

Herausforderungen für die Anwendung von kontaktfreien Dosiertechniken in in-vitro Diagnostik (IVD) Analysesystemen

Challenges of contact-free dispensing technologies at in-vitro diagnostics (IVD) analyzers

Nadine Losleben, Roche Diagnostics GmbH, 68305 Mannheim, Germany, nadine.loleben@roche.com

Dr. Jürgen Spinke, Roche Diagnostics GmbH, 68305 Mannheim, Germany

Prof. Dr. Roland Zengerle, University of Freiburg, Laboratory for MEMS Applications, IMTEK – Department of Microsystems Engineering, 79110 Freiburg, Germany

Dr. Norbert Oranth, Roche Diagnostics GmbH, 68305 Mannheim, Germany

Kurzfassung

Diese Arbeit untersucht die Verwendung von kontaktfreien Dosiersystemen in IVD Analysegeräten. Dabei werden zwei Herausforderungen näher betrachtet: 1) Die temperaturabhängigen Eigenschaften der zu dosierenden Reagenzien und deren Einfluss auf kontaktfreie Dosiersysteme, sowie 2) das Risiko von Volumenverlusten durch Satellitentropfen beim kontaktfreien Flüssigkeitstransfer in Reaktionsgefäße. Als Resultate werden die Fluideigenschaften (Dichte, Viskosität, und Oberflächenspannung) einer repräsentativen Auswahl an IVD Reagenzien und deren Änderung mit der Temperatur präsentiert, sowie mögliche Bedingungen für einen vollständigen Reagenzientransfer in das Reaktionsgefäß in Abhängigkeit der Umgebungsbedingungen und der Düsengeometrie vorgestellt.

Abstract

This work deals with the usage of contact-free dispensing systems for IVD analysers. Two main challenges are: 1) The temperature dependent fluid properties and their impact on contact-free dispensing systems, as well as 2) the risk of volume losses due to satellite formation. The results present the fluid properties of a representative selection of different IVD reagents and their changes with the temperature. Moreover, possible conditions for a complete fluid transfer in the reaction vessel depending on the surrounding and the nozzle geometry are shown.

1 Kontaktfreie Dosiersysteme in der in-vitro Diagnostik (IVD)

Kontaktfreie Dosiersysteme sind eine attraktive Alternative zu konventionellen Pipettiersystemen für IVD Analysegeräte, da diese eine präzise Volumenabgabe bis in den Submikroliterbereich ermöglichen. Weiterhin eröffnen diese Systeme eine verschleppungsfreie Pipettierung, wenn für jede Flüssigkeit eine eigene Auslassdüse am Reservoir vorhanden ist. Zudem kann das Reagenzienreservoir nahezu vollständig verschlossen werden, was den Gasaustausch mit der Umgebung verhindert und somit die on-board Haltbarkeit der Reagenzien verlängert. Schlussfolgernd können kontaktfreie Dosiersysteme die benötigten Reagenzienvolumen sowie die damit verbundenen Kosten pro Test erheblich verringern und gleichzeitig die Zuverlässigkeit der Testergebnisse erhöhen. [1]

1.1 Reagenzieneigenschaften bestimmen Dosierparameter

Eine Herausforderung bei der Implementierung von kontaktfreien Dosiersystemen ist deren Abhängigkeit von den Flüssigkeitseigenschaften. Ein Fluidabriss an der Düse ist nur gewährleistet, wenn das Dosiersystem eine hinreichend hohe Dynamik aufweist. Diese kann mit Hilfe der in

Gleichung 1 dargestellten Weber-Zahl (We) beschrieben werden. Ein Abriss der Flüssigkeit von der Düse erfolgt oberhalb der kritischen Weber-Zahl (We_c), welche für Tropfen 12 und für Jets 8 ist [2]. Da die Weber-Zahl die Viskosität (η) nicht berücksichtigt, sind die beschriebenen Bedingungen nur für nichtviskose Fluide geeignet. Eine Anpassung an höhere Viskositäten kann jedoch mit der Ohnesorge-Zahl (On) und der von Brodkey in 1969 beschriebenen empirischen Korrelation zwischen der kritischen Weber-Zahl und der Ohnesorge-Zahl erfolgen, siehe Gleichung 2 [3].

$$We = \frac{\rho v^2 d}{\sigma} \quad (1)$$

$$We_c = 12 \cdot \left(1 + 1.77 \cdot On^{1.6}\right); \quad On = \frac{\eta}{\sqrt{\rho \cdot d \cdot \sigma}} \quad (2)$$

Somit bestimmen die Fluideigenschaften Dichte (ρ), Viskosität (η) und Oberflächenspannung (σ) die zu wählenden Dosierparameter, wie die Dosiergeschwindigkeit (v) und den Düsendurchmesser (d).

Um mit kontaktfreien Dosiertechnologien die universelle Einsatzbarkeit derzeitiger Pipettiertechniken zu erreichen, sollten daher die Fluideigenschaften der IVD Reagenzien

hinreichend bekannt sein und berücksichtigt werden. Nur so kann gewährleistet werden, dass das verwendete Dosiersystem alle Reagenzien kontaktfrei abgeben kann.

1.2 Charakterisierung Reagenzieneigenschaften und Temperaturverhalten

Typischerweise haben die meisten Diagnostikhersteller mehrere hundert verschiedene Reagenzien in ihrem Sortiment. Eine Evaluierung aller Reagenzien mit deren großen Spanne an rheologischen Eigenschaften (Dichte, Viskosität und Oberflächenspannung) ist daher nahezu unmöglich.

Eine repräsentative Auswahl an IVD Reagenzien aus dem Roche Sortiment wurde charakterisiert und ergab folgende Spanne an Fluidparametern:

- Dichte: 997 – 1192 kg/m³,
- Viskosität: 0.87 – 15.6 mPas und
- Oberflächenspannung: 26.2 – 77.8 mN/m [4].

Desweiteren konnte gezeigt werden, dass zur Evaluierung von Dosiersystemen hinsichtlich der Dosierbarkeit von IVD Reagenzien, sieben einfache Modellfluide ausreichend sind [4]. **Bild 1** zeigt die Reagenzienlandschaft aus dem Bereich Immunchemie, klinische Chemie, und molekular Diagnostik, sowie die Position der Modellfluide [4].

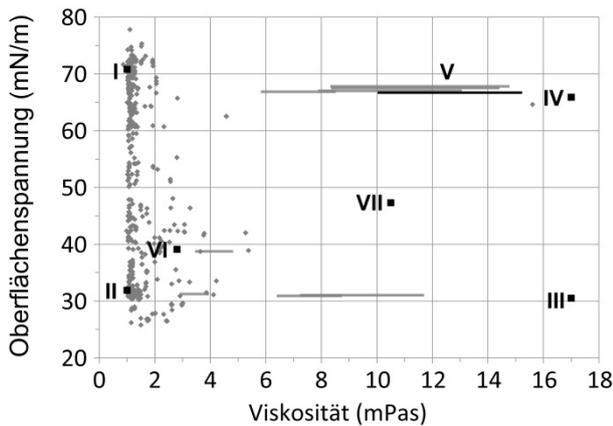


Bild 1 Modellfluide I-VII in der IVD Reagenzienlandschaft bei 20 °C. Die Linien präsentieren Fluide mit scherratenabhängiger Viskosität zwischen 200 s⁻¹ und ~45000 s⁻¹. [4]

Die Integration mehrerer Funktionalitäten innerhalb eines IVD Analysegerätes, wie zum Beispiel 4-8 °C für die Aufbewahrung der Reagenzien, 37 °C für die Reaktionsführung und 20 °C in der Umgebung, führen zu unterschiedlichen klimatischen Bedingungen. Eine Verschiebung der temperaturabhängigen Reagenzieneigenschaften ist die Folge. Dies führt insbesondere bei kühleren Temperaturen zum Anstieg der kritischen Weber-Zahl, was wiederum die benötigte Energie für kontaktfreies Dosieren erhöht.

Daher wurde eine Auswahl an Reagenzien, zusätzlich zu den bereits bekannten Eigenschaften bei 20 °C, bei 10 °C und 4 °C charakterisiert. Die Messergebnisse sind in

Bild 2 dargestellt. Sie verdeutlichen, dass sich die Fluideigenschaften erwartungsgemäß verändern; je tiefer die Temperaturen sind, desto höher ist die Viskosität, die Oberflächenspannung und die Dichte.

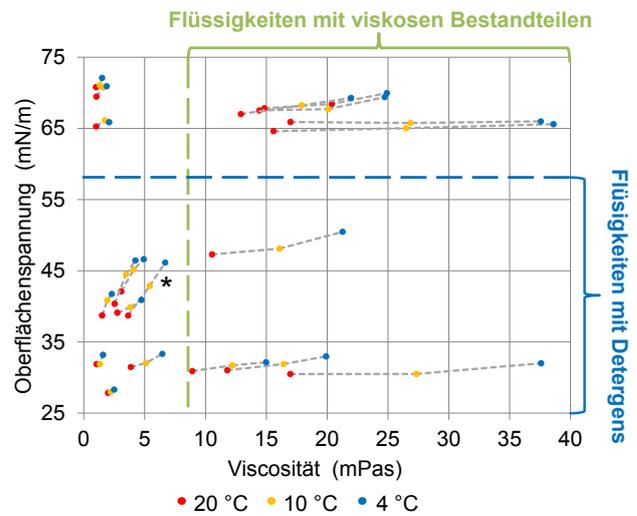


Bild 2 Viskosität und Oberflächenspannung von ausgewählten IVD Reagenzien bei 4 °C, 10 °C, und 20 °C. * Fluid für spätere Temperaturuntersuchung

Die untersuchten Eigenschaften der Reagenzien änderten sich folgendermaßen mit der Temperatur:

- Dichte: < 0.1 %/K
- Viskosität: 1.6 – 9.2 %/K
- Oberflächenspannung: 0.1 – 1.2 %/K

Dabei zeigte sich, dass die Reagenzien mit viskosen Bestandteilen, wie Polyvinylpyrrolidon oder Glycerin, sowie mit Detergenzien stärker von Temperaturänderungen betroffen sind.

1.3 Temperaturschwankungen und deren Auswirkung auf Zeit-Druck gesteuerte Dosiersysteme

Derzeitige IVD Anwendungen dosieren üblicherweise Volumen zwischen 3 und 200 µl pro Reagenz. Durch die hohe Präzision von kontaktfreien Dosiersystemen bei geringen Volumen, kann der Reagenzienverbrauch pro Test in den sub-µl Bereich reduziert werden [1]. Für diesen Volumenbereich sind Druck-Zeit gesteuerte Dosiersysteme gut geeignet, da diese bei schnellen Ventilöffnungs- und Schließzeiten alle Volumen innerhalb kürzester Taktzeiten kontaktfrei abgeben können.

Zeit-Druck gesteuerte Dosiersysteme regulieren die abgegebenen Volumen über den Druck und die Öffnungszeit des Ventils. Dabei hängt der benötigte Druck von den aus der Viskosität resultierenden Reibungskräften (innerhalb des Fluid und zwischen Wand und Fluid) ab. Für IVD Analysegeräte sind daher für das Reagenz angepasste Parametereinstellungen notwendig. Problematisch ist jedoch die Veränderung der Flüssigkeitseigenschaften mit der Temperatur (T).

Wie groß der Einfluss von Temperaturschwankungen auf das dosierte Volumen ist und welche Toleranzgrenzen

einzuhalten sind, um präzise Volumen abzugeben, soll an dieser Stelle beispielhaft gezeigt werden. Dafür wurde das Vermes Dosiersystem (Vermes Microdispensing GmbH, MDV 3010-70) als Vertreter eines Zeit-Druck gesteuerten Dosiersystems ausgewählt. Mit diesem System wurde ein typisches IVD Reagens (siehe * Bild 2) ohne viskose Zusätze und mit Detergens bei 20 °C, 10 °C, und 4 °C dosiert und die abgegebene Volumenmenge gravimetrisch bestimmt (Messmethode siehe [5]). Die in **Bild 3** dargestellten Ergebnisse zeigen, dass bereits eine Temperaturänderung von 1 °C zu einer Volumenänderung von 3 % führt, beziehungsweise eine Änderung von 1.7 °C das Volumen um 5 % verschiebt.

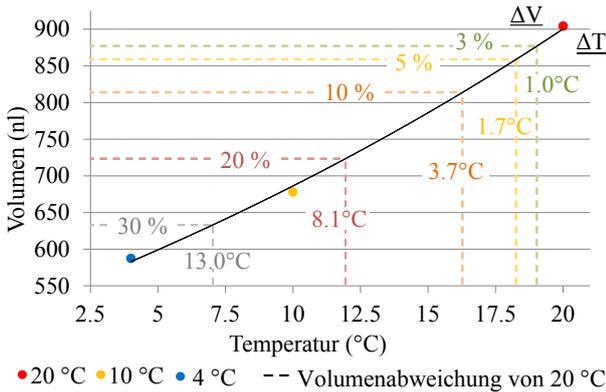


Bild 3 Einfluss der Temperatur auf das dosierte Volumen eines Zeit-Druck gesteuerten Dosiersystems.

Wenn diese enge Temperaturgrenze nicht eingehalten werden kann, ist alternativ die Verwendung von volumendirektverdrängenden Dosiersystemen zu bevorzugen. Dabei ist jedoch zu bedenken, dass durch die meist mechanische Aktuierung der kontaktfreie Tropfenabriss bei kleinen Volumen nur schwer erreichbar ist [6].

2 Kontaktfreier Flüssigkeitstransfer in Reaktionsgefäße

Um die präzise abgegebenen Volumen von kontaktfreien Dosiersystemen in IVD Analysesystemen nutzen zu können, muss gewährleistet sein, dass diese auch verlustfrei ins Reaktionsgefäß überführt werden. Das ist eine Herausforderung, besonders wenn ein gewisser Abstand zwischen Reaktionsgefäß und Düse einzuhalten ist, zum Beispiel durch geometrische Restriktionen oder um Reagenzienverschleppung zu vermeiden. Dabei ist die Bildung von Satelliten, deren Flugbahn leicht ablenkbar ist, eine Hauptursache für Volumenverluste.

Für experimentelle Untersuchungen hinsichtlich der Satellitenbildung wurde die „Cartridge for dispensing a fluid“, als volumendirektverdrängendes System, gewählt (detailliertere Systembeschreibung siehe EP12167108.5; [1]). Durch die Fluidunabhängigkeit können somit verschiedene Fluide mit einem Setup dosiert werden. Die eingestellten Parameter führen zu einem Tropfenabriss im Rayleigh-Regime [8,14]. Dies bedeutet, dass die kritische

Weber-Zahl überschritten wird, so dass das Fluid kontaktfrei abreißt und der abgegebene Jet aufgrund von Instabilitäten in der Umgebung zerfällt.

2.1 Satelliten: Entstehung und Auswirkung

Satelliten sind kleine, leichte Tropfen, welche nahezu bei jeder kontaktfreien Jet-Dosierung entstehen. Ihr Bildungsprozess kann in fünf Schritten beschrieben werden: 1) Aufgrund von Unruhen in der Umgebung nimmt der abgegebene Jet eine Sinusform an (**Bild 4**). 2) Instabilitäten in der Amplitude treten auf. 3) Ausbildung von dünnen Fäden zwischen zwei Auswölbungen. 4) Am Ende der dünnen Fäden bilden sich Haupttropfen aus. 5) Wenn ein Haupttropfen abgelöst wird und der dünne Faden sich nicht zu dem zusammenhängenden Jet oder Haupttropfen darüber zurückziehen kann, dann wird mindestens ein Satellitentropfen gebildet.

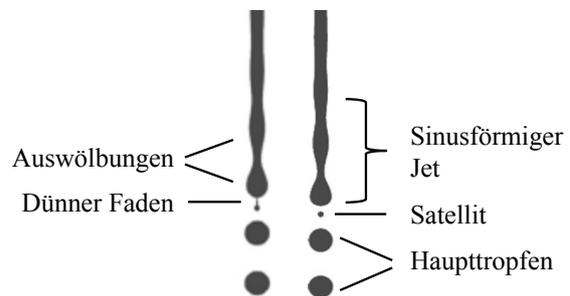


Bild 4 Schematische Darstellung des Jetzerfalls in Haupttropfen und Satelliten [7].

Die Auswirkungen der Satellitenbildung auf das dosierte Volumen wurden in dieser Arbeit näher untersucht. Bei der Dosierung von 1 µl Wasser und einem Abstand zwischen Reaktionsgefäß und Düse von 40 mm tritt ein Volumenverlust von bis zu 7.4 % pro Flüssigkeitsabgabe auf. Der gemessene mittlere Volumenverlust aller Dosierungen mit Satelliten außerhalb des Reaktionsgefäßes ist 5 %. Für die 10 µl Dosierungen ist der Volumenfehler im Mittel 0.7 % und somit prozentual gesehen erheblich geringer als bei der 1 µl Dosierung.

Obwohl der Flüssigkeitsverlust bei größeren Volumen prozentual klein ist besteht stets das Risiko benachbarte Reaktionsgefäße zu kontaminieren. Für einen Abstand zwischen Reaktionsgefäß und Düse zwischen 20 mm und 40 mm wurden Satelliten bis zu einem Umkreis von 20 mm von der Mitte des Gefäßes beobachtet.

2.2 Einflussfaktoren auf die Satellitenbildung

Seit dem 18. Jahrhundert werden die Einflussfaktoren auf die Satellitenbildung untersucht. Der derzeitige Fokus liegt in der Verbesserung heutiger Technologien, wie den Tintenstrahldruckern, der Faserherstellung oder der Silizium-Chip-Produktion. Die dabei gewonnenen Erkenntnisse können jedoch auch auf kontaktfreie Dosiersysteme übertragen werden. Einen Überblick der in der Literatur beschriebenen Einflussfaktoren auf die Satellitenbildung gibt das in **Bild 5** dargestellte Ishikawa-Diagramm.

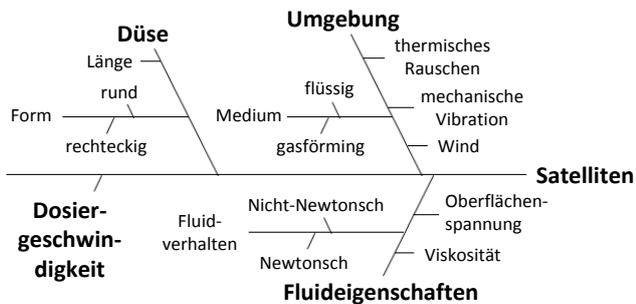


Bild 5 Ishikawa-Diagramm zu den Einflussfaktoren auf die Satellitenbildung [7-14].

2.3 Bedingungen für vollständigen Flüssigkeitstransfer / Lösungsvorschläge

Der Einfluss der Fluideigenschaften, der Düsenlänge und der Umgebung auf die Satellitenbildung wurde hinsichtlich der Anwendung im IVD-Bereich experimentell untersucht.

Die Ergebnisse bestätigen die theoretischen Annahmen; je ruhiger und vibrationsärmer die Umgebungsbedingungen sind, desto weniger Satelliten werden gebildet. Zudem konnte gezeigt werden, dass eine längere Düse, 12 mm gegenüber 2 mm, die Anzahl der Satelliten außerhalb des Reaktionsgefäßes deutlich reduziert.

Weiterhin wird die Bildung von Satelliten mit steigenden Oberflächenspannungskräften und abnehmender Viskosität gefördert. Ferner konnte gezeigt werden, dass sich das nicht-Newtonsche Verhalten von IVD Reagenzien sich hinsichtlich der Satellitenbildung nicht von den Newtonschen Flüssigkeiten unterscheidet, wenn die Grundviskosität vergleichbar ist. Somit bildet Wasser (Modellfluid I), von allen untersuchten Modellfluiden, die meisten Satelliten.

Um herauszufinden unter welchen Bedingungen ein verlustfreier Flüssigkeitstransfer in Reaktionsgefäße möglich ist, wurden verschiedene Kombinationen untersucht. Dabei diente ein klimatisierter Laborraum als unruhige und ein vibrationsgeschützter Tisch mit Windschutz als optimale Umgebung. Als Flüssigkeit wurde Wasser mit 1 µl und 10 µl in ein Reaktionsgefäß mit einer Öffnung von 5 mm im Durchmesser dosiert.

Folgende Kombinationen haben sich als geeignet ergeben:

Unruhige Umgebung:

Keine Satelliten außerhalb der Öffnung für:

- einem Abstand zwischen Düse und Reaktionsgefäß ≤ 20 mm bei der Verwendung einer 12 mm Düse,
- einem Abstand zwischen Düse und Reaktionsgefäß < 10 mm bei der Verwendung einer 2 mm Düse.

Optimale Umgebung:

Volumenabweichung durch Satellitenbildung < 3 % für:

- einem Abstand zwischen Düse und Reaktionsgefäß ≤ 30 mm bei der Verwendung einer 12 mm Düse,
- einem Abstand zwischen Düse und Reaktionsgefäß ≤ 20 mm bei der Verwendung einer 2 mm Düse.

Interessenskonflikt

Die verwendeten Materialien wurden von der Roche Diagnostics GmbH Mannheim zur Verfügung gestellt. Für die Durchführung und die Auswertung der Experimente sind die Autoren allein verantwortlich.

Danksagung

Die Autoren bedanken sich bei dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) und dem Cluster MicroTEC Südwest für die Forderung des Projects ‚Smart Reagent Dosing‘ (SFK 16SV5118K).

3 Literatur

- [1] Spinke, J.: Smart Reagent Dosing (SRD), microTEC Südwest Clusterkonferenz, 10.05.2012
- [2] Koltay, P.; Zengerle, R.: Non-Contact Nanoliter & Picoliter Liquid Dispensing, Transducers & Eurosensors '07 Vol. 1A6.1, 2007, pp. 165-170
- [3] Pilch, M.; Erdman, C. A.: Use of breakup time data and velocity history data to predict the maximum size of stable fragments for acceleration-induced breakup of a liquid drop, Int. J. Multiphase Flow Vol. 13, 1987, pp. 741-757
- [4] Losleben, N.; Spinke, J.; et al.: Definition of model fluids representing aqueous IVD reagents for the development of dispensing systems“, Drug Discov. Today, in press
- [5] Liang, D.; Steinert, C.; et al.: Novel gravimetric measurement technique for quantitative volume calibration in the sub-microliter range, Meas. Sci. Technol. Vol. 24, No. 025301, 2013, pp. 1-10
- [6] Tisone, C.T.: Dispensing systems for miniaturized diagnostics, IVD Technology Magazine, 01.05.1998
- [7] van Hoeve, W.; Gekle, S.; et al.: Breakup of diminutive Rayleigh jets, Physics of Fluids Vol. 22, No. 122003, 2010, pp. 1-11
- [8] Eggers, J.: Nonlinear dynamics and breakup of free-surface flows, Rev. Mod. Phys. Vol. 69, No. 3, 1997, pp. 865-929
- [9] Eggers, J.; Villermaux, E.: Physics of liquid jets, Rep. Prog. Phys., Vol. 71, 2008, pp.1-79
- [10] Yildirim, O.E.; Basaran, O.A.: Deformation and breakup of stretching bridges of Newtonian and shear-thinning liquids: comparison of one- and two-dimensional models, Chemical Engineering Science Vol. 56, 2001, pp. 211-233
- [11] Razumovskii, N.A.: Shape of drops and satellite droplets formed as a result of forced capillary breakup of liquid jet, Technical Physics Vol. 38, No. 9, 1993, pp. 752-761
- [12] Takahashi, T.; Kitamura, Y.: Effect of Nozzle Length on Breakup Length of Liquid Jet, Memoirs of the school of Engineering, Okayama University Vol. 4, No. 1, 1969, pp. 57-64
- [13] Moseler, M.; Landman, U.: Formation, Stability, and Breakup of Nanojets, Science Vol. 289, 2000, pp. 1165-9
- [14] Lin, S.P.; Reitz, R.D.: Drop and Spray Formation from a Liquid Jet, Annu. Rev. Fluid. Mech. Vol. 30, 1998, pp. 85-105