

KANTONSSCHULE WETTINGEN

# Blutaufbereitung für ein Point-of-Care Testing

---

Edith Simmen

Betreuer: Thomas Werner

Gegenleser: Daniel Margadant

**Maturaarbeit**

**01.11.2014**

# 1 Inhaltsverzeichnis

2	Zusammenfassung.....	1
3	Einleitung.....	2
3.1	Hintergrund .....	2
3.2	Ziele .....	3
3.3	POCT – Point of Care Testing.....	3
3.4	Menschliches Blut.....	6
4	Material und Methoden .....	7
4.1	Blutaufbereitung im POCT.....	7
4.2	Material .....	7
4.2.1	Blut .....	7
4.2.2	Vivid™ Plasma Separation Membrane.....	8
4.2.3	PBS.....	8
4.2.4	Human IL-6 ELISA Development Kit.....	8
4.2.5	Biotek™ Synergy™ HT Multi-Mode Microplate Reader .....	11
4.3	Gebrauch der Vivid Plasma Separation Membrane .....	11
4.5	Vergleich der Verfahren zur Blutaufbereitung.....	12
4.6	Datenverarbeitung .....	15
4.6.1	Berechnung der Resultate .....	15
4.6.2	Konzentrationsänderung durch Blutauftrennung.....	15
4.6.3	Verdünnung durch PBS.....	15
5	Resultate.....	16
5.1	Blutauftrennung im POCT.....	16
5.2	Anwendung der Vivid™ Plasma Separation Membrane .....	21
5.3	Standardkurve .....	22
5.4	Vergleich der Verfahren zur Blutaufbereitung.....	23
6	Diskussion.....	26
6.1	Konzepte zur Blutaufbereitung .....	26

6.2	Anwendung der Vivid™ Plasma Separation Membrane .....	28
6.3	Vergleich der Verfahren zur Blutaufbereitung.....	29
6.4	Schlussfolgerung.....	34
6.5	Reflexion.....	36
7	Danksagung .....	37
8	Quellenverzeichnis .....	38
8.1	Abbildungsverzeichnis.....	38
8.2	Endnotenverzeichnis .....	39
9	Anhang.....	42
9.1	Messresultate.....	42
9.2	Human IL-6 DuoSet.....	<b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>

## 2 Zusammenfassung

Blutaufbereitung ist notwendig für eine Vielzahl von Labortests, kann aber an Orten ohne Laborinfrastruktur, wie teilweise in Entwicklungsländern, schwer oder gar unmöglich sein. In dieser Arbeit wurde zur Blutaufbereitung durch Zentrifugieren eine Alternative gesucht, welche sich für ein Point-of-Care Testing (POCT) eignen würde. Es wurde ein kurzer Bericht zu den verschiedenen alternativen Möglichkeiten zusammengestellt.

Die Filtration des Blutes durch eine Membran wurde für eine weitere Untersuchung ausgewählt. Das Plasma der verwendete Vivid™ Plasma Separation Membrane wie auch der Zentrifuge wurde durch einen ELISA auf seine IL-6-Konzentration hin untersucht und verglichen. IL-6 diene als Modellantikörper vertretend für mögliche Zielantikörper bzw. -gene. Unter Verwendung einer Membran ging mehr IL-6 verloren. Die Ergebnisse waren aber in vergleichbarer Nähe zu den Resultaten der zentrifugierten Probe und schienen relativ stabil zu sein. Es bieten sich klare Vorteile für ein POCT an, die Membran müsste in ihrer Anwendung aber noch optimiert werden.

## 3 Einleitung

### 3.1 Hintergrund

Schon seit Anbeginn der Medizin besteht das Bedürfnis, Diagnosen zeitnah und möglichst am Ort des Geschehens zu machen. Mit dem Fortschritt des technischen Wissens nahm auch die Komplexität der diagnostischen Tests zu. Es wurden nun spezielle Räumlichkeiten und Instrumente, sowie labormedizinisches Spezialwissen vorausgesetzt. Gleichzeitig führte dieser Fortschritt aber zu längeren Antwortzeiten. Das Point-of-Care Testing (POCT) entstand ursprünglich dort, wo in lebensbedrohlichen Notfallsituationen möglichst schnell aus Laborwerten eine therapeutische Schlussfolgerung abgeleitet werden musste. Bald wurden dessen Vorteile auch im ambulanten Bereich erkannt und genutzt.<sup>1</sup>

Das POCT wird allgemein als labormedizinisches Verfahren verstanden, welches in der Nähe des Patienten innerhalb einer kurzen Zeit angewendet werden kann. Neben der zunehmenden Verwendung ausserhalb von Arztpraxis und Krankenhaus, ermöglicht es Entwicklungsländern den Zugang zu komplizierteren diagnostischen Tests. Eine Studie aus dem Jahr 2006 hat gezeigt, dass Patienten in Afrika nur zu 28% Zugang zu fortschrittlicher Infrastruktur mit zuverlässiger Elektrizitäts- und Wasserversorgung, sowie einem Labor mit minimaler bis guter Ausstattung (Zentrifuge, Kühl-/Gefrierschrank, Mikroskop) haben<sup>2</sup>. Die meisten Patienten werden somit in Gesundheitseinrichtungen ohne Zugang zu Labortests behandelt. Im Bereich der Infektions-diagnostik kann dies zu einer Überbehandlung und demzufolge Ressourcenverschleiss und Antibiotikaresistenzen führen. Obwohl in vielen Infektionsfällen die Patienten effektiv mithilfe von WHO „Guidelines for syndromic Management“ behandelt werden können, bleiben die Diagnosen ungenau.<sup>3</sup>

Die Stärke des POCT liegt darin, auch an entlegenen Orten ohne Laborinfrastruktur gebraucht werden zu können.<sup>4</sup> Speziell für Entwicklungsländer gedachte POCT müssen aber bestimmte Eigenschaften erfüllen. Sie sollten auch in ressourcen-limitierten Orten mit extremeren Umweltbedingungen wie zu wenig Wasser, unzuverlässige Elektrizität, hohe Temperaturen (35-45°C) und hoher Feuchtigkeit gebraucht werden können.<sup>5</sup> Trotzdem oder genau aus diesen Gründen können nicht alle diagnostischen und Laborverfahren erfolgreich als POCT umgesetzt werden. Sogar der einfachste molekulare Test braucht grundlegende Infrastruktur wie Stromanschluss und Temperaturkontrolle<sup>4</sup>. So sind auch dem gewöhnlichen Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) in ressourcenlimitierten Orten Schranken auferlegt. Ein ELISA wird für den spezifischen Nachweis von Antigenen in einer Probe, zum Beispiel zur Diagnose einer Krankheit, verwendet<sup>6</sup>. Die Durchführung eines Assays geht lange, es muss umständlich mit Flüssigkeiten gearbeitet werden und es braucht grosse Mengen an teuren Reagenzien und Ausrüstung. Zudem muss es von einer Person mit

Laborerfahrung durchgeführt werden und ist damit unter Umständen für einen Gesundheitsarbeiter oder Arzt zu kompliziert.<sup>2,5</sup> Grundsätzlich stellt sich bei einem ELISA schon ganz am Anfang eine Herausforderung. Da Inhibitoren vom Vollblut den ELISA stören und in einer tiefen Genauigkeit resultieren können, muss in einem ersten Schritt das Plasma bzw. Serum von den Blutzellen getrennt werden. In einem klinischen Labor sind Zentrifugen vorhanden und die Blutauftrennung stellt kein Problem dar. An Orten ohne Laborinfrastruktur und mit nur limitierten Ressourcen kann es aber zu einer Herausforderung werden.<sup>7</sup>

Obwohl immer wieder auf die Probleme und Krankheiten in Entwicklungsländern aufmerksam gemacht und viel Geld darin investiert wird, fokussiert ein grosser Teil der Investitionen in globale Gesundheitsforschung und –Entwicklung auf die Prävention und das Heilen. Die Notwendigkeit Krankheiten zu diagnostizieren ist aber gleich gross.<sup>2</sup> So wurden im Jahr 2008 weniger als 3% der totalen Forschungsgelder für HIV/AIDS und Malaria in Diagnostika investiert, obwohl gerade diagnostische Hilfsmittel essentiell für eine effiziente und kosteneffektive Diagnose einer Krankheit sind. Der Befund einer Krankheit ermöglicht eine spezifische und wirkungsorientierte Behandlung für diejenigen, die sie brauchen und führt zu einer tieferen Erkrankungs- und Sterberate.<sup>28</sup>

Im Rahmen eines grösseren Projektes wird bei BioRevels deshalb versucht, aufgrund der momentan erhältlichen Biodetektions-Technologien, einen neuen diagnostischen POCT in Form eines Handheld und Einweggerätes zu entwickeln. In der hier vorliegenden Maturaarbeit wird dabei der erste Schritt, die Blutaufbereitung für ein POCT, auf einen möglichen Lösungsansatz hin untersucht.

### 3.2 Ziele

In dieser Maturaarbeit wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

Was gibt es für verschiedene Ansätze zur Blutaufbereitung für ein POCT?

Wie gut ist ein solcher Ansatz in einer ersten Anwendung verglichen zur Zentrifugation?

Es soll anhand von Recherchen nach Technik(en) für die Blutaufbereitung in einem POCT gesucht werden. Es wird probiert, eine dieser Methoden im Labor umzusetzen. Die Qualität der Blutaufbereitung wird in einem ersten Vergleichstest analysiert und soweit wie möglich mit der herkömmlichen Methode verglichen. Das Verfahren sollte mit mindestens 25µl auskommen.

### 3.3 POCT – Point of Care Testing

Im allgemeinen Sprachgebrauch wird unter dem Begriff „Point-of-Care Testing“ (POCT) die Anwendung labormedizinischer Verfahren verstanden, die direkt am Patientenbett oder in

unmittelbarer Nähe zum Patienten zur Anwendung kommen. Es gibt für diese Bezeichnung aber keine einheitliche Definition. Zusätzlich gibt es auch unterschiedliche Begriffe, die auf ein ähnliches, aber nicht zwingend gleiches Verfahren hinweisen. Im Deutschen ist vor allem „patientennahe Labordiagnostik“ ein gebräuchliches Synonym, im englischen Sprachgebrauch werden auch Wörter wie „near patient testing“ oder „decentralized testing“ verwendet.<sup>9</sup>

Bei allen verschiedenen Arten des POCT können gewisse charakteristische Eigenschaften gefunden werden, die nun im Folgenden aufgeführt sind. Diese Merkmale sind zwar typisch, aber nicht verbindlich. Es kann noch von einem POCT gesprochen werden, wenn nicht alle Punkte erfüllt sind:<sup>9</sup>

1. Durchführung von Laboruntersuchungen in unmittelbarer Nähe zum Patienten
2. Durchführung von Laboruntersuchungen ausserhalb eines Zentral- oder Satellitenlaboratoriums
3. Keine Probenvorbereitung, d.h. meist Vollblut als Untersuchungsmaterial
4. Keine Pipettierschritte
5. Ready-to-use-Reagenzien, z. B. als Kassettengeräte oder Test zur einmaligen Verwendung
6. Nur für Einzelprobenmessungen vorgesehene oder eingesetzte, spezielle Messgeräte
7. Keine eingehende medizinisch-technische Qualifikation für die Bedienung der Messgeräte notwendig
8. Rasche Verfügbarkeit der Ergebnisse
9. Unmittelbare Ableitung einer Diagnose bzw. therapeutische Konsequenzen aus den Ergebnissen möglich

Trotz diesen gemeinsamen Charakteristika gibt es eine breite Palette an verschiedenen Systemen von POCT. Einige dieser Tests sind nur zur einmaligen Verwendung gedacht, während andere als technische Geräte auf Strom angewiesen sind. Aufgrund dieser verschiedenen Verwendungsmöglichkeiten, können die POCT in Target Product Profiles (TPP) unterteilt werden (Tabelle 1).<sup>4</sup> Als Rapid Diagnostic Test (RDT) wird ein diagnostischer Test bezeichnet, der für den Gebrauch am POC entwickelt und für Orte mit wenig Ressourcen angepasst wurde. Ein RDT ist billig, einfach zu bedienen und zu interpretieren, sensitiv, spezifisch, auch bei hohen Temperaturen stabil und schnell durchzuführen.<sup>10</sup>

Grob werden 5 verschiedene TPPs, die in Tabelle 1 kurz beschrieben sind, unterschieden. Es ergeben sich aufgrund der verschiedenen Zielgruppen zwar andere Eigenschaften, trotzdem bestimmt die Art des Verfahrens nicht zwingend die Zugehörigkeit zu einem TPP. Für einige, wie beispielsweise einen

einfachen molekularen Test, können zudem bestimmte TPPs ausgeschlossen werden. Sie benötigen grundlegende Infrastrukturen, wie zum Beispiel Stromanschluss.<sup>4</sup>

Target Product Profile	TPP1: Zu Hause	TPP2: Gemeinschaft	TPP3: Klinik/ Gesundheits- posten (ambulant)	TPP4: peripheres Labor	TPP5: Krankenhaus (stationär)
Ort des Testens	Selbst-Testen	Gemeinschaft	Klinik	Peripheres Labor	Krankenhaus (stationärer Patient)
Benutzer	Laie	Wenig trainiertes Gesundheitspersonal	Klinik-angestellter	Laborant	Krankenhaus-angestellte
Gerät	RDT	RDT	RDT, Handheld	RDT, molekulare Tests, ELISA, Mikroskopieren, etc.	RDT, molekulare Tests, Abstriche, etc.

**Tabelle 1** Verschiedene „Target Product Profiles“ des POCT und ihre Benutzer<sup>4</sup> Es werden fünf Target Product Profiles (TPP) aufgrund ihrer Eigenschaften unterschieden. Zu den Eigenschaften werden der Ort des Testens, der Benutzer, sowie die Art des Geräts gezählt.

Für diese Arbeit soll sich ein POCT auf die Kriterien der Gruppen TPP1 bis höchstens TPP3 beschränken. Aufgrund dieser verschiedenen Charakteristika und Einteilungen lauten die Ansprüche an ein POCT wie folgt:

- Das Verfahren soll ausserhalb eines Labors und in unmittelbarer Nähe des Patienten stattfinden können.
- Es kann direkt Vollblut als Untersuchungsmaterial verwendet werden.
- Es sind keine Pipettierschritte notwendig.
- Das Verfahren ist auf keinen direkten Stromanschluss angewiesen.
- Es ist ein Resultat in weniger als 30 Minuten erhältlich.
- Der Test kann auch von einem Laien ohne jegliche medizinische oder Laborerfahrung durchgeführt werden.



### 3.4 Menschliches Blut

Das Blut setzt sich aus zwei Hauptbestandteilen zusammen, der Blutflüssigkeit und den verschiedenen Blutzellen (Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten). Daneben enthält das Blut noch weitere kleinere und wichtige Bestandteile.<sup>11</sup>

Unter Blutplasma wird folglich die Blutflüssigkeit ohne Blutzellen verstanden. Es hat eine gelbliche Farbe und besteht zum grössten Teil aus Wasser, beinhaltet aber auch Eiweisse, Salze und Säuren. Darunter sind auch die Gerinnungsfaktoren enthalten, welche zusammen mit den Blutplättchen für eine Blutstillung an der Wundoberfläche sorgen.<sup>11,12</sup>

Das Blutserum ist gleich wie das Blutplasma, enthält aber keine Gerinnungsfaktoren. Es wird durch Zentrifugieren von bereits geronnenem Blut gewonnen. Plasma erhält man durch Zugabe von Antikoagulanzen zum Vollblut und anschliessender Zentrifugierung.<sup>13</sup>

Aufgrund verschiedener Quellen im Internet, wie auch basierend auf Erfahrungswerten, wurde eine Richtlinie als Vorlage für spätere Versuche zur Plasmaherstellung definiert. Mit Antikoagulanzen versetztes Blut wird 10 Minuten in einer (gekühlten) Zentrifuge bei 1000g zentrifugiert und der Überstand in ein neues und sauberes Röhrchen überführt<sup>14,15</sup>.

## 4 Material und Methoden

Das hier vorliegende Kapitel widmet sich dem experimentellen Teil der Arbeit und soll genauer über die Vorgehensweise und die verwendeten Materialien Bescheid geben.

Das praktische Arbeiten war in zwei Teile geteilt: zuerst wurde nach einer Methode gesucht, um die Membran zu gebrauchen, dann wurde getestet, wie gut sich dieses Verfahren als Alternative zum herkömmlichen Zentrifugieren eignet.

### 4.1 Blutaufbereitung im POCT

Um einen genaueren Überblick der Methoden einer alternativen Blutaufbereitung zu erhalten, wurde eine ausführliche Literatur- und Internetrecherche durchgeführt. Dadurch konnten verschiedene aktuelle und POCT geeignete Verfahren gefunden werden. Für eine erste Anwendung im Labor wurde die Blutauftrennung aufgrund einer Membran ausgewählt.

### 4.2 Material

200ml Bechergläser

20 und 35ml Spritzen

Petrischale aus Kunststoff

Mikropipetten

Eppendorf-Röhrchen

0.22µm Spritzenfilter

Deionisiertes Wasser

Zentrifuge

#### 4.2.1 Blut

Für die Experimente wurde frisches Blut vom Blutspendedienst Bern bezogen. Das Blut (Blutgruppe: A, Rh+) wurde am 06. August von einem anonymen Spender genommen, mit EDTA versetzt geliefert und war so im Kühlschrank etwa 2 Wochen haltbar. Der gesunde Spender hatte sich dazu bereit erklärt, sein Blut für Forschungs- und Entwicklungszwecke zur Verfügung zu stellen. Der Blutspendedienst Bern bestimmt nach Vorschriften der Blutspende SRK Schweiz die Blutgruppe, wie auch Untergruppe und untersucht das Blut auf Hepatitis B und C, HIV, Lues und Alloantikörper.<sup>16</sup> Für die Experimente wurden allgemeine, im Labor übliche Sicherheitsvorkehrungen getroffen, das heisst es wurde mit Laborkittel, Schutzbrille und Handschuhen gearbeitet.

#### 4.2.2 Vivid™ Plasma Separation Membrane

Die Vivid™ Plasma Separation Membrane von Pall Corporations ist eine Membran aus Polysulfon, die der Filtration des Plasmas vom Vollblut dient. Das Filtrationsverfahren beruht auf der stark asymmetrischen Struktur der Membran, welche die Blutzellen ohne Hämolyse in den grossen Poren fangen kann. Das Plasma kann gleichzeitig durch die kleiner werdenden Poren auf die andere Seite der Membran gelangen. Die Membran hat wegen ihrer asymmetrischen Struktur eine glänzende und eine matte Seite. Um das gewünschte Plasma zu bekommen muss das Blut auf die matte Seite aufgetragen werden.<sup>17</sup>

Beim Benutzen der Membran sollte darauf geachtet werden, dass nicht mehr als das empfohlene Volumen aufgetragen wird. Ansonsten wird die Membran überladen und es kann zur Verunreinigung von Plasma durch die Blutzellen kommen. Es wurden zwei verschiedene Membrantypen verwendet, welche beide für Anwendungen mit kleinen Blutmengen, z. Bsp. in Fingersticks, geeignet sind. Die von Pall empfohlenen Probenvolumina sind für die beiden Membranen etwas verschieden.<sup>18</sup>

#### Vivid™ Plasma Separation GF Membrane (Pall Corporation, #T9EXPPA0200S00A)

Da bei der GF-Membran keine Nachbehandlung durchgeführt wurde, kann es zu einer stärkeren Hämolyse als bei den anderen Membranen kommen.

Empfohlenes Volumen für Vollblutprobe ( $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ):  $20\mu\text{l}$ <sup>18</sup>

#### Vivid™ Plasma Separation GX Membrane (Pall Corporation, #T9EXPPA0200S00A)

Die GX-Membran ist auch für die Detektion von elektrochemischen Analyten geeignet. Dank einer Nachbehandlung kann die Hämolyse minimiert werden.

Empfohlenes Volumen für Vollblutprobe ( $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ): 20 -  $30\mu\text{l}$ <sup>18</sup>

#### 4.2.3 PBS

Die phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) wurde von Sigma Aldrich als Tabletten bezogen und in 200ml deionisiertes Wasser gelöst. Daraus ergibt sich eine Lösung mit 0.01M Phosphatpuffer, 0.0027M Kaliumchlorid und 0.137M Natriumchlorid. Der pH beträgt bei 25°C 7.4.<sup>19</sup>

#### 4.2.4 Human IL-6 ELISA Development Kit

Das DuoSet Ancillary Reagent Kit 2 (R&D Systems, #DY008) enthält alle benötigten Reagenzien, um einen ELISA durchzuführen.<sup>20</sup> Der DuoSet ELISA Development Kit, genauer gesagt das Human IL-6 DuoSet von R&D Systems (R&D Systems, #DY206-05) beinhaltet alle grundlegenden Komponenten, sowie das Protein selber, um mit einem Sandwich ELISA das menschliche IL-6 in einer Probe zu messen.<sup>21</sup>

***DuoSet Ancillary Reagent Kit 220***

Saubere Polystyrol Mikroplatten

ELISA Plattenversiegler

Farbreagenzien A und B

Stopplösung

ELISA Plattenbeschichtungs-Puffer

Reagenzverdünner-Konzentrat 2

Waschpuffer

***Human IL-6 DuoSet<sup>21</sup>***

Primärer Antikörper für menschliches IL-6

Detektions-Antikörper für menschliches IL-6

Menschlicher IL-6 Standard

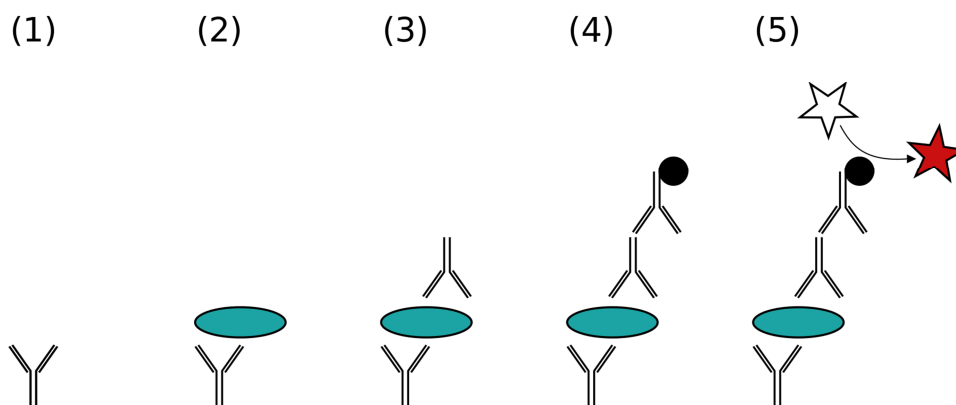
Streptavidin zu Meerrettichperoxidase konjugiert (Streptavidin-HRP)

***Menschliches IL-6***

Das Interleukin-6 ist bei Entzündungsprozessen und der Reifung von B-Zellen aktiv. Das Protein wird vor allem auch an Orten akuter und chronischer Entzündungen produziert.<sup>22</sup>

### Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

In einem Sandwich-ELISA werden zwei Antikörper verwendet, welche beide spezifisch an das nachzuweisende Antigen binden. Der erste, auch primärer Antikörper genannt, wird an einer festen Phase, meist einer Multilochplatte, fixiert (1). Anfangs bindet sich das zu detektierende Antigen an den ersten Antikörper (2), danach wird der zweite Antikörper, der Detektions-Antikörper, zugegeben (3). Er macht sich an einer anderen Stelle am Antigen fest, um eine gegenseitige Behinderung der beiden Antikörper zu verhindern. Durch den typischen Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex ist das Antigen zwischen den beiden Antikörpern wie in einem Sandwich eingepackt. Dadurch ist auch der Name des ELISA-Typs entstanden. Am Ende des Detektions-Antikörpers ist ein Reporterenzym gebunden, das durch die Reaktion mit einem passenden chromogenen Substrat die Detektion und Quantifizierung des Antigens ermöglicht. Als Alternative bietet sich an, das Enzym nicht direkt an den zweiten Antikörper zu binden sondern wie in Abb. 1 einen dritten Antikörper zu verwenden (4). Dieser kann für viele verschiedene Antigene verwendet werden, da er an einer gemeinsamen Stelle der verschiedenen Antikörper bindet. So muss nicht für jedes Antigen ein spezifischer Antikörper mit einem angebundenen Enzym produziert werden<sup>23</sup>. Das zugegebene Substrat wird dann vom Enzym zu einem Reaktionsprodukt umgesetzt (5). Dessen Nachweis durch Farbumschlag, Fluoreszenz oder Chemolumineszenz kann mit einem passenden Messgerät quantitativ nachgewiesen werden. Es kann mithilfe einer Serie bekannter Antigenkonzentrationen (Standardreihe) eine Kalibrierungskurve für das gemessene Signal ermittelt und die unbekannt Konzentrationen in der Probe festgestellt werden.<sup>6</sup>



**Abb. 1 Sandwich-ELISA.** Die Platte wird mit einem primären Antikörper beschichtet (1), an dem das Antigen festmacht (2). An dieses Antigen bindet wiederum der Detektions-Antikörper (3), welcher entweder ein Enzym am Ende gebunden hat oder an den ein nächster Antikörper mit ebendiesem Enzym festmacht (4). Ein zugegebenes Substrat wird vom Enzym so umgesetzt, dass ein Farbumschlag, eine Fluoreszenz oder eine Chemolumineszenz nachgewiesen werden kann (5).

#### 4.2.5 Biotek™ Synergy™ HT Multi-Mode Microplate Reader

Der Biotek™ Synergy™ HT Multi-Mode Microplate Reader ist für die Messung der Fluoreszenz, der Extinktion und der Lumineszenz geeignet<sup>24</sup>. Die optische Dichte wurde bei 450 und 540nm gemessen.

#### 4.3 Gebrauch der Vivid™ Plasma Separation Membrane

Für die zwei verschiedenen Membrantypen wurden mit einer Reihe von Versuchen zwei Anleitungen zur Herstellung von Plasma aufgestellt. Das genaue Vorgehen ist in Tabelle 2 beschrieben (Seite 21). Der genaue Versuchsaufbau, wie er auch im Folgenden für die beiden Membranen beschrieben ist, wird in Abb. 2 dargestellt.

##### GF Vivid™ Plasma Separation Membrane

Membrangröße:  $\sim 10\text{cm}^2$  (Der Radius ist etwas grösser als 1cm)

100 $\mu\text{l}$  PBS werden für einen besseren Oberflächenkontakt auf eine Glasoberfläche aufgetragen.



50 $\mu\text{l}$  der Vollblutprobe werden auf die Membran gegeben und während ca. 5-6 Minuten zum Einziehen stehen gelassen.

Es werden 2-3 Mal 50 $\mu\text{l}$  PBS auf die Membran gegeben, um das Plasma wieder aus der Membran zu waschen.

##### GX Vivid™ Plasma Separation Membrane

Membrangröße:  $\sim 10\text{cm}^2$  (Der Radius ist etwas grösser als 1cm)

50 $\mu\text{l}$  PBS werden für einen besseren Oberflächenkontakt auf eine Glasoberfläche aufgetragen.

70 $\mu\text{l}$  der Vollblutprobe werden auf die Membran gegeben und kurz zum Einziehen stehen gelassen. Falls nicht das ganze Blut aufgenommen wurde, muss die Membran kurz angehoben und das angesammelte Plasma mit einer Pipette entfernt werden.

**Abb. 2 Versuchsaufbau** Die Membran liegt auf dem Rücken eines Becherglases. Mit einer Pipette werden das Blut und PBS aufgetragen.

Es werden 1-2 Mal 50 $\mu\text{l}$  PBS auf die Membran gegeben, um das Plasma herauszuwaschen.

#### 4.5 Vergleich der Verfahren zur Blutaufbereitung

1. Es wurden 56.7 $\mu$ l des primären Antikörpers in 6.8ml PBS auf Arbeitskonzentration verdünnt. In jeden Wells wurden je 100 $\mu$ l davon gegeben, die Platte abgedichtet und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.
2. Vorbereitung Waschpuffer: 16ml konzentrierter Waschpuffer wurde in 384ml deionisiertes Wasser gelöst.  
Die restliche Flüssigkeit des primären Antikörpers sind von der Platte entfernt und die Platte gut abgetrocknet worden. Durch dreimaliges Hinzufügen und Entfernen von je 400 $\mu$ l Waschpuffer wurden die einzelnen Wells gewaschen.
3. Vorbereitung des Reagenzverdünners: Es wurden 3.5ml des Reagenzverdünner-Konzentrates zuerst mit Spritzenfilter gefiltert und dann durch Auffüllen auf 35ml mit deionisiertem Wasser verdünnt.  
Die Platte wurde mit 300 $\mu$ l Reagenzverdünner pro Wells blockiert und während einer Stunde inkubiert.
4. Versetzung des Blutes mit Human IL-6 Standard: Zu 3x 500 $\mu$ l Blut wurden 4.25 $\mu$ l des IL-6 Standard Bestandes (120ng/ml) gegeben. Die neue Konzentration betrug so mind. 1ng/ml.
5. Herstellung des Plasmas:  
Zentrifugiertes Plasma: Das Blut wurde in den Eppendorf-Röhrchen während 10 Minuten bei 1000g zentrifugiert und der Überstand in ein neues Röhrchen gegeben. In Abb. 3 ist das so erhaltene Plasma zu sehen.

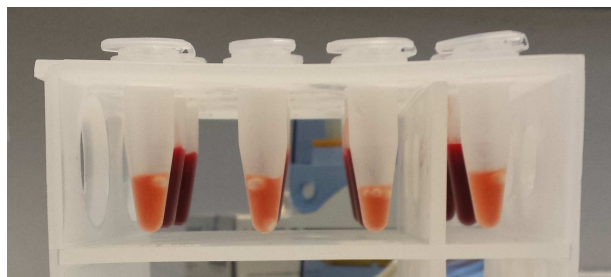


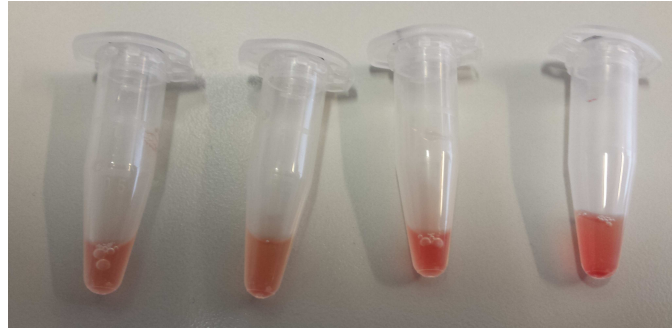
Abb. 3 Zentrifugiertes Plasma

Filtriertes Plasma:

GF Vivid™ Plasma Separation Membrane: Auf den Rücken eines Becherglases wurden 200 $\mu$ l PBS gegeben und ein Stück Membran daraufgelegt ( $r=2$ cm). Es wurden 200 $\mu$ l Blut filtriert und dreimal je 100 $\mu$ l PBS als Waschpuffer auf die Membran hinzugefügt. Vor jedem erneuten Hinzufügen wurde zuerst das filtrierte Plasma in ein Eppendorf-Röhrchen überführt.

GX Vivid™ Plasma Separation Membrane: 150µl PBS wurden auf den Rücken eines Becherglases gegeben. Auf das darüber gelegte Stück Membran ( $r=1.5\text{cm}$ ) wurden zweimal je 100µl Blut und danach dreimal 50µl Blut geladen.

In Abb. 4 ist das filtrierte Plasma zu sehen.



**Abb. 4 Filtriertes Plasma** In den beiden linken Röhrchen befindet sich das Plasma der GX-, in den beiden rechten das Plasma der GF-Membran.

6. Vorbereitung der Proben:

Verdünnungsreihe: Es wurden 2µl des IL-6 Standards in 400µl des Reagenzverdünners verdünnt (600pg/ml). Die Verdünnungsreihe enthielt folgende Konzentrationen: 600pg/ml, 300pg/ml, 150pg/ml, 75pg/ml, 37.5pg/ml, 18.8pg/ml und 9.38pg/ml. Um die Verdünnungsreihe aufzustellen, wurden je 200µl der nächst weniger verdünnten Lösung mit 200µl Reagenzverdünner versetzt. Es wurden zwei dieser Kontroll-Verdünnungsreihen aufgestellt.

Plasmaproben (zentrifugiert und filtriert): 65µl des Plasmas wurden je mit 260µl des Reagenzverdünners versetzt.

7. Die Platte wurde wie in Punkt 2 gewaschen.

8. In jeden Wells wurden 100µl einer Probe eingefüllt. Die Plasmaproben wurden je in dreifacher Ausführung aufgetragen. Danach wurde die Platte abgedichtet und während 1.5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

9. Die Platte wurde wie in Punkt 2 gewaschen.

10. Vorbereitung des Detektions-Antikörpers: Es wurden 83.3µl des Detektions-Antikörpers in 5ml Reagenzverdünner gelöst (60fache Verdünnung).

100µl des verdünnten Detektions-Antikörpers wurden in jeden Wells gefüllt. Die Platte wurde abgedichtet und während 1.5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

11. Die Platte wurde wie in Schritt 2 waschen.

12. Vorbereitung des Streptavidin-HRP: Es wurden 130µl Streptavidin-HRP in 5.2ml Reagenzverdünner gelöst (40fache Verdünnung).



100µl des verdünnten Streptavidin-HRP wurden in jeden Wells eingefüllt, die Platte abgedichtet und während 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platte durfte dabei nicht in direktes Sonnenlicht gestellt werden.

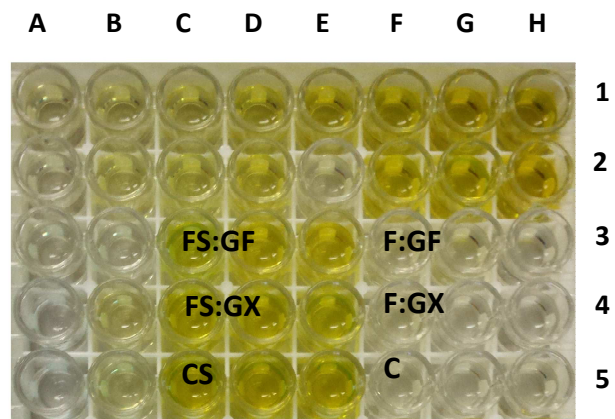
13. Die Platte wurde wie in Punkt 2 gewaschen.

14. Vorbereitung der Substratlösung (erst kurz vor Gebrauch): Von den Farbreagenzien A (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) und B (Tetramethylbenzidin) wurden je 2.75ml in einem Verhältnis von 1:1 vermischt.

Je 100µl der Substratlösung wurden in jeden Wells gegeben, die Platte abgedichtet und während 50 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Anleitung sollte es nur während 20 Minuten inkubiert werden, da man aber für die optischen Messungen das Labor wechseln musste, verzögerte sich dies auf 50 Minuten. Die Platte sollte wiederum nicht in direktes Sonnenlicht gestellt werden und wurde darum in Alufolie ein-gewickelt.

15. Es wurden 50µl Stopplösung zu jedem Wells hinzugefügt.

16. Die optische Dichte wurde sofort mit dem Lesegerät für Mikroplatten, einem Synergy™ HT von BioTek™, bei 450 und 540nm gemessen. Die optische Dichte bei 540nm diente als Korrekturwert, um mögliche optische Fehler in der Platte korrigieren zu können.



**Abb. 5 Anordnung der Proben im der Multilochplatte** 1A-H und 2A-H: Verdünnungsreihen. Konzentrationen von links nach rechts (in pg/mL): 9.38, 18.8, 37.5, 75, 150, 300, 600. Die Proben sind je in zweifacher Ausführung vorhanden. Abkürzungen: F (Gefiltert), C (Zentrifugiert), S (Blut zusätzlich mit IL-6 versetzt), GF bzw. GX (Membrantyp). In A3-5 und B3-5 befinden sich keine Proben.

Die Proben in der Multilochplatte waren, wie in Abb. 5 dargestellt, angeordnet.

## 4.6 Datenverarbeitung

### 4.6.1 Berechnung der Resultate

Nach der Messung der optischen Dichte wurde mithilfe dieser Werte die Konzentration des IL-6 in der Plasmaprobe errechnet.

Um die Standardkurve aufzustellen, wurden die gemessenen Werte der Verdünnungsreihe mit bekannten Konzentrationen verwendet. Obwohl ursprünglich zwei Verdünnungsreihen angefertigt wurden, verwendete man für die Eichgerade nur eine der Reihen. In der zweiten Verdünnungsreihe hatte ein Probenpunkt nicht auf den Test angesprochen.

Die gemessenen optischen Dichten der Punkte wurden als logarithmische Werte zur Basis 10 in Excel eingetragen, um eine lineare Regression zu ermöglichen. Aufgrund der erhaltenen Funktionsgleichung konnten die unbekannt Konzentrationen der Plasmaproben ausgerechnet werden. Das erhaltene Ergebnis entsprach aber wiederum dem Logarithmus der Konzentration und musste daher zuerst zur Basis 10 exponenziert werden.

Da das Probenmaterial für den ELISA 5fach verdünnt wurde, musste auch dieser Wert wieder auf die ursprüngliche Konzentration aufgerechnet werden.

### 4.6.2 Konzentrationsänderung durch Blutauftrennung

Bei beiden Aufbereitungsmethoden wurde durch die Blutauftrennung in Plasma und Blutzellen das Volumen und damit auch die Konzentration des darin enthaltenen IL-6 verändert. Diese neue Konzentration konnte mithilfe der Volumenänderung ausgerechnet werden. Aufgrund von Literaturwerten wurde mit einem Wert von 45% Blutzellen, das heisst 55% Blutplasma gerechnet.

### 4.6.3 Verdünnung durch PBS

Durch die Blutfiltration mit der Membran unter Verwendung von PBS wurde das Plasma verdünnt und somit auch wieder in seiner IL-6 Konzentration verändert. Aufgrund des verwendeten PBS wurde der Verdünnungsfaktor evaluiert und so die Konzentrationen für das unverdünnte Blut ausgerechnet. Anhand dieses Verdünnungswertes konnte die richtige Konzentration berechnet werden.

Für die GF Membran wurden insgesamt 500µl PBS auf 200µl Blut verwendet, das heisst das Blut wurde 3.5x verdünnt. Bei der GX Membran wurden nur 300µl PBS auf die gleiche Menge Blut gebraucht, daraus ergab sich eine Verdünnung von 2.5x.

## 5 Resultate

### 5.1 Blutauftrennung im POCT

Die durch Recherche gefundenen Methoden zur alternativen Blutaufbereitung, sowie der zur Vereinfachung der Blutaufbereitung existierenden Möglichkeiten wurden im Folgenden zu einem kurzen Bericht zusammengestellt.

#### Serum Separating Tubes

Serum Separating Tubes enthalten ein spezielles Gel, das Blutzellen vom Serum trennt, sowie Teilchen, die das Blut schnell gerinnen lassen. Die Probe kann zentrifugiert werden, um das Serum für den Test zu reinigen.<sup>25</sup>

#### Microfluidic paper-based analytical device

Bei diesem Gerät wird das Plasma vom Blut durch Verklumpung der Blutzellen getrennt. Dabei befinden sich agglutinierende Proteine in der Mitte der Plasmatrennzezone, während die Reagenzien des kolorimetrischen Assays am Rand

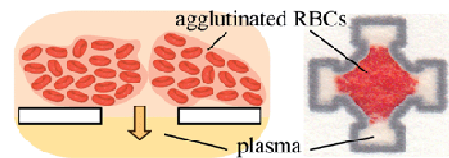


Abb. 6

sind. Die roten Blutzellen verklumpen in der Mitte und aufgrund der hydrophoben Barrieren gelangt nur das Plasma zum äusseren Rand der Testzone. Dort reagiert es mit den Reagenzien des kolorimetrischen Assays und verursacht einen Farbwechsel, der mit einem tragbaren Scanner untersucht und analysiert werden kann.<sup>26</sup>

#### Lab-in-a-Pen

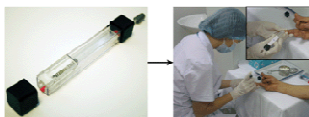


Abb. 7

Hier werden Probennahme und -verarbeitung mit kommerziell verfügbaren « paper-based » assays in einem stiftförmigen Gerät verbunden.<sup>27</sup>

**Field tested milliliter-scale blood filtration device for point-of-care applications.**

Das Gerät ist so designt, dass es direkt in andere Geräte integriert werden kann und das Plasma nach dem Filtrieren nicht noch einmal pipettiert werden muss. Nachdem das Blut durch die Spritzenöffnung hinzugefügt wurde, wird das Plasma durch die Vivid™ Plasma Separation GR Membrane vom Vollblut getrennt. Das Plasma fließt durch kleine Kanäle zur Extraktionsöffnung. Damit es schneller vorankommt wurden die Kanäle mit hydrophilem Material beschichtet. Es kann 0.8-1ml Vollblut verwendet werden.<sup>28</sup>

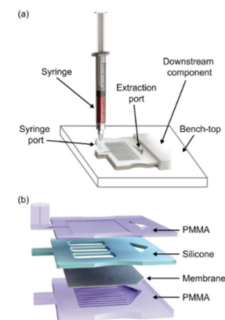


Abb. 8

**Low cost blood filtration element separating plasma from undiluted whole blood**

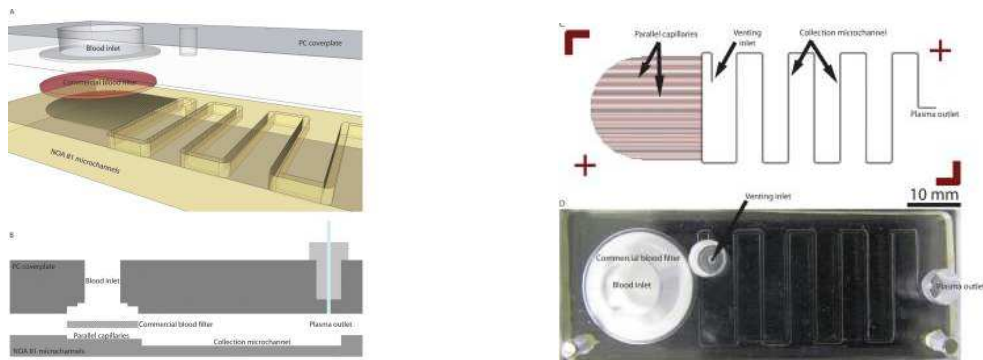


Abb. 9

Das Blut wird durch eine Plasma-Trennungsmembran vom Blut filtriert und fließt dann durch Mikrokanäle in den Mikrosammelkanal. Man kann das Gerät auch an eine externe Druckquelle anschliessen. Mit dem Gerät können 12µl Plasma von 100µl Blut in 7 Minuten gesammelt werden.<sup>29</sup>

**Membrane-based, sedimentation-assisted plasma separator for point-of-care applications**

Das Gerät besteht aus zwei Kammern. Nachdem das Blut in die linke Kammer eingefüllt wurde, sinken die Blutkörperchen ab und es befindet sich oben nur noch das Plasma. Dieses kann einerseits leichter durch die Membran in die linke Kammer treten, andererseits wird die Membran durch die vertikale Ausrichtung auch weniger verstopft. Das Plasma kann bei der Austrittsöffnung mit einer Pipette eingesammelt werden und einen negativen Druck bewirken, der das Plasma besser durch die Membran fließen lässt. Es kann innerhalb von 7 Minuten 275 ± 33.5µL Plasma aus 1.8mL Vollblut gewonnen werden.<sup>30</sup>

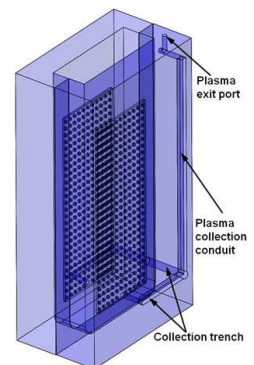


Abb. 10

### Stand-alone self-powered integrated microfluidic blood analysis system (SIMBAS)

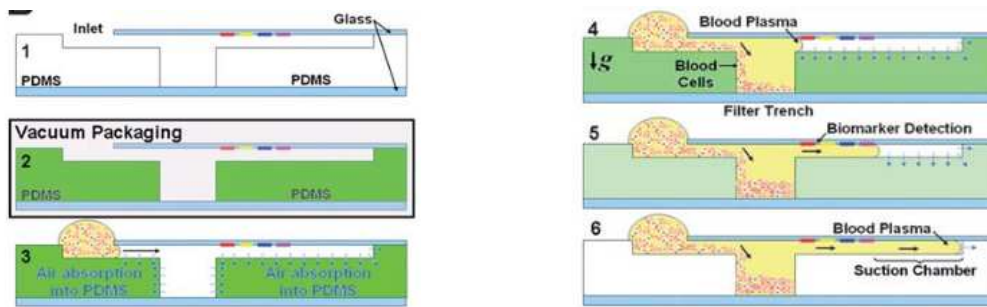


Abb. 11

Mit dem SIMBAS können ohne externe Hilfe  $5\mu\text{l}$ -Bluttropfen aufgetrennt und verschiedene Proteine mithilfe von Biomarkern detektiert werden. Durch kleine Gruben sinken die Blutkörperchen ab, während das Plasma oben durchfließen kann und so vom Vollblut getrennt wird.<sup>31</sup>

### Rapid Plasma Separation Device



Abb. 12

Das Vollblut wird auf eine Filtermatrix aufgetragen, welche die roten Blutkörperchen abtrennt. Das Plasma sammelt sich am Ende der Matrix, von der es durch Drücken des Geräts befreit werden kann. Der ganze Prozess braucht nur einige Minuten und es kann Plasma von bis zu mehreren Hundert Mikrolitern erhalten werden.<sup>32</sup>

### Magnetic Beads

Magnetic Beads sind kleine magnetische Kügelchen, an deren Oberfläche verschiedene Biomoleküle, zum Beispiel Antikörper oder DNA/RNA gebunden sind. Dadurch können sie spezifisch zum gewünschten Objekt, wie Antigene oder bestimmte DNA/RNA-Moleküle, binden. Durch Magnetismus werden sie vom Rest der Flüssigkeit isoliert.<sup>33</sup> Es sind verschiedene Magnetic Beads, beispielsweise von Perkin Elmer<sup>34</sup> oder Lifetechnologies<sup>35</sup> erhältlich.

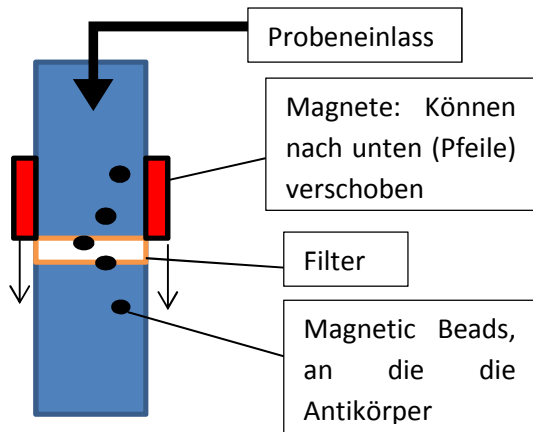


Abb. 13

Für die Anwendung von Magnetic Beads zur Blut-auftrennung (Abb. 13) würde ein Röhrenchen aus zwei oder eventuell sogar drei verschiedenen Abschnitten bestehen. Die Blutauftrennung würde wie folgt ablaufen: Das Blut wird direkt mit dem Gerät entnommen und fließt in die erste Kammer, in der sich bereits die Magnete befinden. Eventuell werden diese in eine neue Kammer bewegt, in der sich eine Flüssigkeit befindet, die für das Anbinden der zu detektierenden Substanzen nötig ist. Danach ist eine

Membran, ein Filter oder etwas anderes eingebaut, welches die Trennung der Antikörper vom restlichen Blut erlaubt. Der Magnet ist beweglich und lässt sich nun leicht auf die richtige Höhe schieben. Er befindet sich anfangs weiter oben, damit die Magnete nicht vorher schon durch den Filter treten. In der nächsten Kammer befindet sich eine neue Flüssigkeit, in der die Antikörper bzw. -gene gelöst werden. Diese können nun direkt weiterverwendet werden. Die Magnete werden dabei dem eigentlichen Test nicht im Wege stehen, da sie nun vom Magnet zurückgehalten werden.

## Membranen

Es sind auf dem Markt Membranen verfügbar, welche wie ein Filter das Plasma vom Vollblut trennen können. Es können beim Passieren der Membran die Blutzellen zurückgehalten werden und nur das Plasma tritt durch die Membran.

Im Internet waren zwei verschiedene Membranen erhältlich, von denen die Vivid™ Plasma Separation Membrane in mehreren der gelesenen Publikationen verwendet wurde. Die Membran ist asymmetrisch aufgebaut, um die Blutkörperchen in grösseren Poren zu fangen und somit die Gerinnung und die damit verbundene Verstopfung zu verhindern.<sup>17</sup>

BLOOD SEPARATION MEMBRANES\* von iPOC trennen das Plasma auch aufgrund der verschiedenen Grössen von Plasma und Blutkörperchen.<sup>36</sup>

In einer Anwendung würde die Membran als Filter eingefügt werden. Der Versuch wäre so aufgebaut, dass das Plasma aufgrund der Gravitation durch den Filter fließen kann. Durch das vertikale Einfügen der Membran wird verhindert, dass die Membran mit Blutteilchen zuklebt<sup>30</sup>. Eventuell könnte ein Druck von Nutzen sein, welche das Plasma dazu zwingt, durch die Membran zu treten.

### Beschleunigung der Gerinnung

Mithilfe von sogenannten Clot Activator Tubes kann vor dem Zentrifugieren die Gerinnung beschleunigt werden. Trotzdem liegt die angegebene Gerinnungszeit immer noch bei bis zu 30min.

- Clot Activator Blood Collection Tubes (syrvet): 15-30 Minuten Gerinnungszeit<sup>37</sup>
- Gel and Clot activator (demorphorius): weniger oder bis zu 30 Minuten Gerinnungszeit<sup>38</sup>

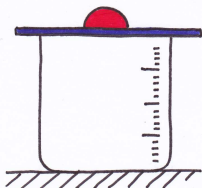
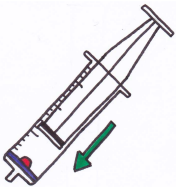
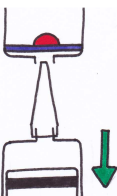

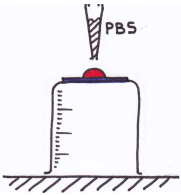
Diese eignen sich daher aus zeitlichen Gründen nicht für die Verwendung in einem POCT.

BD hingegen bietet BD Vacutainer® Rapid Serum Tube (RST) an, welche die Gerinnungszeit von Blut auf 5 Minuten reduzieren.<sup>39</sup> Die Tubes wurden in einer Studie getestet und ergaben einen Median der Gerinnungszeit von 2.05 Minuten.<sup>40</sup>

### Verhindern der Gerinnung (Antikoagulanzen)

Zur Verhinderung von Gerinnung gibt es verschiedene Antikoagulanzen, darunter EDTA, Citrate und Heparin. Zu den einzelnen Antikoagulanzen wurden nicht gross Recherchen durchgeführt und es kann darum nicht gesagt werden, ob sich einige besser eignen als andere.<sup>41,42</sup>

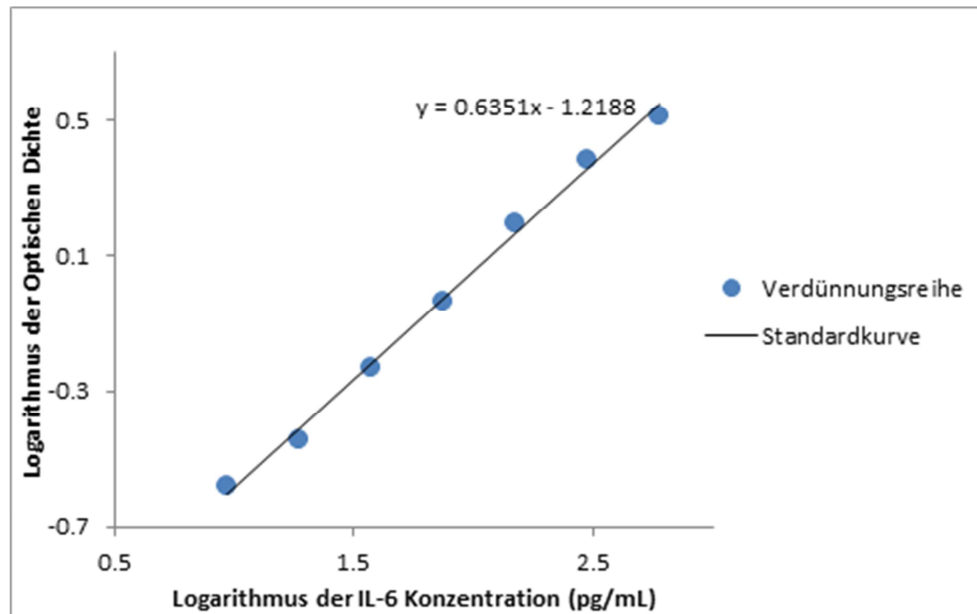
### 5.2 Anwendung der Vivid™ Plasma Separation Membrane

Material	Versuchsordnung	Skizze	Resultat	Probleme
Becherglas	Membran freiliegend auf einem Becherglas		Keine Flüssigkeit	Kein direkter Kontakt zu einer Oberfläche.
Spritze	Positiver Druck durch Spritzenkolben. Membran am Boden der ersten Spritze liegend.		Rote Flüssigkeit	Die Ränder der Membran können nicht abgedichtet werden. Vielleicht zu starker Druck.
Spritze und Pipettenaufsatz	Membran wieder auf Boden der Spritze. Negativer Druck durch zweite Spritze		Rote Flüssigkeit oder gar nichts.	Ränder können nicht abgedichtet werden. Falsches Untergrundmaterial.
Petrischale und PBS	PBS als Kontakt- und Waschflüssigkeit. Membran auf Petrischale liegend.		Rötliche Flüssigkeit	Falsche Materialbeschaffenheit der Petrischale.
Becherglas und PBS	PBS als Kontakt- und Waschflüssigkeit. Membran auf Rücken des Becherglases liegend.		Plasma	-

**Tabelle 2 Anwendung der Vivid™ Plasma Separation Membrane** Verlauf der verschiedenen Stufen und Probleme der Membrananwendung, bis schliesslich ein erfolgsversprechender Versuchsaufbau gefunden wurde. Die Grössenverhältnisse in den Skizzen stimmen nicht mit der Realität überein. Die Membran ist immer blau, das Blut rot und die Wirkungsrichtung des angebrachten Druckes grün gezeichnet.



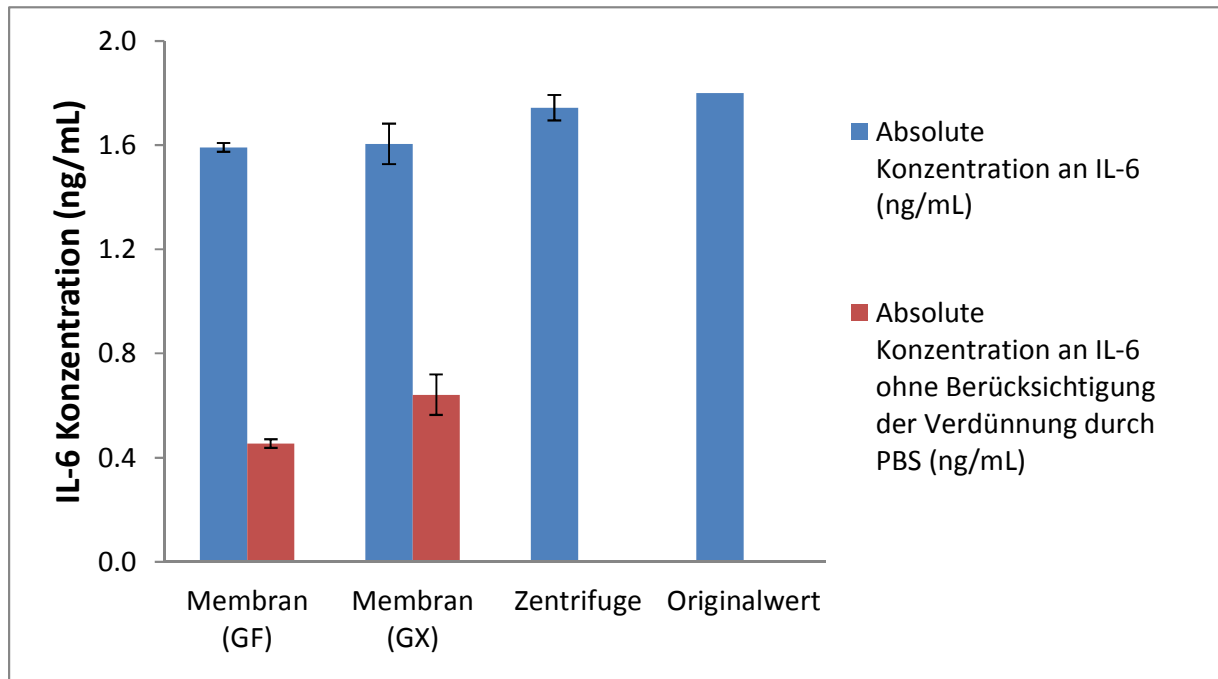
### 5.3 Standardkurve



**Grafik 1 Standardkurve der IL-6 Konzentration im Verhältnis zur optischen Dichte** Die Messpunkte basieren auf den Logarithmen der folgenden Verdünnungen (in pg/mL): 600, 300, 150, 75, 37,5, 18,8, 9,38. Die Messungen wurden bei einer Wellenlänge von 450nm durchgeführt. Als Korrektur wurde die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 540 nm abgezogen. Das Bestimmtheitsmass beträgt  $R^2 = 0,9954$ .

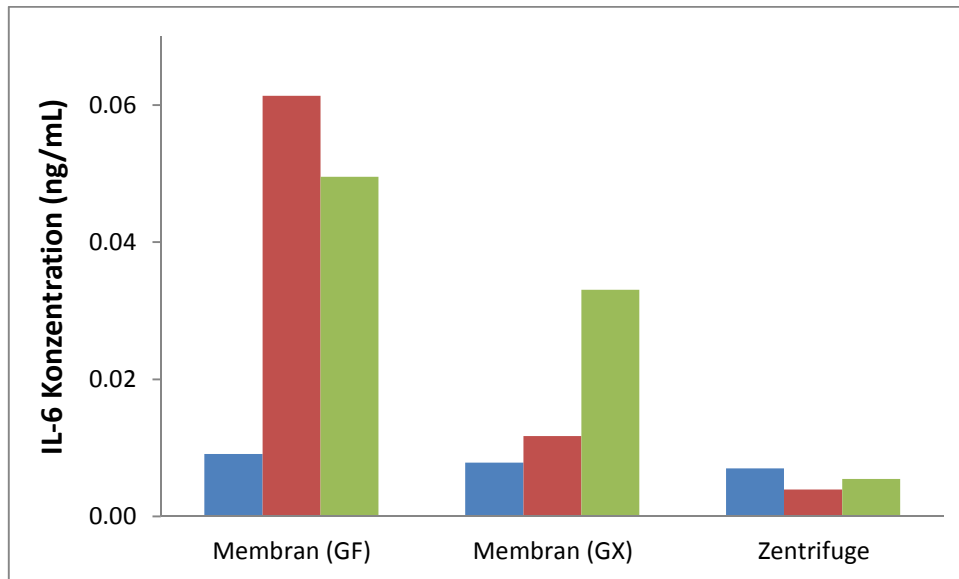
Grafik 1 zeigt die Standardkurve, welche aufgrund der Messwerte der Verdünnungsreihe berechnet wurde. Auf der x-Achse befindet sich der Logarithmus der IL-6-Konzentration im Blut und auf der y-Achse der Logarithmus der optischen Dichte.

## 5.4 Vergleich der Verfahren zur Blutaufbereitung



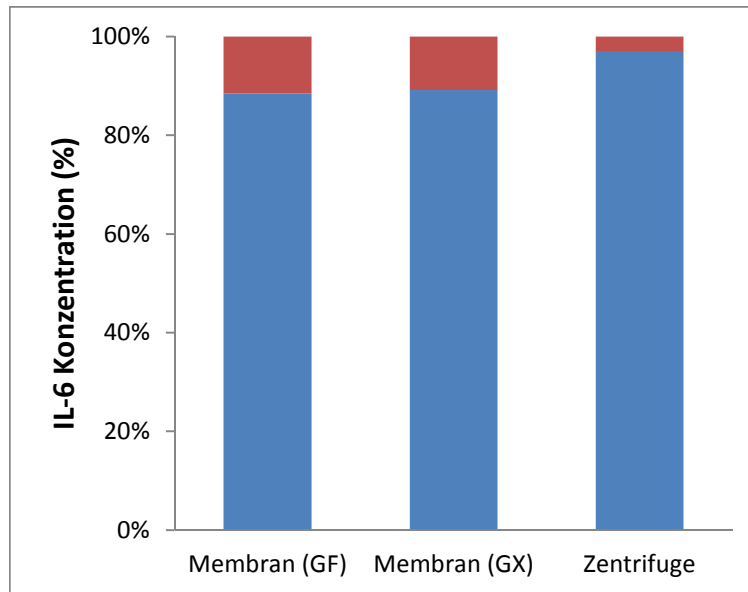
**Grafik 2 Die verschiedenen IL-6 Konzentrationen im Vergleich.** Verwendung des Blutes mit erhöhter IL-6 Konzentration. Die ursprünglich hinzugefügte Konzentration, der Originalwert, betrug 1.8 ng/mL. Es ergaben sich folgende Konzentrationen nach der Blutaufbereitung (in ng/mL): 1.59 (GF-Membran), 0.45 (GF-Membran verdünnt), 1.60 (GX-Membran), 0.64 (GX-Membran verdünnt), 1.74 (Zentrifuge).

Grafik 2 zeigt die IL-6 Konzentrationen (in ng/mL) der verschiedenen Aufbereitungsmethoden im Vergleich. Da durch den Gebrauch der Membran das Plasma mit PBS verdünnt wurde, ist in Rot die Konzentration an IL-6 ohne Berücksichtigung dieser Verdünnung als Vergleich zur hochgerechneten Konzentration in Blau dargestellt. Die Werte sind auf zwei Stellen nach dem Komma gerundet. Die IL-6-Konzentration ist bei beiden Membranen etwa gleich gross, die des zentrifugierten Plasmas etwas höher.



**Grafik 3 Vergleich der natürlichen Konzentrationen von IL-6 im Blut** Pro Aufbereitungsmethode wurden jeweils drei Messungen mit den gleichen Proben durchgeführt. Es ergaben sich folgende Werte, wobei zuerst der blaue, rote und dann der grüne Wert in ng/mL angegeben ist: 0.009, 0.061, 0.050 (GF-Membran), 0.008, 0.012, 0.033 (GX-Membran), 0.007, 0.004, 0.005 (Zentrifuge).

Grafik 3 zeigt die natürliche Konzentration des IL-6 im menschlichen Blut, das heisst die gemessene Konzentration, wenn kein zusätzliches IL-6 zum Vollblut hinzugefügt wurde. Ursprünglich waren die verschiedenen Konzentrationen auch mit dem Durchschnitt ausgerechnet worden, die einzelnen Werte unterschieden sich aber so drastisch, dass sie wie in der Grafik zu sehen dargestellt wurden. Weil die natürliche IL-6 Konzentration vorher nicht bekannt war, kann kein Originalwert angegeben werden. Die drei Werte pro Aufbereitungsmöglichkeiten stammen alle von der gleichen Blutprobe und sollten darum die gleiche Konzentration haben. Trotzdem unterscheiden sie sich relativ zueinander gesehen aber stark. Die Werte sind im Allgemeinen sehr tief, das heisst sie gehen nicht über 0.07ng/mL hinaus, der absolute Unterschied von fast 0.015 ng/mL (GF-Membran) ist verglichen mit dem maximalen Unterschied von bis zu 0.1 ng/mL (Zentrifuge) des mit IL-6 versetzten Blutes sogar kleiner.



**Grafik 4 Relativer Anteil des IL-6 im Vergleich** Verwendung des mit zusätzlichem IL-6 versetzten Blutes. 100% entspricht der ursprünglich dem Blut zugefügten Konzentration an IL-6 von 1.8 ng/mL. Der relative Anteil des IL-6 beträgt folgenden Werte (in %): 88.4 (GF-Membran), 89.1 (GX-Membran), 96.9 (Zentrifuge).

Praktisch die gleichen Werte wie auch schon in der oben gezeigten Grafik 2 werden in Grafik 4 noch einmal auf andere Weise dargestellt. Dabei werden die einzelnen Konzentrationen an IL-6 in Abhängigkeit des Originalwertes gezeigt. Der blaue Teil jedes Balkens steht für den Anteil des erhaltenen IL-6, der rote Abschnitt steht für das verlorene IL-6. Wie in Grafik 2 sind auch hier die Konzentrationen des filtrierten Plasmas bei beiden Membranen etwa gleich gross, während beim zentrifugierten Plasma einen kleineren Verlust anzutreffen ist.

## 6 Diskussion

### 6.1 Konzepte zur Blutaufbereitung

Obwohl Serum und Plasma für einen möglichen diagnostischen Test verwendet werden kann, eignet sich das Serum weniger, da dieses während längerer Zeit gerinnen muss. Die Gerinnung kann zwar beschleunigt werden, es würde aber in der Anwendung möglicherweise zu weiteren Schwierigkeiten, wie zum Beispiel Verstopfung der Membranporen führen.

Aufgrund der Recherchen ergaben sich drei verschiedene Möglichkeiten zur alternativen Blutaufbereitung: 1. Auftrennung durch Sedimentierung, 2. Isolation der Antikörper bzw. Antigene, 3. Filtrieren des Blutes mithilfe einer Membran.

Wenn Plasma durch Sedimentierung von Blutzellen separiert wird, erfolgt die Trennung zwar effektiv und ohne äusserliche Hilfe, es eignet sich aber bei SIMBAS trotzdem nur für kleinere Blutmengen von  $5\mu\text{l}$ <sup>31</sup>. Für das von BioRevels vorgesehene POCT sollten schlussendlich etwa  $25\mu\text{l}$  Blut gebraucht werden können. Die Flüssigkeit im SIMBAS wird innerhalb des Gerätes durch ein Vakuum getrieben, das heisst es wird bei der Produktion im Gerät selbst ein Vakuum erzeugt. Dieses befördert das Blut in den Kanälen durch den Druckunterschied. Einerseits ist es nicht einfach so möglich, ein solches oder vergleichbares Gerät herzustellen, andererseits würde sich die Anwendung mit einem etwas komplizierteren Nachweisverfahren für Antikörper, wie auch die Verwendung eines grösseren Blutvolumens mit den gleichen Resultaten als schwierig bis unmöglich erweisen.

Eine der grundlegenden Anforderungen eines wie zu Beginn definierten POCT, ist eine einfache Anwendung. Wenn möglich sollte ein Gerät auch von einem Laien oder einer Person mit nur wenig Laborerfahrung bedient werden können. Magnetic Beads sind zwar spezifisch und bieten einen sinnvollen Ansatz, um gewisse Körper in einer Flüssigkeit gezielt zu isolieren oder nachzuweisen. Trotzdem erschweren sie den einfachen Aufbau eines Gerätes in mehreren Punkten stark. Will man das gewünschte Zielobjekt isolieren, müssen die in der Probeflüssigkeit gelösten magnetischen Kügelchen zuerst von derselben getrennt und dann erneut in einer anderen Flüssigkeit gelöst werden. Nachdem die Kügelchen die gewünschten Körper wieder freigegeben haben, müssen zudem die Magnetic Beads durch Magnetismus von der Lösung entfernt werden.<sup>33</sup> Normalerweise werden diese Schritte durch mehrmaliges Pipettieren vollzogen, in einem POC-Gerät müsste das gleiche auf andere und einfachere Weise im Gerät selbst geschehen. Das Gerät müsste so aufgebaut sein, dass entweder zuerst eine Flüssigkeit abgesogen und dann die andere hinzugefügt werden kann, oder dass eine Trennung dieser beiden Flüssigkeiten durch ein Material erfolgt, welches nur die magnetischen Kügelchen passieren lässt. Zusätzlich stellt sich die Frage, ob die Abtrennung mit zum Beispiel einer Membran überhaupt möglich wäre. Die Dynabeads® von Lifetechnologies besitzen

einen minimalen Durchmesser von  $1\mu\text{m}$ <sup>43</sup>, bei PerkinElmer sind sie mit einer Grösse von  $0.5\text{-}1\mu\text{m}$  etwas kleiner<sup>34</sup>. Die Kleinsten der zellulären Blutbestandteile, die Blutplättchen, sind aber auch nur  $1\text{-}4\mu\text{m}$  gross<sup>44</sup>. Obwohl nichts zur Porengrösse in einer Membran gefunden werden konnte, wird aus den Zahlen ersichtlich, dass die Magnetic Beads trotz kleiner Grösse im Vergleich zu den Blutplättchen zu gross sind. Infolgedessen würden entweder beim Filtrieren die Blutplättchen mitgerissen werden und so zu Verunreinigungen führen oder die Magnetic Beads überhaupt erst daran gehindert werden, durch die Membran zu treten, da sie selbst zu gross sind.

Die Blutfiltration mithilfe einer Membran zieht auch Schwierigkeiten nach sich. Der Weitertransport des Plasmas könnte eventuell Schwierigkeiten bereiten. Als Lösungsansatz würde sich sicher ein Transport basierend auf Kapillarkräften anbieten. Für einen der Blutauftrennung folgenden, diagnostischen Test, stellt sich die Frage, ob noch andere Bestandteile als nur Blutzellen zurückgehalten werden. Dazu können beispielsweise Antikörper oder –gene gehören. Die grundlegende Anwendung ist aber in Bezug auf die Verwendung in einem POCT mit weniger Schwierigkeiten verbunden. Einerseits liesse sich eine Membran relativ einfach in ein Gerät einbauen, andererseits würde es die Blutzellen auch gleich räumlich trennen. Das heisst das Plasma könnte sofort weiterverwendet werden, ohne dass es in Gefahr läuft, sich erneut mit den Blutzellen zu vermischen.

In Anbetracht der oben aufgeführten Vor- und Nachteile, wie auch den Anforderungen eines POCT eignet sich eine Membran zur Blutaufbereitung am besten. Zusätzlich handelt es sich auch um einen, innerhalb des kurzen Zeitrahmens einer Maturaarbeit realisierbaren, Ansatz.

Die Aufbereitung des Blutes zu Plasma ist der erste und wichtigste labortechnische Schritt. Trotzdem spielen auch noch andere Faktoren eine Rolle. Blut gerinnt schon nach kurzer Zeit an der Luft. Zur Verwendung von Vollblut, beziehungsweise der Benutzung von Plasma im POCT müsste der Blutprobe deshalb ein Antikoagulans hinzugefügt werden. Das verwendete Blut wurde bereits mit EDTA versetzt geliefert. Als Alternativen bieten sich zum Beispiel Citrate oder Heparin an<sup>45</sup>. Die Beschleunigung der Gerinnung ist bei der Verwendung einer Membran nicht sinnvoll, da diese durch die Gerinnung verstopft und damit untauglich gemacht werden könnte.

## 6.2 Anwendung der Vivid™ Plasma Separation Membrane

Bis zu einer brauchbaren Anwendung der Vivid™ Plasma Separation Membrane wurden verschiedene Möglichkeiten ausprobiert. In Tabelle 2 (Seite 21) sind die unterschiedlichen Entwicklungsstufen der Membrananwendung anhand einer Skizze und einem kurzen Beschrieb erklärt. Im Folgenden werden auf die verschiedenen Versuche genauer eingegangen. Für ein positives Ergebnis der Anwendung spielten drei Punkte eine wichtige Rolle: 1. Materialbeschaffenheit des Untergrundes, 2. Abdichtung der Ränder, 3. Verwendung eines Kontakt- und Waschpuffers.

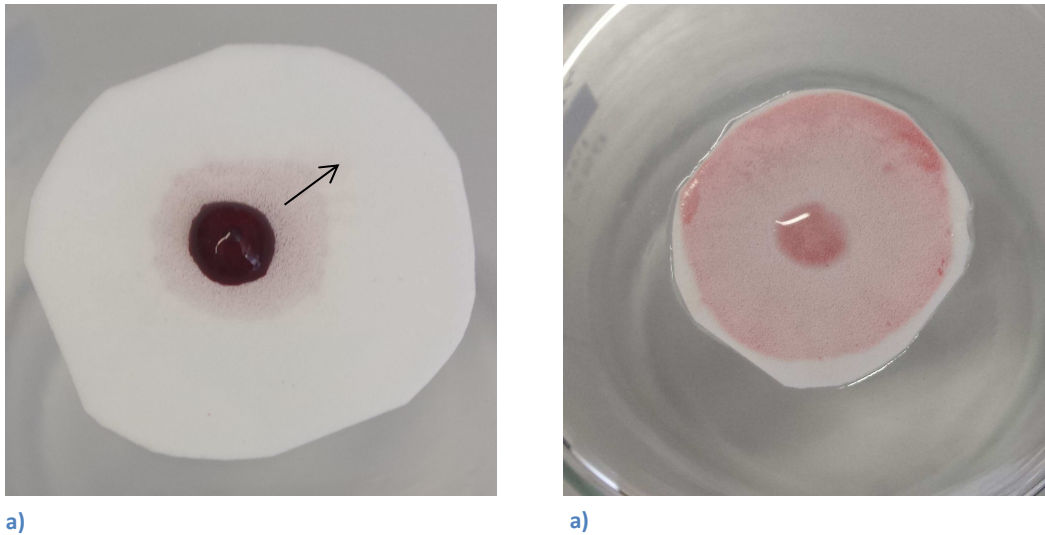
In einem ersten Anwendungsversuch wurde die Membran frei in der Luft liegend auf ein Becherglas gestellt. Wie zu erwarten war, zog die Membran das Blut zwar ein, gab aber kein Plasma mehr frei. Es brauchte ein Untergrundmaterial. Trotzdem konnte nicht irgendeine Substanz verwendet werden. Beim Einsatz einer Petrischale oder einer Spritze aus Kunststoff konnte das Plasma nicht freiwillig aus der Membran befördert werden, bei der Verwendung einer Glasoberfläche aber schon. Bechergläser, wie in diesem Versuch verwendet, bestehen grösstenteils aus Borosilikatglas. Das heisst sie enthalten ca. 80% Siliciumdioxid und andere Oxide.<sup>46</sup> Im Gegensatz zu den langen Kohlenwasserstoffketten eines Kunststoffes sind diese Verbindungen viel polarer und damit hydrophil, das heisst sie haben eine starke Wechselwirkung mit Wasser. Da Plasma zum grössten Teil aus Wasser besteht, zieht die Glasoberfläche das Plasma aus der Membran zu sich.

Die Verwendung einer Spritze als Gefäss schlug aber nicht nur aufgrund der Materialeigenschaften fehl. Die Idee hinter diesem Versuchsaufbau war die Verwendung eines positiven bzw. negativen Druckes. Leider konnten die Ränder der Membran nicht abgedichtet werden und die Blutzellen gelangten so über den Rand auf die andere Seite der Membran. Durch Versiegelung der Membranränder hätte die Kontaminierung der so gewonnenen Flüssigkeit verhindert werden können. Ob ein positiver oder ein negativer Druck ausgeübt wurde, spielte dabei keine Rolle.

Auch wenn das Becherglas aus dem richtigen, das heisst einem hydrophilen Material bestand, war eine Wasch- bzw. Kontaktflüssigkeit nötig. Mit PBS als Kontakthersteller können kapillarartige Kräfte zwischen der Oberfläche und der Membran hergestellt werden und so dem Plasma aus der Membran helfen. Auch die Verwendung von PBS als Waschpuffer, im englischen „chase buffer“ genannt, ist wichtig. Wie der Name schon sagt, wäscht er das Plasma wieder aus der Membran heraus. Es wird vermutet, dass er zuerst den freigebliebenen Platz in der Membran einnimmt, dann aber auch das Plasma verdrängt.

In Abb. 14 ist die Plasmaauftrennung mithilfe der Membran zu sehen. Abb. 14 a) zeigt, wie das Blut zuerst innerhalb der Membran aufgetrennt wird. Das Plasma fliesst in die Membran und kann sich überall verteilen, während die Blutkörperchen auf der Oberfläche hängen bleiben. So könnte eine

solche Membran auch für Teststreifen verwendet werden, bei denen nur das Plasma bis zur Testzone gelangt und z.B. eine farbliche Reaktion hervorruft, ähnlich dem Microfluidic Paper-based Analytical Device (Seite 16). Die Fließrichtung des Plasmas geht, analog zum gezeichneten Pfeil, in alle Richtungen vom Auftragungsort des Blutes weg.



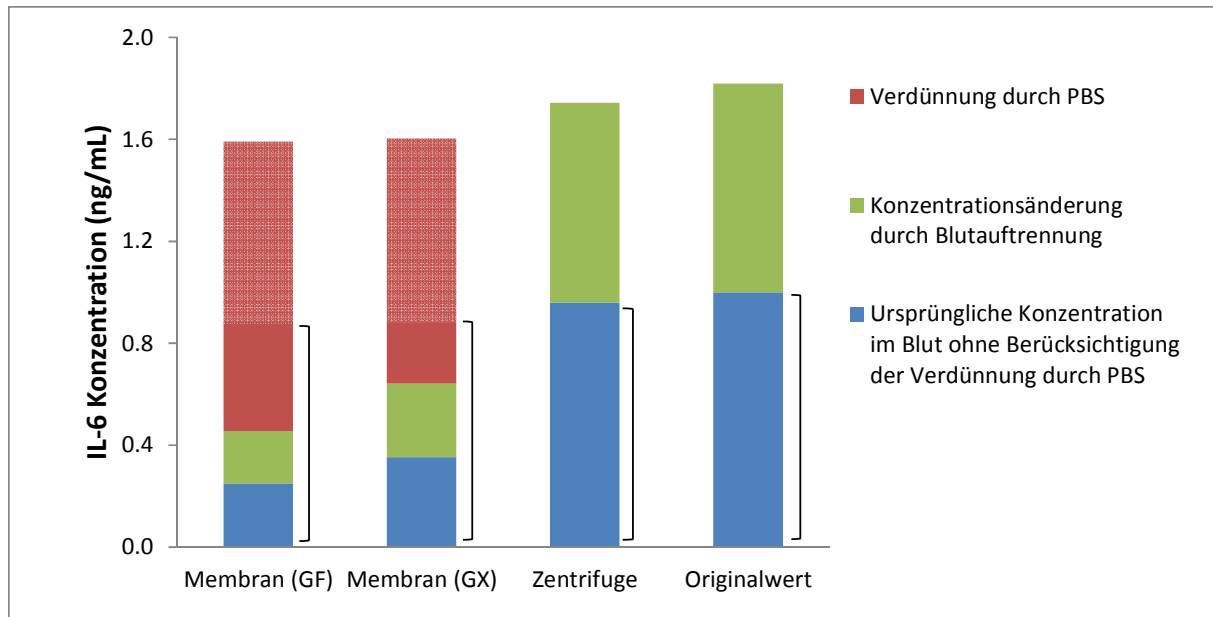
**Abb. 14 Blutaufbereitung mithilfe einer Membran** In a) ist das Anbringen des Blutes auf einer Membran dargestellt. Der Pfeil zeigt die Fließrichtung des Plasmas innerhalb der Membran. b) Nach dem Auftragen des PBS sammelt sich unter der Membran Plasma an (schimmernde Stellen neben dem Membranrand)

In Abb. 14b) ist das unter der Membran angesammelte Plasma anhand der glänzenden Stellen neben dem Membranrand sichtbar. Da sich schon viel Plasma gebildet hat, wird das PBS erst weiter einziehen, wenn das Plasma unter der Membran entfernt wurde. Falls das Plasma kontinuierlich abgesogen und die Ränder abgedichtet werden würden, wäre die Kontaminierung des Plasmas durch Blutzellen sicher kleiner.

### 6.3 Vergleich der Verfahren zur Blutaufbereitung

Mithilfe der Membran wie auch der Zentrifuge konnten Plasmavolumina im Bereich von 60-85 $\mu$ l bei einer ursprünglichen Blutmenge von 200 $\mu$ l gewonnen werden. Die eigentliche Menge an filtriertem Plasma ist durch die Verdünnung mit PBS um den Faktor 2.5 (GX-Membran) bzw. 3.5 (GF-Membran) etwas kleiner. Auch beim Zentrifugieren ging Volumen verloren, da die gesamte Entfernung vom Plasma durch Pipettieren des Überstandes ohne Kontaminierung mit Blutzellen nicht möglich war. Um vergleichbare Plasmavolumina zu erhalten, müsste die Blutaufbereitung für ein statistisch aussagekräftiges Resultat mehrmals durchgeführt werden. Zudem müsste der Teil an Plasma bzw. an PBS bekannt sein, um die eigentliche Menge an Plasma in der erhaltenen Flüssigkeit ermitteln zu können.





**Grafik 5 Absolute Konzentrationsänderungen der verschiedenen Methoden im Vergleich.** Verwendung des Blutes mit erhöhter IL-6 Konzentration. Die Konzentration von IL-6 im verwendeten Blut setzt sich aus zwei bis drei Werten zusammen. Die ursprünglich hinzugefügte Konzentration im Blut ist durch den schwarzen Bogen gekennzeichnet und beträgt (in ng/mL): 0.88 (GF- und GX-Membran), 0.78 (Zentrifuge), 1 (Originalwert). Der gemessene Wert setzt sich aus dem grünen und blauen Balken zusammen (in ng/mL): 0.45 (GF-Membran), 0.64 (GX-Membran), 1.74 (Zentrifuge). Anhand von ihm wurde die ursprüngliche Konzentration im Blut ohne Berücksichtigung der Verdünnung durch PBS berechnet (blau). Es ergaben sich folgende Konzentrationen nach der Blutauftrennung (in ng/mL): 1.59 (GF-Membran), 1.60 (GX-Membran), 1.74 (Zentrifuge), 1.81 (Originalwert).

Während der Blutaufbereitung veränderte sich die IL-6-Konzentration unvorhergesehen auf zwei Wege. Einerseits wandelte sich das Volumen durch die Abtrennung der Blutzellen, andererseits wurde das Plasma unter der Verwendung von PBS verdünnt.

Ursprünglich wurde die IL-6-Konzentration im Blut auf bekannte 1ng/mL erhöht, trotzdem lag im zentrifugierten Plasma der GX-Membran eine Konzentration von 1.74ng/mL vor. Denn sobald das Blut zentrifugiert bzw. durch die Membran gefiltert wird, bleibt die Menge an Antikörpern im Plasma gleich, während das Volumen durch die Abtrennung der Blutzellen kleiner wird. Es kommt zu einer Konzentrationsänderung. In Grafik 5 ist die Konzentrationsänderung durch die Blutaufbereitung dargestellt. Da sich die gemessene Konzentration an IL-6 aus dem grünen und blauen Balken ergibt, lässt sich leicht erkennen, dass die ursprüngliche nur etwa halb so gross wie die gemessene IL-6-Konzentration im Blut ist. Man kann diese durch die Blutaufbereitung hervorgerufene Konzentrationsabweichung relativ leicht berechnen, vorausgesetzt die Volumenänderung ist bekannt. Die Konzentration der Blutzellen im Vollblut ist von Geschlecht, Alter und Person abhängig. Weil diese Konzentration im Spenderblut nicht bekannt war, wurde aufgrund von Literaturquellen ein Durchschnittswert bestimmt. Es wurden nach Angaben zum Anteil der Blutzellen, Hämatokrit<sup>47</sup> genannt, im menschlichen Blut gesucht. Er wird auch für diagnostische Zwecke bestimmt und ist somit leichter zu finden. Es wurde mit einem Anteil von 45% Blutzellen, d.h. 55% Plasma gerechnet. Zum Vergleich sind untenstehend einige Literaturwerte angegeben.

Wie in der Tabelle ersichtlich, kann der Hämatokrit stark variieren. Um ein genaues Resultat zu erhalten, müsste der Hämatokrit des Blutspenders zum Zeitpunkt der Blutspende bekannt sein. Trotz dieser bedingten Verfälschung kann der hergeleitete Wert einer IL-6-Konzentration von ursprünglichen 1.8ng/mL im Blut verwendet werden, um Aussagen zu machen.

<b>Anteil Blutzellen [%]</b>	Mensch	Männer	Frauen
<b>Blutspende SRK<sup>48</sup></b>	45.01		
<b>DocCheck Flexikon<sup>49</sup></b>		43-49	37-45
<b>Unser Blut<sup>50</sup></b>		42-50	37-45
<b>Pharmazeutische Zeitung<sup>47</sup></b>		43-53	37-47

**Tabelle 3 Anteil der zellulären Bestandteile im menschlichen Blut**

Es wurde bereits früher mehrmals erwähnt, dass für die Plasmaherstellung mit einer Membran PBS zur Hilfe genommen werden musste. Daraus ergibt sich eine Verdünnung des Plasmas um einen gewissen Faktor. In Grafik 2 (Seite 23) werden die verschiedenen IL-6 Konzentrationen (ng/mL) für die verschiedenen Membranen und das zentrifugierte Blut, sowie der Originalwert angegeben. Die sehr tiefen Werte für das gefilterte Blut (rote Balken) erklären sich durch die starke Verdünnung mit PBS. Auch in Grafik 5 ist diese Verdünnung zu sehen. Obwohl die IL-6 Konzentration durch Abtrennung der Blutzellen höher sein sollte, liegt dieser Wert unter der Konzentration, welche ursprünglich dem Blut hinzugefügt wurde. Durch das PBS wird eine so starke Verdünnung hervorgerufen, dass diese erhöhte Konzentration wieder aufgelöst wird. Um den richtigen Wert zu erhalten, muss daher mithilfe des Verdünnungsfaktors die ursprüngliche Konzentration ausgerechnet werden. Obwohl sich dieser Faktor ziemlich genau ausrechnen liess, kann eine gewisse Ungenauigkeit des Resultates nicht ausgeschlossen werden. In Anbetracht der aber ziemlich gleich grossen Werte der GF- und GX-Membran (1.59ng/mL und 1.60ng/mL), kann angenommen werden, dass diese Werte dem originalen Wert ziemlich nahe sind.

Neben den bereits gewollt mit IL-6 versetzten Blutproben wurden auch Negativ-Kontrollen mit unverändertem Blut getestet. Diese sollten sicherstellen, dass nicht unerwartet hohe Konzentrationen an IL-6 das Endresultat der Proben verfälschen. Die Messwerte allein in einer Grafik dargestellt schienen sich, wie in Grafik 3 (Seite 24) zu sehen, stark zu unterscheiden. Es wurden pro Probe immer drei Messungen durchgeführt und wie in der Grafik erkenntlich, unterscheiden sich diese Konzentrationen auch bei der gleichen Probe. Diese Differenzen können nicht mit der Aufbereitungsmethode zusammenhängen, da immer drei Messungen mit dem gleichen Probematerial durchgeführt wurden. Die absolut stark unterschiedlichen Werte hängen in erster

Linie mit den kleinen Konzentrationen im Blut zusammen. Die kleinste Konzentration der Standardkurve von 9.38pg/mL hat eine optische Dichte von 0.265 und ist mehr als doppelt so gross wie der höchste der drei gemessenen optischen Dichten von 0.134 der GF-Membran. Dieser ELISA-Kit wurde für höhere Konzentrationen konzipiert und ist darum in so kleinen Bereichen nicht mehr anwendungsfähig. Falls für spätere Anwendungen gleich kleine Konzentrationen gemessen werden würden, müsste ein anderer Test gebraucht oder der hier benutzte für die Verwendung angepasst werden. Die stark variierenden Werte werden zusätzlich durch Verwendung einer Regressionskurve verstärkt, da die gemessenen Werte ausserhalb der eigentlichen Standardkurve liegen. Obwohl die Kurve extrapoliert werden kann, ist es mit einer verstärkten Ungenauigkeit verbunden. Schaut man die Unterschiede zwischen den einzelnen Messwerten in Relation zu den Differenzen der mit zusätzlichem IL-6 versetzten Blutproben an, liegen diese im gleichen Bereich. Der absolute Unterschied von fast 0.015 ng/mL (GF-Membran) ist verglichen mit dem maximalen Unterschied von bis zu 0.1 ng/mL (Zentrifuge) des mit IL-6 versetzten Blutes sogar kleiner.

In Grafik 4 (Seite 25) wird der relative Anteil der erhaltenen Konzentrationen im Verhältnis zur ursprünglichen Konzentration von 1.8ng/mL gezeigt. Die beiden Werte für die GF- und GX- Membran sind praktisch gleich, das heisst ihre absoluten Werte unterscheiden sich um 0.01ng/mL und werden darum im Folgenden gleichwertig behandelt. Daraus ergibt sich, dass der Membrantyp für das gleiche Ergebnis keine grosse Rolle zu spielen scheint. Um ein statistisch aussagekräftigeres Resultat zu erhalten, müsste man das Verfahren allerdings noch mehrere Male testen. Da der Standardfehler beim filtrierten Plasma beider Membranen trotz kleiner Probenanzahl gering ist, kann von einer gewissen Stabilität des Verhältnisses vom verlorenen zum ursprünglich vorhandenen IL-6 ausgegangen werden. Bleibt dieses Verhältnis auch nach einer grossen Anzahl Versuchsdurchführungen stabil, kann experimentell ein Umrechnungsfaktors hergeleitet werden und so eine zuverlässige Aussage über die IL-6-Konzentration ermöglichen. Es würde also keine Rolle spielen, dass die Konzentration an IL-6 durch die Verwendung einer Membran sinkt. Der prozentuale Anteil an erhaltenem IL-6 ist beim filtrierten Blut zwar kleiner, es handelt sich aber mit gemessenen 88.4% (FS:GF) und 89.1% (FS:GX) im Vergleich zu den 96.9% (CS) trotzdem um ein gutes Resultat. Einen Wert zur normal auftretenden Konzentrationsänderung eines Antikörpers durch Blutaufbereitung konnte nicht gefunden werden. Da aber das Blut auch auf klassische Weise, das heisst durch Zentrifugieren aufbereitet wurde, sollte es sich bei diesem Wert um ein relativ gutes Resultat handeln. Das filtrierte Blut verlor zwar etwas mehr IL-6, liegt aber trotzdem noch in vergleichbarer Nähe zum Ergebnis des zentrifugierten Blutes.

Anfänglich sollte auch der zeitliche Aspekt der verschiedenen Methoden sowie der beiden Membranen getestet werden. Es wurde trotzdem darauf verzichtet, da sich die Anwendung der Membran noch in einem Anfangsstadium befand und sich das zeitliche Resultat bis zur endgültigen Anwendungsform noch stark verändern könnte. Eine genaue zeitliche Untersuchung wäre somit nicht aussagekräftig. Nachträglich kann trotzdem gesagt werden, dass die alternative Aufbereitungsmethode nicht mehr Zeit als die herkömmliche brauchte. Aufgrund einer ermittelten Anleitung wurde das Blut während 10 Minuten zentrifugiert. Auf der Website von Pall wurde eine zeitliche Blutauftrennung von ca. 2 Min. angegeben<sup>17</sup>. In der Anwendung verzögerte sich dieser Vorgang aber noch einmal um einige Minuten. Die GF-Membran brauchte 5-6 Minuten, bis das Blut ganz einsog, die GX-Membran war mit 2-3 Minuten beträchtlich schneller. Dazu kamen je drei Mal 100µl (GF-Membran) bzw. 50µl PBS (GX-Membran), welche je 1-2 Minuten zum Einziehen brauchten. Infolgedessen liegt die gesamte Zeit von 10-15 Minuten etwa im gleichen zeitlichen Rahmen wie das Zentrifugieren. Die Plasmaherstellungzeit mit der Membran wird sich voraussichtlich aber noch stark im positiven Sinne verändern.

Im Allgemeinen entsprach das quantitative Ergebnis der Vivid™ Plasma Separation GF Membrane dem der Vivid™ Plasma Separation GX Membrane, trotzdem liessen sich in der Anwendung Unterschiede feststellen. Die GX-Membran zog generell das Blut schneller ein. Zusätzlich wird für die GX-Membran nur etwa halb so viel Waschpuffer gebraucht wie für die GF-Membran. Obwohl die Membranen weitgehend gleichwertig behandelt wurden, ist ihnen durch die Bauweise ein Unterschied gegeben. Anhand des sogenannten Hohlvolumens lässt sich das empfohlene Probenvolumen an Blut bestimmen. Unter dem Hohlvolumen wird der freie Platz in der festen Phase, welcher von einer flüssigen Probe besetzt werden kann, verstanden. Das Hohlvolumen der GX-Membran ist 1-1.5x grösser, wie das der GF-Membran. Für die GF-Membran ist ein Hohlvolumen von  $\sim 20 \pm 1 \mu\text{l}/\text{cm}^2$  angegeben. Damit beträgt das Hohl-, sowie auch das empfohlene Probenvolumen  $20\text{-}30 \mu\text{l}/\text{cm}^2$  für die GX-Membran.<sup>18</sup> Je nachdem welche Probenvolumina später verwendet werden sollen, kann sich die eine oder die andere Membran besser eignen. Mithilfe der Vivid™ Plasma Separation GX Membrane sollten sich zumindest auf kleinerem Platz grössere Blutmengen trennen lassen. Der Aufwand für die Anwendung war sonst bei beiden Membranen gleich gross. Durch die einerseits kürzere Anwendungszeit, aber auch durch den kleineren Materialverbrauch, eignet sich die Vivid™ Plasma Separation GX Membrane besser für die Verwendung in einem POCT und kann darum für weitere Anwendungen empfohlen werden.

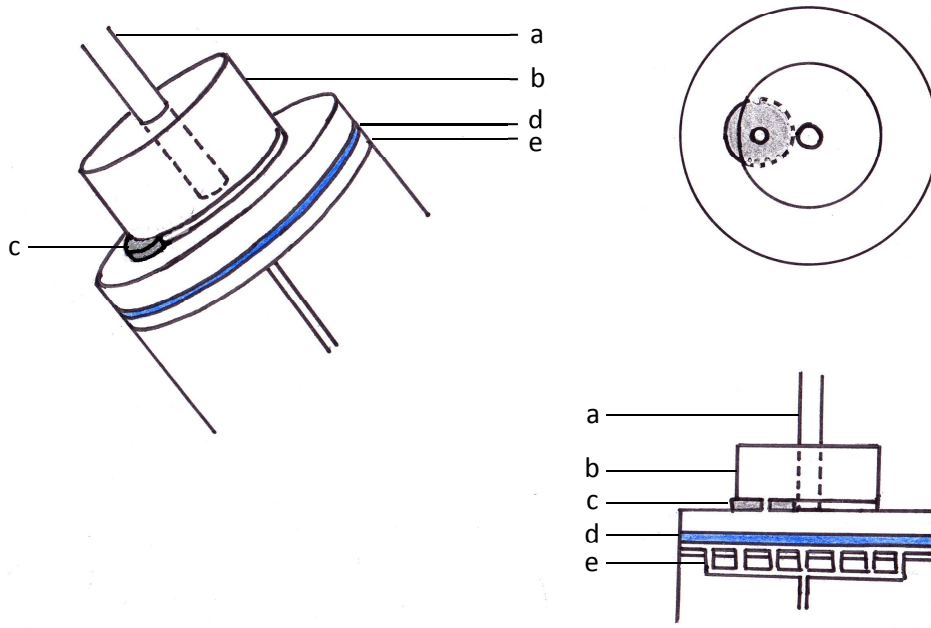
## 6.4 Schlussfolgerung

Der Versuch, eine Alternative zur herkömmlichen Blutaufbereitung zu finden, kann als gelungen betrachtet werden. In Tabelle 4 ist ein Vergleich der beiden Methoden abgebildet. Eine Gegenüberstellung der beiden Verfahren zeigt die Vorteile der Vivid™ Plasma Membrane, obwohl dieses sich noch in einem ersten Versuchsstadium befindet. Es wurde unter Verwendung einer Membran zwar mindestens so viel Zeit wie beim Zentrifugieren aufgewendet, der grösste Zeitverlust wurde aber durch mehrmaliges Auftragen von PBS und das daraus resultierende Pipettieren verursacht. Durch Optimierung und Einbau der Membran in ein richtiges Gerät könnte die Zeit wahrscheinlich auf etwa 5 Minuten reduziert werden. Die Gewinnung von Blutplasma kann durch Zentrifugation zeitlich nicht mehr optimiert werden. Zusätzlich muss das Plasma zur weiteren Verwendung pipettiert werden, eine Trennung, die bei Verwendung der Membranen schon inbegriffen ist. Sie verhindert ein erneutes Vermischen mit den Blutzellen.

	Vivid™ Plasma Separation Membrane	Zentrifugieren
<b>Zeit (in Min.)</b>	10-15	10-12
<b>Stromanschluss</b>	Nein	Ja
<b>Zusätzl. Gerät</b>	Nein	Ja
<b>Pipettieren</b>	(Ja)	Ja
<b>POCT tauglich</b>	Ja	Nein

Tabelle 4 Vergleich der zwei verschiedenen Blutaufbereitungsmethoden

Durch ihre einfache Handhabung und den Verzicht auf zusätzliche technische Hilfe (Zentrifuge, Stromanschluss), erfüllt das Membransystem die Kriterien, welche an ein einfaches POCT gestellt werden. Zur Optimierung der Anwendung in einem POCT müsste einerseits die Membran auf den Seiten gut abgedichtet sein, sodass kein Blut über den Rand der Membran auf die andere Seite gelangen kann. Andererseits wären eine Empfangsmatrix oder Kapillarkräfte nötig, welche das Plasma aus der Membran befördern würden. Es sollte zudem auch die Verwendung von PBS vermindert oder ganz vermieden werden. In anderen Publikationen wurde anstelle einer Waschflüssigkeit negativer Druck verwendet, welcher das Plasma zusammen mit den Kapillarkräften durch die Membran zog<sup>30</sup>.



**Abb. 15 Mögliche Blutaufbereitung in einem POCT-Gerät** Das Blut kommt durch den Kanal (a) auf die Membran (d). In der Kammer (b) befindet sich PBS, welches durch Öffnen des Verschlusses (c) zugegeben werden kann. Unter der Membran befindet sich ein hydrophiles Material mit einem Sammelkanal (e), welches das Plasma zum eigentlichen Test leitet.

In Abb. 15 wurde ein Vorschlag für einen möglichen Einbau des Verfahrens in ein Gerät dargestellt. Es ist von oben und der Seite, wie auch als Querschnitt zu sehen. Die Grösse des Geräts kann variieren und die Proportionen stimmen nicht zwingend mit der Realität überein. Die Blutaufbereitung würde wie folgt verlaufen: Das EDTA-Blut gelangt durch einen Kanal (a) auf die Membran (d). Das PBS befindet sich in einer runden Kammer (b) und kann nach kurzer Zeit durch Öffnen des Verschlusses (c) zugegeben werden. Der gezeichnete Verschluss enthält eine Öffnung, die durch Drehen geöffnet bzw. geschlossen werden kann. Er dient aber nur stellvertretend für einen möglichen Verschluss. Unter der Membran befindet sich ein hydrophiles Material, in dem kleine Löcher zu kleinen Kanälen führen. Diese Kanäle kommen alle in einem Sammelkanal zusammen und führen das Plasma zum eigentlichen Test. Das Plasma könnte zum Beispiel durch kapillare Kräfte oder Ähnliches durch die Kanäle befördert werden.

## 6.5 Reflexion

Auch wenn ich nur den allerersten, kleinen Schritt eines grösseren Projektes bearbeiten konnte, habe ich doch einen wichtigen Teil eines vielleicht zukünftigen POCT ermöglicht. Der Begriff des POCT schien in meinem Umfeld, mich eingeschlossen, nur bedingt bekannt zu sein. Die Recherche über die Hintergründe des POCT wurde nicht gross in dieser Arbeit aufgeführt, trotzdem habe ich viel Spannendes darüber erfahren. Dieses Projekt hat mich auch viel Neues gelehrt. Ich habe gelernt eine Fragestellung zu erarbeiten, darüber eine Literaturrecherche zu führen und dieses Wissen in einer praktischen Arbeit umzusetzen. Zusätzlich habe ich mehr über den Aufbau eines wissenschaftlichen Artikels gelernt und so ganz nebenbei meine Kenntnisse über das Microsoftprogramm Word vertieft. Auch wenn sich der Stress bei mir in einem akzeptablen Rahmen gehalten hat, würde sich die Zeiteinteilung noch um einiges verbessern lassen.

Es würde mich nachträglich reizen, auch andere Aspekte des POCT, wie zum Beispiel den geschichtlichen Hintergrund oder ein bestimmtes diagnostisches Verfahren, genauer zu betrachten. Auch die Anwendung der Vivid™ Plasma Separation Membrane befindet sich erst in den Kinderschuhen und würde sich auf vielfache Weise verbessern lassen. Leider hätte die Optimierung der Membrananwendung den zeitlichen wie auch inhaltlichen Rahmen einer Maturaarbeit gesprengt. Trotz meiner drei ganztägigen Aufenthalte im Labor unter Erreichung aller Ziele hätte die praktische Arbeit als Grundlage dieses Projektes grösser ausfallen können. Eigentlich wäre die praktische Arbeit schon für die letzte Ferienwoche vorgesehen gewesen, die Lieferung der Membran verzögerte sich aber auf Ende Woche und ich musste noch einmal während der Schulzeit ins Labor.

Die Realisierung eines Projektes braucht auch viel Zeit und man kommt oft nur in kleinen Schritten voran. Zusätzlich muss man immer wieder mit kleinen, zeitraubenden Problemen kämpfen, sodass der Aufwand schnell unterschätzt wird. Während der praktischen Arbeitsphase verlor ich kurzzeitig den Gesamtüberblick, da ich mich zu fest auf die Anwendung der Vivid™ Plasma Separation Membrane fokussiert hatte. Daraus habe ich gelernt, nie den Überblick über das Ganze zu verlieren, während man sich mit dem Kleinen beschäftigt.

Im Allgemeinen bin ich aber mit meiner Arbeit zufrieden und denke, dass ich die anfänglich formulierten Ziele erreicht habe.

## 7 Danksagung

Diese Arbeit wurde nur durch eine vielseitige Unterstützung von mehreren Personen ermöglicht, denen ich hier gerne danken würde.

Mein erster und wichtigster Dank geht an das Start-Up-Unternehmen BioRevels. Ohne die materielle wie auch wissenschaftliche Unterstützung, der Zurverfügungstellung des Labors und allen Materialien, sowie die Beschaffung des Blutes vom Blutspendedienst Bern und der Vivid™ Plasma Separation Membrane von Pall Corporations, wäre die ganze Arbeit nicht möglich gewesen. Ein spezieller Dank geht an:

Adrian Szydelko, der mir während allen Experimenten mit Rat und Tat zur Seite stand.

Alicia Hegglin, an die ich mich zu Beginn, aber auch während der ganzen Arbeit immer wieder wenden konnte.

Peter Seitz, der mir diese Maturaarbeit durch seine Beziehungen zu BioRevels überhaupt erst ermöglicht hat.

Eine weitere Danksagung geht an meinen Betreuer Thomas Werner sowie meinen Gegenleser Daniel Margadant. Thomas Werner hat mich in vieler Hinsicht unterstützt und vor allem auch während der schriftlichen Arbeit geholfen.

Als letztes danke ich allen Leuten, die mir in jeglicher Hinsicht geholfen haben und im Speziellen meiner Familie und meinen Freunden, die sich dazu bereit erklärten, meine Arbeit auf Fehler zu korrigieren.



## 8 Quellenverzeichnis

### 8.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 ELISA-sandwich. [http://de.wikipedia.org/wiki/Enzyme-linked\\_Immunsorbent\\_Assay#mediaviewer/File:ELISA-sandwich.svg](http://de.wikipedia.org/wiki/Enzyme-linked_Immunsorbent_Assay#mediaviewer/File:ELISA-sandwich.svg)

(Zugriff: 22.10.14)

Abb. 6: Integrated separation of blood plasma from whole blood for microfluidic paper-based analytical devices <http://pubs.rsc.org/en/Content/ArticleLanding/2012/LC/C1LC20803A#!divAbstract>

(Zugriff: 22.06.14)

Abb. 7: Lab-in-a-pen: a diagnostics format familiar to patients for low-resource settings <http://pubs.rsc.org/en/Content/ArticleLanding/2014/LC/c3lc51185e#!divAbstract>

(Zugriff: 22.06.14)

Abb. 8: Field tested milliliter-scale blood filtration device for point-of-care applications <http://scitation.aip.org/content/aip/journal/bmf/7/4/10.1063/1.4817792>

(Zugriff: 22.06.14)

Abb. 9: Development and validation of a low cost blood filtration element separating plasma from undiluted whole blood <http://scitation.aip.org/content/aip/journal/bmf/6/1/10.1063/1.3672188#figures>

(Zugriff: 22.06.14)

Abb. 10: Gravity Assisted Membrane Filter Separates Plasma from Whole Blood <http://www.medgadget.com/2013/10/plasma-detector.html>

(Zugriff: 22.06.14)

Abb. 11: Stand-alone self-powered integrated microfluidic blood analysis system (SIMBAS) <http://biopoets.berkeley.edu/stand-alone-self-powered-integrated-microfluidic-blood-analysis-system-simbas/>

(Zugriff: 22.06.14)

Abb. 12: Rapid Plasma Separation Device <http://www.mdimembrane.com/Products/Immunodiagnosics/Products/Rapid%20Plasma%20Separation%20Device.html> (Zugriff: 24.06.14)

## 8.2 Endnotenverzeichnis

- <sup>1</sup> JUNKER, Ralf; LUPPA, Peter B.; SCHLEBUSCH, Harald; Hoffmann, Georg; Von Eiff, W.: Medizinische und wirtschaftliche Bedeutung von POCT, in: LUPPA, Peter B.; SCHLEBUSCH, Harald (Hg.): POCT – Patientennahe Labordiagnostik, 2. Auflage, Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 12-14
- <sup>2</sup> BIO VENTURES FOR GLOBAL HEALTH (2010): The Diagnostics Innovation Map., Seiten: 20-21, 31, 55, [http://www.bvgh.org/Portals/0/Reports/2010\\_the\\_diagnostics\\_innovation\\_map.pdf](http://www.bvgh.org/Portals/0/Reports/2010_the_diagnostics_innovation_map.pdf) (Zugriff: 07.10.14)
- <sup>3</sup> PEELING, R.W.; MABEY, D. (2010): Point-of-care tests for diagnosing infections in the developing world. In: Clinical Microbiology and Infection, Vol. 16, Iss. 8, 1062-1069, <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1469-0691.2010.03279.x/full> (Zugriff: 07.10.14)
- <sup>4</sup> PAI, Nitika Pant; VADNAIS, Caroline; DENKINGER, Claudia; ENGEL, Nora; PAI, Madhukar (2012): Point-of-Care Testing for Infectious Diseases: Diversity, Complexity, and Barriers in Low- and Middle-Income Countries. In: PLOS Medicine, Vol. 9, Iss. 9, <http://www.plosmedicine.org/article/fetchObject.action?uri=info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pmed.1001306&representation=PDF> (Zugriff: 12.08.14)
- <sup>5</sup> LEE, Won Gu; KIM, Yun-Gon; CHUNG, Bong Geun; DEMIRCI, Utkan; KHADEMHOSEINI, Ali (2010): Nano/Microfluidics for diagnosis of infectious diseases in developing countries. In: Advanced Drug Delivery Reviews, Vol. 62, Iss. 4-5, 445-457, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2829381/> (Zugriff: 07.10.14)
- <sup>6</sup> WIKIPEDIA (04.07.14): Enzyme-Linked Immunosorbent Assay [http://de.wikipedia.org/wiki/Enzyme-linked\\_Immunsorbent\\_Assay](http://de.wikipedia.org/wiki/Enzyme-linked_Immunsorbent_Assay) (Zugriff: 22.10.14)
- <sup>7</sup> WANG, ShuQi; SARENAC, Dusan; CHEN, Michael H.; HUANG, Shih-Han; GIGUEL, Francoise F.; KURITZKES, Daniel; DEMIRCI, Utkan (17.09.12): Simple filter microchip for rapid separation of plasma and viruses from whole blood. In: International Journal of Nanomedicine, Vol. 7, 5019-5028, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3457680/pdf/ijn-7-5019.pdf> (Zugriff: 08.10.14)
- <sup>8</sup> Aledort, J.E.; Ronald, A. et al. Ibid.: Reducing the burden of HIV/AIDS infants: the contribution of improved diagnostics. zit. In BIO VENTURES FOR GLOBAL HEALTH (2010): The Diagnostics Innovation Map., 13, [http://www.bvgh.org/Portals/0/Reports/2010\\_the\\_diagnostics\\_innovation\\_map.pdf](http://www.bvgh.org/Portals/0/Reports/2010_the_diagnostics_innovation_map.pdf) (Zugriff: 07.10.14)
- <sup>9</sup> LUPPA, Peter B.; JUNKER, Ralf; SCHLEBUSCH, Harald: Definition und Anwendungsbereiche, in: LUPPA, Peter B.; SCHLEBUSCH, Harald (Hg.): POCT – Patientennahe Labordiagnostik, 2. Auflage, Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 4-9
- <sup>10</sup> BIO Ventures for Global Health (2014): Rapid Diagnostic Test (RDT). <http://www.bvgh.org/Current-Programs/Neglected-Disease-Product-Pipelines/Global-Health-Primer/Targets/cid/ViewDetails/ItemID/16.aspx> (Zugriff: 13.10.14)
- <sup>11</sup> ÖSTERREICHISCHES ROTES KREUZ (2014): Blutbestandteile. <http://www.rotekreuz.at/blutspende/blut-im-detail/wissenswertes-ueber-blut/blutbestandteile/>. (Zugriff am 18.04.2014)
- <sup>12</sup> AMERICAN RED CROSS (2014): Blood Components. <http://www.redcrossblood.org/learn-about-blood/blood-components> (Zugriff: 10.10.14)
- <sup>13</sup> LABOR ENDERS (o.J.): Parameter aus Blut, Serum, Plasma und Co. <http://www.labor-enders.de/449.html> (Zugriff: 18.04.14)
- <sup>14</sup> LABOR DR. BAYER (2012): Anleitung zur Präanalytik. <http://www.labor-bayer.de/einsenderservice/DrBayer-Anleitung-Praeanalytik-08.pdf> (Zugriff: 25.06.14)
- <sup>15</sup> LIFETECHNOLOGIES (o.J.): What are general guidelines for the production of blood serum and plasma for cytokine analysis using ELISA and Luminex® assays? <http://www.lifetechnologies.com/search/support/supportSearchAction.action?query=Luminex> (Zugriff: 25.06.14), Antwort-Kennung: E5220
- <sup>16</sup> BLUTSPENDEDIENST BERN (o.J.): Blutprodukte für Forschung / Labor. <http://www.bsd-be.ch/blutversorgung/blutprodukte-fuer-forschung-labor.html> (Zugriff: 18.08.14)
- <sup>17</sup> PALL CORPORATION (2014): Vivid™ Plasma Separation Membrane. <http://www.pall.com/main/oem-materials-and-devices/product.page?id=46962> (Zugriff: 18.08.14)
- <sup>18</sup> PALL CORPORATION (2009): Vivid™ Plasma Separation Membrane Product Data. [http://www.pall.com/pdfs/OEM-Materials-and-Devices/09.2730\\_VividPlasma\\_DS\\_6pg.pdf](http://www.pall.com/pdfs/OEM-Materials-and-Devices/09.2730_VividPlasma_DS_6pg.pdf) (Zugriff: 18.08.14)
- <sup>19</sup> SIGMA ALDRICH (2014): Phosphate buffered saline. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/p4417?lang=de&region=CH> (Zugriff: 28.08.14)
- <sup>20</sup> R&D SYSTEMS (o.J.): DuoSet Ancillary Reagent Kit 2. <http://www.rndsystems.com/Products/DY008> (Zugriff: 28.08.14)

- 
- <sup>21</sup> R&D SYSTEMS (o.J.): Human IL-6 Duo Set. <http://www.rndsystems.com/Products/dy206/> (Zugriff: 18.08.14)
- <sup>22</sup> NCBI (08.10.14): IL6 interleukin 6 [Homo sapiens (human)].  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3569#general-protein-info> (Zugriff : 10.10.14)
- <sup>23</sup> WIKIPEDIA (10.10.14): ELISA: Sandwich ELISA („Indirect“ ELISA)  
[http://en.wikipedia.org/wiki/ELISA#Sandwich\\_ELISA\\_.28.22Indirect.22\\_ELISA.29](http://en.wikipedia.org/wiki/ELISA#Sandwich_ELISA_.28.22Indirect.22_ELISA.29) (Zugriff: 24.10.14)
- <sup>24</sup> LABWRENCH (2014): BioTek Synergy HT.  
<http://www.labwrench.com/?equipment.view/equipmentNo/2125/BioTek/Synergy-HT/> (Zugriff: 09.10.14)
- <sup>25</sup> WIKIPEDIA (08.02.14): Serum-separating tube. [http://en.wikipedia.org/wiki/Serum-separating\\_tube](http://en.wikipedia.org/wiki/Serum-separating_tube) (Zugriff: 22.06.14)
- <sup>26</sup> YANG, Xiaoxi; FOROUZAN, Omid; BROWN, Theodore P.; SHEVKOPLYAS, Sergey S. (2011): Integrated separation of blood plasma from whole blood for microfluidic paper-based analytical devices. in: *Lab Chip*, Vol. 12, Iss. 2, 274-280, <http://pubs.rsc.org/en/Content/ArticleLanding/2012/LC/C1LC20803A#!divAbstract> (Zugriff: 22.06.14)
- <sup>27</sup> GONG, Max M.; MACDONALD, Brendan D.; NGUYEN, Trung Vu; NGUYEN, Kinh Van; SINTON, David (2014): Lab-in-a-Pen: a diagnostics format familiar to patients for low-resource settings. in: *Lab Chip*, Vol. 14, Iss. 5, 957-963, <http://pubs.rsc.org/en/Content/ArticleLanding/2014/LC/c3lc51185e#!divAbstract> (Zugriff: 22.06.14)
- <sup>28</sup> GONG, Max M.; MACDONALD, Brendan D.; NGUYEN, Trung Vu; NGUYEN, Kinh Van; SINTON, David (2013): Field tested milliliter-scale blood filtration device for point-of-care applications. in: *Biomicrofluidics*, Vol. 7, Iss. 4, <http://faculty.uoit.ca/macdonald/Gong-MacDonald-FieldTested-2013.pdf> (Zugriff : 22.06.14)
- <sup>29</sup> HOMSY, Alexandra; VAN DER WAL, Peter D.; DOLL, Werner; SCHALLER, Roland; KORSATKO, Stefan; RATZER, Maria; ELLMERER, Martin; PIEBER, Thomas R.; NICOL, Andreas; DE ROOIJ, Nico F. (2012): Development and validation of a low cost blood filtration element separating plasma from undiluted whole blood. in: *Biomicrofluidics*, Vol. 6, Iss. 1, [http://www.nccr-must.ch/libraries/files/Design\\_Simulation\\_Fabrication\\_Packaging\\_and\\_Characterization\\_of\\_MEMS\\_Micromirror\\_for\\_Femtosecond\\_Pulse-Shaping\\_in\\_Phase\\_and\\_Amplitude\\_BIOMGB-000006-012804\\_1.pdf](http://www.nccr-must.ch/libraries/files/Design_Simulation_Fabrication_Packaging_and_Characterization_of_MEMS_Micromirror_for_Femtosecond_Pulse-Shaping_in_Phase_and_Amplitude_BIOMGB-000006-012804_1.pdf) (Zugriff: 22.06.14)
- <sup>30</sup> LIU, Changchun; MAUK, Michael; GROSS, Robert; BUSHMAN, Frederic D.; EDELSTEIN, Paul H.; COLLMAN; Ronald G.; BAU, Haim H. (2013): Membrane-Based, Sedimentation-Assisted Plasma Separator for Point-of-Care Applications. in: *Anal. Chem.*, Vol. 85, Iss. 21, 10463–10470, <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac402459h> (Zugriff: 22.06.14)
- <sup>31</sup> DIMOV, Ivan K.; BASABE-DESMONTS, Lourdes ; GARCIA-CORDERO, Jose L. ; ROSS, Benjamin M. ; RICCO, Antonio J. ; LEE, Luke P. (2013) : Stand-alone self-powered integrated microfluidic blood analysis system (SIMBAS). in: *Lab Chip*, Vol. 11, Iss. 5, 845-850, <http://biopoets.berkeley.edu/stand-alone-self-powered-integrated-microfluidic-blood-analysis-system-simbas/> (Zugriff: 22.06.14)
- <sup>32</sup> Mdi Membrane Technologies (2011): Rapid Plasma Separation Device.  
<http://www.mdimembrane.com/Products/Immunodiagnosics/Products/Rapid%20Plasma%20Separation%20Device.html> (Zugriff : 24.06.14)
- <sup>33</sup> LIFETECHNOLOGIES (2014): Dynabeads® Types and Uses.  
<https://www.lifetechnologies.com/ch/en/home/brands/product-brand/dynal/dynabeads-types-and-uses.html> (Zugriff: 24.06.14)
- <sup>34</sup> PERKINELMER (1998-2013): „Ready-to-Use“ M-PVA Magnetic Beads. <http://www.chemagen.com/ready-to-use-m-pva-beads.html> (Zugriff: 08.10.14)
- <sup>35</sup> LIFETECHNOLOGIES (2014): Dynabeads® Magnetic Separation Technology.  
<https://www.lifetechnologies.com/ch/en/home/brands/product-brand/dynal.html> (Zugriff: 30.10.14)
- <sup>36</sup> INTERNATIONAL POINT OF CARE INC. (2011): BLOOD SEPARATION MEMBRANES\*.  
[http://www.ipocdx.com/pro\\_membranes.html](http://www.ipocdx.com/pro_membranes.html) (Zugriff: 23.06.14)
- <sup>37</sup> SyrVet (2010): Clot Activator Blood Collection Tubes.  
[http://www.syrvet.com/products/?clot\\_activator\\_blood\\_collection\\_tubes&show=product&productID=104624](http://www.syrvet.com/products/?clot_activator_blood_collection_tubes&show=product&productID=104624) (Zugriff : 23.06.14)

- 
- <sup>38</sup> DEMOPHORIOUS HEALTHCARE (24.03.12): Gel and Clot Activator. <http://www.demophorius.com/dvac?id=71> (Zugriff : 23.06.14)
- <sup>39</sup> BD (Becton, Dickinson and Company) (2014): BD Vacutainer® Rapid Serum Tube (RST). <http://www.bd.com/vacutainer/rst/> (Zugriff: 23.06.14)
- <sup>40</sup> NG, Wai-Yoong; YEO, Chin-Pin (2013): Thrombin-Accelerated Quick Clotting Serum Tubes: An Evaluation with 22 Common Biochemical Analytes. in : Advances in Hematology, Vol. 2013, <http://www.hindawi.com/journals/ah/2013/769479/> (Zugriff : 23.06.14)
- <sup>41</sup> TUSKEGEE UNIVERSITY (2009): Chapter 1 Anticoagulants. <http://compepid.tuskegee.edu/syllabi/pathobiology/pathology/clinpath/chapter1.html> (Zugriff: 23.06.14)
- <sup>42</sup> WIKIPEDIA (Stand: 17.06.14): Anticoagulant. <http://en.wikipedia.org/wiki/Anticoagulant> (Zugriff: 23.06.14)
- <sup>43</sup> WIKIPEDIA (12.07.13): Dynabeads. <http://en.wikipedia.org/wiki/Dynabeads> (Zugriff: 08.10.14)
- <sup>44</sup> DOCHECK FLEXIKON (23.02.14): Thrombozyt. <http://flexikon.doccheck.com/de/Thrombozyt> (Zugriff: 08.10.14)
- <sup>45</sup> LAM, Nicole Y.L. ; RAINER, Timothy H.; CHIU, Rossa W.K.; LO, Dennis Y.M. (2004): EDTA Is a Better Anticoagulant than Heparin or Citrate for Delayed Blood Processing for Plasma DNA Analysis. In: Clinical Chemistry, Vol. 50, Iss. 1, 256-257, <http://www.clinchem.org/content/50/1/256.full> (Zugriff: 10.10.14)
- <sup>46</sup> UNIVERSITY OF DELAWARE (o.J.): Physical Properties: The four most common glass types utilized by UD <http://www.udel.edu/chem/GlassShop/PhysicalProperties.htm> (Zugriff: 27.10.14)
- <sup>47</sup> PHARMAZEUTISCHE ZEITUNG (2008): Was die Zellzahlen verraten. <http://www.pharmazeutische-zeitung.de/?id=4603> (Zugriff: 08.09.14)
- <sup>48</sup> BLUTSPENDE SRK SCHWEIZ (2014): Zusammensetzung des Blutes. [http://www.blutspende.ch/de/blutspende/wissen\\_und\\_blut/zusammensetzung\\_des\\_blutes](http://www.blutspende.ch/de/blutspende/wissen_und_blut/zusammensetzung_des_blutes) (Zugriff: 08.09.14)
- <sup>49</sup> DOCHECK FLEXIKON (28.08.14): Hämatokrit. <http://flexikon.doccheck.com/de/H%C3%A4matokrit> (Zugriff: 08.09.14)
- <sup>50</sup> UNSER BLUT (2014): Hämatokrit. <http://www.grossesblutbild.de/haematokrit.html> (Zugriff: 08.09.14)

## 9 Anhang

### 9.1 Messresultate

Platte [450 nm]						
	1	2	3	4	5	6
A	3.349	3.396	0.071	0.079	0.107	3.755
B	2.469	2.422	0.166	0.089	0.091	3.161
C	1.63	1.567	0.159	0.147	0.104	2.397
D	0.965	0.118	1.075	1.272	2.557	1.539
E	0.631	0.577	1.13	1.351	2.597	0.8
F	0.403	0.455	1.122	1.483	2.509	0.46
G	0.306	0.323	0.082	0.281	0.225	0.283

Platte [540 nm]						
	1	2	3	4	5	6
A	0.079	0.073	0.031	0.034	0.032	0.077
B	0.059	0.066	0.032	0.031	0.039	0.07
C	0.058	0.056	0.042	0.035	0.04	0.058
D	0.045	0.031	0.044	0.043	0.06	0.048
E	0.045	0.037	0.053	0.051	0.069	0.043
F	0.042	0.034	0.051	0.055	0.068	0.044
G	0.041	0.036	0.032	0.04	0.034	0.034