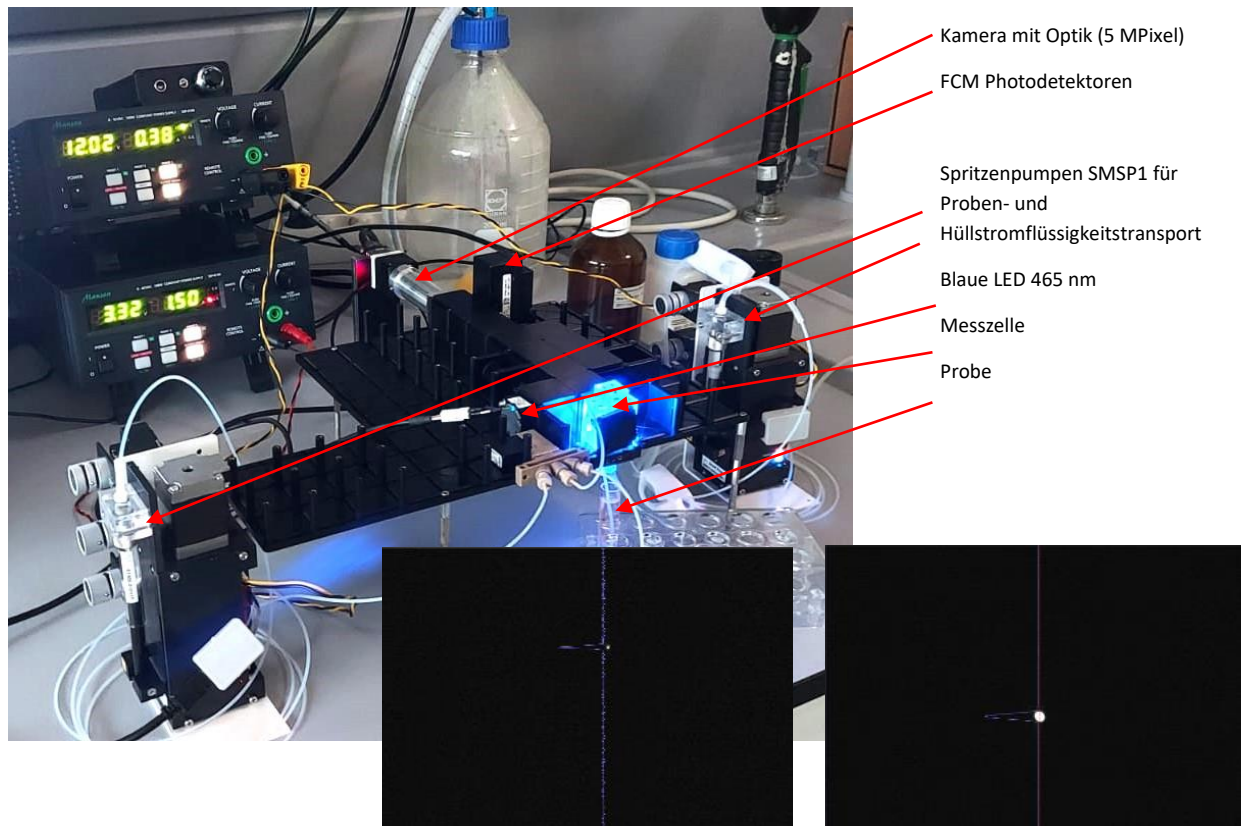


Abb. 24) Experimenteller Demonstrator-Aufbau (Optik und Fluidik) für dynamische Analyse (RCMIA Modus 2). Insets: Einzelpartikel-Fluoreszenzbilder (exemplarisch) von Modellpartikeln von 3 µm und 10 µm Durchmesser (mit Intensitäts-Linienprofilen) im Slow Flow.

Im Demonstrator-Aufbau für den dynamischen Modus (Abb. 24) werden seltene Partikel zunächst mit Hilfe von FCM-Signalen detektiert. Eine schnelle, auf µs-Skala triggerbare Fluoreszenzkamera (5 MPixel) wird damit zeitlich so synchronisiert, dass einzelne Bilder der Partikel an der Messstelle aufgenommen und damit zusätzliche Bildinformationen für eine genauere Identifikation von Partikeln gewonnen werden können. Um eine möglichst gute optische Auflösung mit etwas längerer Wechselwirkungszeit und ausreichendem Fluoreszenzsignal zu gewinnen, kann die Geschwindigkeit der Partikel gegenüber üblichem FCM deutlich reduziert werden (Slow Flow Mode).

## Automatisierung/Ablaufsteuerung: Software

Das RCMIA-Instrument wird über eine zugehörige von QA entwickelte spezielle umfangreiche Software CVIS gesteuert. Diese bietet neben Automatisierungsfunktionen für die Aufnahme großer Bildbereiche, das anschließende Zusammensetzen („stitchen“) der Einzelbildkacheln auch eine Automatisierung der mikrofluidischen Färbesequenz. Abb. 25 zeigt wichtige Elemente der Benutzeroberfläche. Darüber hinaus sind in der Software innovative Algorithmen zur automatischen Identifikation von Partikeln und Extraktion sowie quantitativ statistischen Analyse von Einzelpartikelbildern enthalten. Im Ergebnis können z.B. Histogramme und Dotplots wie bei FCM üblich generiert werden, erweitert mit morphologischen Parametern (Größe, Verteilungsindex von Sonden etc.). Für weitergehende spezielle Bildanalysealgorithmen können Daten in andere Bildverarbeitungsprogramme exportiert werden, z.B. in die Software BloodCat, die IMT mit Unterstützung von QA für NADIM entwickelt hat.

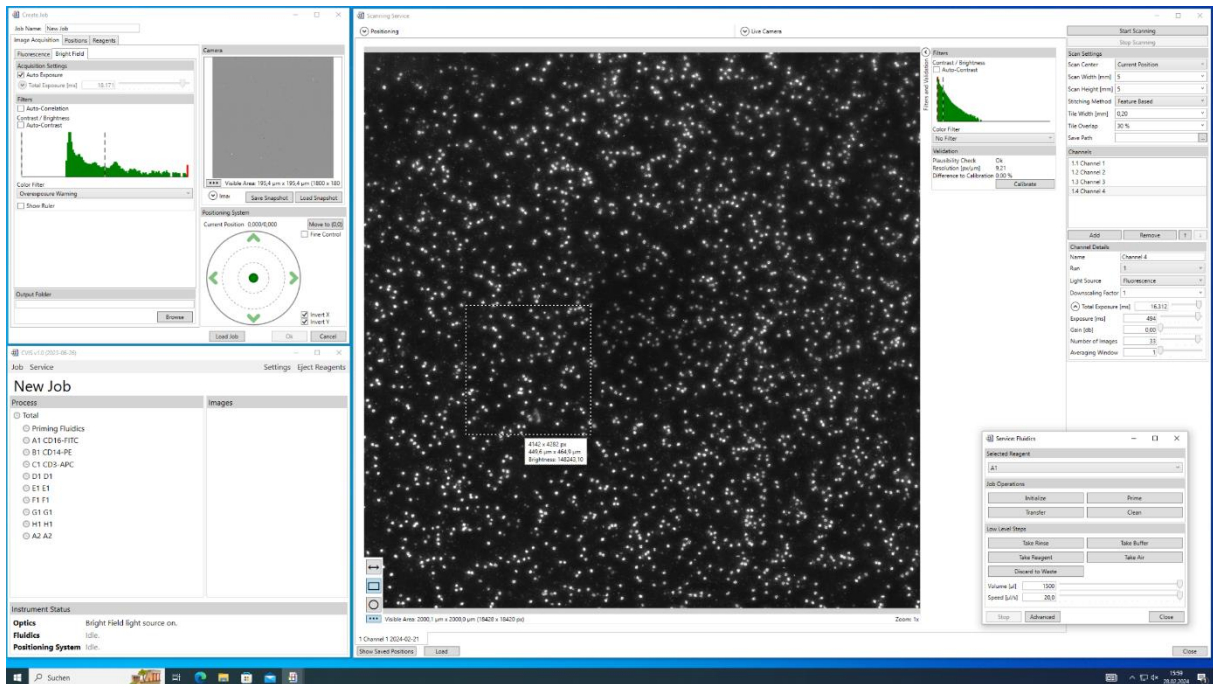


Abb. 25) CVIS Software (Benutzeroberfläche) mit Steuerelementen für Bildaufnahmeparameter (Lichtquellen, Belichtungszeit, ...), Probenvorpositionierung (motorisierter XY-Tisch), Sonden-Lösungen-Handling, sequenzielle Färbung und Automatisierung („Job“), Einzelpartikel-Bild-Extraktion, statistische Bildverarbeitung.

### **Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises**

Quantum Analysis (QA) hat das Teilprojekt RCMIA (Rare Cell Multiprobe Imaging Analyzer) streng im ursprünglich beantragten und bewilligten Rahmen der Arbeitspakete und für Personalkosten (410.000 €) und Material (74.000€ ) durchführen können. Entstanden sind u.a. 3 Demonstratoren mit einer Zahl von Submodulen.

Aufgrund personeller Möglichkeiten bei Projektpartnern und QA wurde auch das Teilprojekt von QA einmalig kostenneutral um 8 Monate verlängert, Laufzeit schließlich: 01.03.2020...30.11.2023. Dadurch konnten insbesondere die Unterstützung der Projektpartner ausgedehnt und technische Detailwünsche (z.B. Unterstützung weiterer Anregungswellenlängen) umgesetzt und erprobt werden.

### **Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Projektarbeiten**

Die Aufgaben und die mit den möglichen Personalressourcen in den zugehörigen Arbeitspaketen erzielbaren Ergebnisse erforderten Investitionen in angemessenem und erfolgtem Umfang. Ohne Förderung hätte QA die Arbeiten aufgrund der Komplexität der Aufgabenstellung und der Risiken von Machbarkeit und Verwertbarkeit im gegebenen Umfang nicht durchführen können. Mit den im Projektverlauf realisierten Instrumenten und instrumentellen Komponenten sowie dem dabei und daran gewonnenen Wissen werden sich mittelfristig angemessene wirtschaftliche Erfolge erzielen lassen.

### **Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere die Verwertbarkeit des Ergebnisses - auch konkrete Planungen für die nähere Zukunft - im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans**

Die im Projektverlauf gewonnenen Erkenntnisse mit der neuen Methode machen die Entwicklung eines routine- und wettbewerbsfähigen Instruments innerhalb der kommenden Jahre greifbarer. Dafür sind aber noch erhebliche Entwicklungsarbeiten, nicht zuletzt im Bereich der Softwareintegration und Usability, aber auch in Bezug auf Untersuchungen und Festlegungen zu spezifischen Anwendungsdetails (Präparation, Markierungen) erforderlich, die mit den Projektpartnern angegangen werden sollen.

An der Einschätzung des Marktpotenzials kann nach Projektverlauf im Wesentlichen festgehalten werden. Die regulatorischen Anforderungen für IVD-Anwendungen nach aktuellem Medizinproduktegesetz sind ohne erhebliche Investitionen bzw. von QA allein möglicherweise jedoch nicht ohne weiteres zu schultern.

In jedem Fall werden sich Erkenntnisse und technische Teilergebnisse für QA z.T. auch kurzfristig in anderen, vor allem auch nicht-medizinischen Bereichen nutzen lassen, wo es um kleinste Partikelkonzentrationen ankommt, z.B. in der Lebensmittelqualitätskontrolle oder Umweltanalytik.

### **Während der Durchführung des Vorhabens dem Zuwendungsempfänger bekannt gewordenen Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen**

Neben großen, modularen und relativ teuren Forschungsmikroskopen mit Optionen für großflächige Bildaufnahmen mit subzellulärer Auflösung, ebenfalls mit einem motorisierten Probentisch, ist ein für solche Aufnahmen und biologische Zellanalyseanwendungen dediziertes und kompaktes System von BioRad auf den Markt gekommen (ZOE Fluorescent Imaging Analyzer). Dieses System basiert offensichtlich ebenfalls auf einem invers-mikroskopischen Aufbau. Es bietet einen Hellfeldkanal und 3 Fluoreszenzkanäle mit 3 Anregungs- und Emissionswellenlängen. Auflösung ist 1 µm bei jedoch nur 6 mm Verfahrweg. Eine Vorrichtung für (z.B. wie bei RCMIA mikrofluidisch sequenzielle) Vielfachfärbung ist jedoch nicht vorgesehen, ein dynamischer Modus nicht möglich.

Anderweitige Alternativen, vor allem routinefähige Ansätze, sind QA nicht bekannt.

### **Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen des Ergebnisses nach Nr. 5 der NKBF/NABF**

Ergebnisse aus dem Teilprojekt von QA werden ggf. gemeinsam mit den Projektteilnehmer (wissenschaftlich) geeignet veröffentlicht. Darüber hinaus wird QA auch für andere Bereiche

verwertbare Ergebnisse und Teilergebnisse der neue(n) Methode(n) veröffentlichen und bewerben, u.a. auf der Website, und soweit möglich wirtschaftlich nutzen.