

Advanced microfluidic platforms for pathogen detection

Doctoral Thesis

Author(s):

Halvorsen, Zahra Alsadat

Publication date:

2021

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-b-000499996>

DISS. ETH NO. 27402

Advanced microfluidic platforms for pathogen detection

A thesis submitted to attain the degree of DOCTOR

OF SCIENCES of ETH ZURICH

(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

Zahra Alsadat Halvorsen

Laurea Magistrale, Polytechnic University of Turin, Italy

born on 25.06.1987

citizen of Iran

accepted on the recommendation of

Prof. Andrew deMello

Prof. Klaus Eyer

Dr. Vincent Revol

Dr. Stavros Stavrakis

2021

Abstract

The overarching goal of this thesaural work was to develop novel and powerful microfluidic platforms for the accurate detection and analysis of pathogens. More specifically, studies focused on developing a microfluidic sample preparation module for high-throughput flow cytometric detection of bacteria and the implementation of a field-deployable nucleic acid amplification system.

The first part of the thesis describes the creation of a miniaturized and automated sample preparation platform that interfaces with the optical module of a portable commercial flow cytometer. The integrated system is able, for the first time, to perform fully automated and high-throughput analysis of microbial species in drinking and lake water samples. The utility of the platform as a valuable tool in the water treatment industry is confirmed through the quantitative analysis of contaminated lake water samples on timescales of less than 30 minutes.

The second part of the thesis describes the development of a microfabricated step emulsification device for the high-throughput generation of monodisperse droplet populations that can be used as templates for the production of functional microparticles. As a proof-of-concept, we used this system to produce large quantities of monodisperse PAA hydrogel and PLGA microparticles on short timescales.

Accordingly, the final part of this thesis describes the development of a novel micro-compartmentalized nucleic acid quantification assay based on hydrogel microparticles that can be batch synthesized in large numbers and stored for subsequent application in loop-

mediated isothermal amplification (LAMP)-based procedures. Specifically, we targeted the detection of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), the most prevalent AMR pathogen. In our hydrogel LAMP assay (which we term H-LAMP), monodisperse polyacrylamide microbeads were used for particle-templated emulsification of LAMP reaction components, thus achieving micro-compartmentalization of the reaction. The assay was successful in detecting MRSA within 30 minutes, with a limit-of-detection of 1 fg/ μ L (103 copies/ μ L). Overall, this new approach enables the direct translation of technical advances in droplet-based microfluidics to the in vitro diagnostics field, whilst circumventing the need for costly, complex, and cumbersome instrumentation. Such a platform has significant potential utility for use in resource-limited environments and represents a significant advance in field-deployable diagnostic tools for pathogen detection and quantification.

This thesis shows the benefit of combining interdisciplinary knowledge in biology, chemistry, and engineering, to develop industry-oriented tools for point of care diagnostics applications, especially for resource-limited areas.

Keywords: flow cytometry, water monitoring, Nucleic Acid Amplification, automation, step emulsification, microfluidics.

Zusammenfassung

Das übergreifende Ziel dieser Thesis liegt darin, neue und effizientere Microfluidics-Plattformen zu entwickeln für die präzise und effiziente Erkennung von Pathogenen. Genauer gesagt, konzentrierten sich die Studien auf die Entwicklung eines mikrofluidischen Probenvorbereitungsmoduls für den rapiden Flow-Zytometrischen Nachweis von Bakterien und die Implementierung eines feldtauglichen Nukleinsäure-Amplifikationssystems.

Der erste Teil der Arbeit beschreibt die Erstellung einer miniaturisierten und automatisierten Probe-Analyse-Plattform, die mit dem optischen Modul eines tragbaren kommerziellen Flow-Zytometers verbunden ist. Das integrierte System ist zum ersten Mal in der Lage, eine vollständig automatisierte Hoch-Durchsatz-Analyse von mikrobiellen Spezies in Trink- und Seewasserproben durchzuführen. Die Nützlichkeit der Plattform als wertvolles Werkzeug in der Wasseraufbereitungsindustrie wird durch die quantitative Analyse von kontaminierten Seewasserproben in weniger als 30 Minuten bestätigt.

Der zweite Teil der Arbeit beschreibt die Entwicklung eines mikrofabrizierten Stufen-Emulsifizierungs-Geräts für die Hoch-Durchsatz-Generierung von monodispersen Droplets, die als Vorlagen für die Herstellung von funktionalen Mikropartikeln verwendet werden können. Als Proof-of-Concept haben wir dieses System verwendet, um grosse Mengen an monodispersen PAA-Hydrogel- und PLGA-Mikropartikeln in kurzer Zeit zu produzieren.

Dementsprechend beschreibt der letzte Teil dieser Arbeit die Entwicklung eines neuartigen Micro-Compartmentalized Nukleinsäure-Quantifizierungstests auf der Basis von Hydrogel-Mikropartikeln, die in grossen Mengen im Batch-Verfahren hergestellt und für die spätere Anwendung im Loop-Mediated Isothermal Amplification-Verfahren (LAMP) gelagert

werden können. Speziell haben wir uns auf den Nachweis von Methicillin-resistentem Staphylococcus Aureus (MRSA), dem häufigsten AMR-Erreger, konzentriert. In unserer Hydrogel-LAMP-Probe (die wir als H-LAMP bezeichnen) wurden monodisperse Polyacrylamid-Mikroperlen für die partikelgesteuerte Emulgierung der LAMP-Reaktionskomponenten verwendet, wodurch eine Mikrokompartimentierung der Reaktion erreicht wurde. Die Probe war erfolgreich beim Nachweis von MRSA innerhalb von 30 Minuten mit einer Genauigkeit von 1 fg/ μ L (103 Kopien/ μ L). Insgesamt ermöglicht dieser neue Ansatz die direkte Übertragung der technischen Fortschritte im Bereich der Droplet-Microfluidics auf den Bereich der In-vitro-Diagnostik und umgeht gleichzeitig die Notwendigkeit einer kostspieligen, komplexen und umständlichen Instrumentierung. Eine solche Plattform bietet einen gewaltigen potenziellen Nutzen für den Einsatz in ressourcenbeschränkten Umgebungen und stellt einen bedeutenden Fortschritt bei feldtauglichen Diagnosewerkzeugen zur Erkennung und Quantifizierung von Krankheitserregern dar.

Diese Arbeit zeigt den Nutzen der Kombination von interdisziplinärem Wissen in Biologie, Chemie und Technik auf, um industrietaugliche Werkzeuge für Point-of-Care-Diagnoseanwendungen zu entwickeln, insbesondere für ressourcenbeschränkte Gebiete.