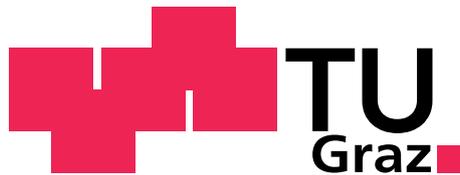


Paul Georg HÖLZL

Entwicklung einer Methodik
zur spektrophotometrischen Messung
des freien Hämoglobins
im Blutplasma

Diplomarbeit



Institut für Medizintechnik
Technische Universität Graz
Kronesgasse 5, A - 8010 Graz
Vorstand: Univ.Prof.Dipl.-Ing.Dr.techn. Rudolf Stollberger

Betreuer:
O.Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr.techn. Hermann Scharfetter
Begutachter:
O.Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr.techn. Hermann Scharfetter

Diese Arbeit wurde in Kooperation mit
Roche Diagnostics Graz GmbH
Kratkystraße 2, A - 8020 Graz
durchgeführt.

Betreuer seitens der Firma:
Dipl.-Ing. Michael Schlaminger

Graz, November 2011

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst, andere als die angegebenen Quellen/Hilfsmittel nicht benutzt, und die den benutzten Quellen wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am

.....

(Unterschrift)

Zusammenfassung

Die „Entwicklung einer Methodik zur spektrophotometrischen Messung des freien Hämoglobins im Blutplasma“ wurde mit einer Voruntersuchung begonnen, die Aufklärung darüber geben sollte, ob die Implementierung des neuen Parameters freies Hämoglobin in einem vorhandenem Blutgasanalysegerät möglich ist.

Es stellte sich weiters die Frage, ob das bekannte System in dem gewünschten Messbereich von 0.005 bis 0.4 g/dl in der Lage ist, zuverlässig Messwerte zu erfassen und diese auch korrekt weiterzuverarbeiten.

Daraufhin wurde eine Suche nach einer zuverlässigen Referenzmethode durchgeführt. Es stellte sich heraus, dass die HICN- Methode (Cyan- Hämoglobin- Methode) die am weitest verbreitete und anerkannte Messmethode ist. Daraufhin konnten Messreihen sowohl am zu untersuchenden System als auch an der ausgewählten Referenzmethode durchgeführt und in weiterer Folge diese beiden Systeme miteinander verglichen werden. Die Abweichungen, die zwischen dem firmeninternen System und der Referenzmethode auftraten, wurden durch mathematisch erstellte Korrekturen ausgebessert.

Weiters wurde die Zuverlässigkeit des Messsystems bei Auftreten von Interferenzen untersucht. Zur Kompensation der starken Beeinflussung des Interferenzen Methylenblau wurde eine Korrekturfunktion erstellt und in den vorhandenen Algorithmus der Entwicklungssoftware implementiert.

Abschließend konnte die Kompensationsmethode in einem externen Versuch auf ihre Zuverlässigkeit bei eventuell auftretenden Störeinflüssen ausgetestet und charakterisiert werden.

Schlüsselwörter: *freies Hämoglobin, Interferenteneinfluss, Korrekturfunktion, Referenzmethoden, Regressionsanalyse*

Abstract

The diploma thesis was initiated with a pilot study, which should investigate the possibility of the implementation of the new parameter „free hemoglobin“ inside an existing blood- gas- analyzer. The aim of this study was to determine if the existing system is able to capture the measured values without hardware adaptations in the requested range from 0.005 to 0.4 g/dl.

The main topics of the diploma thesis were a search for a widely accepted reference method, the performing of measurements on the investigation system as well as on the reference system and an extension of the existing algorithm for several important interferences.

The HICN- Method (cyan- haemoglobin) was found out to be the most used method which is also accepted as a reference- method. Measurements were executed on both systems, the concentrations were compared and the differences, which occurred between these two systems, were used to adopt the existing algorithm by mathematical corrections.

To compensate the influence of an interference, e.g. methylene blue, the algorithm was extended with its absorption spectra and an adopted wavelength range. Additionally, the functionality of the compensation method was tested in an external study.

After applying several software adaptations and finally also hardware adaptations, the system was able to measure fHb- concentrations correctly in the requested range.

Keywords: *free hemoglobin, regression analysis, reference methods, interference effect, correction function*

Danksagung

Die vorliegende Diplomarbeit ist im Rahmen meiner Tätigkeit in der Firma Roche Diagnostics GmbH in Graz, Abteilung DPGRSO, entstanden. Sie bildet den Abschluss meines Studiums der Elektrotechnik, Biomedizinische Technik an der Technischen Universität in Graz.

Mein erster Dank geht an Herrn Stefan Untersberger, für die Möglichkeit, diese Diplomarbeit am Standort Graz durchzuführen und für seine Betreuung in der Anfangsphase.

Besonderer Dank geht an Herrn Michael Schlaminger, meinem fachlichen Betreuer. Ich danke ihm für die vielseitige Unterstützung und seine engagierte Betreuung.

Weiters möchte ich mich beim gesamten Team der Abteilung DPGRSO für die stetige Hilfsbereitschaft und Unterstützung bedanken.

Für die fachliche Betreuung und die Begutachtung der Arbeit seitens der Technischen Universität Graz möchte ich Herrn Professor Hermann Scharfetter danken.

Meiner Partnerin Eva danke ich für die alltägliche Unterstützung und Hilfe während der gesamten Studienzeit, besonders aber in der Endphase des Studiums.

Mein ganz besonderer Dank gebührt abschließend meinen Eltern, die mir diese Ausbildung ermöglicht haben und meiner Schwester die mir stets motivierend zur Seite stand.

Inhaltsverzeichnis

1	Begriffe	1
1.1	Abkürzungen	1
1.2	Blutgasparameter	1
1.3	sonstige Begriffe	1
1.4	Bemerkung	2
1.5	Umrechnungsfaktoren	2
2	Einleitung	3
2.1	Vorwort	3
2.2	Motivation	3
2.3	Aufgabenstellung	4
2.4	Messsystem	5
2.5	Blutgasanalysegerät cobas b 221 System	6
2.5.1	Messparameter	7
2.5.2	Anwendungsbereich	7
2.6	Einsatzgebiet Point- of- Care Diagnostik	8
2.6.1	Hintergrund Intensivstation- Patienten	8
2.7	Einsatzgebiet Blutbanken	9
3	Physiologische Grundlagen	10
3.1	Blut- Zusammensetzung	10
3.1.1	Aufgaben der Blutzellen und des Plasmas	10
3.1.2	Erythrozyten	11
3.1.3	Hämatokrit- Wert	11
3.2	Hämoglobin	11
3.2.1	Totales Hämoglobin tHb	12
3.2.2	Oxy- Hämoglobin O ₂ Hb	13
3.2.3	Desoxy- Hämoglobin HHb	13
3.2.4	Carboxy- Hämoglobin COHb	13
3.2.5	Meth- Hämoglobin MetHb	14
3.3	Blut- Plasma	14
3.4	Beschreibung der natürlichen Hämolyse	15
3.5	Freies Hämoglobin	16
3.6	Haptoglobin	16
4	Physikalische Grundlagen	17
4.1	Absorption des Lichtes	17
4.2	Wellenlängenbereich des Messsystems	18
4.3	Lambert- Beer'sches Gesetz	18
4.3.1	Schichtdicke der Küvette	20
4.4	Absorptionseigenschaften von Blut	21
4.4.1	Absorptionsbanden	22

5	Mathematische/Statistische Methoden	23
5.1	Multiple lineare Regression, Ordinary Least Squares	23
5.2	Non negative least squares- Methode	24
5.3	Rechenalgorithmus des cobas b 221 Systems	24
6	Probenpräparation	26
6.1	Methoden zum Stellen der Blutproben „freies Hämoglobin“	26
6.1.1	Methode 1	26
6.1.2	Methode 2	26
6.1.3	Methode 3	27
6.1.4	Methode 4	27
6.2	Trennung von Plasma und Erythrozyten	27
6.3	Herstellung der Proben freies Hämoglobin	28
6.4	Möglichkeiten der Durchführung der Hämolyse	29
6.4.1	Mechanische Hämolyse	29
6.5	Herstellung des Hämolysates	29
6.6	Proben- Tonometrie	30
6.7	Lyophilisiertes Erythrozyten- Pulver	31
6.7.1	Probleme mit lyophilisiertem Erythrozyten- Pulver	32
7	Literaturstudie	34
7.1	Übersicht Literaturstudien	34
7.2	Verfügbare Techniken zur Bestimmung von freiem Hämoglobin	35
7.3	Spektroskopisches Messverfahren für freies Hämoglobin	36
7.4	Vergleichsstudie fHb	36
7.4.1	Direkte optische Techniken, unverdünnte Proben:	37
7.4.2	Direkte optische Techniken, verdünnte Proben:	39
7.4.3	Techniken mit zugefügten Chemikalien: Cyanmethemoglobin- und Tetramethylbenzidine- Methode	40
7.4.4	Analytische Sensitivität	41
7.5	Ringversuch zur Bestimmung von freiem Hämoglobin	42
7.6	Weitere Methoden	44
7.7	Weitere Literaturstellen	44
7.8	Verfahren zur Bestimmung des Detektionslimits	44
7.8.1	Limit of Blank (LOB)	45
7.8.2	Limit of Detection (LOD)	45
8	Verwendete Methoden	47
8.1	Auswahl der Referenzmethode	47
8.2	Cyanmethemoglobin Methode (HICN- Methode)	47
8.2.1	Hintergrund	47
8.2.2	Berechnung	48
8.2.3	Vor- und Nachteile der HICN- Methode	49
8.3	AHD- Methode	49
8.4	Harboe 3 Wellenlängen- Methode	50
8.5	HemoCue [®] - Methode nach Vanzetti	50
8.5.1	HemoCue [®] - Einsatzgebiete	51

8.6	Abtrenndevise	51
8.7	Berechnung mit Hilfe des Programms Matlab®	52
8.8	Regressionsanalyse	53
8.8.1	Ordinary Least Squares	53
8.8.2	Non negative least squares	54
8.8.3	Vergleich der beiden Regressionsanalysen	54
8.9	Weiterführende Berechnungen	54
8.10	Korrekturfunktion Methylenblau	54
9	Messreihen fHb	57
9.1	Proben- Vermessung	57
9.2	Voruntersuchungen	57
9.2.1	Durchführung und Auswertung	58
9.3	tHb- Messungen unter der Spezifikations- Grenze	59
9.3.1	Auswertung	59
9.4	Erste Messreihe freies Hämoglobin	60
9.4.1	Auswertung	60
9.5	Linearität cobas b 221 System, Vermessung von ClinChek® Lösungen	61
9.5.1	Auswertung	62
9.6	Vermessung gestellter fHb- Lösungen	63
9.6.1	Auswertung	63
9.7	Methodenvergleich cobas b 221 System, Photometer Shimadzu (HICN- und AHD- Methode)	64
9.7.1	Auswertung	64
9.8	Verdünnungsreihe fHb	66
9.8.1	Auswertung	66
9.9	Vermessung von natürlichen fHb- Werten	67
9.9.1	Auswertung	67
9.10	Interferenzmessungen - Korrekturfunktion Methylenblau	68
9.10.1	Auswertung	68
10	Messreihen Referenzmaterial	69
10.1	Referenzreihenbildung mit Lyophilisat- Pulver	69
10.1.1	Auswertung	69
10.2	Photometer HICN- Probenvermessung, zeitlicher Einfluss	70
10.2.1	Auswertung	70
10.3	Abtrenndevise- Probenvermessung	71
10.3.1	Auswertung	71
10.4	Stabilität des HICN- Proben- Gemisches, Vergleich Vollblut mit Lyophilisat- Pulver	72
10.4.1	Auswertung	73
10.5	Vermessung des HICN- Reagents, Plasma Proben (0.01 bis 0.1 g/dl)	74
10.5.1	Auswertung	75
10.6	Ergebnis der Referenzmessungen	75
11	Interferenten- Untersuchung	76
11.1	Auswahl der Interferenten	77

11.2 Durchführung	77
11.3 Auswertung	78
12 Diskussion	80
12.1 Probenherstellung der fHb- Reihen	80
12.2 Beschreibung der typischen Darstellung der Messergebnisse	80
12.3 Messperformance cobas b 221 System	80
12.4 Vergleichsmessungen cobas b 221 System mit HemoCue®	82
12.5 Schichtdickenadaption	84
12.6 Wellenlängen- Variation	85
12.7 Vergleich der Regressionsanalysen	85
12.8 Bewertung der Korrekturfunktion Methylenblau	86
12.9 Detection Limit, Auflösungsgrenze	87
12.10 Externe Studie fHb	87
13 Resumee	89
14 Geräte, Materialien	90
14.1 Programme	90
14.2 Verwendete Geräte	90
14.3 Reagenzien und Materialien	90

Abbildungsverzeichnis

1	Prinzipdarstellung cobas b 221 System [Dia98]	6
2	Darstellung cobas b 221 System, Serienblutgasanalysator [Dia98]	7
3	Hämoglobinstruktur chemisch [Pra98]	12
4	Hämoglobinstruktur schematisch [ST07]	12
5	Wellenlängenbereich VIS [Hof11]	18
6	Schematisches Abbild der Küvette, Abschwächung der Lichtintensität nach Durchlauf des Mediums [Bre11]	20
7	Auswahl der Referenzspektren cobas b 221 System	22
8	Externer Hämolytator	30
9	Prinzipdarstellung der Proben-tonometrie [Leh11]	30
10	Methoden der Teilnehmer am Ringversuch (n=74) [Tea01]	35
11	Quantifizierung von freiem Hämoglobin nach den Absorptionskurven von Oxy- Hämoglobin, Methoden nach Cripps, Porter und Shinowara [Mal97]	38
12	Quantifizierung von freiem Hämoglobin nach den Absorptionskurven von Oxy- Hämoglobin, Methode der ersten Ableitung [Mal97]	39
13	Quantifizierung von freiem Hämoglobin nach den Absorptionskurven von Oxy- Hämoglobin, Methode nach Harboe und HICN- Methode [Mal97]	40
14	Analytische Sensitivität der verschiedenen Messmethoden [Mal97]	42
15	Mittelwert und Standardabweichung der Methoden für Probe b [Tea01]	43
16	Berechnung von LOB und LOD [NCC01]	46
17	Analysegerät HemoCue [®] [AB98]	51
18	Darstellung des Abtrenn- device (Spritze und Filtergehäuse)	52
19	Ursprüngliche Wellenlängenbereiche / Blöcke die in der Multikomponentenanalyse betrachtet werden	53
20	Aufnahme dreier verschiedener Konzentrationen von Methylenblau	55
21	Referenz Spektren inklusive Methylenblau- Spektrum	56
22	Gesamte Messpunkte der Messreihe 9.2	58
23	Ausschnitt von Messpunkten der Messreihe 9.2	58
24	Gesamte Messpunkte der Messreihe 9.2	59
25	Ausschnitt von Messpunkten der Messreihe 9.2	60
26	Messpunkte der Messreihe 9.4	60
27	Ausschnitt der Messpunkte der Messreihe 9.4	61
28	Vermessung der Clin Check [®] Kontrollproben, Photometer	62
29	Vermessung der Clin Check [®] Kontrollproben, cobas b 221 System	63
30	Messwerte cobas b 221 System mit Korrektur nach Formel 29	64
31	Vergleich Messwerte HICN- und AHD- Methode	65
32	Vergleich Messwerte HICN- Methode und cobas b 221 System	65
33	Vergleich Messwerte AHD- Methode und cobas b 221 System	66
34	Gesamter Messbereich cobas b 221 System mit Korrektur- Faktor	67
35	Ausschnitt Messbereich cobas b 221 System mit Korrektur- Faktor aus Kapitel 8.9	67
36	Ausschnitt Messbereich cobas b 221 System mit Korrektur- Faktor aus Kapitel 8.9	68
37	Einwaagewerte gegen cobas b 221 System	69

38	Einwaagewerte gegen Photometer HICN	70
39	Unterbestimmung der Konzentrationen von fHb	70
40	Vermessung fHb Wert mit und ohne Abtrenndevice	72
41	Zusammenhang Anzahl der Filter und Höhe des Hämatokritwertes	72
42	Vermessung Blutplasma Proben, Messzeitpunkt 1	73
43	Vermessung Blutplasma Proben, Messzeitpunkt 2	73
44	Vermessung Lyophilisat- Proben, Messzeitpunkt 1	74
45	Vermessung Lyophilisat- Proben, Messzeitpunkt 2	74
46	Vergleich HICN- Reagent alt zu HICN- Reagent neu	75
47	Lipidem, Omegaven, Lipofundin	79
48	Haes- Steril, Gelofusin, Voluven	79
49	SMOF- Lipid, Intralipid, Propofol	79
50	Methylenblau, Indocyaningrün, Evans- Blau	79
51	Unterschied der Absorptionskurven von tHb und fHb	81
52	Ausschnitt des Bereichs der fHb- Konzentrationen	81
53	Messdaten, herangezogen für Präzisionsauswertung	82
54	Vergleich HemoCue [®] gegen Photometer	83
55	Vergleich cobas b 221 System gegen Photometer	83
56	Absorption eines Analyten bei unterschiedlicher Schichtdicke	84
57	Messwerte aus 9.2, Berechnung mit „OLS“- Methode	85
58	Messwerte aus 9.2, Berechnung mit „NNLS“- Methode	86
59	Darstellung der Funktionalität der Methylenblaukorrektur	86
60	Vergleich LOB und LOD bei unterschiedlichen Schichtdicken	87
61	Messergebnisse der Linearitätsmessung der externen Studie	88
62	Vergleich der Interferenteneinflüsse bei verschiedenen Messmethoden	88

Tabellenverzeichnis

1	Umrechnungsfaktoren	2
2	Beispiel Einwaage bei Probenherstellung	28
3	Absorptionsgleichungen direkter optischer Techniken, unverdünnte Proben	37
4	Absorptionsgleichungen direkter optischer Techniken, verdünnte Proben	39
5	Absorptionsgleichungen, Techniken mit zugefügten Chemikalien	40
6	Häufigkeit der verwendeten Methoden [Tea01]	43
7	Probenherstellung der Clin- Check [®] Lösungen mit Rekonstitutionsflüssigkeit	61
8	Probenherstellung natürliches fHb	63
9	Probenherstellung Verdünnungsreihe mit NaCl	66
10	Auswahl der relevanten Interferenten	78
11	Ergebnisse der LOB- und LOD- Berechnung	87

1 Begriffe

1.1 Abkürzungen

<i>fHb</i>	freies Hämoglobin im Blutplasma in g/dl
<i>c_{fHb}</i>	Konzentration des freien Hämoglobin in g/dl
<i>tHb</i>	totales Hämoglobin in g/dl
<i>c_{tHb}</i>	Konzentration des totalen Hämoglobin in g/dl
<i>Hp</i>	Haptoglobin
<i>N₂</i>	Stickstoff
<i>CO₂</i>	Kohlenstoffdioxid
<i>O₂</i>	Sauerstoff
<i>npls</i>	Non negative least squares
<i>BSA</i>	Bovine- serum- albumine
<i>HSA</i>	Human- serum- albumine
<i>A</i>	Absorption
<i>c</i>	Konzentration
<i>E</i>	Referenzspektrum
<i>I</i>	Intensität Messlicht
<i>I₀</i>	Intensität Referenzlicht
λ	Wellenlänge
<i>Res</i>	Residuen
<i>HICN</i>	Cyan- Hämoglobin- Methode
<i>AHD</i>	Alkaline- Heamatine- D575- Methode
<i>LOD</i>	Limit of Detection
<i>LOB</i>	Limit of Blank
<i>d</i>	Schichtdicke der Küvette in cm
<i>PBS</i>	phosphatgepufferte Salzlösung
<i>TMB</i>	Tetramethylbenzidine
<i>NaOH</i>	Natronlauge (wässrige Lösung)
<i>NaCl</i>	Natrium- Chlorid

1.2 Blutgasparameter

<i>tHb</i>	totales Hämoglobin in g/dl
<i>fetHb</i>	fetales Hämoglobin in g/dl
<i>O₂Hb</i>	Oxihämoglobin in Prozent
<i>HHb</i>	Desoxihämoglobin in Prozent
<i>COHb</i>	Carboxihämoglobin in Prozent
<i>MetHb</i>	Methämoglobin in Prozent
<i>SulfHb</i>	Sulfdihämoglobin in Prozent

1.3 sonstige Begriffe

<i>Precision</i>	Grad der Reproduzierbarkeit
<i>Accuracy</i>	Grad der Abweichung vom wahren Wert

1.4 Bemerkung

Üblicherweise wird heute für das Konzentrationsmaß nicht mehr g/dl oder mg/dl verwendet, es wird die sogenannte Molarität (mol/l) und die Normalität bzw. Äquivalentkonzentration ($\text{val/l} = \text{mol} \cdot \text{Wertigkeit} \cdot 1^{-1}$) verwendet [ST07].

Im medizinischen Sprachgebrauch, im Speziellen auch in der Oxymetrie, der optischen Messtechnik des menschlichen Blutes, hat sich die alte Schreibweise für das Konzentrationsmaß aber gehalten und es wird daher in der vorliegenden Arbeit diese Art der Beschriftung beibehalten.

1.5 Umrechnungsfaktoren

Parameter	Einheit	Faktor	Einheit
Hämoglobin	g/dl	0.6206	mmol/l

Tabelle 1: Umrechnungsfaktoren

2 Einleitung

2.1 Vorwort

Die Bestimmung der Menge des Hämoglobins im Vollblut ist eine der wichtigsten Untersuchung eines Parameters des menschlichen Blutes. Trotzdem wird diese Bestimmung mit weniger Sorgfalt und mit weniger genauen Methoden durchgeführt als alle anderen Untersuchungen der wesentlichen Bestandteile des Blutes des menschlichen Körpers. [Cam41].

Seit der Publikation der oben genannten Aussage wurden bis heute viele Fortschritte und Verbesserungen in der Methodik und der Instrumentierung dieser Bestimmung durchgeführt und publiziert. Auf ausgewählte Methoden wird im Kapitel 8 näher eingegangen.

Bei der Bestimmung eines neuen Messparameters ist die Entwicklung einer Referenzmethode und in weiterer Folge eine breite Akzeptanz dieser Referenzmethode ein sehr wichtiger Schritt. Durch Literaturrecherche konnte solch eine Referenzmethode gefunden werden. Weiters ist auch die Erstellung von Kalibrations- Standards für die Akzeptanz der Methode ein sehr wichtiger Schritt [fCLS94], den es ebenfalls zu berücksichtigen galt.

Da all diese Aspekte mit in die Erstellung dieser Diplomarbeit eingeflossen sind, wird in Kapitel 10.1 auch auf das Aufsuchen der Referenzmethode näher eingegangen.

2.2 Motivation

Die Idee hinter dieser Diplomarbeit ist es, ein bereits vorhandenes System zur Blutgasanalyse so anzupassen, dass Messungen von Hämoglobin, des roten Blutfarbstoffes, in einem Bereich sehr niedriger Konzentrationen möglich sind.

Diese Forderung zielt darauf ab, freies Hämoglobin im Blutplasma vermessen zu können. Der aktuelle Messbereich des vorhandenen Messsystems, **cobas b 221 System**, liegt zwischen 3 bis 25 g/dl für totales Hämoglobin [Sch08]. Der gewünschte Zielbereich des Parameters freies Hämoglobin liegt zwischen 0.005 und 0.4 g/dl, also zwischen 5 und 400 mg/dl.

Um die Hämolyse, siehe Kapitel 3.4, die Zerstörung der roten Blutkörperchen und das Freitreten des darin gebundenen Hämoglobins, im menschlichen Blut nachweisen und auch quantifizieren zu können, wird schon seit über 70 Jahren an Methoden für die Messung des freien Hämoglobins im Blutplasma gearbeitet. Bis heute stehen in der Humanmedizin verschiedene Messmethoden für das freie Hämoglobin im Plasma zur Verfügung. Speziell auf die spektralphotometrischen Messmethoden wird näher eingegangen, diese werden in Kapitel 7.2 beschrieben.

Die physiologische Konzentration des freien Hämoglobins im Blutplasma beträgt bei einem Erwachsenen zwischen 0.37 und 3.17 $\mu\text{mol/l}$ [BB94]. Diese Werte entsprechen 0.596 bis 5.11 mg/dl und variieren je nach körperlichem Zustand der Person.

Werden durch Hämolyse mehr Erythrozyten als natürlich abgebaut, steigt der Wert von freiem Hämoglobin. Ein Teil dieses freien Hämoglobins kann durch Haptoglobin, siehe

Kapitel 3.6, gebunden werden. Ab einer Konzentration von 100 mg/dl ist die Transportkapazität des Haptoglobins aber erschöpft. Es tritt somit freies Hämoglobin auf, welches über die Nieren ausgeschieden wird. Das freie Hämoglobin ist somit ein möglicher Indikator für eine Hämolyse.

Ein Bedarf an der Vermessung von freiem Hämoglobin besteht bei der Überwachung von Akutpatienten in Intensivstationen, bei Qualitätskontrollen von Arzneimittelherstellenden Betrieben, oder bei der Kontrolle von Blutkonserven in Blutbanken.

Aus diesen Forderungen folgt, dass das freie Hämoglobin ein wichtiger Parameter ist, der bis heute noch nicht zufriedenstellend genau bestimmt werden kann bzw. einen umständlichen Messablauf erfordert und somit großteils auf die Bestimmung verzichtet wird. Könnten aber die Kosten je Messung verringert und der Messablauf vereinfacht werden, wäre fHb ein „must-have“-Parameter [Rue10].

Weiters ist gefordert, die vorhandene Software so anzupassen, dass keine Hardwareseitigen Veränderungen notwendig sind und die Messungen an freiem Hämoglobin ohne Beeinflussung der weiteren Parameter im gesamten Messbereich durchgeführt werden können. Dies soll weiters zu einer genauen Feststellung der Leistungsfähigkeit des vorhandenen Algorithmus und zur weiterführenden Adaption dieses Algorithmus führen.

2.3 Aufgabenstellung

Das Ziel der Arbeit ist, für das bereits vorhandene System zur Blutgasanalyse, das **cobas b 221** System, eine neue Möglichkeit zu finden, das optische Messsystem, genauer die verwendete Algorithmik, dahingehend zu erweitern, dass Messungen des fHb im geforderten Auflösungsbereich möglich sind.

Die Einführung des neuen Parameters freies Hämoglobin umfasst eine Literaturrecherche in den Bereichen optische Messtechnik und medizinische Diagnostik, die Weiterentwicklung des Algorithmus der Multikomponentenanalyse, das Identifizieren einer weitgehend akzeptierten und zuverlässigen Referenzmethode, das Erstellen von Referenzreihen und das Feststellen von Einflüssen anderer Blutderivate (MetHb, COHb, O₂Hb) auf das Messergebnis und das Charakterisieren anderer Störfaktoren, Lipide, Pharmaka, Infusionslösungen, die Konzentrations- und Patientenabhängig sind.

Die laut Lastenheft durchzuführenden Punkte sind:

- eine Literaturstudie zum Thema freies Hämoglobin, die Suche nach Publikationen bereits vorhandener Referenzmethoden und weiters die Suche nach bereits verwendeten Messmethoden
- das Identifizieren und Charakterisieren einer Referenzmethode für fHb
- ein Referenzmethodenvergleich der HICN- (Hämoglobin- Cyanid) Methode mit der AHD- (Alkalisches- Hämatin- Detergens) Methode

- die Charakterisierung des vorhandenen Algorithmus und dessen Performance
- eine Adaptierung des Algorithmus, der mathematischen Funktionen und eine Implementierung einer neuen Regressionsmethode („non- negative- least- squares- Methode“)
- die Charakterisierung und Anpassung der neuen Methode im gesamten Wellenlängenbereich (VIS- Bereich von 459 nm bis 666 nm)
- die Ermittlung und Charakterisierung etwa 15 verschiedener relevanter Interferenzen
- weiters soll im Lauf der Arbeit mit Hilfe extern ermittelter Messergebnisse die Messperformance gezeigt werden und somit intern ermittelte Ergebnisse bestätigt werden
- ein Einbau von Korrekturfaktoren in die Entwicklungs- Software

2.4 Messsystem

Ein Messsystem für Blutderivate ist bereits vorhanden. Das Prinzip des Systems ist „State of the Art“ und bereits hinreichend beschrieben und publiziert. Trotzdem soll hier kurz auf die Grundlagen der Oxymetrie eingegangen werden.

Das sogenannte Oxymeter- Modul ist ein optisches Sensormodul zur Bestimmung verschiedener Hämoglobinderivate. Weiters werden mit diesem Modul auch Totalhämoglobin und das Abbauprodukt Bilirubin quantifiziert. Die messtechnische Erfassung erfolgt photometrisch. Die Bestimmung der Hämoglobinderivate erfolgt nach dem Lambert- Beer'schen Gesetz.

Die Absorption vom sichtbaren Licht (VIS) bei 512 verschiedenen diskreten Wellenlängen wird zwischen 459 nm und 666 nm aufgenommen. Daraus resultiert ein Gleichungssystem, welches stark überbestimmt ist. Es sind sehr viel mehr Wellenlängen als zu bestimmende Parameter vorhanden. Daraus kann auf die Konzentrationen der Hämoglobinderivate und auf die Konzentration des Totalhämoglobins geschlossen werden [Sch08].

Im Fall der Vermessung von freiem Hämoglobin ist die Probe kein hämolysiertes Blut, sondern abgetrenntes Blutplasma. Dieses wird durch Zentrifugation von Vollblut und das darauffolgende Abheben des Plasmas gewonnen. Diese Probe muss nicht mehr zwingend hämolysiert werden, da die korpuskulären Bestandteile bereits entfernt wurden und das zu vermessende Hämoglobin frei im Plasma gelöst ist. Eine zusätzliche Homogenisierung, durch die Hämolysierung (Mikrozirkulation), wirkt sich jedoch nicht negativ auf das Messergebnis aus.

Das bekannte Messsystem besteht aus folgenden Komponenten (Prinzipdarstellung):

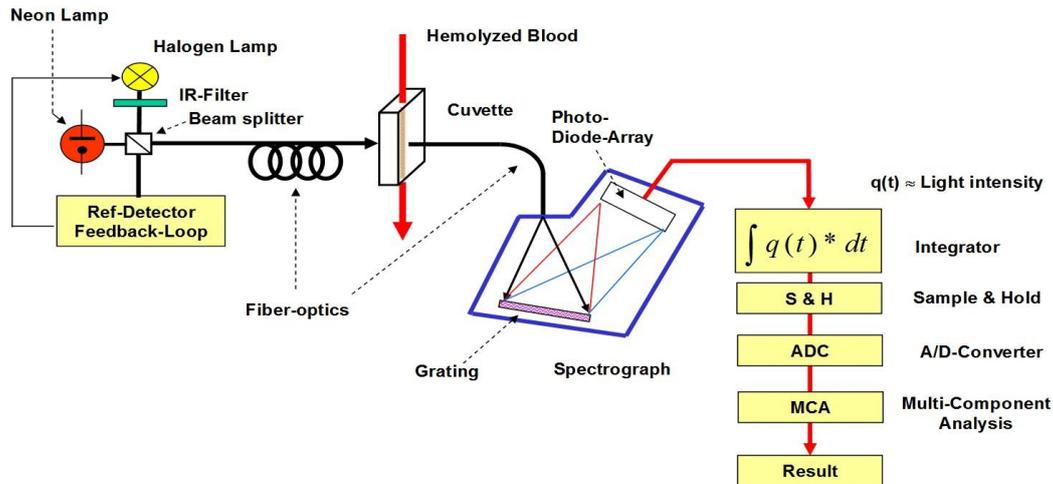


Abbildung 1: Prinzipdarstellung **cobas b 221** System [Dia98]

In Abbildung 1 ist ersichtlich, dass das Licht der Halogenlampe mit Hilfe eines Lichtleiters zur Küvette gelenkt wird. Das Licht wird beim Durchtritt der Küvette und der Probe abgeschwächt, Teile des Lichtes werden absorbiert. Somit gibt die resultierende Absorption Auskunft über die Zusammensetzung der Probe.

Das nicht absorbierte Restlicht wird über einen weiteren Lichtleiter zum Polychromator geführt. Hier wird das Licht zuerst in seine Einzelwellenlängen gebeugt, danach wird es auf einem photosensitiven Array (Photodioden-Array) abgebildet. Aus dem resultierenden elektrischen Signal wird zuerst die Absorption bestimmt und dann in weiterer Folge die daraus resultierenden Konzentrationen der verschiedenen Hämoglobinderivate berechnet [Sch08].

Um die Streueffekte der Probe zu minimieren, wird die Probe bevor sie in die Küvette geleitet wird, hämolysiert. Die Hämolyse erfolgt durch Anlegen eines Ultraschallfeldes. Dieser Aspekt ist vor allem bei der Vollblutmessung zu berücksichtigen, siehe auch Kapitel 6.4.

Bei der Vermessung des Blutplasmas enthält die Probe wenige feste Zellbestandteile, was den Störeinfluss, die Lichtstreuung und die Lichtbeugung, geringer werden lässt. Weiters befindet sich das Hämoglobin nicht mehr gebunden in den Erythrozyten, sondern nur noch als freies Hämoglobin in der Probe. Somit ist eine Hämolyse nicht mehr zwingend erforderlich.

2.5 Blutgasanalysegerät **cobas b 221** System

Die Vermessung der Proben erfolgt zum Großteil mit Hilfe des **cobas b 221** Systems, S.Nr. 5653 der Firma Roche Diagnostics. In Abbildung 2 ist dieses Blutgasanalyse-System dargestellt.

2.5.1 Messparamter

Das **cobas b 221** System ist ein Analysator mit integriertem AutoQC- Modul als Option. Je nach Kombination und Ausbaustufe werden folgende Parameter in humanem Vollblut, Serum, Plasma, in acetat- und bicarbonathaltigen Dialysatlösungen und QC- Materialien gemessen:

- pH
- Blutgase- BG (PO_2 , PCO_2)
- Elektrolyte- ISE (Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+})
- Hämatokrit (Hct)
- Metabolite- MSS
- Totalhämoglobin (tHb)
- Sauerstoffsättigung (SO_2)
- Hämoglobinderivate- COOX (O_2Hb , HHb , $COHb$, $MetHb$)

2.5.2 Anwendungsbereich

Das Gerät ist für die Messung von Parametern in humanem Vollblut, Serum, Plasma und Dialysatlösungen (nur Elektrolyte) konzipiert und daraufhin sind die Spezifikationen oder Leistungsmerkmale der Messwerte geprüft.



Abbildung 2: Darstellung **cobas b 221** System, Serienblutgasanalysator [Dia98]

Für den Nachweis der explizit im Plasma vorhandenen Häm- Anteile gibt es aber bis heute noch keine geeignete Methode bzw. kein eigenständiges System [Wea06].

2.6 Einsatzgebiet Point- of- Care Diagnostik

Die sogenannte Point- of- Care Diagnostik ist die Diagnostik direkt am Patientenbett. Das Point- of- Care- Testing (POCT), hat sich als feste Größe in der Mehrzahl der Kliniken etabliert. Schnell verfügbare Messergebnisse zur sofortigen Therapieentscheidung und einfach zu bedienende Systeme sind Merkmale dieser Art der Diagnostik. Somit ist dieser Bereich zu einem essentiellen Bestandteil der Patientenbetreuung geworden.

Da freies Hämoglobin ab einer Konzentration von mehr als 100 mg/dl eine toxische Substanz für den menschlichen Körper ist, kann eine Schädigung der Nieren eintreten. Daher besteht ein Interesse an einer schnellen und korrekten Diagnose.

Die Einsatzgebiete für ein Gerät, das in der Lage ist, sehr schnell freies Hämoglobin zu bestimmen, sind nachfolgend angeführt:

- bei Blutarmut/Anämie:
 - bei mechanisch verursachter Anämie, hervorgerufen durch Stents, Herz- Lungen- Maschine oder ähnlichen Ursachen
 - bei autoimmuner hämolytischer Anämie, z.B. verursacht durch Blut- Transfusionen
 - bei Anämie, die durch Infektionen verursacht ist, z.B. Sepsis, Malaria
 - bei Hypersplenismus (Vergrößerung der Milz), z.B. verursacht durch Leberzirrhose (Erythrozyten- Verringerung in der Milz)
- bei Ischämie (Blutleere) lebenswichtiger Organe, z.B. bei Herz, Lunge, Niere
- bei Hämoglobinurie (Ausscheidung von Hämoglobin über den Harn), als eine Reaktion auf eine akute Anämie
- als Marker für Patienten- Stress nach OP, vor allem bei Operationen mit extrakorporalem Blutfluss
- als Qualitätskontrolle von Spenderblut

2.6.1 Hintergrund Intensivstation- Patienten

Ein weiteres Einsatzgebiet der Messung von freiem Hämoglobin in der Point of Care Diagnostik ist das Monitoring von Intensivstations- Patienten. Es liegt zum Beispiel bei einem Darm- Verschluss ein spezielles Interesse an der Messung von freiem Hämoglobin vor, da der Darm nicht unter Kontrolle von externen Geräten gestellt werden kann, wie es bei Herz, Lunge oder der Niere möglich ist. Die Sterblichkeits- Rate beträgt hier zwischen 10 und 25 Prozent [Rue10].

2.7 Einsatzgebiet Blutbanken

Das freie Hämoglobin im Plasma ist ein essentieller Parameter der Qualitätskontrolle von Spenderblut. Das akzeptierte obere Limit beträgt 0.8 % der gesamten Masse an Erythrozyten [EP99]. Aufgrund des Fehlens eines Diagnostic- Tools wird das Spenderblut nach der Einlagerzeit verworfen.

Freies Hämoglobin, ein Indikator für Hämolyse, ist für Blutbanken ein Parameter zur Qualitätskontrolle bei gelagerten Erythrozytenkonzentraten. Unsachgemäße Lagerung bei der Tiefgefrierung und ungenügende Deglycerolisierung der Erythrozyten sind typische Bedingungen, bei denen Hämolyse auftreten kann und die Konzentration an freiem Hämoglobin inakzeptabel hohe Werte erreichen kann [AB98].

In Blutbanken kann somit der Parameter „freies Hämoglobin“ zur Analyse der Lagerungsdauer von Blutkonserven verwendet werden. In weiterer Folge gibt der Parameter fHb Aufschluss darüber, ob die Blutkonserve dem Patienten noch verabreicht werden darf.

Zurzeit liegt der Ausschuss von Spenderblutkonserven in Blutbanken, am Ende der Aufbewahrungsperiode einer Blutkonserve, bei ca. 5 bis 10 %. Eine Aufbewahrungsperiode dauert üblicherweise 42 Tage. Dieser Ausschuss entspricht ca. 4 bis 8 Millionen Beutel pro Jahr, das entspricht schätzungsweise einem Verlust von 500 bis 1000 Mio. Euro pro Jahr in Blutbanken weltweit.

Da keine Überprüfung des fHb- Wertes erfolgt, wird die Konserve nach 42 Tagen verworfen. Wäre eine Untersuchung des fHb- Wertes schnell und unkompliziert möglich, so könnte die Aufbewahrungsperiode verlängert werden und man könnte somit den Ausschuss verringern [Rue10].

3 Physiologische Grundlagen

In diesem Kapitel sollen die zugrundeliegenden physiologischen Grundlagen kompakt zusammengefasst werden. Dabei wird bewusst auf ausführliche Erklärungen verzichtet, da hierfür die Sekundärliteratur zur Verfügung steht.

Der Sinn und Zweck dieses Abschnittes ist eine Darlegung der wichtigsten biologischen Zusammenhänge, auf welche in den folgenden Abschnitten bei Bedarf verwiesen werden kann.

3.1 Blut- Zusammensetzung

Das menschliche Blut ist eine undurchsichtige rote Flüssigkeit. Sie besteht aus gelblichem Blut- Plasma und aus den darin suspensierten festen Blut- Bestandteilen. Diese sind die roten Blutzellen, die sogenannten Erythrozyten, die weißen Blutzellen, die sogenannten Leukozyten und die Blutplättchen, die sogenannten Thrombozyten. Ist das Blut- Plasma vom Fibrinogen getrennt, so wird es als Serum bezeichnet.

Da das menschliche Vollblut leicht zu gewinnen ist, spielt es in der klinischen Diagnostik eine sehr wichtige Rolle. Bei diversen Erkrankungen ergeben sich typische Abweichungen der Eigenschaften und Zusammensetzung der Bestandteile des Blutes, die zur Diagnose herangezogen werden können [ST07].

3.1.1 Aufgaben der Blutzellen und des Plasmas

- **die Transportfunktion:** Das Blut transportiert die Atemgase physikalisch gelöst und chemisch gebunden. Sauerstoff O_2 von der Lunge zum Gewebe und Kohlendioxid CO_2 vom Gewebe zurück zur Lunge. Blut bringt Nährstoffe vom Ort der Aufnahme (Resorption oder Speicherung) zum Ort des Verbrauchs. Weiters ist das Blut auch für den Hormon- und Vitamintransport zuständig. Das Blut verteilt zusätzlich die im Stoffwechsel gebildete Wärme und sorgt auch für deren Abführung.
- **die Milieufunktion:** Beim Kreislauf des Blutes durch den Körper werden die Zusammensetzung und die physikalischen Eigenschaften durch zuständige Organe ständig kontrolliert und wenn nötig korrigiert. Somit stellt sich der Zustand der Homöostase ein. Dieser Zustand zeichnet sich durch die Konstanz der Konzentrationen gelöster Stoffe, der Temperatur und des pH- Wertes aus.
- **die Abwehrfunktion:** Bewerkstelligt die Fähigkeit des Körpers, auf eingedrungene Fremdkörper und Krankheitserreger Antikörper zu bilden und somit die Erreger unschädlich zu machen. Diese Fähigkeit ist den phagozytierenden und antikörperbildenden weißen Blutzellen zuzuschreiben.
- **Schutz vor Blutverlust:** Das Blut besitzt die Fähigkeit Blutungen entgegenzuwirken. Blutungen können durch den Verschluß kleiner verletzter Gefäße und durch Gerinnung des Blutes gestillt werden [ST07].

3.1.2 Erythrozyten

Die Blutzellen haben alle eine unterschiedliche Größe und sind in unterschiedlicher Menge vorhanden. Die roten Blutkörperchen sind die größte Gruppe, mit einer Konzentration von $5 \cdot 10^{12}$ Zellen/Liter. Ihre Hauptaufgabe ist der Sauerstofftransport von der Lunge zum Gewebe sowie der CO_2 -Transport vom Gewebe zurück zur Lunge. Diese Stoffe binden sich an das Hämoglobin, welches der Hauptbestandteil der roten Blutkörperchen ist [Sch08].

Die Erythrozyten sind kernlos, ihre kernhaltigen Vorgänger werden im Knochenmark gebildet. Die Form der roten Blutkörperchen ähnelt der einer Kugel die von zwei Seiten zu einer flachen Form eingedrückt wurde, einer bikonkaven Form. Dadurch ergeben sich kleine Wegstrecken für Diffusionsprozesse. Die Austauschvorgänge sind ebenfalls durch die größere Oberfläche begünstigt. Die roten Blutkörperchen haben einen durchschnittlichen Durchmesser von $7.5 \mu\text{m}$ und ein durchschnittliches Volumen von 87 fl .

Die roten Blutkörperchen sind in der Lage sich sehr stark zu verformen, um eventuelle Engstellen in Arterien und Venen auch passieren zu können. Sie bestehen aus einer wasserdurchlässigen Membran, welche eine Veränderung der Größe zulässt.

Die Erythrozytenanzahl variiert je nach Geschlecht. Bei Frauen beträgt sie 4.0 bis $5.2 \cdot 10^{12}$ Zellen/l, bei Männern beträgt sie 4.5 bis $5.9 \cdot 10^{12}$ Zellen/l.

3.1.3 Hämatokrit- Wert

Der Anteil der roten Blutkörperchen, der Erythrozyten, am gesamten Blutvolumen wird Hämatokrit bezeichnet. Dieser Anteil beträgt bei einer gesunden erwachsenen Frau 41 bis 43% und bei einem gesunden erwachsenen Mann 44 bis 46% . Kleinkinder haben um einen 10% geringeren Wert als Frauen. Bei Neugeborenen beträgt der Wert um 20% mehr als bei Frauen. Die Blutviskosität nimmt mit erhöhtem Hämatokrit überproportional zu [Gei79], [Win81], [ST07].

3.2 Hämoglobin

Das Hämoglobin ist, wie schon in 3.1.1 beschrieben, für den Transport von Sauerstoff und Kohlendioxid verantwortlich. Es ist ein konjugiertes Protein, bestehend aus vier Aminosäuren-Ketten, welche ein einfaches Protein formen. Dieses besteht aus 2α - und 2β -Ketten. Weiters befindet sich das Häm im roten Blutkörperchen, bestehend aus einem Eisen-Atom und Protoporphyrin IX, dem roten Pigment.

Das Eisen-Atom ist der Teil des Blutes, der sich leicht an Sauerstoff und Kohlendioxid binden kann, weiters gibt es dem roten Blutkörperchen die charakteristische rote Farbe.

Die Sauerstoffbindungskapazität ist direkt proportional der Hämoglobin - Konzentration. Sie ist nicht direkt abhängig von der Menge der roten Blutkörperchen, da die Menge von Hämoglobin von Blutkörperchen zu Blutkörperchen verschieden ist. Zur Erkennung von

Blutanämie ist es wichtiger das Hämoglobin zu bestimmen, als die Anzahl der Erythrozyten [Sch08].

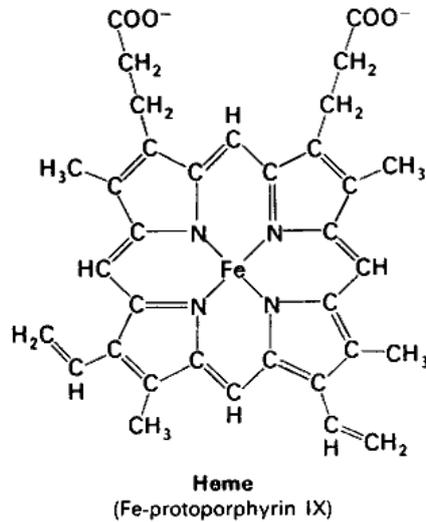


Abbildung 3: Hämoglobinstruktur chemisch [Pra98]

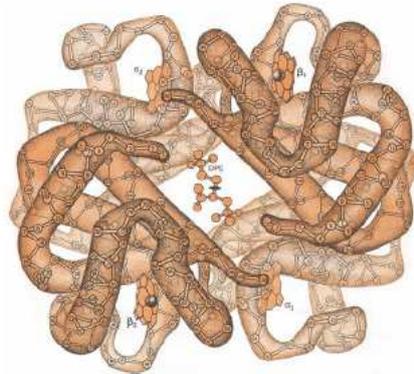


Abbildung 4: Hämoglobinstruktur schematisch [ST07]

Die Normwerte der Konzentration des totalen Hämoglobins im Vollblut betragen für Frauen 12.0 bis 15.0 g/dl und für Männer 13.9 bis 16.3 g/dl. Die molare Masse von Hämoglobin beträgt 64.458 g/mol.

3.2.1 Totales Hämoglobin tHb

Die Konzentration des totalen Hämoglobins in g/dl wird aus der Summe aller Blutderivate bestimmt. Die Berechnung erfolgt nach folgender Formel:

$$c_{tHb} = c_{COHb} + c_{O_2Hb} + c_{HHb} + c_{MetHb} \quad (g/dl) \quad (1)$$

$c_{Derivate}$ bezeichnet die jeweilige Konzentration des genannten Derivats. Das freie Hämoglobin (fHb) ist das totale Hämoglobin (tHb) gemessen im natürlichen Blutplasma.

3.2.2 Oxy- Hämoglobin O₂Hb

Bindet jede Gruppe des Hämoglobin- Moleküls mit einem Sauerstoffmolekül, so wird das Hämoglobin als Oxyhämoglobin bezeichnet. Die sogenannte Oxyhämoglobin Fraktion bezeichnet den Prozentsatz des Oxyhämoglobin im Vergleich zum totalen Hämoglobin. Der dabei gebundene Sauerstoff bildet den größten Anteil des gesamten Blutsauerstoffs, ca. 98 %. Die Sauerstoff- Affinität des Hämoglobins, der Gradient der Sauerstoff- Bindungs- Kurve hängt von verschiedenen Parametern ab. Der Sauerstoff bindet weniger leicht an das Hämoglobin, wenn

- eine Temperatur- Erhöhung erfolgt,
- eine Erhöhung des CO₂- Partial- Druckes erfolgt und
- eine Verringerung des pH- Wertes auftritt.

Der CO₂ und der H⁺ Einfluss auf die O₂ Bindungskurve ist als der Bohr- Effekt in der Literatur bekannt. Dieser beeinflusst den O₂ Austausch zwar in einem nur sehr geringen Ausmaß, soll hier der Vollständigkeit halber aber auch erwähnt sein.

3.2.3 Desoxy- Hämoglobin HHb

Das Desoxy- Hämoglobin ist ein Hämoglobin, welches ein Sauerstoff- Molekül binden kann. Dies erfolgt am divalenten Eisen- Atom der Häm- Gruppe.

Die Summe aus Desoxy- Hämoglobin und Oxy- Hämoglobin, sind die Derivate, die die Möglichkeit besitzen Sauerstoffatome im Blut zu transportieren. Das Desoxy- Hämoglobin wird auch als funktionelles Hämoglobin bezeichnet.

3.2.4 Carboxy- Hämoglobin COHb

Das Hämoglobin besitzt wie schon erwähnt die Fähigkeit, sowohl Sauerstoff als auch Kohlenmonoxid zu binden. Dies erfolgt in gleicher Anzahl. Eine Häm- Gruppe des Hämoglobins kann entweder ein Kohlenmonoxid- Molekül oder ein Sauerstoff- Molekül binden. Der Unterschied besteht nur in der Bindungs- Affinität. Das Kohlen- Monoxid Molekül bindet 200 bis 300 mal stärker an die Häm- Gruppe als das Sauerstoff- Molekül.

Somit ist ein Aussetzen des menschlichen Körpers von geringen Mengen von Kohlenmonoxid auch bei sehr kurzen Zeiträumen lebensbedrohlich. Es führt zu einer lebensbedrohlichen COHb- Konzentration im Blut. Geringste Kohlenmonoxid- Konzentrationen reichen aus, dass der Sauerstofftransport im Blut gehemmt beziehungsweise komplett unterdrückt wird.

Der Effekt der „Blockade“ der Häm- Gruppe kann auch bei starken Rauchern beobachtet werden. Es kann ein Anstieg des COHb- Prozentsatzes im Blut nachgewiesen werden, bis

ca. 6 %.

Bei höheren COHb- Konzentrationen im Blut, von ca. 10 bis 20 %, treten Kurzatmigkeit und Kopfschmerzen auf. Konzentrationen von 30 bis 40 % verursachen visuelle Defekte und können bis zur Ohnmacht führen. Noch höhere Konzentrationen, von 50 bis 70 %, führen zu Krämpfen, einer Beeinträchtigung des ganzen Herz- Lungen Kreislaufs und können auch bis zum Koma führen. Treten Konzentrationen von über 70 % auf, führt das üblicherweise zum Tod.

3.2.5 Meth- Hämoglobin MetHb

Meth- Hämoglobin entsteht bei der Oxidation des Eisen- Anteils des Hämoglobins vom bi- zum trivalenten Zustand. Somit wird die Fähigkeit, Sauerstoff zu binden, reduziert. Fe_{3+} ist nicht mehr fähig, Sauerstoff reversibel zu binden. Das Meth- Hämoglobin wird gebildet durch:

- organische Oxidanzien
- anorganische Oxidanzien
- Pharmazeutika

Das Enzym Meth- Hämoglobin Reduktase ist verantwortlich für die Umwandlung von Meth- Hämoglobin zurück in Hämoglobin. Der Anteil von Meth- Hämoglobin im Blut übersteigt normalerweise nicht den Wert von 1%. Trotzdem werden Konzentrationen bis zu 20 % akzeptiert. Es treten keine Patienten- Beschwerden auf. Konzentrationen von 30 bis 40 % verursachen Übelkeit, Brechreiz, sowie Cyanose und Kopfschmerzen. Übersteigt die Konzentration einen Wert von 40 % wird eine Therapie vorgeschlagen.

Ablauf der Therapie: Während der gesamten Dauer der Therapie wird dem Patienten der Farbstoff Methylenblau verabreicht. Dies erfolgt durch eine intravenöse Injizierung. Dieser Farbstoff produziert zwar auch Meth- Hämoglobin, ist aber weiters fähig die enzymatische Degeneration von hohen Meth- Hämoglobin Konzentrationen zu beschleunigen. Dies führt am Ende zu einem Gleichgewicht, zu einer Konzentration von Meth- Hämoglobin, die den Wert 10 % nicht übersteigt.

Der Farbstoff Methylenblau ist aber auch ein Interferent bei der photometrischen Bestimmung von fHb. In Kapitel 12.8 wird die Erstellung einer Korrekturfunktion und die Überprüfung ihrer Funktionsfähigkeit betrachtet.

3.3 Blut- Plasma

Das Blutplasma ist der extrazelluläre Anteil des Blutes. Es ist eine klare, gelbliche Flüssigkeit. In Abhängigkeit des enthaltenen freien Hämoglobins kann sich die Farbe in leicht rötlich ändern. Das menschliche Blutplasma enthält pro Liter ca. 0.9 l Wasser, 9 g Elektrolyte, 72 g Proteine und 20 g niedermolekulare organische Substanzen [ST07].

Das spezifische Gewicht von Plasma beträgt 1.0225 bis 1.0290. Der pH- Wert von Plasma schwankt sehr gering zwischen 7.37 bis 7.43 um einen Mittelwert von 7.4 im arteriellen Blut. [ST07]

Für die Aufrechterhaltung der vollen Funktionsfähigkeit der Zellen des menschlichen Körpers ist die Isotonie des Blutplasmas eine Grundvoraussetzung. Diese beschreibt die Aufrechterhaltung eines konstanten osmotischen Druckes. Zusätzlich zur Isotonie ist eine Isoionie erforderlich, die besagt, dass das Vorhandensein bestimmter Ionen in einem bestimmten Verhältnis bewerkstelligt sein muss. [ST07]

Im Blutplasma sind weiters 65 bis 80 g/l einer Mischung von Proteinen gelöst, die alle unterschiedliche Molekulargewichte aufweisen. Durch diese Proteine hat das Plasma eine relativ hohe Viskosität, die das 1.9 bis 2.6 fache der Viskosität von Wasser beträgt.

Die Plasmaeweißkörper haben folgende Funktionen: eine Nährfunktion als schnell verfügbares Eiweißreservoir, eine Vehikelfunktion beim Transport von kleinmolekularen Stoffen, eine Trägerfunktion, die unspezifisch ist, bei der Bindung von Ionen in nichtdiffusibler Form. Weitere Funktionen sind die Erzeugung des kolloidosmotischen Druckes, eine Pufferfunktion der ampholytischen Plasmaeweißkörper, die zur Konstanthaltung des BlutpH- Wertes beiträgt, die Blutgerinnungsfähigkeit, die darauf beruht, dass der Plasmaeweißkörper Fibrinogen vorhanden ist und eine Schutz- und Abwehrfunktion des Blutes [ST07].

Die Albuminfraktion im Plasma erzeugt 80 % des kolloidosmotischen Druckes. Zusätzlich dienen das Albumin, wie auch andere Bestandteile wie α - und β - Globuline als Transportvehikel. Die γ - Globuline haben größtenteils eine Abwehrfunktion. Das Plasma enthält weiters Lipide, Kohlenhydrate und Aminosäuren. Die Konzentration dieser Stoffe ist davon abhängig welche Mahlzeiten der Patient zu sich nimmt und kann stark ansteigen. Weiters werden Hormone und auch Vitamine mit dem Blutplasma zu ihren Zielorten gebracht. Substrate, wie zum Beispiel die Milchsäure, können nach dem Transport wieder von Zellen aufgenommen werden. Zu guter Letzt werden stickstoffhaltige Stoffwechselendprodukte zu ihrer Ausscheidung in die Nieren transportiert [ST07].

3.4 Beschreibung der natürlichen Hämolyse

Die Hämolyse beschreibt die Zerstörung der roten Blutkörperchen (Erythrozyten) im menschlichen Körper. Hierbei wird zwischen der physiologischen Hämolyse und der gesteigerten Hämolyse unterschieden. Die physiologische Hämolyse, die nach etwa 120 Tagen der Lebenszeit der Erythrozyten auftritt, ist bis zu einem gewissen Grad normal. Die zerstörten Erythrozyten werden in der Milz abgebaut. Bei der gesteigerten Hämolyse ist die Lebensdauer der Erythrozyten um ein Vielfaches geringer als 120 Tage. Wenn die Neubildung nicht mehr ausreicht, den Abbau der Erythrozyten zu kompensieren, kann es zu einer Anämie kommen [RPH05].

3.5 Freies Hämoglobin

Das freie Hämoglobin wird unter anderem durch den Abbau von roten Blutkörperchen auf unnatürlichem Wege in das Blutplasma freigesetzt. Das fHb im Blutplasma ist ein wichtiger Parameter zur Feststellung von Hämolyse, sowohl akut als auch chronisch. Eine Hämolyse kann zum Beispiel bei Patienten mit Herzklappenersatz, bei hämolytischen Anämien, bei Bluttransfusionen, bei Hämoglobinopathien und bei Infektionen mit bestimmten Erregern vorkommen [BB94].

Eine Erhöhung des freien Hämoglobins im menschlichen Blut geht auch meist mit einer schweren Erkrankung des Patienten einher [Rue10].

Das freie Hämoglobin ist ein Radikalfänger für Stickstoffmonoxid. NO besitzt eine Transportfunktion und hat einen starken Einfluss auf das vaskuläre System. Im Fall einer geringen NO- Konzentration durch zu hohe freie Hämoglobinwerte tritt eine Blutgefäßverengung auf und eine Aktivierung von Thrombozyten ist die Konsequenz daraus. Eine Schädigung der Organe ist dadurch möglich.

Da das freie Hämoglobin ein viel schnellerer Radikalfänger für Stickstoffmonoxid ist, ca. 500 bis 1000 mal schneller als das gebundene Hämoglobin in den Erythrozyten, ist eine Abnahme des NO- Levels bei einer Zunahme von freiem Hämoglobin zu beobachten.

Da weiters die Lebensdauer von NO im Plasma nur wenige Millisekunden beträgt, kann der NO- Gehalt nicht sehr zuverlässig gemessen werden.

3.6 Haptoglobin

Haptoglobin (Hp) ist ein Transport- und Akute- Phase- Protein, das zur Gruppe der α -2-Globuline gehört. Es wird von der Leber gebildet und in das Blutplasma abgegeben. Die Hauptaufgabe sind die Bindung und der Transport von Hämoglobin, um es dem Abbau im Retikuloendothelialen System (RES) zuzuführen. Somit wird die Ausscheidung von Eisen über die Nieren ermöglicht und eine Schädigung durch Hämoglobin verhindert [Pin68], [Mie69].

Eine leichte Zunahme von freiem Hämoglobin, wie zum Beispiel bei der chronischen Anämie, wird durch das Haptoglobin kompensiert. Dieses ist fähig, freies Hämoglobin zu binden.

Dieser Wert kann aber bei einer Leber- Erkrankung und einer eventuellen Entzündung dieser sehr stark verfälscht werden. Im Fall eines akuten hämolytischen Effekts ist die Transportkapazität von Haptoglobin stark limitiert, es kann nur 0.07 g/dl bis 0.15 g/dl des freien Hämoglobins an sich binden und die Menge von Haptoglobin korreliert in weiterer Folge nicht länger mit der Menge von fHb.

Somit ist Haptoglobin kein idealer Parameter um akute hämolytische Effekte zu detektieren. Es folgt daraus, dass die direkte Messung von fHb eine höhere Signifikanz aufweisen sollte als die Messung via Haptoglobin.

4 Physikalische Grundlagen

In diesem Kapitel werden die verwendeten physikalischen Grundlagen kompakt zusammengefasst. Es wird bewusst auf ausführliche Erklärungen verzichtet, da hierfür Sekundärliteratur zur Verfügung steht.

Der Sinn und Zweck dieses Abschnittes ist eine Darlegung der wichtigsten mathematischen Zusammenhänge, auf welche in den folgenden Abschnitten bei Bedarf verwiesen werden kann.

4.1 Absorption des Lichtes

Moleküle, wie auch Atome belegen bestimmte diskrete Energiezustände. Bei Aufnahme oder Abgabe von Energie sind Übergänge zwischen diesen diskreten Zuständen möglich. Die Änderung der von der Lichtquelle ausgehenden Strahlung beim Einführen eines absorbierenden Stoffes in den Strahlengang wird bei den Absorptionmessungen näher betrachtet. Das Messmedium entnimmt dem Licht beim Übergang von energieärmeren in den energiereicheren Anregungszustand einen Teil seiner Energie [Böc97], [Sch08].

Die Eigenschaften und der Zusammenbau eines Atoms können mit Hilfe des Bohr'schen Atommodells recht einfach beschrieben werden. Nach diesem schon überholten aber für diese Anwendung ausreichenden Modell besteht ein Atom aus einem positiv geladenen Kern und mehreren negativ geladenen Elektronen. Diese Elektronen umkreisen den Kern auf konzentrischen Bahnen. Jede dieser konzentrischen Bahnen entspricht einem bestimmten Energieniveau. Diese Bahnen werden auch als Orbitale bezeichnet.

Ist die zugeführte Energie gleich der Energiedifferenz von zwei benachbarten Energieniveaus, so ist es möglich, dass die Atome aus dem niedrigeren Zustand, dem Grundzustand, in ein höheres Energieniveau, den angeregten Zustand, wechseln können. Somit nimmt die Anzahl der Atome im Grundzustand ab und dementsprechend nimmt die Anzahl der Atome im angeregten Zustand zu.

Das heißt weiters, dass die Strahlung abgeschwächt und somit die Anzahl der Photonen nach Durchlauf weniger wird. Die Energie, die zur Anregung eines Elektrons benötigt wird, wird somit der einfallenden Strahlung entzogen. Weiters gilt, dass pro absorbiertem Photon maximal ein absorbierendes Teilchen angeregt werden kann.

Die Abschwächung der einfallenden Strahlung ist umso größer

- je besser die Wechselwirkung der Materie mit der einfallenden Strahlung ist,
- je mehr Teilchen im Medium vorhanden sind und somit mehr Strahlung absorbieren können,
- je höher die Konzentration des Analyten ist,
- und je länger der Weg ist, den die Strahlung durch das Medium durchlaufen muss.

Somit ist die Schichtdicke des Systems ein Parameter, der bei geringer Konzentration der Probe erhöht werden kann, sodass die Empfindlichkeit des Messsystems gesteigert werden kann.

4.2 Wellenlängenbereich des Messsystems

Bei dem vorhandenen System erfolgt die Vermessung von Vollblut im sichtbaren Bereich des Lichtes, genau von 459 bis 666 nm. Der Bereich wird in äquidistante Abstände unterteilt. Die Wahl auf das sichtbare Licht erfolgt aufgrund der charakteristischen Absorptionseigenschaften der Blutbestandteile in diesem Spektralbereich.

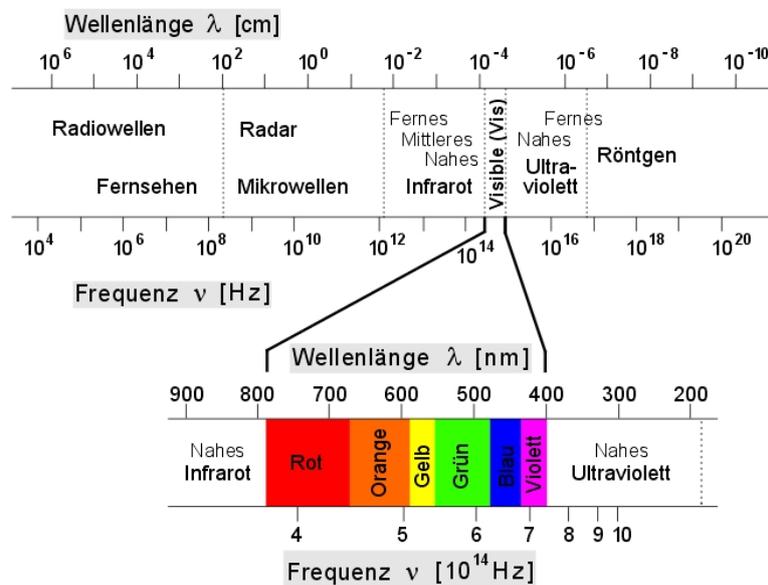


Abbildung 5: Wellenlängenbereich VIS [Hof11]

4.3 Lambert- Beer'sches Gesetz

Mit Hilfe der spektroskopischen Methode ist es möglich, eine Bestimmung der Konzentrationen von bestimmten Elementen in zumeist wässriger Lösung durchzuführen und damit die chemische Zusammensetzung eines Materials festzustellen. Sie beruht im Wesentlichen auf einer Farbreaktion der Atome eines bestimmten Elements des Analyten mit einer Reagent- Lösung und deren Auswertung mit Hilfe des Lambert- Beer'schen Gesetzes. [wik11b], [Sch08].

Das klassische Lambert-Beer'sche Gesetz ist aber nur dann gültig, wenn bestimmte Voraussetzungen erfüllt sind:

- der Einfall des Messlichtes muss senkrecht auf die Küvette des zu untersuchenden Mediums erfolgen
- das Zerlegen des Lichtes in seine Einzelkomponenten ist erforderlich und das Messlicht muss monochromatisch sein

- es sollte keine Wechselwirkung der Moleküle untereinander auftreten (Vermeidung sogenannter intermolekularer Wechselwirkungen)
- die Küvettenfenster müssen parallel zueinander ausgerichtet sein (Planparallelität muss vorherrschen)
- die Probe darf nicht inhomogen sein

Die Abnahme der Intensität dI in einem unendlich schmalen Schichtelement ds ist proportional zur Schichtdicke ds und der Konzentration c der Substanz. Weiters ist die Abnahme auch proportional zur Intensität I des in das Schichtelement einfallenden Lichtes. Der Proportionalitätsfaktor der Gleichung ist der Extinktionskoeffizient E_λ , welcher abhängig von der Wellenlänge des monochromatischen Lichtes ist, was durch den Index λ zum Ausdruck gebracht wird [Sch08].

$$dI = -E_\lambda \cdot I \cdot c \cdot ds \quad (2)$$

Zur Lösung dieser Differentialgleichung trennt man die Variablen und integriert sie in den gegebenen Grenzen. Die Integration erfolgt über den Weg s von $s = 0$ bis d sowie über die Intensität I von I bis I_0 .

$$\int_{I_0}^I \left(\frac{dI}{I} \right) = -E_\lambda \cdot c \cdot d \quad (3)$$

$$I = I_0 e^{-E_\lambda c d} \quad (4)$$

$$A = \log \left(\frac{I_0}{I} \right) = c \cdot E_\lambda \cdot d \quad (5)$$

Will man über das Lambert-Beer'sche Gesetz auf die jeweilige Konzentration von zwei verschiedenen Blutderivaten, wie z.B. HHb und O2Hb, schließen, so ergibt sich ein System mit zwei Unbekannten, welches über zwei Gleichungen gelöst werden kann.

$$A_{\lambda_1} = (c_1 E_{1,\lambda_1} + c_2 E_{2,\lambda_1}) \cdot d \quad (6)$$

$$A_{\lambda_2} = (c_1 E_{1,\lambda_2} + c_2 E_{2,\lambda_2}) \cdot d \quad (7)$$

Es ergibt sich ein Zwei-Wellenlängensystem, wobei in der Regel eine Wellenlänge bei einem Absorptionsmaximum und die andere bei einem isobestischen Punkt ($E_{1,\lambda_1} = E_{2,\lambda_1}$) gewählt wird. Der isobestische Punkt wird gewählt, um das Gleichungssystem möglichst einfach zu halten.

Damit das Gleichungssystem um weitere Parameter erweitert werden kann, ist für jede zusätzliche Unbekannte mindestens eine separate Absorptionsmessung bei unterschiedlicher Wellenlänge notwendig.

Wird, wie im verwendeten Messsystem, bei 512 Wellenlängen gemessen, so ergibt sich ein sehr stark überbestimmtes Gleichungssystem, welches die Vorteile des Auftretens einer höheren Rechengenauigkeit und vor allem einer größeren Robustheit gegenüber Interferenzen und Ausreißern mit sich bringt [Sch08].

4.3.1 Schichtdicke der Küvette

Die Definition des Lambert- Beer'schen Gesetzes besagt, dass eine Abnahme der Intensität des Messlichtes proportional mit der Konzentration c der gelösten Substanzen und der Schichtdicke d der Messkammer auftritt. Aus diesem Grund muss die optisch aktive Weglänge bekannt sein, um das System vollständig charakterisieren zu können. Ist das nicht der Fall, erfolgt bei der Berechnung der tHb- wie auch bei der fHb- Konzentration ein Fehler.

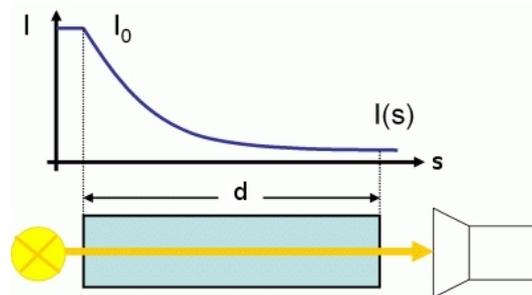


Abbildung 6: Schematisches Abbild der Küvette, Abschwächung der Lichtintensität nach Durchlauf des Mediums [Bre11]

Die im System eingebaute Küvette besitzt eine Soll- Schichtdicke von $100 \mu\text{m}$. Aufgrund von Schwankungen in der Produktion kann diese Soll- Schichtdicke vom tatsächlichen Wert abweichen. Es kann eine Schwankung von bis zu $15 \mu\text{m}$ auftreten und die Schichtdicke der jeweilig eingebauten Küvette muss nach dem Einsetzen vermessen werden. Nach dem Gesetz von Lambert- Beer entsprechen die $15 \mu\text{m}$ Abweichung einer Unsicherheit des freien Hämoglobin- Wertes von bis zu 15% [Sch08].

Um die tatsächliche Schichtdicke zu bestimmen, können die zwei folgenden Methoden angewendet werden:

Zum einen kann ein Vergleich zwischen dem gemessenen und dem zu erwartenden tHb- Wert für das Absorptionsspektrum erfolgen. Daraus kann ein Schichtdickenkorrekturfaktor d bestimmt werden. Die Schichtdickenbestimmung kann mit einer beliebigen Blutprobe erfolgen, bei welcher der tHb- Wert zuvor mit Hilfe einer Referenzmethode bestimmt wurde.

Zum anderen kann eine Farbstofflösung mit einer bekannten Absorption bei einer Schichtdicke von $100 \mu\text{m}$ vermessen werden. Als Farbstofflösung kann z.B. ein tHb- Calibrator der Firma Roche verwendet werden. Der Unterschied in der Absorption zum Sollwert kann dann als Schichtdicken- Korrekturfaktor angewendet werden.

Um den Einfluss von Probenfehlern, wie dem Einfluss der Hämolyse und in weiterer Folge ein Verstellen der Blutgaskonzentrationen im Blut, zu minimieren, sollte die Schichtdickenbestimmung mit Hilfe des tHb- Kalibrators erfolgen.

4.4 Absorptionseigenschaften von Blut

Das menschliche Vollblut ist in optischer Hinsicht ein eingefärbtes, trübes und partikelbehaftetes Medium. Das einfallende Licht wird in Abhängigkeit der Wellenlänge gedämpft und gestreut. Beim Durchtritt des Lichtes durch die Probe erfolgt eine sehr starke Dämpfung des kurzwelligen Lichtes, welches dem bläulichen Farbbereich des Lichtes entspricht. Weiters kommt es zu einer geringeren Dämpfung des weniger kurzwelligen Lichtes, welches dem roten bis infraroten Bereich des Lichtes entspricht und welches die charakteristische rote Farbe des Blutes bestimmt. Je nach Oxigenierung des Blutes ist diese rote Farbe heller oder dunkler.

Weiters tritt eine Streuung des Lichtes auf. Diese Streuung wird durch die im Blut befindlichen Zellen hervorgerufen. Ein weiterer Faktor, der die Dämpfung des Lichtes hervorruft und beeinflusst, sind die verschiedenen festen wie auch aufgelösten Blutbestandteile. Diese beeinflussen die Absorption in charakteristischen Wellenlängenbereichen [Neu11], [Sch08].

Zum Beispiel der Hauptbestandteil des Blutes, das darin enthaltene Wasser, dämpft infrarotes Licht bei einer Wellenlänge größer 1000 nm sehr stark. Eiweiße und Hämoglobin absorbieren im Bereich von 430 bis 560 nm, dem Grün- und Blaubereich des Lichtes sehr stark [Neu11].

Im nicht hämolysierten Vollblut findet an den vorhandenen Partikeln nicht nur die Absorption, sondern auch eine Streuung und Beugung des eingestrahnten Lichtes statt. Die von einer Lichtquelle ausgesandte Lichtintensität wird in Abhängigkeit der Wellenlänge absorbiert. Im Gegensatz dazu ist die Reflexion an den im Blut vorhandenen Zellen nur sehr gering frequenzabhängig. Durch die Komplexität des Streuvorganges, bedingt durch den bikonkaven Querschnitt, die Varianz der Form der Erythrozyten und die formbedingte hohe Anisotropie gibt es keinen mathematisch einfachen Zusammenhang zwischen der Konzentration der im Blut gelösten Stoffe bzw. der an das Hämoglobin gebundenen Gase und der detektierten Lichtschwächung.

Ganz ein anderes Bild zeigt sich, wenn das Blut vollständig hämolysiert ist und alle streuenden Zellfragmente entfernt sind. Das einfallende Licht der Intensität I wird ausschließlich absorbiert. Dieser Vorgang geschieht wieder wellenlängenabhängig und ortsunabhängig. Eine Gleichverteilung des im Plasma befindlichen Hämoglobins wird dabei vorausgesetzt und angenommen.

Auf das in Folge homogenisierte Medium kann nun zur Konzentrationsberechnung das Lambert-Beer'sche Gesetz angewendet werden, welches die konstante Dämpfung entlang eines Weges s in einem bestimmten Medium beschreibt. Nach der Integration folgt eine exponentielle Dämpfung des Lichtes in Abhängigkeit von der zurückgelegten Weglänge des Lichtes d , der Konzentration des dämpfenden Mediums c und dessen wellenlängenabhängigen Absorptionskoeffizienten [Sch08].

4.4.1 Absorptionsbanden

Als Folge des Vorhandenseins der konjugierten Doppelbindungen des Porphyrinringsystems absorbiert das Häm- Licht im sichtbaren Spektralbereich. Die Lage der Absorptionsbanden ist von der Wertigkeit des Eisens und der Art der Liganden abhängig. Die Bezeichnung Ligand steht für ein meist negativ geladenes Ion oder ein ungeladenes Molekül, das in Folge einer Komplexbildungsreaktion über eine sogenannte koordinative Bindung an ein Zentralteilchen, meist ein Metallkation, bzw. an ein Molekül gebunden ist [Sch08]. Daraus ergeben sich für verschiedene Hämoglobinderivate unterschiedliche Absorptionsmaxima.

- Oxyhämoglobin (O_2Hb), dieses Derivat besitzt eine hellrote Farbe. Es tritt eine typische Schwächung des Blauanteils (der sog. Soret- Bande) auf. Weiters bestehen zwei charakteristische Absorptionsbanden im gelben bzw. gelb- grünen Bereich des Spektrums, die Maxima liegen bei 577 und 541 nm.
- Desoxyhämoglobin (HHb), dieses Derivat besitzt eine bläulich violettrote Farbe, das Licht wird hier im langwelligen Bereich etwas stärker und im kurzwelligen Spektralbereich etwas schwächer absorbiert als bei dem O_2Hb . Das absolute Maximum liegt bei einer Wellenlänge von 555 nm.
- Carboxyhämoglobin (COHb), dieses Derivat besitzt eine dunkelrote Farbe. Das absolute Maximum liegt bei einer Wellenlänge von 545 nm, ein weiteres Maximum bei 575 nm.
- Methämoglobin (MetHb), dieses Derivat ist deutlich dunkler als das Oxyhämoglobin. Das absolute Maximum liegt bei einer Wellenlänge von 500 nm.

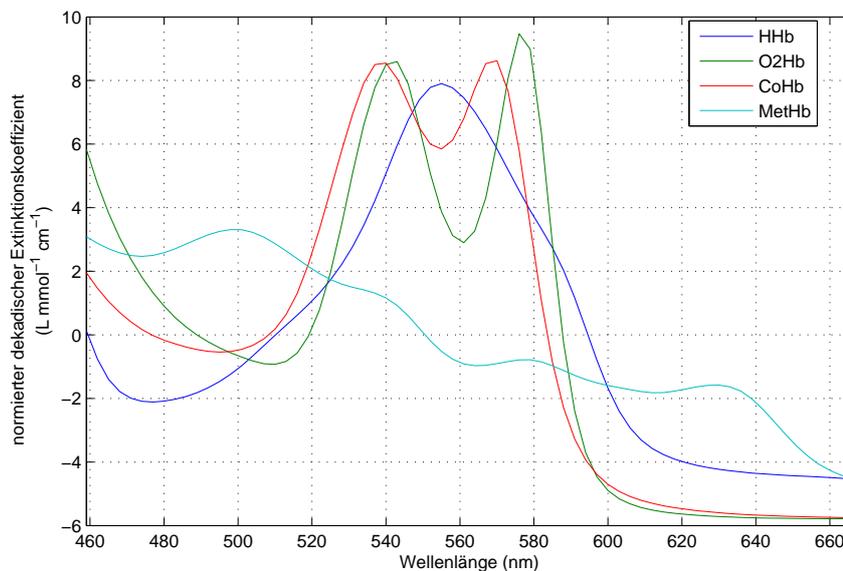


Abbildung 7: Auswahl der Referenzspektren **cobas b 221** System

In Abbildung 7 sind die zuvor angeführten Referenzspektren des **cobas b 221** System im sichtbaren Bereich dargestellt. Die Spektren sind mittelwertkorrigiert.

5 Mathematische/Statistische Methoden

Die Regressionsanalyse ist eine Sammlung von statistischen Analyseverfahren, welche das Ziel haben, Beziehungen zwischen einer abhängigen und einer oder mehreren unabhängigen Variablen festzustellen [Bac06].

5.1 Multiple lineare Regression, Ordinary Least Squares

Werden diese Variablen nicht von einer, sondern von mehreren bekannten Variablen, den sogenannten Prädiktor-Variablen beeinflusst, so kann dieses Problem über die multiple lineare Regression gelöst werden. Das allgemeine Modell dieser multiplen Regressionsanalyse geht von einer Kriteriumsvariable und n Prädiktorvariablen aus [Sch08].

Wird die Schichtdicke d vorerst als konstanter Faktor vernachlässigt, so lässt sich in vorliegendem Fall das zu lösende Problem mit der gemessenen Summenabsorption A als Kriteriumsvariable (Response), den Referenzspektren E als Prädiktorvariablen und den zu bestimmenden Koeffizienten c wie nachfolgend anschreiben [RM04], [Esb02], [Sch08].

$$A_\lambda = c_1 E_{\lambda,1} + c_2 E_{\lambda,2} + \dots + c_n E_{\lambda,n} + \epsilon_\lambda \quad (8)$$

Dieser Term entspricht der gemessenen Summenabsorption bei einer Wellenlänge. Da es sich um ein lineares Gleichungssystem handelt, können die Elemente des Systems in Matrix-Schreibweise zusammengefasst werden. Man erhält die Spaltenvektoren der abhängigen Variablen A (Absorption), den Spaltenvektor der Regressionskoeffizienten c (Konzentration), der Störgröße als Zufallsvektoren und der Matrix E (Einzelextinktionen). Auf diese Weise lässt sich das Gleichungssystem einfacher darstellen.

$$A = c \cdot E + \epsilon \quad (9)$$

Damit die Regressionsschätzungen analysiert werden können, müssen für das klassische lineare Regressionsmodell bestimmte Annahmen erfüllt sein. Der Zufallsvektor ϵ ist normalverteilt um den Erwartungswert 0, d.h. $E(\epsilon)$ ist 0, die Zufallsvariablen ϵ_i sind stochastisch unabhängig.

Mit der ersten Annahme haben also alle ϵ_i die gleiche Varianz und sind unkorreliert. Man kann das so interpretieren, dass die Störgröße zufällig streut und keinerlei Information enthalten darf. Deshalb kann A nur durch Informationen aus E erklärt werden.

Die zweite Annahme besagt, dass E konstant gehalten werden muss. Im multiplen-linearen Regressionsmodell wird die Quadratsumme der Residuen nach der Methode der kleinsten Quadrate minimiert, d.h. es sollen diejenigen Parameter c ausgewählt werden, bei denen die Summe der Quadrate der Abweichungen zwischen den entsprechenden Modellkurven und den Messdaten minimal wird. Der kleinste-Quadrate-Ansatz führt somit zu einem linearen Ausgleichsproblem. Man erhält mit Hilfe des Gauß-Markow-Theorems als Lösung den Vektor der geschätzten Regressionskoeffizienten c [Sch08].

$$c = [E^T E]^{-1} E^T A \quad (10)$$

Der Satz von Gauß-Markow beschreibt im Prinzip, dass in einem linearen Modell, in dem die Fehler unkorreliert sind, ein Erwartungswert von Null und gleiche Varianz vorliegen [Sch08].

5.2 Non negative least squares- Methode

Die „Non negative least squares“ Methode (NNLS), erstmals erwähnt von Lawson and Hanson im Jahr 1974, löst die grundlegende Matrizen- Gleichung algebraisch, aber unterliegt der zusätzlichen Forderung, dass c keine negativen Elemente enthält.

$$A = c \cdot E \cdot d \quad (11)$$

Summenabsorption A , Regressionskoeffizient c , Referenzspektren E , Schichtdicke d

$$c^* = c \cdot d \quad (12)$$

Die NNLS- Methode löst somit nicht negative „least- squares“- Probleme der Form:

$$\min_{c^*} \|E \cdot c^* - A\|_2^2, \text{ mit } c^* \geq 0 \quad (13)$$

Im Prinzip hat der Algorithmus den Vorzug, dass bei ausreichend zur Verfügung gestellter Zeit wohldefinierte Abbruch- Bedingungen erfüllt werden, dessen Ausgang nicht anfällig und empfindlich bei einer unglücklichen Wahl der Eingangsparameter ist und dadurch eine Verfälschung des Messergebnisses verursachen kann [LH74].

5.3 Rechenalgorithmus des cobas b 221 Systems

Um die Berechnung der Derivatskonzentrationen aus den gemessenen Spektren durchführen zu können wurde der am **cobas b 221** System verwendete Rechenalgorithmus in der Software Matlab[®] implementiert. Die Hauptfunktionen dieses Rechenalgorithmus lassen sich auf folgende Punkte zusammenfassen:

- die Vorverarbeitung der Rohdaten
 - das Glätten des gemessenen spektralen Verlaufs, das sogenannte „smoothing“
 - eine Mittelwertkorrektur, „mean normalization“
 - die Auswahl der zur Berechnung verwendeten Wellenlängen, es können einzelne Wellenlängen oder ganze Wellenlängenblöcke sein
 - das Ableiten des spektralen Verlaufs
 - die Orthogonalisierung
- die Berechnung der linearen Regression, Ausgabe der Derivats- Konzentrationen
- die Berechnung der Bilirubin- Konzentration

Die Einheiten bei den Berechnungen der Konzentrationen sind grundsätzlich mmol/l. Da die Ergebnisse für tHb in g/dl, bzw. die restlichen Derivate in % angegeben werden, sind weitere Umrechnungen notwendig.

Zur qualitativen Verbesserung der Darstellung des Verlaufs der gemessenen Absorption, werden zwei weitere Parameter eingeführt. Die Parameter „Slope“ und „Residuen“.

Dazu wird, basierend auf den ermittelten Derivats- Konzentrationen und den verwendeten Referenzspektren, das Lambert- Beer'sche Gesetz in Richtung der Absorption aufgelöst. Somit erhält man ein Soll- Absorptions- Spektrum das mit der gemessenen Absorption verglichen werden kann [Sch08].

$$\epsilon_{\lambda} = A_{mess,\lambda} - \sum_{i=1}^N c_{i,mess} E_{i,\lambda} d \quad (14)$$

Unter dem Begriff Residuen versteht man den mittleren Fehler der linearen Regression, der dem nicht durch die Referenzspektren abgedeckten Teil der Summenabsorption entspricht. Auf diese Weise kann auf eventuell absorbierende Interferenzen rückgeschlossen werden. Im Fall der Übereinstimmung von Mess- und Modelldaten kann die Quadratsumme der Residuen minimal werden, die Residuen sind normalverteilt.

Der Parameter Slope entspricht dem mittleren Steigungsunterschied aller Punkte zwischen den beiden Absorptionsspektren [Sch08].

6 Probenpräparation

6.1 Methoden zum Stellen der Blutproben „freies Hämoglobin“

Das Stellen des fHb- Wertes in Blutproben kann auf vier verschiedene Arten erfolgen. Bei allen vier Möglichkeiten wird zuerst der tHb- Wert (typisch 13 bis 15 g/dl) einer natürlichen Vollblut- Probe an einem Blutgasanalysator, **cobas b 221** System, vermessen.

Anschließend wird für die Methoden 1 und 2 das Vollblut mit 3000 U/min für 10 Minuten zentrifugiert und das Blutplasma, welches sich an der Oberfläche angesammelt hat, mit Hilfe einer Pipette abgehoben. Das Plasma und die Erythrozyten werden separat abgewogen.

Für die Methoden 3 und 4 wird das gesamte Probenvolumen des Vollbluts mit Hilfe eines externen Hämolysators, siehe Abbildung 8, hämolysiert. Somit ist das gesamte Hämoglobin, welches in der Probe enthalten ist, freies Hämoglobin. Alle roten Blutkörperchen sind durch die Hämolyse zerstört worden.

6.1.1 Methode 1

In Formel 15 werden die zuvor ermittelten Messwerte eingetragen. Mit Hilfe dieser Formel können die Mengen von Plasma und Erythrozyten berechnet werden, die für die gewünschten fHb- Konzentrationen notwendig sind. Diese Mengen werden in ein Probenröhrchen eingewogen und man erhält die gewünschte fHb- Konzentration.

Der Nachteil dieser Art des Probenstellens ist, dass das freie Hämoglobin, welches im Plasma natürlich vorhanden ist, nicht berücksichtigt wird. Somit entsteht beim Stellen des Blutes ein Probanden- abhängiger Fehler. Die Messung des gestellten freien Hämoglobins ist mit dieser Methode überbestimmt. Eine Möglichkeit diesen Fehler zu korrigieren ist eine zusätzliche Vermessung des Plasmas mit einem Zweistrahlphotometer. Der Fehler kann somit durch eine Differenzbildung der erhaltenen Messwerte kompensiert werden.

Für das endgültige Ergebnis werden das erhaltene Ergebnis des **cobas b 221** Systems und das Messergebnis des Photometers voneinander subtrahiert.

Anmerkung: Um diese Methode des Blutstellens auch mit Hilfe des Abtrenndevice, siehe 8.6, vermessen zu können, müssen die Erythrozyten, bevor diese hinzugefügt werden, extern hämolysiert werden. Dies erfolgt mit Hilfe des externen Hämolysators, siehe Abbildung 8.

6.1.2 Methode 2

In das abgehobene Blutplasma wird nun lyophilisiertes Hämoglobinpulver eingewogen. Die gewünschten fHb- Konzentrationen können mittels Einwaage sehr einfach gestellt werden.

Die Fehlerquellen, die hierbei auftreten können, sind, wie schon bei Methode 1, dass das natürlich vorhandene Hämoglobin im Plasma nicht berücksichtigt wird. Eine weitere

Fehlerquelle ist die nicht 100 prozentige Reinheit des Lyophilisat- Pulvers, welche sich auf die Genauigkeit der Probenpräparation negativ auswirkt.

6.1.3 Methode 3

Das Stellen der gewünschten fHb- Konzentrationen erfolgt entweder in Kochsalzlösung (NaCl) oder in Natronlauge (NaOH). Die Verdünnungsreihe kann bis zum unteren Ende des gewünschten Auflösungsbereichs (0.001 g/dl) durchgeführt werden.

Ein Unsicherheitsfaktor bei dieser Art des Probenstellens ist das eventuelle Auftreten eines Pipettierfehlers, der sich bei sehr geringen Mengen des Hämolysates immer stärker auswirkt. Es ist daher auf sehr genaue Labortätigkeit zu achten.

6.1.4 Methode 4

Das Stellen der gewünschten Konzentrationen erfolgt entweder in HSA (Humanes Serum Albumin) oder BSA (Bovines Serum Albumin).

Der Vorteil im Vergleich zu Methode 3 ist, dass HSA im Gegensatz zu NaCl oder NaOH mit der Zusammensetzung des natürlichen Blutplasmas am besten übereinstimmt. Die sogenannte natürliche Matrix wird somit am besten nachgebildet.

6.2 Trennung von Plasma und Erythrozyten

Zur Trennung von Plasma und Erythrozyten sind für eine Point- of- Care- Applikation bis heute drei verschiedene Methoden bekannt.

Die am häufigsten verwendete Methode ist die der Zentrifugation und des darauffolgenden Abhebens des Blutplasmas. Wie schon beschrieben wird das Vollblut mittels Blutzentrifuge für zehn Minuten bei 3000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Daraufhin kann das Blutplasma, welches sich an der Oberfläche angesammelt hat, abgehoben werden. Dabei ist zu beachten, dass die Umdrehungszahl 3000 U/min nicht überschreitet, da es sonst aufgrund von Scherkräften in der Blutprobe zu einer mechanischen Hämolyse kommen kann, die in weiterer Folge zu einer Verfälschung des fHb- Wertes führen kann.

Weiters kann die Trennung von Plasma und Erythrozyten mit Hilfe eines Abtrenn- Device, siehe 8.6, durchgeführt werden. Es ist wieder darauf zu achten, durch sachgemäßes Probenhandling (kein starker Unterdruck durch das Abtrenndevice), die natürliche Hämolyserate nicht zu maskieren. Ein Nachteil dieser Methode ist, dass nur das Plasma für die weiteren Vermessungen verwendet werden kann, die Erythrozyten und sonstigen festen Bestandteile des Blutes aber im Filtermaterial gebunden sind. Ein Vorteil dabei ist, dass überhaupt keine festen Bestandteile mehr im Plasma vorhanden sind.

Der Vollständigkeit halber soll noch eine Micro- Zentrifuge mit Schaum genannt werden, welche sich noch im Entwicklungs- Stadium befindet. Die Vorteile dieser Methode sind das einfache Handling und die hohe Portabilität des Gerätes [Rue10].

6.3 Herstellung der Proben freies Hämoglobin

Die Herstellung der Proben, die freies Hämoglobin enthalten, kann nach den in Kapitel 6.1 beschriebenen Methoden erfolgen. Die Berechnung der gewünschten fHb- Konzentrationen erfolgt nach Formel 15.

$$V_{Haemolysat} (ml) = \left(\frac{c_{fHb\ Probe\ soll} (g/dl) \cdot V_{Plasma\ soll} (ml)}{c_{tHb\ ist} (g/dl)} \right) \quad (15)$$

Als Beispiel soll ein bestimmter Zielwert, $c_{fHb\ Probe\ soll}$ von 0.01 g/dl, berechnet werden. Der gemessene native tHb- Wert, $c_{tHb\ ist}$ beträgt 16 g/dl. Das gewünschte Probenvolumen soll $V_{Plasma\ soll}$ gleich 4ml betragen.

Nach Einsetzen der Werte in Formel 15 erhält man für $V_{Haemolysat}$ gleich 2.5 μ l. Diese Menge des Hämolysates wird in das Plasma hinzugefügt und homogenisiert. Bei den weiteren Berechnungen mit der tatsächlichen Probenkonzentration muss nun neben dem gestellten fHb- Wert auch das zusätzliche Volumen Hämolysat in der Probe berücksichtigt werden. Im oben angeführten Beispiel beträgt somit das Probenvolumen $V_{Plasma\ ist}$ gleich 4.0025 ml.

Zur Veranschaulichung der Probenberechnung ist folgend ein Beispiel einer Messreihe angeführt. Das Vollblut mehrerer Vacutainer- Röhrchen wird zentrifugiert, das Plasma daraufhin abgehoben und zusammengepoolt (zusammengemischt). Das Plasma wird ein weiteres Mal bei 3000 U/min für zehn Minuten zentrifugiert. Somit werden die festen Bestandteile, die sich eventuell noch im Plasma befinden, beseitigt. Durch diesen Schritt wird der Handling- Fehler bei der Probenherstellung mit natürlichem Plasma so gut wie möglich reduziert.

Die Probenherstellung erfolgt unabhängig vom gewünschten fHb- Wert immer nach dem gleichen Ablauf. In ein PS- Röhrchen wird Plasma pipettiert. Um den Pipettierfehler weitestmöglich zu vermeiden muss die Pipettenspitze zu Beginn mit Plasma vorgespült werden. Daraufhin erfolgt die Zugabe von Hämolysat in entsprechender Menge, berechnet nach Formel 15. Die Zugabe erfolgt z.B. nach folgender Tabelle:

Probe	$c_{fHb\ Probe\ soll}(g/dl)$	$V_{Plasma\ soll}(ml)$	$V_{Haemolysat} (\mu l)$
1	/	4	/
2	0.01	4	2.5
3	0.05	4	12.5
4	0.1	4	25
5	0.2	4	50
6	0.3	4	75
7	0.5	4	125
...

Tabelle 2: Beispiel Einwaage bei Probenherstellung

Beim Pipettieren wird das Hämolysat in die Spitze aufgesaugt. Die Pipetten- Spitze muss

nach dem Aufsaugen des Hämolyats außen vorsichtig abgewischt werden. Dabei darf kein Hämolyat aus der Spitze gesaugt werden. Die gesäuberte Pipetten-Spitze wird in das Plasma getaucht, das Hämolyat wird ausgestoßen und die Spitze wird solange mit Plasma gespült, bis in der Spitze kein Hämolyat mehr erkennbar ist (mindestens drei Mal spülen). Die Proben werden zur Homogenisierung auf den Probenroller gelegt. Die Probe 1 entspricht bei dieser Messreihe der Blindprobe. Diese besteht zu 100 Prozent aus reinem Blutplasma.

Die Nullpunkt- Probe besteht aus reiner physiologischer Kochsalzlösung. Sie dient als absoluter Nullpunkt. Der Offset der Nullpunkt- Probe zur Blindprobe (reines Plasma) wird ermittelt, um bei weiteren zu vermessenden Proben eine rechnerische Nullpunktkorrektur durchführen zu können.

6.4 Möglichkeiten der Durchführung der Hämolyse

Die Hämolyse, die Zerstörung der roten Blutkörperchen, kann auf folgende vier verschiedene Arten erfolgen [Sch08]:

- mechanisch, zB. mit Hilfe eines Ultraschall- Resonators,
- chemisch, durch Hinzugabe von Reagenzien, Tensiden, die die Membran der roten Blutkörperchen zersetzen können,
- thermisch, durch oftmaliges Frieren und wieder Auftauen der Probe wird der hämolysierende Effekt erreicht und
- durch eine osmotische Schädigung.

6.4.1 Mechanische Hämolyse

Eine mechanische Hämolyse der Erythrozyten kann durch eine zu hohe mechanische Belastung der Membran erfolgen. Es wird zwischen subletal, keine Zerstörung der Zelle, und letal unterschieden.

Bei der subletalen Schädigung werden die Poren der Membran vergrößert, sodass Hämoglobin in das Blutplasma diffundieren kann. Die Ausdehnung der Membran ist reversibel, sodass die Erythrozyten wieder in ihre eigentliche Größe und Form zurückkehren können. Der Gehalt von Hämoglobin in den Erythrozyten ist aber vermindert.

Bei der letalen Schädigung ist die mechanische Belastung der Membran so hoch, dass sie reißt und den gesamten Zelleninhalt in das Blutplasma freigibt.

6.5 Herstellung des Hämolyates

Das gestellte Vollblut wird durch einen externen Hämolyator, siehe Abbildung 8 geführt. Durch Anlegen eines Ultraschallfeldes wird das Blut hämolysiert, alle festen Bestandteile werden aufgelöst. Die Verschlauchung des externen Hämolyators wird zuerst mit etwas Vollblut gespült, dann wird das Vollblut zugeführt, hämolysiert und beim Austritt in

einem PS-Röhrchen aufgefangen. Das Hämolysat wird auf einen Probenroller gelegt und bis zum weiteren Gebrauch gerollt. Die Verschlauchung des externen Hämolysators wird nach Durchführung der Hämolyse mit destilliertem H_2O ausgiebig gespült.

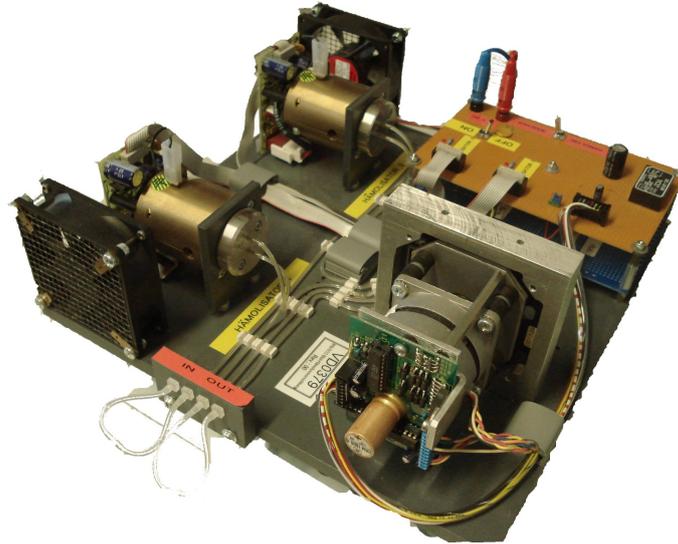


Abbildung 8: Externer Hämolysator

6.6 Proben- Tonometrie

Die Proben- Tonometrie erfolgt bei Vollblutmessungen mit Hilfe eines sogenannten Filmtonometers. Hierbei diffundieren die Moleküle eines Gases eines Wasserbades so lange in die Probenflüssigkeit (Blut) bis sich die beiden Partialdrücke angepasst haben. Die Proben-tonometrie erfolgt bei einer Temperatur von exakt 37 Grad Celsius. Die Probe wird je nach gewünschter Konzentration des geforderten Blutgases für eine bestimmte Zeitdauer mit N_2 , CO_2 , und O_2 begast, siehe Abbildung 9.

Bei der Vermessung von Blutplasma kann aufgrund der sehr geringen Menge an Erythrozyten auf die Tonometrierung mit Hilfe des Filmtonometers weitestgehend verzichtet werden. Die Probe wird stattdessen mit Luftsauerstoff gesättigt. Dies erfolgt durch mehrmaliges Öffnen des Probenröhrchens während der Homogenisierung am Probenroller.

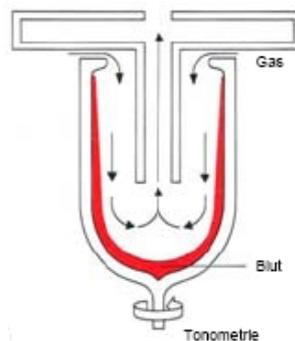


Abbildung 9: Prinzipdarstellung der Proben-tonometrie [Leh11]

6.7 Lyophilisiertes Erythrozyten- Pulver

Die sogenannte Lyophilisation ist eine Technik, die angewendet wird, um Wasser aus einer Lösung zu entfernen. Das Produkt beinhaltet nur noch feste, trockene Bestandteile, ist somit stabiler, leichter und hat ein geringeres Volumen als die Lösung.

Bei der Lyophilisation wird das Produkt bei -40 bis -50 °C in Vakuum eingefroren. Daraufhin erfolgt eine langsame Erhitzung, damit das Eis brechen und in weiterer Folge in Dampf übergehen kann. Auf diese Weise wird der Wassergehalt des Produkts durch die sogenannte Sublimation entfernt.

Da am Beginn der Arbeit das Finden einer passenden Referenzierungsmöglichkeit im Vordergrund stand, wurde mit Hilfe der Gravimetrie und des Lyophilisat- Pulvers versucht einen internen „goldenen Standard“ zu erstellen. Das Lyophilisat- Pulver sollte hierbei in humanes Blutplasma eingewogen werden.

Es stellte sich jedoch heraus, dass humanes Plasma sowohl durch Filtration als auch durch Zentrifugation nicht völlig „rein“ sein kann. Die Wahrscheinlichkeit, dass freies Hämoglobin im Plasma vorhanden ist, ist gegeben. Wie in der Einleitung erwähnt, tritt dies entweder durch mechanische Zerstörung der Erythrozyten auf oder ist zuvor durch den biologischen Abbau der Erythrozyten entstanden. Somit wird der gestellte freie Hämoglobinwert durch den natürlichen freien Hämoglobin- Anteil verfälscht.

Als leichte Abwandlung dieses Ansatzes wurde durch Einwaage der lyophilisierten Erythrozyten in NaOH oder in NaCl eine weitere Möglichkeit der Referenzreihen- Bildung ausgetestet. Man kann die gewünschten theoretischen freien Hämoglobinwerte mittels Einwaage sehr einfach stellen. Es stellte sich aber auch hier heraus, dass einige Punkte zu berücksichtigen sind, damit Fehler vermieden werden.

Da zum Teil kein Verunreinigungsgrad auf dem Beipackzettel des lyophilisierten Erythrozyten- Pulvers angegeben ist, ist die exakte Einwaage des Pulvers in wässrige Lösung auf einen bestimmten Konzentrationswert nicht immer möglich. Das aufgelöste Pulver weist eine stark dunkelrote Farbe auf, das deutet auf einen sehr hohen Methylen- Hämoglobin Anteil hin.

Zur Veranschaulichung wird eine typische Konzentrationsreihen- Bildung beschrieben. Zu Beginn wird die Menge, die für die gewünschte Konzentration des freien Hämoglobins notwendig ist, berechnet. Daraufhin wird diese Menge mit Hilfe der Präzisionswaage Mettler AE 260 bestimmt. Diese wird der zuvor berechneten Menge an NaCl hinzugefügt. Die Probe wird für mindestens drei Stunden auf einem Proben- Roller homogenisiert, das heißt, die Probe wird bis zur vollständigen Auflösung des Lyophilisat- Pulvers am Proben- Roller belassen.

Trotz der langen Zeitdauer, die für die Homogenisierung einberaumt wurde, löst sich das Pulver nicht vollständig auf. Daraus kann als erste Gegenmaßnahme ein Verlängerung der Dauer der Homogenisierung folgen. Trotz der Verlängerung der Homogenisierungs- Dauer der Proben, sind immer noch feste Bestandteile in der Probe mit freiem Auge festzustel-

len. Folglich sind auch bei der Vermessung dieser Proben Probleme aufgetreten. Sowohl für das Messsystem des **cobas b 221** System als auch für die Methode am Photometer Shimadzu stellen diese festen Bestandteile einen Störfaktor bei der Vermessung dar. Die erlangten Messergebnisse hatten bei der gleichen Sollkonzentration eine sehr große Messwertabweichung und Messwertstreuung, siehe Kapitel 10.1

6.7.1 Probleme mit lyophilisiertem Erythrozyten- Pulver

Die Fehlerquellen beim Stellen des freien Hämoglobins mit Hilfe des lyophilisierten Erythrozyten- Pulvers in NaCl wurden bereits kurz angesprochen. In Abfolge des Auftretens der Messungen werden die Ursachen aufgelistet. Mögliche Lösungsvorschläge sind mit angeführt.

- Ein nicht vollständiges Auflösen der Partikel in der NaCl- Lösung.

Versuch der Abhilfe:

- Ein längeres Rollen des Erythrozyten- Flüssigkeitsgemisches (3h, 24h und 48h)
- Das Mischen der Probe erfolgt mit Hilfe eines Magnetrührers
- Eine zusätzliche Filterung der Probe mit Hilfe eines Luer Lock Filters:

Der Einsatz des Filtermaterials Whatman 1842- 047 GMF $2\mu\text{m}$ führte dazu, dass die Lösung partikelfrei wurde. Durch die nicht vollständige Auflösung des Pulvers konnte sich nicht die gewünschte Konzentration einstellen, es wird somit eine Messabweichung zur Sollkonzentration festgestellt.

- Es ist bei 2 von 3 Herstellern keine genaue Angabe über die Verunreinigung des Lyophilisat- Pulvers angegeben (diese ist weder auf der Packung noch am Beipackzettel abgedruckt).

Versuch der Abhilfe:

- Anfrage bei den Herstellern, da auf den Datenblätter keine genauen Daten abzulesen sind
 - Es erfolgt weiters eine Rücksprache mit einem firmeninternen Chemiker. Dieser stellte die Annahme auf, dass das Pulver eine Reinheit von ca. 95 Prozent besitzt. Da der Vorgang des Lyophilisierens mit Schwefel erfolgt, kann ein Teil als Rückstand im Pulver weiterhin vorhanden sein. Weiters kann auch ein Rückstand von H_2O vorhanden sein. Die Menge ist abhängig von der Vollständigkeit des Prozesses der Gefriertrocknung.
- Es folgt die Vermutung eines Operator- Fehlers bei der Einwaage der Probe.

Versuch der Abhilfe:

- sehr genaues Arbeiten bei der Pippetierung und Einwaage der Probe notwendig
- die Verwendung einer Präzisionswaage

Die Vermessung der Proben, die mit der Referenzreihenbildung mit Hilfe des Lyophilisat-Pulvers zusammenhängen, erfolgen auf dem Zweikanal- Photometer Shimadzu.

Trotz aller Versuche, die Messungen des Lyophilisat- Pulvers zu verbessern, konnte nicht die gewünschte Genauigkeit erzielt werden, die für eine Referenzreihenbildung nötig ist. Somit wird auf die Verwendung des Lyophilisat- Pulvers als Grundlage für die Erstellung einer Referenzreihe verzichtet, siehe auch Kapitel 10.

7 Literaturstudie

Zu Beginn der Literaturstudie wurde der Istzustand (State of the Art) der verschiedensten Methoden zur Bestimmung von freiem Hämoglobin festgestellt. Besonderes Augenmerk wurde auf die photometrischen Messmethoden gelegt. Weiters soll kurz über den Beginn der Forschung an freiem Hämoglobin geschrieben werden.

Da im Zuge der Literaturrecherche auch eine Vergleichsstudie verschiedener Messmethoden für freies Hämoglobin gefunden wurde, soll diese besondere Erwähnung finden. Es sollen die Vorteile und auch die jeweilige Problematik der einzelnen Methoden angesprochen werden. Weiters wird besonderes Augenmerk auf die Messbereichsgrenzen und auf Auflösungsprobleme der verschiedenen Methoden gelegt und auf deren Bedeutung eingegangen.

7.1 Übersicht Literaturstudien

Die erste Erwähnung einer Methode zur Vermessung von freiem Hämoglobin erfolgte im Jahr 1941 [Cam41]. Das erhoffte Resultat der Untersuchungen war es, die erweiterte Hämolyse früher zu erkennen und weiters eventuelle Nierenerkrankungen detektieren zu können.

Da sich das totale Hämoglobin und das freie Hämoglobin aus Sicht der Absorptionsbanden nicht unterscheiden, ist es nicht möglich bei der Vermessung von Vollblut den Parameter freies Hämoglobin zu bestimmen. Somit gibt es bis heute noch keine zuverlässige photometrische Methode, die freies Hämoglobin in Vollblut vermessen kann.

Um dem entgegenzuwirken, bedarf es einer Proben- Präanalytik. Das Blutplasma muss vor der weiteren Vermessung von fHb von Vollblut getrennt werden. Die Trennung kann auf drei verschiedene Arten erfolgen, die in Kapitel 6.2 schon näher beschrieben wurden.

Eine Vergleichsstudie aus dem Jahr 1997, die neun verschiedene Techniken zur Bestimmung von fHb untersucht [Mal97] kommt zum Schluss, dass die Cripps- Methode die Zuverlässigste ist. Spätere Studien aus den Jahren 1997 von K. Tapernon [Tea01], 2001 von Zander et al. [Zea89] und aus dem Jahr 2004 von P. Cookson [Esb04] kommen zum Schluss, dass die Harboe- Methode die zuverlässigste Methode ist.

Bis heute gibt es aber noch keine standardisierte Methode. Als weitgehend akzeptiert und anerkannt wird die Cyanmethemoglobin Methode (HICN- Methode), die von der internationalen Standard- Behörde (CLSI, früher NCCLS) als Referenzmethode empfohlen wird.

Die Verbreitung der jeweiligen Messmethoden kann aus einer Ringversuchs- Reihe, die in Deutschland durchgeführt wurde, folgend festgestellt werden. Von 74 Instituten (Universitäts- Kliniken, Rotes Kreuz, Blutspende- Dienste) ist bekannt, dass 35 % die Harboe- Methode, 28% die HICN- Methode und 37 % fünf andere Methoden verwenden [Tea01]. Diese Ringversuchs- Messreihe wird in Kapitel 7.5 näher beschrieben.

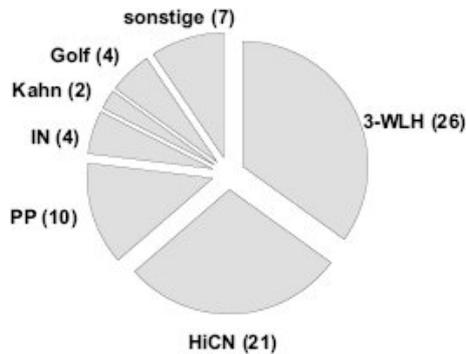


Abbildung 10: Methoden der Teilnehmer am Ringversuch (n=74) [Tea01]

PP = Pseudoperoxidase- Methode, IN = Immunophelometrie, 3WLH = 3- Wellen- Längen- Methode nach Harboe, HICN= Cyanhämoglobin- Methode, Kahn = Methode nach Kahn, Golf = Methode nach Golf, sonstige = sonstige Methoden

Weiters wurde im Zuge der Literaturrecherche nach einer Publikation über eine Multi-Wellenlängen Methode zur Bestimmung von freiem Hämoglobin gesucht. Es konnte keine Information darüber gefunden werden.

Am Ende wurde nach Literatur gesucht, die eine anerkannte Bestimmung relevanter statistischer Messgrößen erlaubt. Es konnten Literaturquellen des NNCLS gefunden werden, mit deren Hilfe man die Parameter LOB, LOD berechnen kann [NCC01].

7.2 Verfügbare Techniken zur Bestimmung von freiem Hämoglobin

Zum jetzigen Zeitpunkt sind verschiedene Techniken zur Bestimmung von freiem Hämoglobin verfügbar, die wie folgt eingegliedert werden können.

- Direkte optische Techniken für unverdünnte Proben:
 - Cripps- Methode [Cri68]
 - Kahn- Methode [Kea81]
 - Porter- Methode [Por62]
 - Shinowara- Methode [Shi54]
- Direkte optische Techniken für verdünnte Proben
 - Harboe- Methode (3- Wellenlängen- Methode) [Har59]
 - Golf- Methode (3- Wellenlängen- Methode) [Gea85]
 - Fairbanks- Methode [Fea92]
- Methode der Bestimmung von Blutderivaten (unverdünnte Probe)
 - Soloni- Methode [Sea86]

- Methoden mit Zufügen von Chemikalien
 - Cyanhaemoglobin- Methode (HICN) von van Kampen und Zjilstra [Sta67]
 - Tetramethylbenzidin- Methode (TMB) [Dia91]
 - AHD- Methode [Zea84]

Ausgewählte Methoden, mit Augenmerk auf die photometrische Bestimmung von fHb, werden in den folgenden Kapitel detaillierter besprochen und es wird auch auf die zugrundeliegenden physikalischen und mathematischen Aspekte näher eingegangen.

7.3 Spektroskopisches Messverfahren für freies Hämoglobin

Das erste in der Literatur erwähnte spektrophotometrische Verfahren zur Bestimmung von freiem Hämoglobin ist das Verfahren von Flink und Watson [FW42]. Zu Beginn wurde diese Analyse zur Bestimmung von Hämoglobin im Stuhl angewendet. Dieses wurde angepasst, um die Analyse von Hämoglobin in verschiedenen Geweben zu ermöglichen. Diese Methode hat sich im Jahre 1942 als die praktischste und zuverlässigste erwiesen.

Das beschriebene Verfahren arbeitet nach dem Prinzip der Umwandlung von Hämoglobin in Pyridin- Ferrohemochromogen, um eine quantitative Bestimmung zu ermöglichen. Das Hämoglobin wird zuerst in Hämatin- Säure umgewandelt, dann in alkalisches Hämatin, und schließlich in Pyridin- Ferrohemochromogen. Letzteres wird quantitativ gemessen und somit die Konzentration von freiem Hämoglobin bestimmt [FW42].

7.4 Vergleichsstudie fHb

Im Jahr 1997 wurde die Studie „Plasma Hemoglobin Measurement Techniques for the In Vitro Evaluation of Blood Damage Caused by Medical Devices“ [Mal97] durchgeführt. In diesem Paper werden die neun am häufigsten verwendeten Messmethoden für fHb vorgestellt und miteinander verglichen. In dieser Studie wird die Vermessung von freiem Hämoglobin allgemein als eine sehr sensitive Messmethode für die Vermessung im Blutplasma beschrieben. Es wird auch darauf hingewiesen, dass es bis heute noch keine weit verbreitete und auch anerkannte Methode der Vermessung von fHb gibt.

Alle Methoden arbeiten nach dem Prinzip der direkten optischen Vermessung, oder sie sind durch chemische Techniken adaptierte optische Methoden. Diese wurden nach den Aspekten für Accuracy, Precision, Interferenz- Effekte und auf Gebrauchstauglichkeit getestet. Grundsätzlich konnte eine gute Linearität, Accuracy und Reproduzierbarkeit bei allen Methoden bis zu einer Konzentration von fHb bis 1 mg/dl gezeigt werden. Es wird aber speziell darauf hingewiesen, dass dies nur für Proben ohne zugefügte Interferenzen gilt.

Wird mit zugefügten Interferenzen die gleiche Vergleichsuntersuchung durchgeführt, beträgt der Streubereich der gemessenen Werte zwischen -2 mg/dl und 39 mg/dl für die jeweils gleiche Probe (eine typische native fHb Probe zugefügt in Rinder- Plasma). In der

Studie wird weiters darauf hingewiesen, dass viele nicht so weit verbreitete Methoden, wie zum Beispiel die Cripps Methode [Cri68] sowohl sicherer und einfacher, als auch präziser und genauer als die Methoden mit chemischen Zusätzen durchzuführen sind.

7.4.1 Direkte optische Techniken, unverdünnte Proben:

Es werden unverdünnte Proben in einem Zweistrahlphotometer vermessen. Der Oxyhämoglobin Peak bei 577 nm soll Auskunft über die Konzentration des fHb- Wertes geben. Die Vermessung erfolgt relativ zu PBS (phosphatgepufferte Salzlösung) oder einer Blank- Probe (dest. Wasser). Die Cripps, Kahn, Porter, Shinowara und erste Ableitungs- Methode arbeiten nach diesem Prinzip. Die Absorptionsgleichungen sind in Tabelle 3 aus [Mal97] abgebildet.

Methode	Absorptions- Gleichung	k- Faktor Studie
Cripps	$k1 \times \{A_{576.5} - [(A_{560} + A_{593})/2]\}$	177.6 ± 3.8
Kahn	$k2 \times [155 \times A_{578} - 86.1 \times A_{562} - 68.9 \times A_{598}]$	1.160 ± 0.024
Porter	$k3 \times (A_{578} - A_{700})$	115.4 ± 1.9
Shinowara	$k4 \times (A_{576.5} - A_{560})$	262.5 ± 5.6
Erste Ableitung	$k5 \times (A'_{571} - A'_{583})$	1792 ± 39

Tabelle 3: Absorptionsgleichungen direkter optischer Techniken, unverdünnte Proben

Der Umrechnungsfaktor k, bestimmt durch die Verdünnung der Probe und das Molekulargewicht des Hämoglobins, wird dafür genutzt, um eine Absorptions- Intensität in eine Hämoglobin Konzentration (mg/dl) umzurechnen.

Methode nach Cripps Die Cripps Methode [Cri68] quantifiziert das Oxy- Hämoglobin, siehe 3.2.2, in einer nicht verdünnten Probe unter Verwendung von drei verschiedenen Wellenlängen. Dieser Messwert kann für eine Grundlinien- Korrektur herangezogen werden.

Es erfolgt die Annahme, dass sich die auftretende Interferenz linear mit der Wellenlänge verändert. Der Messfehler wird größer, wenn diese Annahme nicht mehr hält.

In der Studie von [Mal97] wurde die Teil- Absorption des Oxyhämoglobins bei der Wellenlänge 576.5 nm relativ zu der verkippten, linearen Grundlinie zwischen 560 nm und 593 nm berechnet, siehe Abbildung 11. Die Stärke dieser angewandten Methode ist, dass Verfälschungen des Messergebnisses durch Interferenzen, die bei der Wellenlänge 576.5 nm den Absorptionspeak beeinflussen, korrigiert werden können. Dies kann sehr einfach gelöst werden, da die beiden Wellenlängen 560 nm und 593 nm an den Seiten des Peaks bei 576.5 nm auch aufgenommen werden. Dies tritt zum Beispiel bei positiver spektraler Interferenz auf:

$$A_{576.5}^{Probe} = A_{576.5}^{Haemoglobin} + A_{576.5}^{Hintergrund} \quad (16)$$

Methode nach Kahn Die Kahn- Methode [Kea81] funktioniert grundsätzlich nach dem gleichen Prinzip wie die Cripps- Methode. Der Unterschied ist der, dass diese die Teilabsorption bei 578 nm relativ zur Grundlinie zwischen 562 und 598 nm ausnutzt. Basierend auf der theoretischen Absorption des Oxyhämoglobins bei 578 nm werden die Absorptionskonstanten abgeleitet und weiters in die Gleichung eingebaut. Dies hat den Vorteil, dass keine Referenzmethode und kein Referenzstandard mehr notwendig ist.

Die Porter Methode Mit Ausnahme der Substanzen, die Trübung verursachen, wie zum Beispiel Lipide, absorbieren die meisten Interferenzen der freien- Hämoglobin- Messung unterhalb einer Wellenlänge von 700 nm. Unter der Annahme einer Hintergrund- Interferenz durch humanes Plasma, wird hier die Absorptions- Differenz zwischen A_{578} und A_{700} verwendet, um Oxyhemoglobin zu quantifizieren. In Abbildung 11 ist dieser Bereich dargestellt.

Die Shinowara Methode Laut [Shi54] wird die Absorptionsdifferenz zwischen 576.5 und 560 nm verwendet um Hämoglobin in einer unverdünnten Plasmaprobe zu quantifizieren, siehe Abbildung 11. Aus dem Grund, dass diese beiden Wellenlängen sehr eng aneinander liegen, beeinflussen eventuell auftretende Interferenzen im Plasma die Absorption bei beiden Wellenlängen gleich stark und löschen sich, bei der Berechnung der Absorptionsdifferenz, somit gegenseitig aus. Bei der Anwendung dieser Methode nimmt man somit einen starken Sensitivitätsverlust in Kauf.

Methode der ersten Ableitung A' Diese Methode der ersten Ableitung, adaptiert von [Sea86], wird an einer unverdünnten Probe angewendet. Zuerst wird eine Abtastung von 560 bis 590 nm des Spektrums in 0.5 nm Schritten durchgeführt, davon wird daraufhin die erste Ableitung gebildet. Da sich die Absorptions- Spektren der meisten Interferenzen im Plasma im Bereich von 577 nm nur sehr langsam ändern, kann die Differenz von der ersten Ableitung des Absorptionspeaks bei 571 und 583 nm genutzt werden um Oxy- Hämoglobin zu bestimmen, siehe Abbildung 12.

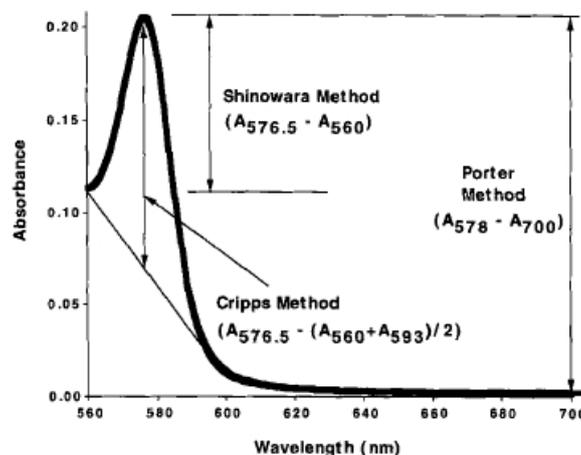


Abbildung 11: Quantifizierung von freiem Hämoglobin nach den Absorptionskurven von Oxy- Hämoglobin, Methoden nach Cripps, Porter und Shinowara [Mal97]

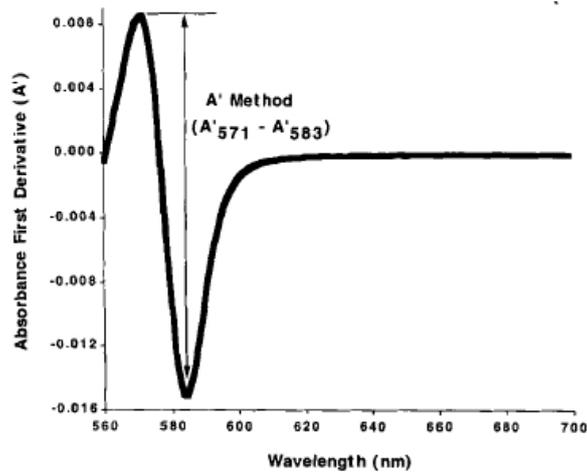


Abbildung 12: Quantifizierung von freiem Hämoglobin nach den Absorptionskurven von Oxy- Hämoglobin, Methode der ersten Ableitung [Mal97]

7.4.2 Direkte optische Techniken, verdünnte Proben:

Es werden verdünnte Proben in einem Zweistrahlphotometer vermessen. Der Oxyhämoglobin Peak bei 415 nm soll Auskunft über die Konzentration des fHb- Wertes geben. Die Vermessung erfolgt relativ zu PBS (phosphatgepufferte Salzlösung) oder einer Blank-Probe (dest. Wasser). Die Absorptiongleichungen sind in Tabelle 4 aus [Mal97] abgebildet.

Methode	Absorptions- Gleichung	k- Faktor Studie
Harboe	$k6 \times [167.2 \times A_{415} - 83.6 \times A_{380} - 83.6 \times A_{450}]$	1.017 ± 0.015
Fairbanks	$k7 \times [154.7 \times A_{415} - 130.7 \times A_{450} - 123.9 \times A_{700}]$	1.017 ± 0.014

Tabelle 4: Absorptiongleichungen direkter optischer Techniken, verdünnte Proben

Für die beiden Techniken werden 100 μl der Probe in 1000 μl von 10 mg/dl Na_2CO_3 verdünnt [Fea92]. Der alkaline pH- Wert dieses Mediums minimiert die Trübung in der Proben- Reagent- Mischung [Hea74]. Die Absorptions- Werte werden daraufhin relativ zur 10 mg/dl Na_2CO_3 Blank- Probe vermessen. Die Harboe- und Fairbanks- Methoden arbeiten nach diesem Prinzip.

Die Harboe Methode Die Harboe Methode [Har59] verwendet eine sogenannte drei Punkte Allen- Korrektur, um die Hämoglobin- Konzentration beim relativen Hämoglobin- Absorptionspeak bei 415 nm zu quantifizieren, siehe Abbildung 13. Für die Allen- Korrektur werden die Wellenlängen 380, 415 und 450 nm herangezogen. Zusätzlich kann eine Korrektur von nicht plausiblen Absorptionen aufgrund von Fremdstoffen in der Hämoglobin- Lösung erfolgen, siehe auch Kapitel 7.4.2. Somit werden die Absorptionsmessungen direkt in Konzentrationsmesswerte umgewandelt und können so einfach zur Anzeige gebracht werden, siehe Tabelle 4.

Die Fairbanks Methode Die Fairbanks Methode [Fea92] basiert auf Studien von Proben mit humanem Plasma. Die Proben beinhalteten normale oder erhöhte Werte von Hämoglobin, Bilirubin und Lipiden. Die Koeffizienten in Tabelle 4 werden so bestimmt, dass die Absorption von Proben mit hohem Bilirubin- Anteil (Peak bei 450 nm) und hohem Trübungs- Anteil (Peak bei 700 nm) kompensiert werden können.

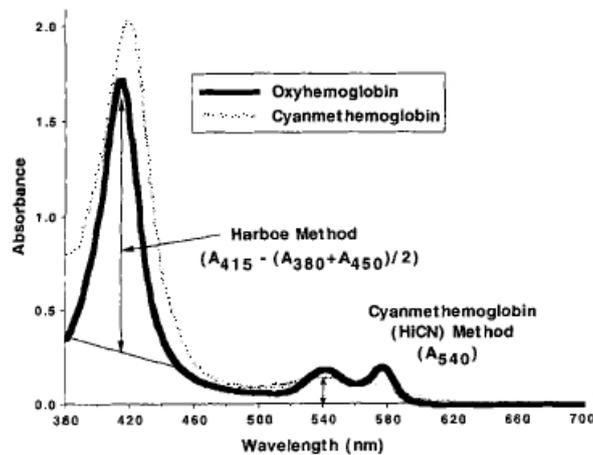


Abbildung 13: Quantifizierung von freiem Hämoglobin nach den Absorptionskurven von Oxy- Hämoglobin, Methode nach Harboe und HICN- Methode [Mal97]

7.4.3 Techniken mit zugefügten Chemikalien: Cyanmethemoglobin- und Tetramethylbenzidine- Methode

Methode	Absorptions- Gleichung	k- Faktor Studie
HICN	$k8 \times A_{540}$	335.5 ± 5.7
TMB	$k9 \times [(A_{sample} - A_{blank}) / (A_{std} - A_{blank}) \times C_{std}]$	1.253 ± 0.073

Tabelle 5: Absorptionsgleichungen, Techniken mit zugefügten Chemikalien

Cyanmethämoglobin- Methode (HICN): Die Konversion der meisten Formen von Hämoglobin zur stabilen HICN- Form ist eine gebräuchliche hämatologische Technik, die für die Quantifizierung der totalen Blut- Hämoglobin- Konzentration (typisch 11000 bis 18000 mg/dl) angewendet wird. Diese Methode ist die einzige, welche durch einen internationalen Standard unterstützt wird [fCLS94], [Sta96].

Laut Moore [Mea81] kann diese Methode modifiziert werden, um freies Hämoglobin im Plasma festzustellen (Konzentrationen über den Messbereich von 5 bis 2000 mg/dl). Wird eine entsprechende Blank- Probe benutzt (reines Plasma), können das Hintergrundrauschen minimiert und zuverlässige Messergebnisse erhalten werden.

Eine typische Messreihe läuft wie folgt ab. Zu Beginn werden 400 μ mol der Probe mit 500 μ l des HICN- Reagents (200 mg $K_3Fe(CN)_6$), 50 mg KCN, 140 mg KH_2PO_4 , und 1 ml Triton X100) miteinander vermischt und in einem Liter Wasser verdünnt. Es soll ein

pH- Wert von 7.0 bis 7.4 eingestellt werden [fCLS94], [Sta96].

Die Reaktion ist nach 5 Minuten beendet. Durch die Konversion zu HICN werden nach dieser Zeit die drei Oxy- Hämoglobin- Peaks bei 415, 541 und 576.5 nm durch zwei Peaks bei 420 und 540 nm ersetzt, siehe Abbildung 13.

Um die tatsächliche Menge des Hämoglobins zu quantifizieren, wird die Absorption bei 540 nm relativ zu einem HICN- Reagenz- Blank gemessen. Zur Gültigkeitskontrolle der Messergebnisse kann ein Vergleich mit dem Internationalen HICN- Standard (Batch 70600, Centers for Disease Control, Atlanta, GA, USA) erfolgen.

Tetramethylbenzidine Methode Die Tetramethylbenzidine- (TMB) Methode ist laut dieser Literaturstelle sehr weit verbreitet und populär, da die für die Vermessung notwendigen Reagenzien in Kit- Form erhältlich sind (Kit 527A Sigma). Im durchgeführten Ringversuch (siehe Kapitel 7.5) findet diese Methode aber keine Erwähnung.

Die Methode basiert darauf, dass Hämoglobin die Oxidation eines Chromogens (TMB) durch Wasserstoff Peroxid ermöglicht. Es entsteht ein Reaktionsprodukt, welches proportional zu einer Farb- Reaktion ist [Sea77], [Dia91].

TMB ist ein Repräsentator von verschiedenen Chromogenen (o- tolidine, chlorpromazine, dianisidine, leucomalachite) der als Ersatz für das karzinogene Benzidin, welches noch in der originalen Methode zum Einsatz kommt, eingesetzt wird.

Eine typische Messreihe läuft wie folgt ab: Zu Beginn werden in Test- Röhrchen, welche 800 μl TMB in Essigsäure (5 mg/dl) beinhalten, 4 μl der Hämoglobin- Probe oder des Standards gemischt. Zu festgelegten Zeitpunkten werden 800 μl von 0.3 prozentiger H_2O_2 zugefügt. Das Probengemisch wird homogenisiert. Nach exakt zehn Minuten des Zeitpunktes der Zugabe von H_2O_2 , wird die Absorption bei 600 nm der Probe gegen Blank vermessen (destilliertes Wasser). Die Messungen bei genau dieser Wellenlänge gewährleisten eine minimale spektrale Interferenz.

Der Messbereich dieser Technik liegt zwischen 5 bis 50 mg/dl [Dia91].

7.4.4 Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität ist definiert als die Änderung der Signal- Absorption relativ zur Änderung der Konzentration von fHb [Tie87]. Bezogen auf die Verdünnungs- Volumina in dieser Studie sind die TMB und die Porter- Methode die sensitivsten bezogen auf Änderungen der Hämoglobin- Konzentration. Die HICN- Methode ist hier die am wenigsten sensitive Methode, siehe Abbildung 14.

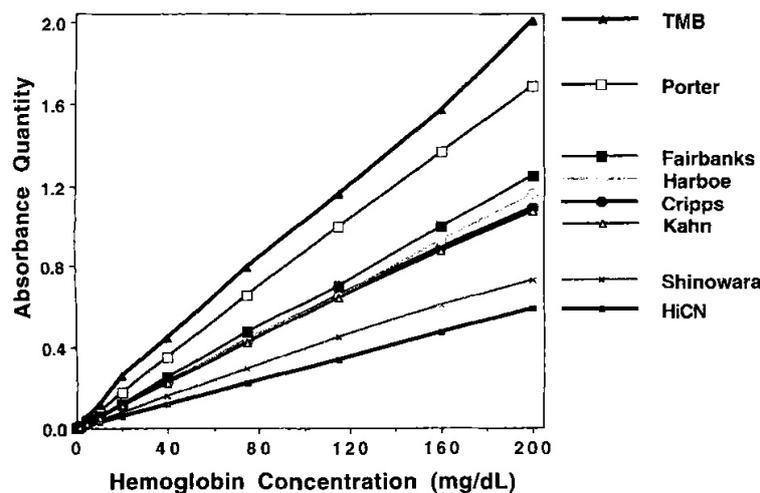


Abbildung 14: Analytische Sensitivität der verschiedenen Messmethoden [Mal97]

7.5 Ringversuch zur Bestimmung von freiem Hämoglobin

Da Arzneimittel-herstellende Betriebe in Bezug auf humane Blutprodukte verpflichtet sind, die von ihnen hergestellten Produkte einer Qualitätskontrolle zu unterziehen (am besten kontinuierlich), stellt der Parameter freies Hämoglobin eine Möglichkeit für die Qualitätskontrolle von Erythrozytenkonzentraten dar. Die Hämolyserate dieses Konzentrates darf am Ende der Haltbarkeit den Wert 0.8 Prozent der Masse der Erythrozyten nicht überschreiten [EP99]. In Abhängigkeit des Hämatokritwertes entspricht dieser Wert einer Hämoglobinkonzentration von in etwa 0.4 g/dl bzw. 400 mg/dl [Tea01].

In dieser Arbeit von Tapernon et al. wurden unterschiedliche Analysemethoden für Hämoglobin (freies Hämoglobin) verglichen. Zu Beginn wurde darauf hingewiesen, dass es bis heute keine bis über den Sollwert hinausgehende Empfehlung für eine Bestimmungsmethode gibt.

Die Autoren dieses Artikels führten zwei sogenannte Ringversuche durch. Bei diesen Ringversuchen wurden den Teilnehmern in den Analyselabors Proben mit verschiedenen definierten Konzentrationen mit freiem Hämoglobin zugesendet. Sie hatten die Aufgabe diese Proben zu bestimmen und die Ergebnisse mitzuteilen.

Der Ablauf war wie folgt: Zuerst erfolgte das Stellen der zu untersuchenden Proben, eine Zusendung der Proben an die Teilnehmer, Vermessung durch die Teilnehmer, die Rücksendung der Ergebnisse und die folgende Auswertung.

Die Proben des zweiten deutschen bundesweiten Ringversuch beinhalteten folgende Konzentrationen von fHb:

- Probe a, Sollwert von 70 mg/dl
- Probe b, Sollwert von 189 mg/dl

- Probe c, Sollwert von 329 mg/dl

In Tabelle 6 ist die Anzahl und Häufigkeit der verwendeten Methoden im Zuge des Ringversuchs dargestellt. Als Beispiel werden in Abbildung 15 die Ergebnisse der Vermessung der Probe b an den häufigst verwendeten Methoden dargestellt (vgl. Abbildung 10 und Tabelle 6).

Methode der Teilnehmer	Anzahl	Probe a	Probe b	Probe c
3-Wellenlängenmethode nach Harboe	26	21 (81%)	22 (85%)	18 (69%)
Cyanhämglobinverfahren	21	13 (62%)	13 (62%)	15 (71%)
Pseudoperoxidaseverfahren	10	2 (20%)	1 (10%)	1 (10%)
Immunnephelometrie	4	2 (50%)	1 (25%)	1 (25%)
Methode nach Kahn	2	0	0	0
Methode nach Golf	4	2 (50%)	2 (50%)	2 (50%)
Sonstige Methoden	7	4 (57%)	1 (14%)	0
Summe	74	44	40	37

Tabelle 6: Häufigkeit der verwendeten Methoden [Tea01]

Bei allen Teilnehmern des Ringversuchs wurden unterschiedliche Analysemethoden eingesetzt, welche sich durch erhebliche Qualitätsunterschiede auszeichneten. Insgesamt lieferten die Analysemethoden 3-Wellenlängen-Verfahren nach Harboe und das Cyanhämglobinverfahren die besten Ergebnisse [Tea01].

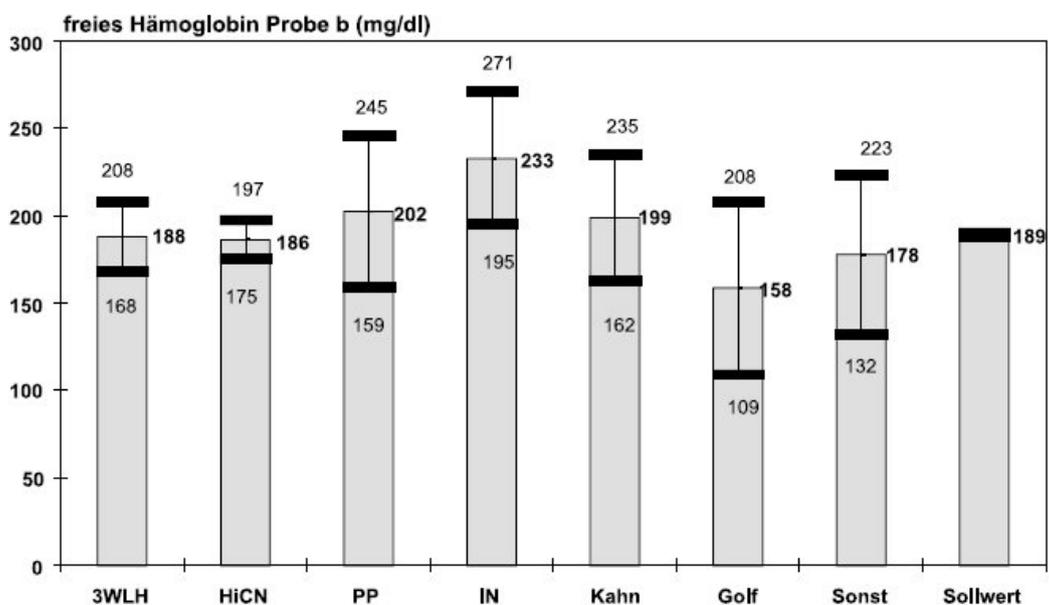


Abbildung 15: Mittelwert und Standardabweichung der Methoden für Probe b [Tea01]

Aus den Ergebnissen aus der Abbildung 15 kann somit darauf geschlossen werden, dass ein Vergleich der Qualität von Erythrozytenkonzentraten bezogen auf die Konzentration von fHb nur unter Berücksichtigung der eingesetzten Analyseverfahren als zulässig erscheint [Tea01].

7.6 Weitere Methoden

Bei der Methode nach Blakney und Dinwoodie (BD-Methode) [BD75] werden die Messungen in unverdünntem Plasma durchgeführt. Die Absorptionskurve der Probe wird aufgetragen. Eine Linie wird tangential an die Kurve im Bereich von 598 bis 700 nm angelegt, diese schneidet die Absorption bei 562 nm. Diese Linie definiert eine Grundlinie, von der aus die Amplitude des 578 nm Peak als ΔA gemessen wird. Unter Zuhilfenahme der Allen- Korrektur [AE53] wird die Absorption berechnet, siehe Formel 17.

$$c_{Hb} = 1.55 \cdot \Delta A \quad (17)$$

Die Methode nach Kahn basiert auf der BD- Methode. Messungen werden wiederum in unverdünntem Plasma durchgeführt, siehe Formel 18.

$$c_{Hb} = 1.55 \cdot A_{578} - 0.862 \cdot A_{562} - 0.689 \cdot A_{596} \quad (18)$$

Die Berechnungen in dieser Formel können ohne zusätzliche graphische Analyse durchgeführt werden. Zusätzlich ist die Gültigkeit der Ergebnisse nicht abhängig davon, ob die Steigung der Linie von A_{598} zur Linie A_{700} parallel zur x- Achse ist [Kea81].

7.7 Weitere Literaturstellen

Das Paper „Standardization of Hemoglobinometry - The Hemiglobincyanide Methode“ [fCLS94] wurde durchgearbeitet. In diesem Paper wird die HICN- Methode sehr detailliert und ausführlich beschrieben. Die Details sind in Kapitel 8.2 angeführt.

Weiters wurde das Paper „Studies on Haptoglobin - Effects of Hp on Resistance and Regeneration of Hemoglobin“ [Pin68] durchgenommen. Die Ergebnisse sind in Kapitel 3.6 berücksichtigt.

Die AHD Methode, in verschiedenen Literaturstellen [ZL89], [Zea89], [Zea84] beschrieben und bewertet, wird in Kapitel 8.3 näher vorgestellt.

Weiters wurde ein Vergleich der Berechnungen aus [BB94] und der Methodenbeschreibung aus [fCLS94] durchgeführt.

7.8 Verfahren zur Bestimmung des Detektionslimits

Soll eine Aussage über das Auflösungsvermögen des Messsystems getroffen werden, so besteht nach Literatur aus [NCC01] die Möglichkeit das Limit of Blank und das Limit of Detection zu bestimmen.

7.8.1 Limit of Blank (LOB)

Die untere Auflösungsgrenze eines Messsystems, das Limit of Blank (LOB), stellt den höchsten zu erwarteten Wert in einer Reihe von Proben, die keinen Analyten enthält, dar. Es ist wichtig darauf zu achten, dass sich das LOB auf ein beobachtetes Testergebnis bezieht, während sich das LOD auf die tatsächlich gemessenen Konzentrationen des Analyten bezieht, siehe auch Abbildung 16.

Für die zuverlässige Bestimmung des LOB gilt die Definition, dass mindestens 60 Blank-Messungen durchzuführen sind. Das LOB wird dann aus wiederholten Messungen von einer oder mehreren Blindproben geschätzt. Durch die Verwendung mehrerer Proben wird dazu beigetragen, dass eine Probe, die eine geringe Menge an Analyten enthält, nicht als eine Blank- Probe missinterpretiert wird. Erscheinen die Daten Gauß- verteilt, wird empfohlen, das parametrische Verfahren zur LOB- Bestimmung zu nutzen, wie in Gleichung 19 dargestellt.

$$LOB = \mu_B + 1.645 * \sigma_B \quad (19)$$

μ_B ... ist der Mittelwert der Blank- Messung

σ_B ... ist die Standardabweichung der Blank- Messung

Sind nur Messwerte aus Humanplasma- Proben vorhanden, welche eigentlich schon als Proben mit geringer fHb- Konzentration und somit nicht mehr als Blank anzusehen sind, tritt eine Falschbestimmung des LOB auf. Als Lösungsvorschlag wird die Vermessung von BSA (mind 60 Messpunkte) vorgeschlagen. Wird anstelle von BSA destilliertes H₂O verwendet, treten auch Abweichungen aufgrund der veränderten Matrix auf.

7.8.2 Limit of Detection (LOD)

Das nächst höhere Limit ist das Limit of Detection (LOD). Dieses Limit beschreibt eine aktuelle Konzentration des Analyten, bei dem ein Messergebnis das LOB sehr wahrscheinlich überschreitet und somit als detektiert beschrieben werden kann, siehe auch Abbildung 16.

Um das LOD zu bestimmen, ist auch die Berechnung der Standardabweichung bei wiederholten Messungen der Proben mit einer entsprechenden niedrigen Konzentration notwendig. Das heißt, es sollen Konzentrationen im Bereich von LOB bis zu ca. 4 x LOB vermessen werden. Es wird wieder empfohlen mindestens 60 Messungen durchzuführen.

$$\sigma'_{pool} = \sqrt{\frac{1}{n-k} \sum_{i=1}^k (n_i - 1) \cdot \sigma_i^2} \quad (20)$$

$$\sigma_{pool} = \left(\frac{1}{1 - \frac{1}{4 \cdot (n-k)}} \right) \cdot \sigma'_{pool} \quad (21)$$

$$LOD = LOB + 1.645 \cdot \sigma_{pool} \quad (22)$$

Das bevorzugte Verfahren besteht darin, mehrere Low- Level- Proben (vier bis sechs) zu nehmen und eine gepoolte Schätzung der Präzision in diesem Bereich zu berechnen, wie in Gleichung 20 bis 22 dargestellt.

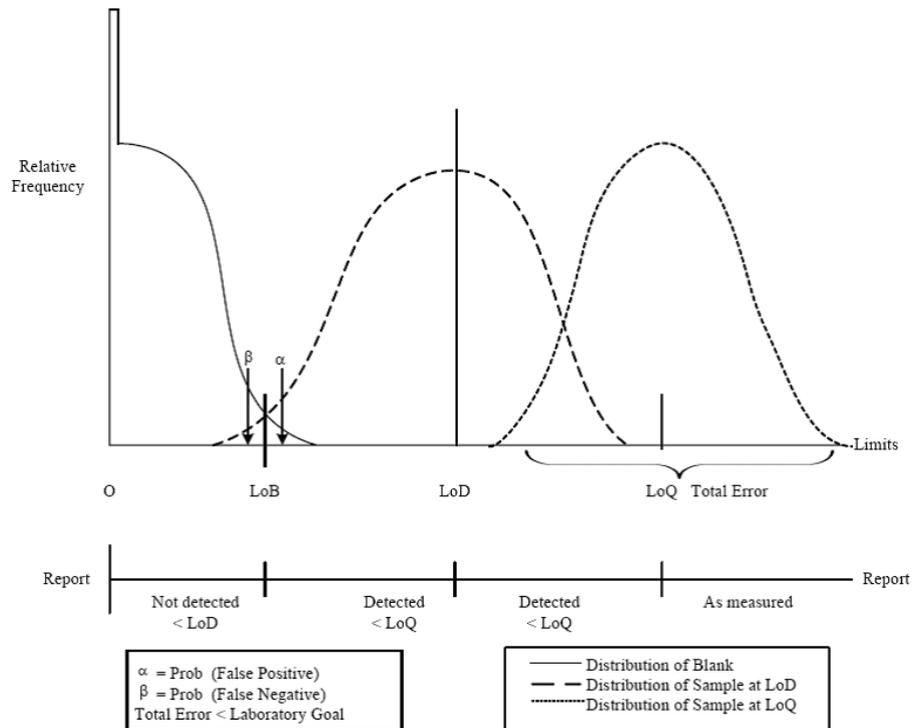


Abbildung 16: Berechnung von LOB und LOD [NCC01]

Die ermittelten Ergebnisse aus den Berechnungen von LOB und LOD des **cobas b 221** System, des HemoCue[®] und eines Entwicklungsmessstandes, an dem veränderte Schichtdicken der Küvette ausgetestet wurden (300 μm und 600 μm) sind in Kapitel 12.9 in Abbildung 60 dargestellt.

8 Verwendete Methoden

Zu Beginn war es notwendig, eine Bewertung des Istzustandes der vorhandenen Messmethode durchzuführen. Hierbei wurden die Voruntersuchungen zum Thema fHb herangezogen, die bereits im März 2009 am Standort Graz vermessen wurden. Bei dieser Messung handelte es sich um eine Vermessung von gestelltem Hämoglobin im Konzentrationsbereich von 0.01 bis 0.5 g/dl an einem **cobas b 221** System Analysegerät mit der unveränderten Standardsoftware. Die Auswertung dieser Messreihe ist im Kapitel 9.2 durchgeführt und näher erläutert.

8.1 Auswahl der Referenzmethode

Nach der erfolgten Literatur- Recherche werden aus den über zehn verschiedenen möglichen Referenzmethoden nur noch drei zur näheren Betrachtung herangezogen. Es werden die HICN Methode (photometrisch mit chemischem Zusatz), die AHD- Methode (photometrisch mit chemischem Zusatz) und die 3 Wellenlängenmethode nach Harboe (photometrisch) untersucht.

Zusätzlich wird, wie schon in Kapitel 6.7 näher beschrieben, das Stellen einer Referenzreihe mit Hilfe eines Lyophilisatpulvers untersucht.

8.2 Cyanmethemoglobin Methode (HICN- Methode)

Die Cyanmethemoglobin- Methode wird im Paper [fCLS94] des „National Committee for Clinical Laboratory Standards“ vorgestellt und beschrieben.

8.2.1 Hintergrund

Im Jahr 1958 wurden in einem Gremium der Division des „Medizinisch Wissenschaftlichen Nationalen Forschungs Council“ verschiedene photometrische Methoden die zur Bestimmung von verschiedenen Hämoglobin Levels verwendet werden genauer untersucht. Aus Gründen der Stabilität und der Einfachheit der Methode im Vergleich zu anderen, wurde die HICN Methode als die Beste auserkoren. Hier wird das Hämoglobin nach der Konversion in Cyan- Hämoglobin spektrophotometrisch bestimmt [fCLS94].

Bei dieser Methode wird die Probe mit nur einem einzigen Reagent verdünnt. Alle Formen des Hämoglobins, die im Vollblut auftreten, mit Ausnahme von SulFHb, werden durch diese Methode zusammen bestimmt. Die resultierende Farbe der Probe ist auch in einfachen Spektrophotometern detektierbar, da die Absorptionsbande bei 540 nm Wellenlänge breit und relativ flach ist. Proben- Standards, die aus kristallinen Hämoglobin oder aus gewaschenen Erythrozyten hergestellt sind und die in sichtgeschützten Glas- Fläschchen aufbewahrt werden (braune Farbe), sind für mindestens neun Monate stabil [fCLS94].

Ein Hämoglobincyanoxid ist ein Hämoglobin, dessen Eisen- Atom oxidiert ist. Dieses ist nun im sogenannten „ferric state“ vorhanden und bindet sich an Cyanid- Ionen. Weitere Be-

zeichnungen dafür sind Cyanmethämoglobin, Methämoglobin- Cyanid oder Cyan- Ferri-Hämoglobin [vA70].

$$A = \log \left(\frac{I_0}{I} \right) \quad (23)$$

Die Absorption A ist der Logarithmus des Verhältnisses der Lichtstärke I_0 der Probe zur durchgetretenen Lichtstärke I der Probe [fTM69]. Andere Bezeichnungen dafür sind alternativ Extinktion oder optische Dichte [vA70].

Das Lambert- Beer'sche Gesetz gilt bei dieser Substanz natürlich genauso, vorausgesetzt es handelt sich um monochromatisches Licht. Die Absorption der homogenen Probe, die die absorbierende Substanz enthält, ist direkt proportional zur Konzentration c der absorbierenden Substanz und der Schichtdicke d der Probe, die sich im optischen Pfad befindet.

Im Fall von HICN wird der Term „quarter molar absorptivity“ benutzt. 1 mol von Hämoglobin ist als Monomer definiert, bestehend aus einer Häm- Gruppe und einer Globin-Kette (α oder β).

$$c_{fHb} = (A_{540} - A_{680}) \cdot 732.5 \quad (mg/dl) \quad (24)$$

Der Unterschied der Formel 24 zu der Formel 1 aus Tabelle 5 ist dadurch zu erklären, dass in Formel 24 mit Hilfe der Absorption an der Wellenlänge A_{680} der Trübungsfaktor bestimmt wird, der dem Messergebnis der Absorption an der Wellenlänge A_{540} abgezogen wird.

8.2.2 Berechnung

Die Berechnung des totalen Hämoglobins bei nur einer gemessenen Wellenlänge kann nach Formel 25 erfolgen [fCLS94]. Die Darstellung der Wellenlänge, an der die Absorption gemessen wird, kann als hochgestellt, die Komponente die gemessen wird als tiefgestellt angegeben werden.

$$c_{fHb} = \frac{A_{HICN}^{540} \cdot 16114.5 \cdot F}{\varepsilon_{HICN}^{540} \cdot d \cdot 1000} \quad (g/dl) \quad (25)$$

- c entspricht der Konzentration von fHb in g/dl
- A_{HICN}^{540} entspricht der Absorption der HICN- Lösung an der Wellenlänge von 540 nm
- 16114.5 ist das relative Molekulargewicht des Hämoglobin- Monomers (abgeleitet von 64458/4) [Bra64]
- F ist der angewendete Verdünnungsfaktor (z.B. 251 bei 0.02 ml der Probe und 5.0 ml des HICN- Reagents)

- $\varepsilon_{HICN}^{540} = 11.0$, ist die viertel- millimolare Absorption von HICN [ZvA75]
- d = die Länge des Lichtpfades in Zentimeter, üblicherweise 1.0 cm
- 1000 = Umrechnungsfaktor von Milligramm zu Gramm

8.2.3 Vor- und Nachteile der HICN- Methode

Die Vorteile dieser Methode liegen darin, dass einerseits ein international akzeptierter Standard vorhanden ist und andererseits kostengünstige Messungen je Probe erfolgen können. Weiters hat Cyanmethämoglobin einen „wide peak“ bei 540 nm, sodass zur Vermessung ein günstiges Spektrometer ausreicht. Darüber hinaus werden die meisten Formen von Hämoglobin sehr schnell zu Cyanmethämoglobin umgewandelt und lassen sich dadurch sehr einfach detektieren.

Weiters ist es eine akzeptierte Methode, um die tHb- Konzentration in Vollblut zu bestimmen. Es kann somit auch genutzt werden, um Messungen von fHb- Konzentrationen im Bereich von 1 mg/dl durchzuführen. Eine Vorgabe ist hier eine Hintergrundkorrektur.

Die Nachteile der HICN- Methode sind die, dass gefährliche Chemikalien genutzt werden. Die Entsorgung muss gründlich durchgeführt werden. Die HICN- Methode hat die geringste Sensitivität aller getesteten Methoden. Die Absorption wird erhöht je mehr Plasma-Anteile in der Probe vorhanden sind [Mal97].

Weitere Methoden zur Bestimmung des Hämoglobins, wie die Methode nach Morikawa [Mea92], die Methode nach Vanzetti [VSea86] (siehe auch Kapitel 8.5.1) und die Methode nach Zander [Zea84] wurden in den letzten Jahren beschrieben. Die Cyan- Methämoglobin- Methode bleibt aber weiterhin die Referenzmethode an der alle anderen neuen Methoden evaluiert werden.

8.3 AHD- Methode

Die Alkaline- Hämatin- Detergens- Methode (AHD) funktioniert nach dem Prinzip der Konversion der Häm- Anteile im Blut [Zea84].

Mit Hilfe der AHD- Methode kann man sehr schnell und genau Hämoglobin vermessen. Diese wird als Alternative zur schon bekannten, konventionellen Cyanhämoglobin- Methode angesehen. Sie basiert auf der Konversion aller Häm- Anteile im Blut, sowohl Hämoglobin als auch Hämoglobin, in ein stabiles Endprodukt. Dies erfolgt durch Zufügen einer Alkaline- Lösung eines nicht- ionischen Detergents, des sogenannten AHD- Reagents, in die Probe. Das Reaktions- Produkt, das aus dem Alkaline- Hämatin D- 575 gebildet worden ist, ist einerseits sehr stabil und zeigt andererseits einen charakteristischen Absorptions-Peak bei 575 nm.

Im Vergleich zur Cyanhämoglobin- Methode (HICN), bietet die AHD- Methode einige Vorteile:

- sehr gute Stabilität des AHD- Reagents und auch der Reaktionsprodukte
- schnellere Reaktions- bzw. Umwandlungsdauer aller Hämoglobin Arten in das Endprodukt
- Verringerung der Häufigkeit von Plasma und Zell- Fehlern und geringere Fehler durch verspätete Umwandlung von CO₂ und fetal- Hämoglobin
- Standardisierung durch einen Primär- Standard (purified crystalline chlorohaemin)

$$c_{tHb} = 34.96 \cdot A_{E575} \text{ (g/dl)} \quad (26)$$

In dieser Methode wird eine Gleichung, basierend auf dem millimolaren Absorptions- Koeffizienten der Standard- Chlorohämin- Referenz- Lösung, genutzt. Die gemessene Absorption der Wellenlänge 575 nm wird zur Berechnung der totalen Hämoglobinkonzentration herangezogen, siehe Formel 26.

8.4 Harboe 3 Wellenlängen- Methode

Die Methode nach Harboe basiert darauf, dass die Hauptabsorptionsbande von Oxyhämoglobin im nahen UV- Bereich mit Peak bei 415 nm erfasst wird. Diese wird als klassische Soret- Bande bezeichnet. Es können auch sehr kleine Hämoglobinkonzentrationen genau erfasst werden, sofern die Bilirubinkonzentration unter 2mg/dl bleibt. Bilirubin tritt hier somit als starker Interferent auf. Durch die Absorption des Bilirubins bei 450 nm wird die charakteristische Soret-Bande bei 415 nm überlagert [BB94]. Die Berechnung erfolgt nach Formel 27.

Das Verfahren nutzt die maximale Absorption von Oxyhämoglobin an der sogenannten Soret- Bande . Das Oxyhämoglobin wird durch die Veränderung der Lichtabsorption nach der Konvertierung in Carboxyhämoglobin identifiziert. Die Methode ist einfach, jede Analyse erfordert in etwa fünf Minuten [Har59].

$$c_{fHb} = 0.836 \cdot [2 \cdot A_{415} - (A_{380} + A_{450})] \text{ (g/dl)} \quad (27)$$

8.5 HemoCue[®]- Methode nach Vanzetti

Im Zuge der Literaturstudie und der Suche nach Referenzmethoden wurde ein Analysergerät zur Bestimmung niedriger Hämoglobinwerte in Plasma, Serum oder wässrigen Lösungen ausfindig gemacht. Der HemoCue[®] Plasma/Low Hb Analyzer ist ein Zweiwellenlängen- Photometer, siehe Abbildung 17. Es wird das Prinzip nach Vanzetti angewendet [Van96]. Es tritt eine chemische Reaktion in der Küvette, eine modifizierte Azidmethämoglobinreaktion, auf. Die Erythrozytenmembran wird durch Natriumdeoxycholat hämolysiert, somit wird Hämoglobin freigesetzt. Natriumnitrit wandelt das Hämoglobin

in Methämoglobin um, welches mit Azid, einer organischen Verbindung der Stickstoffwasserstoffsäure, zu Azidmethämoglobin reagiert. Um den Einfluss von Trübungen auszugleichen, misst das Photometer bei zwei Wellenlängen (570 und 880 nm) [AB98].



Abbildung 17: Analysegerät HemoCue® [AB98]

8.5.1 HemoCue®- Einsatzgebiete

Einsatzgebiete für das HemoCue® Analysegerät sind die Qualitätskontrolle von Blutprodukten in Blutbanken oder die Qualitätskontrolle bei der intraoperativen Blutrückgewinnung. Es kann bestimmt werden, ob z.B. rückgewonnenes Blut reinfundiert werden kann oder nicht. Weiters kann durch die Messung des Hämoglobinwertes in der Spülflüssigkeit während Operationen der Blutverlust kontinuierlich festgestellt und die Entscheidung für eine Transfusion getroffen werden. Bei Proben in der klinischen Chemie ist die Hämolyse häufig ein beeinträchtigender Faktor. Es kann mit einer einzelnen Analyse sehr einfach der Hämolysegrad festgestellt werden.

Laut Hersteller- Angaben ist der HemoCue® Plasma/Low Hb Analyzer ein sehr schnelles und einfaches System zur genauen Messung niedriger Hämoglobinkonzentrationen im Bereich von 0.0 bis 3.00 g/dl (0.0 bis 1.90 mmol/l). In der Anwendung stellt sich aber sehr schnell heraus, dass im Bereich einer Konzentration von fHb von 0 bis 0.5 g/dl die Messdaten sehr stark streuen, siehe Kapitel 12.4.

8.6 Abtrenndevise

Mit Hilfe des Abtrenndevise ist es möglich Plasma aus Vollblut zu extrahieren ohne auf den Einsatz einer Blutzentrifuge zurückgreifen zu müssen. Das Abtrenndevise besteht aus einer handelsüblichen „Terumo® 10ml“- Spritze und einem Kunststoffaufsatz, dem sog. „Filter Device Paradisc“ in den das Filtermaterial „Whatman 1842- 047 GMF 2 μ m“ eingelegt wird, siehe Abbildung 18.



Abbildung 18: Darstellung des Abtrenndevices (Spritze und Filtergehäuse)

Wird nun Vollblut durch das Filtermaterial in die Spritze aufgesogen, trennt sich das Blutplasma von den festen Bestandteilen und kann für die weitere Probenpräparation verwendet werden.

8.7 Berechnung mit Hilfe des Programms Matlab®

Alle durchgeführten Berechnungen erfolgen in der Entwicklungsumgebung des Programms Matlab®. Die Berechnung der Konzentrationen von fHb erfolgt nach den Methoden wie sie in Kapitel 5 beschrieben worden sind.

Im Zuge der Diplomarbeit wird eine Variation der Berechnungsmethoden der Regressionsanalyse durchgeführt. Zuerst wird die „ordinary- least- squares“ mit der „non- negative- linear- least- squares“ Methode verglichen. Weiters wird eine Wellenlängenvariation durchgeführt. Hier wird der Standardmessbereich aufgeweitet. Als Standard sind die hier gewählten Wellenlängenblöcke 510 bis 534 nm, 549 bis 570 nm und 582 bis 660 nm definiert, siehe Abbildung 19. Bei einer mehrmaligen Berechnung der vermessenen Daten werden jeweils andere Wellenlängenbereiche betrachtet und daraus kann eine eventuelle Verbesserung der Sensitivität im gesamten Messbereich abgeleitet werden.

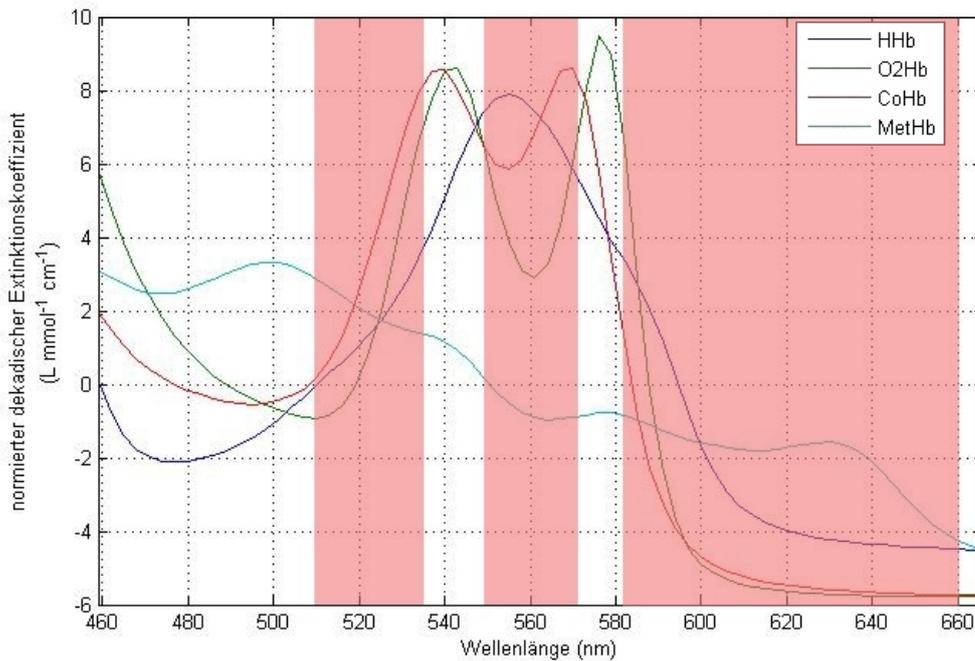


Abbildung 19: Ursprüngliche Wellenlängenbereiche / Blöcke die in der Multikomponentenanalyse betrachtet werden

8.8 Regressionsanalyse

Die Multikomponentenanalyse wird mit Hilfe der linearen Regression durchgeführt. Die Blutgasparameter werden einzeln berechnet. Durch das Fehlen von Blutderivaten wie MetHb, SulFHb, oder COHb im Blutplasma macht die Regressionsanalyse aber einen Fehler. Es können für einzelne Derivate fälschlicherweise große positive Werte und für andere große negative Werte ausgegeben werden, siehe Formel 28. Die vermeintlichen Konzentrationen der Derivate befinden sich im Messrauschen und dadurch findet eine falsche Bestimmung durch den Algorithmus statt. Durch die nachfolgende Addition aller Ergebnisse der einzelnen Blutderivate wird dieser scheinbare Fehler aber behoben und für den fHb- Wert ein korrekter Wert ausgegeben.

$$c_{fHb} = -\llcorner_{Derivat1} + \gg_{Derivat2} + \overset{0}{c}_{Derivat3} \cong 0 \text{ (g/dl)} \quad (28)$$

8.8.1 Ordinary Least Squares

Die Methode der kleinsten Quadrate, “method of least squares“, ist ein mathematisches Standardverfahren zur Ausgleichsberechnung von verschiedenen Datenpunkten. Es wird zu einer Datenpunktwolke eine Kurve gesucht, die möglichst nahe an allen Datenpunkten verläuft. Die Daten können physikalische Messwerte repräsentieren, während die Kurve aus einer parameterabhängigen, problemangepassten Familie von Funktionen abstammt. Die Methode der kleinsten Quadrate besteht somit darin, die Kurvenparameter so zu bestimmen, dass die Summe der quadratischen Abweichungen der Kurve von den einzelnen

Punkten minimiert wird. Die jeweiligen Abweichungen werden als sogenannte Residuen bezeichnet [wik11a]. Diese Methode wurde bereits in Kapitel 5.1 beschrieben.

8.8.2 Non negative least squares

Eine weitere Forderung aus dem Pflichtenheft ist die Implementierung der „non negative least squares Methode“. Der Vorteil bei dieser Art der Regressionsanalyse liegt darin, dass die Regression besser auf die physiologischen Zustände zutrifft. Diese Methode wurde schon in Kapitel 5.2 beschrieben.

8.8.3 Vergleich der beiden Regressionsanalysen

Die Berechnungen mit dem „OLS“- und „NNLS“- Algorithmus erfolgen in mehreren Durchläufen. Die Messergebnisse bzw. die Ergebnisse die aus der Berechnung resultieren werden jedes Mal mit den Referenzwerten, die mittels HICN- Methode am Photometer Shimadzu ermittelt wurden, verglichen. Die Auswertung wird in Kapitel 12.7 beschrieben.

Es wird versucht, mit verschiedenen Wellenlängenblöcken ein besseres Regressions- Ergebnis zu erreichen. Die Untersuchungen erstrecken sich über den gesamten Wellenlängenbereich von 459 bis 666 nm. Zusätzlich werden einzelne Wellenlängenblöcke betrachtet, wie auch die bereits vorhandene Zuteilung der Blöcke untersucht. Später wird zusätzlich der Bereich der Spitzenabsorption von einzelnen Derivaten weggefiltert. Mit dieser Methode konnte bei der Methylenblaukorrektur das beste Ergebnis erreicht werden, siehe Kapitel 12.8.

8.9 Weiterführende Berechnungen

Bei der Vermessung der Blank- Proben und der Proben mit geringen fHb- Werten ist ein Unterschied im Messergebnis erkennbar, ob die Probe in reinem Plasma, in NaCl oder destilliertem H₂O gestellt wurde.

Bei der Vermessung von sehr geringen fHb- Konzentrationen im Blutplasma ist es möglich, dass durch den vorhandenen „OLS“- Algorithmus negative Werte ausgegeben werden. Um dieser Fehlinterpretation entgegenzuwirken, wurde versucht, aus allen aufgenommenen Messwerten eine Korrektur dieses Offsets zu finden. Noch vor der Ausgabe der berechneten Werte wird dieser Offset bereinigt.

Dieser Offset wird somit mit einer Addition beseitigt. Die leichte Verkippung der Messwerte im Vergleich zur Referenzmethode HICN über den Messbereich von 0.01 bis 4.0 g/dl kann durch eine Multiplikation beseitigt werden, siehe Formel 29.

$$y = 1.075 \cdot x + 0.056 \quad (29)$$

8.10 Korrekturfunktion Methylenblau

Als Ergebnis der Interferenzstudie, die zum Teil im Zuge der Diplomarbeit wie auch als zusätzliche Untersuchung durchgeführt wurde, siehe Kapitel 11, entstand die Forderung

nach der Erstellung einer Korrekturfunktion des Interferenten Methylenblau.

Da es Blutgasanalytoren auf dem Markt gibt, welche den Einfluss von Methylenblau erkennen und diesen bis zu einem gewissen Maße unterdrücken oder korrigieren können [CLS10], soll diese Korrektur in weiterer Folge auch am **cobas b 221** System implementiert werden. Durch den Einbau dieser Korrektur sollte ein eventuelles Auftreten von Methylenblau in den zu untersuchenden Blutproben erfasst und im ursprünglichen Spektrum berücksichtigt werden, um eine Beeinflussung des fHb- Wertes zu vermeiden.

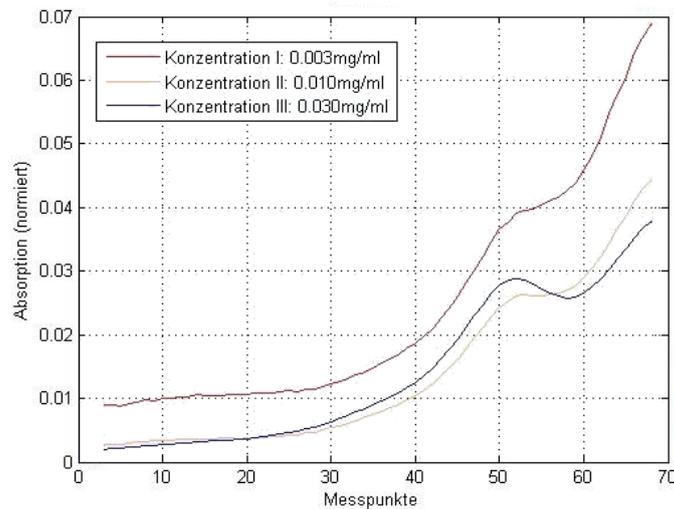


Abbildung 20: Aufnahme dreier verschiedener Konzentrationen von Methylenblau

Zuerst erfolgte eine Aufnahme der Rohabsorptionsspektren von Methylenblau bei drei verschiedenen Konzentrationen, siehe Abbildung 20. Diese aufgenommenen Spektren werden zuerst normiert und daraufhin durch Mittelwertbildung für das Einbauen in die Rohabsorptionsmatrix vorbereitet. In diese Matrix, die die Spektren der zu erwartenden Probenbestandteile umfasst, welche bei der Multikomponentenanalyse verwendet werden, wird das Spektrum von Methylenblau hinzugefügt. Dieses Spektrum wird nun als mögliche Komponente der Probe geführt, siehe Abbildung 21.

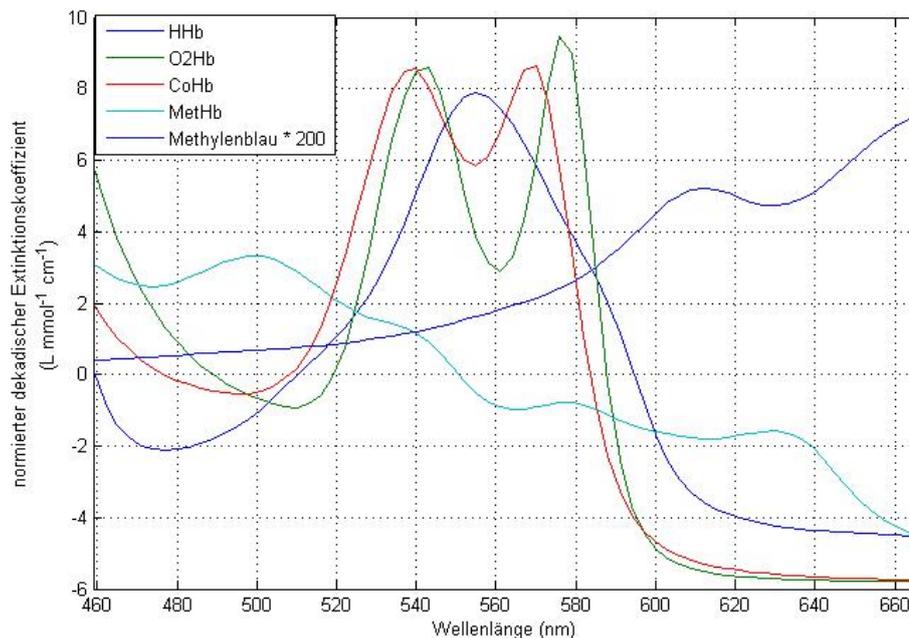


Abbildung 21: Referenz Spektren inklusive Methylenblau- Spektrum

Tritt nun der Fall auf, dass der Farbstoff in einer bestimmten Konzentration in der Probe vorhanden ist, so soll durch die mathematische Berechnung eine Kompensation erfolgen. Ein besonderes Augenmerk ist aber auch darauf zu legen, dass die Proben ohne Methylenblau-Einfluss durch die angewendete Korrektur nicht verfälscht werden.

Um dem wissenschaftlichen Ziel Genüge zu tun, wurde auch ein normiertes Methylenblau-Spektrum aus der Literatur eingebaut. Die Unterschiede der Ergebnisse sind aber marginal, somit ist dieser Punkt nur der Vollständigkeit halber angeführt. Die Ergebnisse sind unter Kapitel 12.8 angeführt.

9 Messreihen „freies Hämoglobin“

In diesem Kapitel werden die im Zuge der Diplomarbeit durchgeführten Messreihen kurz beschrieben und die Messergebnisse dargestellt. Anhand dieser Messergebnisse sollen die weiteren Schritte diskutiert und die Erkenntnisse in den weiteren Untersuchungen umgesetzt werden.

9.1 Proben- Vermessung

Die Probenvermessung erfolgt, unabhängig von der verwendeten Methode, immer mit einer geeigneten Schutzausrüstung (Laborschuhe, Spritzschutzbrille, Mantel und Latexhandschuhe).

In jeder durchzuführenden Messreihe soll jede Probe am **cobas b 221** System mindestens fünfmal vermessen werden. Zur Datenaufzeichnung dient das PolyOx- Datenübernahmeprogramm. Bei den Messungen werden ein Zeitstempel, die **cobas b 221** System Proben-ID, die PolyOx- ID und die Probennummer mitnotiert.

Um etwaige Messverfälschungen durch Proben- Präanalytik zu vermeiden, wird bei den Messungen am Photometer Shimadzu auf eine sehr genaue Einhaltung der zuvor festgelegten und auch vorgeschriebenen Zeitabläufe hingewiesen. Als Beispiel ist die Homogenisierung des HICN- Proben- Gemisches anzuführen, siehe auch 10.4. Erfolgt eine Vermessung der Probe noch bevor die Umwandlung aller Hämoglobinderivate abgeschlossen ist, kommt es zu Fehlergebnissen, die nicht in die Charakterisierung des Systems miteinbezogen werden dürfen.

Bei der Vermessung am **cobas b 221** System ist es aufgrund des Fehlens von chemikalischen Zusätzen, bei der Probenpräparation nicht zwingend notwendig, diese genauen Zeitabläufe einzuhalten. Zur besseren Vergleichbarkeit der Systeme wurde aber der Ablauf der Messreihen nicht verändert.

9.2 Voruntersuchungen

Die erste Messreihe zum Thema freies Hämoglobin wurde bereits im Vorfeld dieser Diplomarbeit durchgeführt. Die Auswertung dieser Messreihen zeigt, dass eine Linearität des Messsystems gegeben ist. Weiters scheint die Auflösungsgrenze in den tiefen Bereichen der fHb- Konzentrationen (0.01 g/dl) noch nicht erreicht zu sein. Auf diese Ergebnisse stützt bzw. gründet die Annahme, dass die gewünschte Messperformance bei den weiteren Vermessungen von fHb am **cobas b 221** System erreicht wird.

Aufgrund eines vorhandenen Offsets der Messwerte zu den Sollkonzentrationen kann nicht auf die absolute Korrektheit der Messergebnisse geschlossen werden. Da der Offset, abhängig von der Konzentration des freien Hämoglobins, zu einer zusätzlichen Verkipfung der Regressionsgeraden führt, sollen weitere Messreihen zur genauen Charakterisierung des vorhandenen Messsystems am **cobas b 221** System durchgeführt werden, siehe Kapitel 9.3.

9.2.1 Durchführung und Auswertung

Ein Teil des nativen Vollblutes wird auf den tHb- Wert von 16 g/dl gestellt und anschließend hämolysiert. Die Hämolysierung erfolgt mit einem externen Hämolysator. Daraufhin werden die fHb- Werte 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3 und 0.5 mit hämolysiertem Vollblut durch Pipettieren gestellt.

Die Aufzeichnung der Spektren erfolgt mit dem sogenannten PolyOx- Datenübernahme- programm. Unter Zuhilfenahme dieser Software können die Rohabsorptionsspektren aus dem Blutgasanalysegerät ausgelesen und somit für die weitere Verarbeitung abgelegt werden. Die Auswertung der Messreihe erfolgte mit Hilfe des Programmes Matlab.

Bei dem Vergleich der Ist- und Sollwerte der fHb- Konzentrationen ist eine Differenz zu erkennen. Diese nimmt bei höherem fHb- Wert zu. Warum dieser Effekt aufgetreten ist, wird bei weiteren Messreihen genauer untersucht werden.

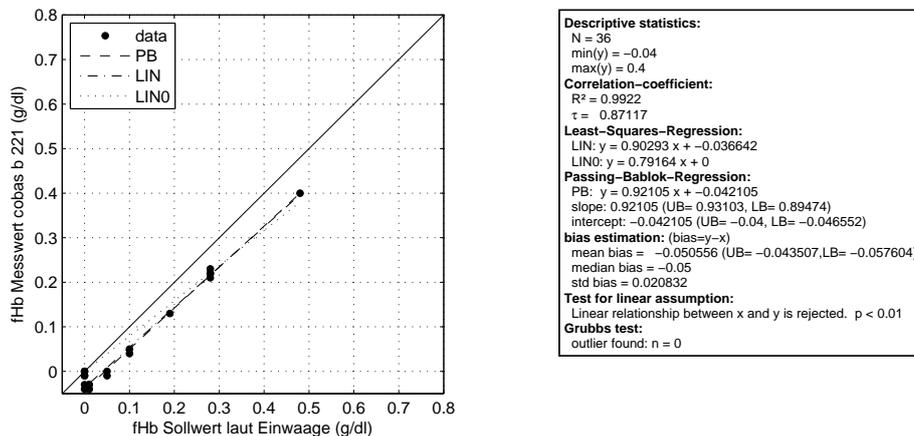


Abbildung 22: Gesamte Messpunkte der Messreihe 9.2

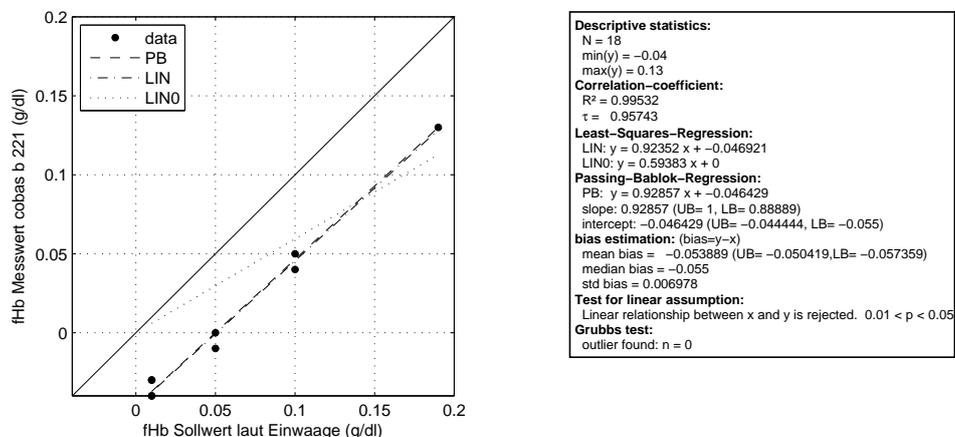


Abbildung 23: Ausschnitt von Messpunkten der Messreihe 9.2

In Abbildung 22 erkennt man die Verkippung der aufgenommenen Istwerte zu den Sollwerten. Auf der y- Ordinate sind die gemessenen Istwerte, auf der x- Ordinate die Sollwerte laut Einwaage aufgetragen.

Greift man den Messbereich 0.01 bis 0.2 g/dl näher heraus, ist eine Verkippung zur Identität feststellbar, siehe Abbildung 23. Es stellt sich bei dieser Untersuchung heraus, dass die aufgenommenen Messwerte in diesem Bereich unterbestimmt sind.

9.3 tHb- Messungen unter der Spezifikations- Grenze

Bei dieser Untersuchung der Messperformance wird die eventuelle Auswirkung verschiedener Blutprobenspender näher betrachtet. Es sollen wieder fHb- Werte im tiefen Konzentrations- Bereich gestellt werden.

Es werden je Spenderblut die fHb- Werte 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 und 5.0 g/dl gestellt. Die Vermessung der Proben erfolgt am **cobas b 221** System. Weiters sollen als Referenzwerte nicht nur die berechneten Konzentrationen herangezogen werden, sondern es soll auch die Vermessung an einem ABL 700 der Firma Radiometer erfolgen.

9.3.1 Auswertung

Im Unterschied zur Untersuchung unter Punkt 9.2 liegen die Messpunkte des **cobas b 221** Systems, siehe Abbildung 24, über den gesamten aufgenommenen Messbereich von 0.4 bis 5.0 g/dl näher an der Identitätslinie als im Vergleich dazu die Messwerte des Radiometer ABL 700, siehe Abbildung 25.

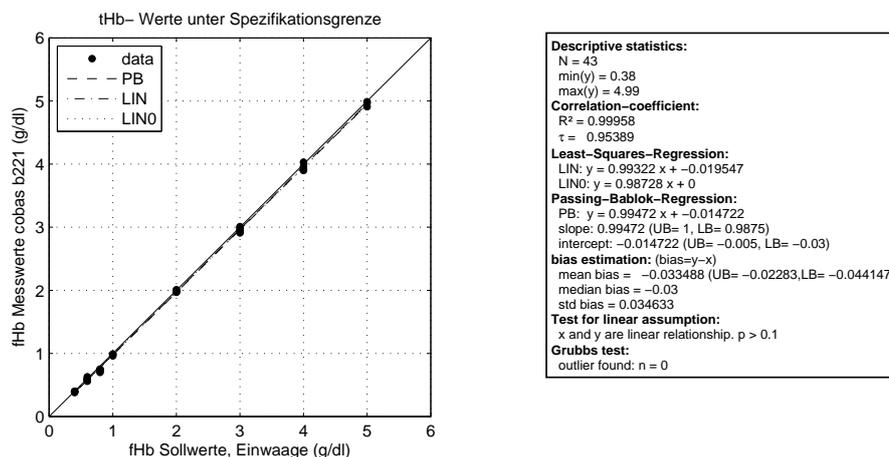


Abbildung 24: Gesamte Messpunkte der Messreihe 9.2

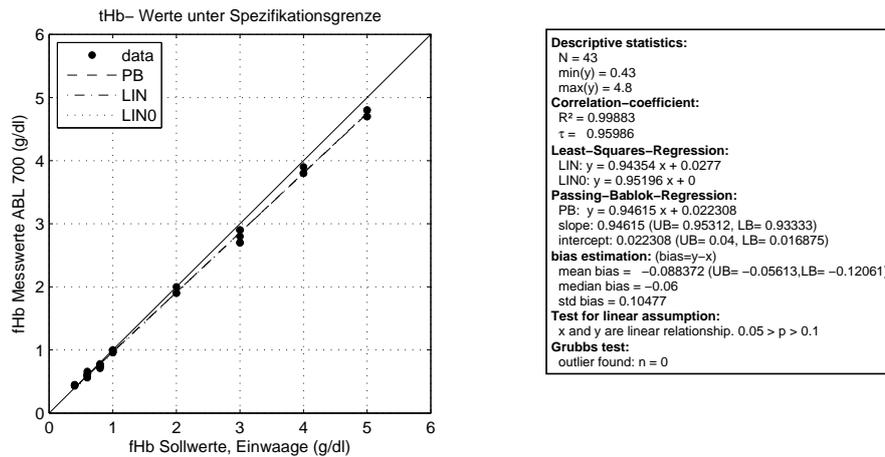


Abbildung 25: Ausschnitt von Messpunkten der Messreihe 9.2

9.4 Erste Messreihe freies Hämoglobin

Ein Teil des nativen Vollblutes wird auf den tHb- Wert von 16 g/dl gestellt und anschließend hämolysiert. Es werden die fHb- Werte 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3 und 0.5 mit hämolysiertem Vollblut durch Pipettieren gestellt. Die Proben werden zusammen mit der Blindprobe, diese entspricht reinem Plasma und physiologischer Kochsalzlösung, am cobas b 221 System vermessen.

9.4.1 Auswertung

Die Messung der fHb- Werte ist über den gesamten Messbereich linear, siehe Abbildung 26. Bei dem Vergleich der Ist- und Soll- Werte ist im Bereich geringer Konzentrationen (0 bis 0.2 g/dl), siehe Abbildung 27, gut erkennbar, dass durch die „OLS“- Methode anstelle von einem fHb- Wert gleich 0 g/dl ein negativer fHb- Wert ausgegeben wird. In Kapitel 12.7 wird darauf noch einmal eingegangen.

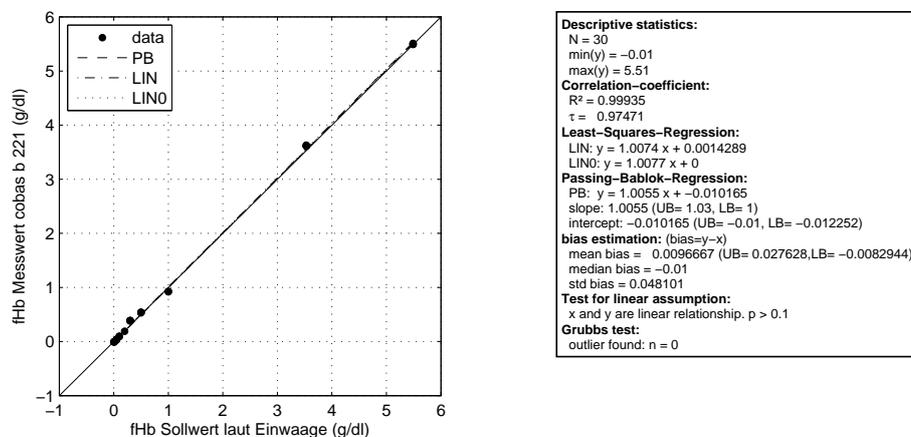


Abbildung 26: Messpunkte der Messreihe 9.4

Der Offset der Messwerte zur Identitätslinie, wie in Messreihe 9.2 beobachtet, tritt hier nicht so stark auf. Der Slope- Fehler ist gar nicht vorhanden. Diese beiden Aspekte könnten auf eine eventuelle Verschmutzung des Blutplasmas in der vorhergehenden Untersuchung zurückzuführen sein.

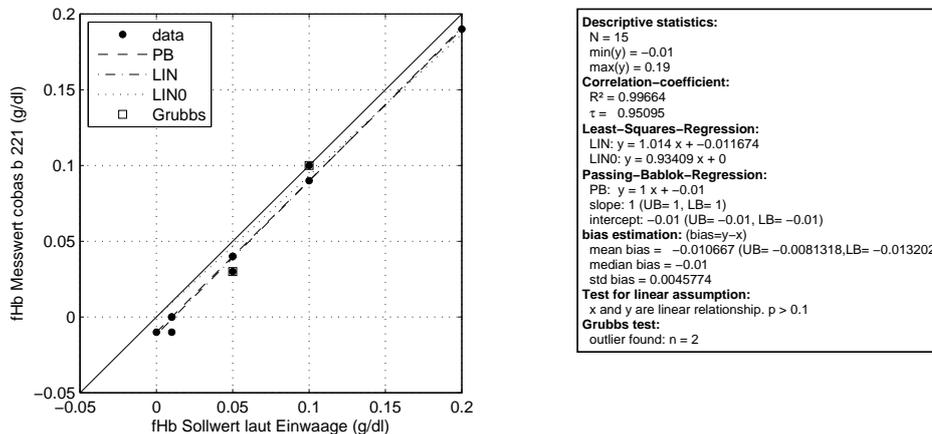


Abbildung 27: Ausschnitt der Messpunkte der Messreihe 9.4

9.5 Linearität cobas b 221 System, Vermessung von ClinChek[®] Lösungen

Es soll eine Vermessung von sechs verschiedenen Level einer Hämoglobin- Kontrolllösung am **cobas b 221** System durchgeführt werden. Zusätzlich soll eine Überprüfung der Richtigkeit der Kontrolllevel mit Hilfe der HICN- Methode am Photometer Shimadzu erfolgen.

ClinChek[®] Kontrollen dienen der internen Qualitätssicherung im klinisch- chemischen Laboratorium. Es handelt sich um lyophilisierte Kontrollen, hergestellt aus Erythrozyten humanen Ursprungs, mit Sollwerten in sechs verschiedenen Konzentrationsbereichen.

Level	Lot Nr.	fHb Soll- Wert (g/dl)	Rekonstitutionslösung (ml)
1	8812	0.0776	1
2	8813	0.1910	1
3	8814	0.4090	1
4	8912	0.0041	1
5	8913	0.0128	1
6	8914	0.0271	1

Tabelle 7: Probenherstellung der Clin- Check[®] Lösungen mit Rekonstitutionsflüssigkeit

Zum vollständigen Lösen des Lyophilisats empfiehlt sich die Verwendung eines Probenrollers. Eine 30- minütige Homogenisierung der Probe ist ausreichend. Zusätzlich ist der

Einsatz eines Vortex- Rüttlers empfehlenswert. Die Rekonstitutionslösung, die den Kontrollen beige packt ist, muss vor Benutzung auf Raumtemperatur gebracht werden. Zum Inhalt eines Fläschchens (Lyophilisat- Pulver) wird exakt 1.0 ml der Rekonstitutionslösung beigefügt. Die Proben werden homogenisiert.

Bei der Messung am **cobas b 221** System sollte sich die bis jetzt ermittelte verkippte lineare Kennlinie wiederfinden. Die Vermessung am Photometer sollte die Datenpunkte genau auf der Identitätslinie abbilden.

9.5.1 Auswertung

Die Vermessung der Clin- Check[®] Lösungen zeigt am Photometer die zu erwartende Messperformance. Die gemessenen Werte der Kontrolllösungen finden sich alle auf der Identitätslinie wieder, siehe Abbildung 28.

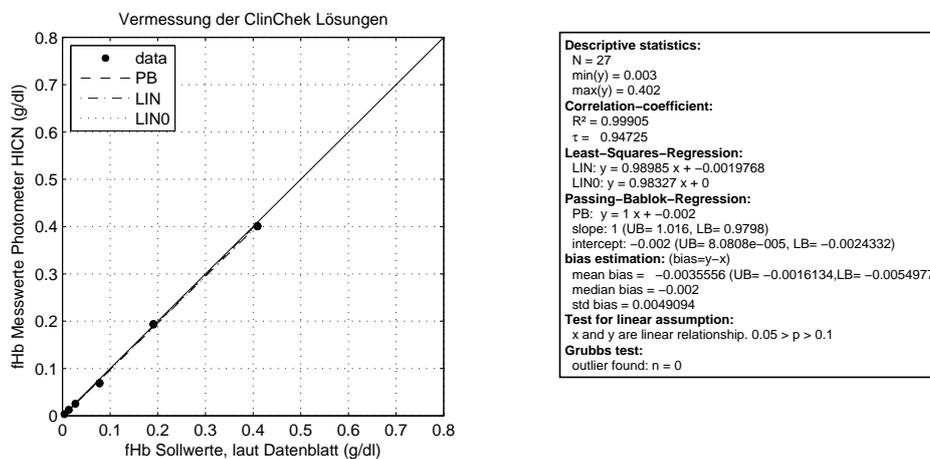


Abbildung 28: Vermessung der Clin Check[®] Kontrollproben, Photometer

Die Vermessung am **cobas b 221** System zeigt, dass die Auflösungsgrenze der Messmethode, die 3 tiefen Kontrolllevel (siehe Tabelle 7) können nicht unterschieden werden, erreicht ist. Zusätzlich wird die schon bekannte Verkipfung der Messwerte weg von der Identitätslinie aufgezeigt. Dies spiegelt sich in der Unterbestimmung der Konzentrationen der fHb- Werte wieder, siehe Abbildung 29. Die stärkere Verkipfung im Vergleich zur Abbildung 22 ist auf die nicht vollständig erfolgte Auflösung des Lyophilisat- Pulvers in der Rekonstitutionslösung zurückzuführen.

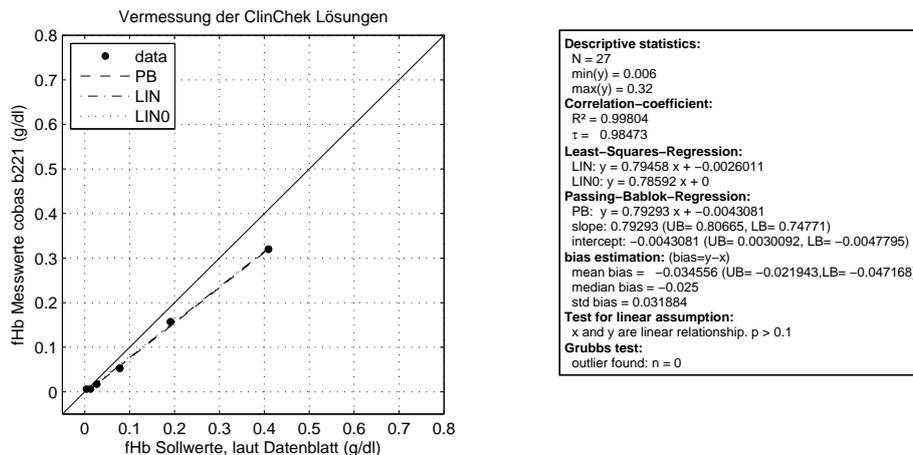


Abbildung 29: Vermessung der Clin Check[®] Kontrollproben, **cobas b 221** System

9.6 Vermessung gestellter fHb- Lösungen

Es soll eine Vermessung von sechs verschiedenen gestellten fHb- Werten in reinem Blutplasma erfolgen. Das Vollblut stammt von einem Spender. Die HICN- Methode wird wieder als Referenzverfahren angewendet.

Das Probenstellen erfolgt nach Methode 1, wie sie in Kapitel 6.1.2 beschrieben ist. Mit Hilfe der Formel 15 werden die gewünschten fHb- Werte zuerst berechnet, und daraufhin mittels Einwaage gestellt. Der tHb- Wert des Vollblutes beträgt 12.92 g/dl, die Masse der Erythrozyten beträgt 33.90 g und die Masse des Blutplasmas beträgt 36.57 g. Die Zugabe der Erythrozyten in Blutplasma erfolgt nach Tabelle 8.

Probe	fHb- Probe soll (g/dl)	Plasma (g)	Erythrozyten (g)
1	0.02	6.15	0.01
2	0.10	6.14	0.02
3	0.15	6.11	0.05
4	0.35	6.04	0.11
5	0.55	5.93	0.23
6	1.0	5.70	0.46

Tabelle 8: Probenherstellung natürliches fHb

9.6.1 Auswertung

Die Vermessung der gestellten Proben mit unterschiedlichen fHb- Werten ist am **cobas b 221** System erfolgreich verlaufen. Bei Herstellung der Photometerproben trat bei der höchsten fHb- Konzentration ein Fehler (Pipettierfehler) auf, daher sind diese Messwerte nicht in die Auswertung miteinbezogen. Auf Basis der bekannten Verkippung erfolgt eine erste Erstellung einer Korrekturfunktion, die in Abbildung 30 angewendet wird, siehe auch Kapitel 8.9. Diese Korrektur wird anhand der Messdaten aus den bisher erfolgten

Messungen in Blutplasma erstellt.

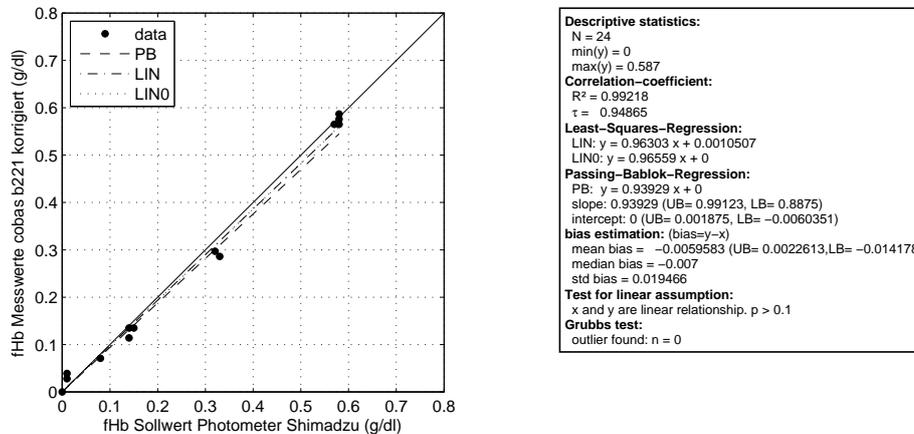


Abbildung 30: Messwerte cobas b 221 System mit Korrektur nach Formel 29

9.7 Methodenvergleich cobas b 221 System, Photometer Shimadzu (HICN- und AHD- Methode)

Wieder sollen zwei verschieden gestellte fHb- Werte in reinem Blutplasma vermessen werden. Das Vollblut stammt von einem Spender. Die HICN- Methode wird wieder als Referenz verwendet. Es soll eine eventuell abweichende Bestimmung des fHb durch die AHD- Methode charakterisiert werden. Die Proben werden am **cobas b 221** System, am Photometer Shimadzu mit Hilfe der HICN- Methode und zusätzlich am Photometer Shimadzu mit Hilfe der AHD- Methode vermessen.

9.7.1 Auswertung

In Abbildung 31 werden zuerst die beiden Methoden (HICN- und AHD- Methode) miteinander verglichen. Es zeigt sich, dass die ermittelten Messwerte der AHD- Methode mehr als die ermittelten Messwerte der HICN- Methode streuen.

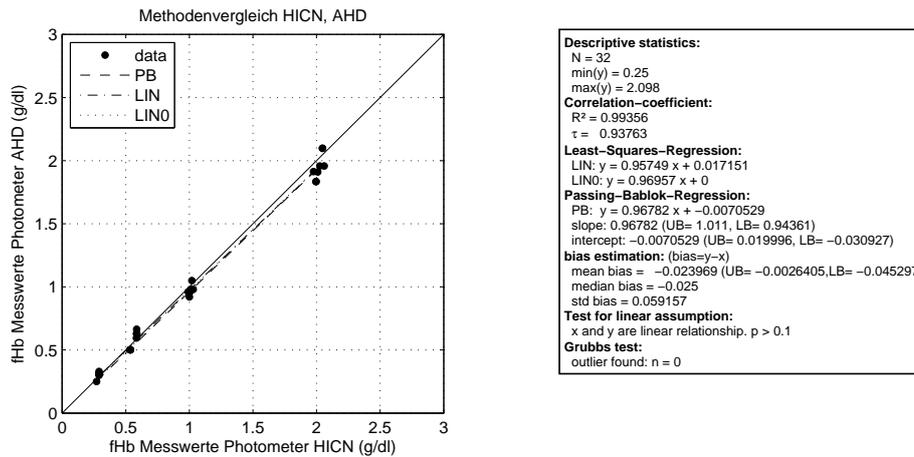
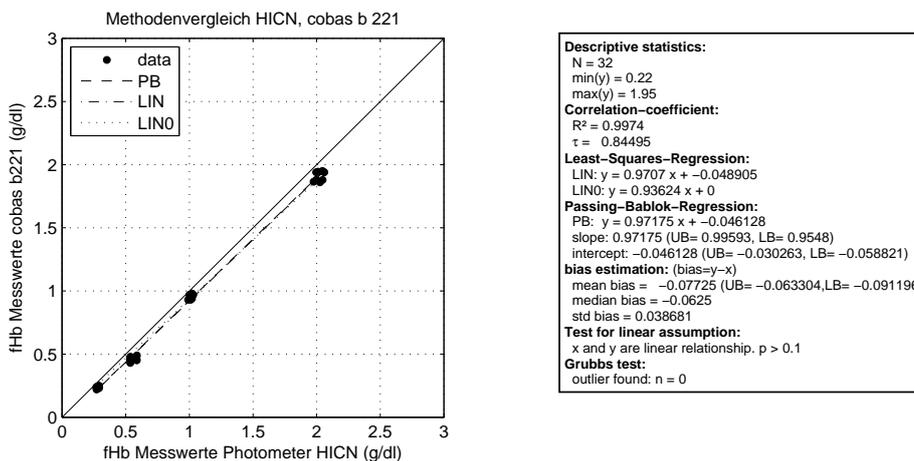
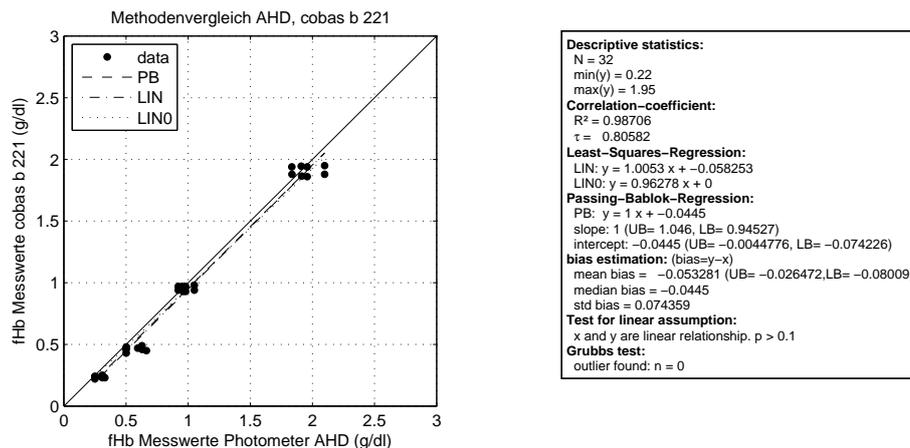


Abbildung 31: Vergleich Messwerte HICN- und AHD- Methode

Abbildung 32: Vergleich Messwerte HICN- Methode und **cobas b 221** System

Es liegt eine gute Übereinstimmung der Messwerte des **cobas b 221** Systems und der HICN- Methode am Photometer Shimadzu vor, siehe Abbildung 32. Die gleichen Messwerte aufgetragen gegenüber der AHD- Methode weisen eine geringere Übereinstimmung auf, siehe Abbildung 33. Somit kann gesagt werden, dass die AHD- Methode für die weiteren Referenzmessungen nicht mehr berücksichtigt wird und weiter die HICN- Methode angewendet wird.

Abbildung 33: Vergleich Messwerte AHD- Methode und **cobas b 221** System

9.8 Verdünnungsreihe fHb

Die Vermessung einer Verdünnungsreihe erfolgt mit extern hämolysiertem Vollblut in NaCl. Das Vollblut stammt von einem Spender. Die HICN- Methode wird als Referenzverfahren angewendet. Es soll die Korrektheit der Vermessung am **cobas b 221** System untersucht werden.

Probe	fHb- Probe soll, g/dl	Probe ml + NaCl ml
Stock	12.7348	
P1	6.3670	4ml Stock + 4 ml NaCl
P2	3.1835	4ml P1 + 4 ml NaCl
P3	1.5900	4ml P2 + 4 ml NaCl
P4	0.7950	4ml P3 + 4 ml NaCl
P5	0.3980	4ml P4 + 4 ml NaCl
P6	0.1990	4ml P5 + 4 ml NaCl
P7	0.0990	4ml P6 + 4 ml NaCl
P8	0.0497	4ml P7 + 4 ml NaCl
P9	0.0250	4ml P8 + 4 ml NaCl
P10	0.0124	4ml P9 + 4 ml NaCl

Tabelle 9: Probenherstellung Verdünnungsreihe mit NaCl

9.8.1 Auswertung

Die Vermessung der Proben zeigt über den gesamten Messbereich einen linearen Verlauf und eine leichte Verkippung. Mit der Korrektur aus Kapitel 8.9 liegen die Messwerte sehr schön an der Identitätslinie, siehe Abbildung 34.

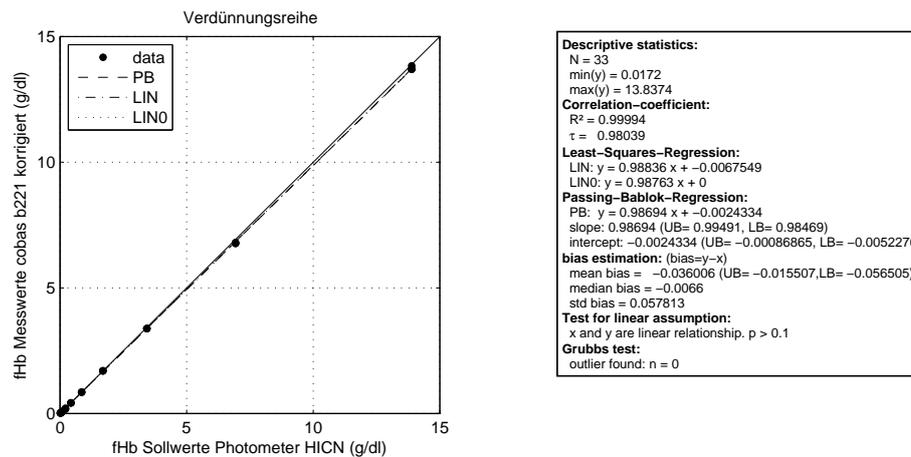


Abbildung 34: Gesamter Messbereich **cobas b 221** System mit Korrektur- Faktor

Sieht man sich den Ausschnitt der Vermessung im Bereich 0.0 bis 0.4 g/dl näher an, so erkennt man einen nichtlinearen Verlauf, siehe Abbildung 35. Diese Eigenschaft ist durch die unterschiedliche Matriceigenschaften von Plasma und NaCl zu erklären. Bei weiteren Vermessungen im tiefen fHb- Bereich in NaCl gestellten Proben muss somit ein weiterer Korrekturfaktor eingebaut werden.

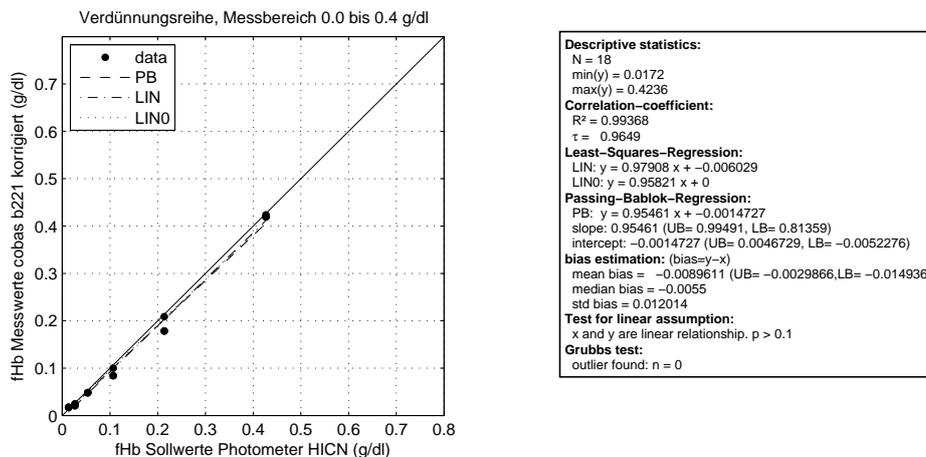


Abbildung 35: Ausschnitt Messbereich **cobas b 221** System mit Korrektur- Faktor aus Kapitel 8.9

9.9 Vermessung von natürlichen fHb- Werten

Die Vermessung von neun natürlichen fHb- Werten in reinem Blutplasma erfolgt am **cobas b 221** System. Das Vollblut stammt von mehreren Spendern. Die HICN- Methode wird als Referenzverfahren angenommen.

9.9.1 Auswertung

Vier Messwerte pro Messpunkt lassen keine eindeutige Bestimmung der Präzision zu, es ist zu wenig Probe je Spender vorhanden. Trotzdem kann man sagen, dass die Auflösung

am **cobas b 221** System (0.01g/dl) bei diesen kleinen Konzentrationen zu gering ist. Eine zufriedenstellende Unterscheidung der verschiedenen Proben bei einer sehr geringen fHb-Konzentration ist nicht möglich, siehe Abbildung 36.

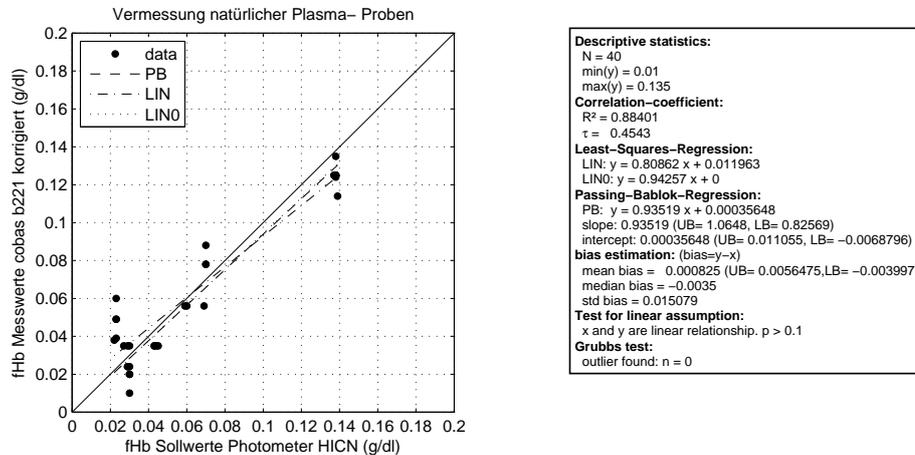


Abbildung 36: Ausschnitt Messbereich **cobas b 221** System mit Korrektur- Faktor aus Kapitel 8.9

9.10 Interferenzmessungen - Korrekturfunktion Methylenblau

Nach der Erstellung einer Korrekturfunktion für den Interferenten Methylenblau mit Hilfe des Programms MatLab[®] soll die eventuell veränderte Messperformance getestet werden. Es soll gezeigt werden, dass die Interferenzeinflüsse von Methylenblau keine Messwertverfälschungen mehr verursachen.

Es werden teils Messdaten aus den Voruntersuchungen verwendet als auch neue Messwerte am **cobas b 221** System aufgenommen. Das Erkennen des Einflusses von Methylenblau in den Rohspektren des **cobas b 221** Systems soll erfolgen. Weiters soll eine zuverlässige Filterung des Interferenten auch bei verschiedenen Konzentrationen erreicht werden. Großer Wert wird auf die Reproduzierbarkeit der Messergebnisse gelegt.

9.10.1 Auswertung

Die Korrekturfunktion wurde erstellt, siehe Kapitel 8.10. Es kann eine merkliche Kompensation des Einflusses des Interferenten Methylenblau erreicht werden. Die Differenz der Interferenz- zur Referenzprobe beträgt vor der Berechnung mit der Korrekturfunktion 0.8 g/dl und danach nur noch 0.1 g/dl, siehe auch Kapitel 12.8.

10 Messreihen Referenzmaterial

10.1 Referenzreihenbildung mit Lyophilisat- Pulver

Es werden Proben mit den tHb- Werten 3, 5, 10, 15 und 20 g/dl durch Einwaage eines Lyophilisat- Pulvers, siehe Kapitel 6.7, in physiologische Kochsalzlösung hergestellt. Die Proben werden zusammen mit der Blindprobe, diese entspricht reiner physiologischer Kochsalzlösung, am Photometer Shimadzu vermessen. Weiters wird auch am **cobas b 221** System eine Vermessung der Proben durchgeführt.

10.1.1 Auswertung

Wie in Kapitel 6.7.1 schon erwähnt, treten bei der Vermessung mit Hilfe des Lyophilisat- Pulvers Probleme auf. Durch die Berücksichtigung der Verschmutzung des Lyophilisat- Pulvers, welche durch eine Anpassung der Einwaage erfolgt, kann keine merkliche Verbesserung der Messwerte am **cobas b 221** System erzielt werden, siehe Abbildung 37.

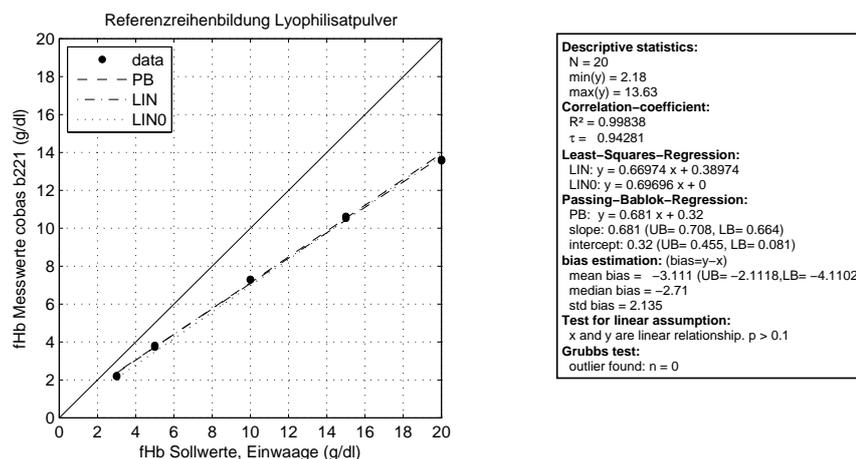


Abbildung 37: Einwaagewerte gegen **cobas b 221** System

Im Gegensatz dazu sind die Messwerte der HICN- Methode weniger verkippt, siehe Abbildung 38. Durch den Vergleich zeigt sich eine starke Abweichung der **cobas b 221** System Messwerte zu den Messwerten am Photometer. Diese stark abweichenden Messergebnisse sind dadurch erklärbar, dass sich das Lyophilisat- Pulver in der zur Verfügung stehenden Zeit von 15 Minuten nicht vollständig in NaCl aufgelöst hat. Abhilfe kann möglicherweise eine längere Homogenisierungsdauer schaffen.

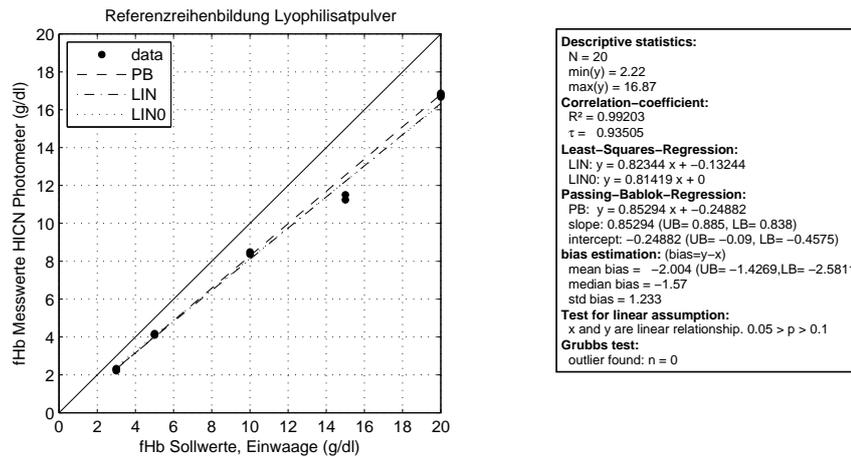


Abbildung 38: Einwaagewerte gegen Photometer HICN

10.2 Photometer HICN- Probenvermessung, zeitlicher Einfluss

Die Aufnahme der Spektren des Hämoglobin- Pulvers erfolgt im Konzentrationsbereich von 3 bis 12 g/dl. Ein Erkennen eines zeitlichen Einflusses auf das HICN- Proben- Gemisch, in weiterer Folge ein Erkennen einer eventuellen Degradation des resultierenden fHb- Wertes, ist das Ziel dieser Untersuchungsreihe. Laut der Literaturstelle [Sta96] soll der zeitliche Einfluss auf die gestellten HICN- Proben gering bis gar nicht vorhanden sein.

Die Probenvorbereitung erfolgt wie in Messreihe 10.1. Die Proben werden am Photometer Shimadzu mit Hilfe der HICN- Methode vermessen.

10.2.1 Auswertung

Der Vergleich der Einwaagewerte mit den Messwerten des Photometer Shimadzu (HICN) zeigt, wie schon in der zuvor durchgeführten Untersuchung, eine leichte Verkippung der Messwerte, siehe Abbildung 39.

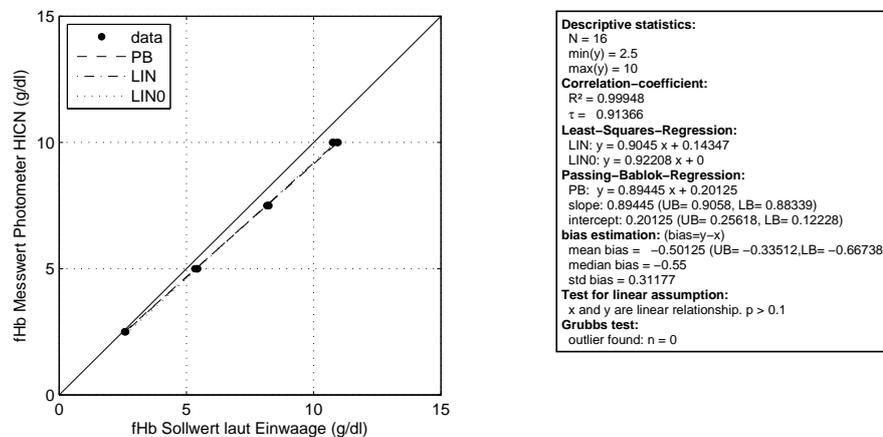


Abbildung 39: Unterbestimmung der Konzentrationen von fHb

Es kann durch die Vermessung der Proben am Photometer gezeigt werden, dass es nach ausreichender Homogenisierungsdauer des Lyophilisat- Pulvers in NaCl, keinen zeitlichen Einfluss auf den fHb- Wert der Probe gibt.

Lässt man aber das HICN- Proben- Gemisch zu kurz am Probenroller, weniger als 30 Minuten, so wird durch die geringere Homogenisierung der Probe der fHb- Wert stark unterbestimmt, wie in Kapitel 10.1 beobachtet. Die Konversion der Hämoglobin- Formen ist noch nicht zur Gänze abgeschlossen. Ab einer Zeitdauer von ca. 30 Minuten ist die Homogenisierung zur Gänze abgeschlossen und die Stabilität des HICN- Proben- Gemisches ist gegeben.

10.3 Abtrenndevise- Probenvermessung

Bei dieser Messreihe soll eine Aufnahme der Spektren des freien Hämoglobins im Konzentrationsbereich von 1 bis 10 g/dl erfolgen. Es soll die Performance des Abtrenndevise bestimmt werden.

Die Proben werden mit fHb- Werten von 1 bis 10 g/dl durch Pipettieren von extern hämolysierten Erythrozyten in reinem Plasma gestellt. Das Stellen erfolgt auf zwei unterschiedliche Arten.

Es wird die Funktionstüchtigkeit der Abtrenndevise- Methode untersucht und eine Charakterisierung der Eigenschaften soll erfolgen. Weiters soll eine Aussage darüber getätigt werden, ob der Hämatokrit- Wert einen Einfluss auf das Messergebnis hat.

Es werden zwei unterschiedliche Arten der Probenherstellung durchgeführt:

- Ein Teil des Vollblutes wird zentrifugiert, das Plasma abgehoben. Der Rest des Vollblutes wird extern hämolysiert. Dieses hämolysierte Blut wird zum abgehobenen Plasma hinzupipettiert. Somit können unterschiedliche fHb- Werte gestellt werden. Die Vermessung erfolgt mit und ohne Verwendung des Abtrenndevices am **cobas b 221** System.
- Ein bestimmter Hämatokrit- Wert wird gestellt. Das Blut wird zentrifugiert, das Plasma abgehoben. Daraufhin werden Erythrozyten in unterschiedlicher Menge in das Plasma hinzugefügt. Die Probe wird für zehn Minuten am Probenroller homogenisiert. Es wird mit Hilfe des Abtrenndevices das Plasma wieder extrahiert. Die Vermessung erfolgt am **cobas b 221** System.

10.3.1 Auswertung

Die zwei unterschiedlich hergestellten Proben werden am **cobas b 221** System bei vier gestellten fHb- Werten vermessen. Die Messwerte zeigen einen linearen Verlauf, siehe Abbildung 40. Das Abtrenndevise beeinflusst die Vermessung, auch bei einem verstellten Hämatokrit- Wert, nicht.

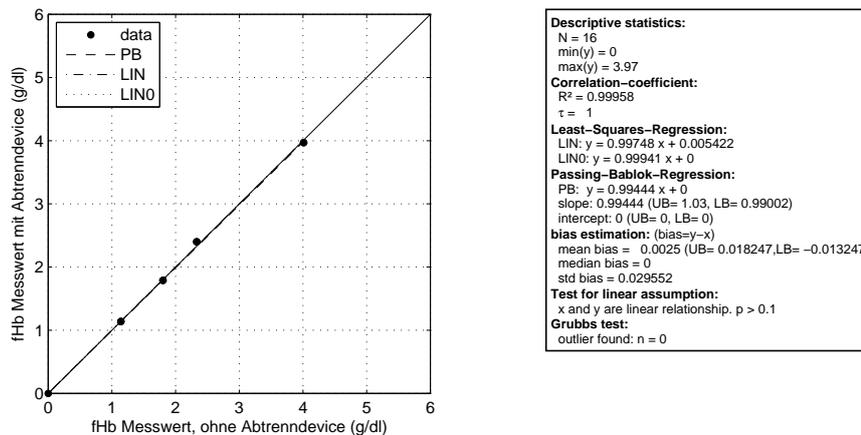


Abbildung 40: Vermessung fHb Wert mit und ohne Abtrenndevise

Weiters kann festgestellt werden, wie sich der Hämatokrit- Wert auf den Probendurchlauf durch das Abtrenndevise auswirkt. Je höher der Hämatokrit- Wert ist, also je mehr Erythrozyten in die Probe hinzugefügt werden, desto mehr Filtermaterial muss im Abtrenndevise eingelegt sein. Ist das nicht der Fall, verstopfen die Filterporen und der Probendurchlauf ist nicht mehr möglich.

Es ist somit auch hier keine negative Beeinflussung der Abtrenndevise- Methode auf das Messergebnis feststellbar. Die Ergebnisse sind sowohl bei Vollblut in NaCl, als auch bei reinem Plasma sehr zufriedenstellend. In Abbildung 41 ist der Zusammenhang zwischen der Anzahl der Filter und der Höhe des Hämatokrit- Wertes dargestellt.

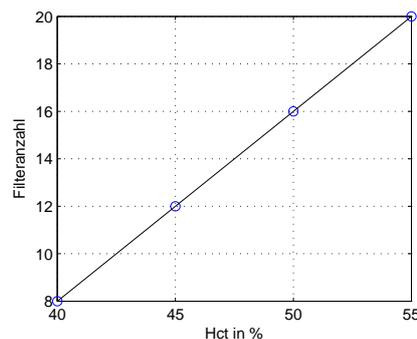


Abbildung 41: Zusammenhang Anzahl der Filter und Höhe des Hämatokritwertes

10.4 Stabilität des HICN- Proben- Gemisches, Vergleich Vollblut mit Lyophilisat- Pulver

Es werden sowohl Proben durch Einwaage von extern hämolysierten Erythrozyten in Blutplasma mit den fHb- Werten 1.1, 1.8, 2.3 und 4.0 g/dl als auch Proben durch Einwaage eines Lyophilisat- Pulvers (Hämoglobin) in physiologische Kochsalzlösung mit den fHb- Werten 2.5, 5.0, 7.5 und 10 g/dl hergestellt. Die Proben werden nach der Homogenisierung

je zweimal am Photometer Shimadzu mit Hilfe der HICN- Methode, im Abstand von 24 Stunden, vermessen.

10.4.1 Auswertung

Die gemessenen Werte der gestellten Proben mit hämolysierten Erythrozyten eingewogen in Blutplasma, liegen zum Messzeitpunkt 1 nahe an der Identitätslinie. Es liegt eine leichte Verkippung vor, siehe Abbildung 42. Zum Messzeitpunkt 2 ist ein leichter Offset zu Messzeitpunkt 1 feststellbar, die Verkippung nimmt nur sehr leicht zu, siehe Abbildung 43. Somit tritt nur eine sehr geringe Abweichung der Messwerte über die Zeit auf.

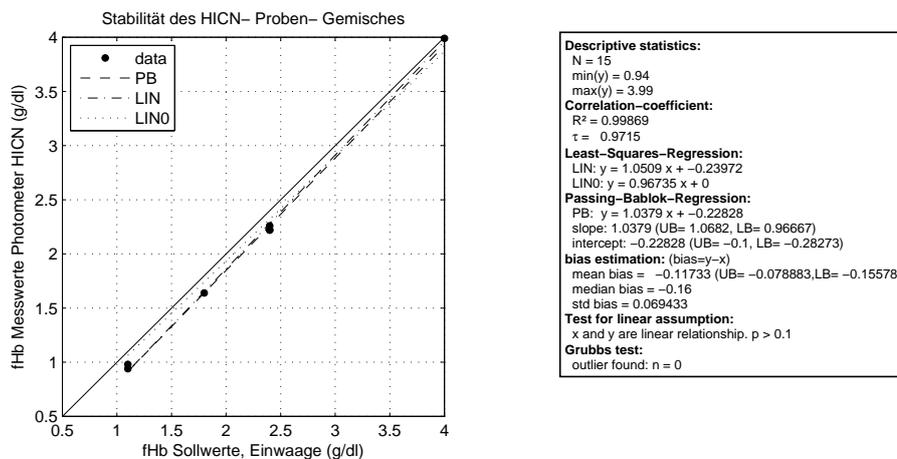


Abbildung 42: Vermessung Blutplasma Proben, Messzeitpunkt 1

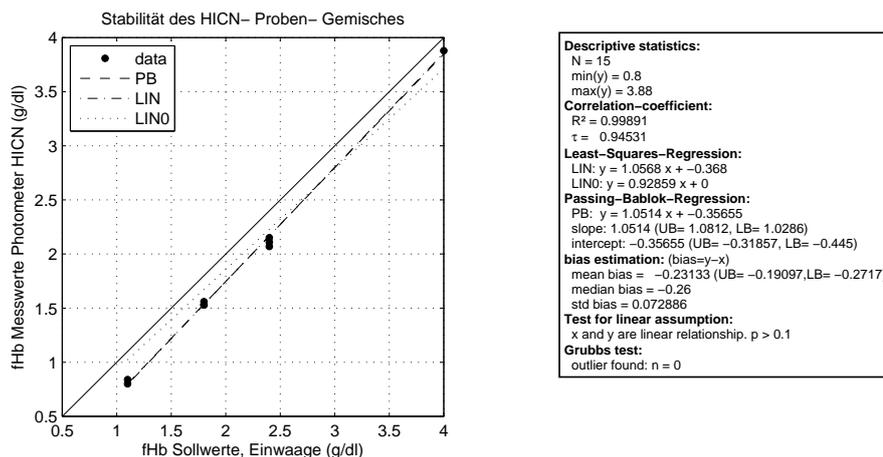


Abbildung 43: Vermessung Blutplasma Proben, Messzeitpunkt 2

Bei der Vermessung der Proben, die durch Einwaage eines Lyophilisat- Pulvers in physiologische Kochsalzlösung gestellt wurden, ist eine gut erkennbare Zeitabhängigkeit feststellbar. Die Messwerte sind zu Beginn, aufgrund einer fehlerhaften Probeneinwaage leicht überbestimmt, siehe Abbildung 44. In weiterer Folge fallen diese Proben aber viel stärker

als die gestellten Proben mit hämolysierten Erythrozyten über die Zeit ab, siehe Abbildung 45.

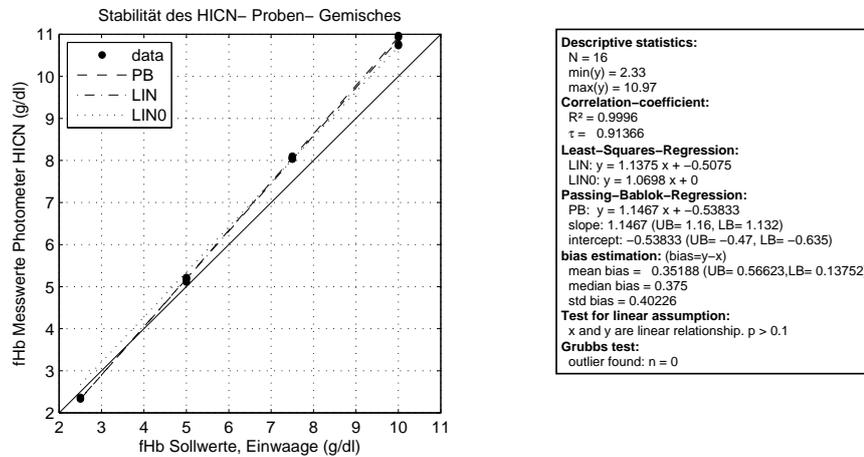


Abbildung 44: Vermessung Lyophilisat- Proben, Messzeitpunkt 1

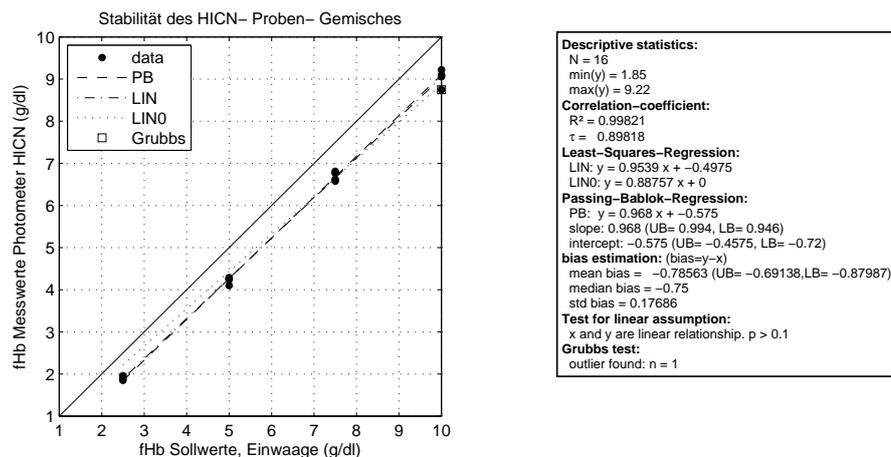


Abbildung 45: Vermessung Lyophilisat- Proben, Messzeitpunkt 2

10.5 Vermessung des HICN- Reagents, Plasma Proben (0.01 bis 0.1 g/dl)

Die natürlichen Plasma- Proben werden am Photometer Shimadzu mit Hilfe der HICN- Methode vermessen. Es sollen unterschiedliche Reagenzlösungen für die HICN- Methode verwendet werden, um einen Einfluss veralteter Reagenzien ausschließen zu können. Es soll eine Vermessung mehrerer nativer Plasmaproben von verschiedenen Spendern erfolgen.

Das Probenstellen erfolgt nach Methode 2, wie sie in Kapitel 6.1.2 beschrieben ist.

10.5.1 Auswertung

Die erfassten Messdaten am Photometer Shimadzu, welche mit der neuen HICN- Reagent-Lösung (Erstelldatum: Februar 2010) hergestellt worden sind, sind im Vergleich zum Referenzwert, der älteren HICN- Reagent- Lösung (Erstelldatum: 16.10.2009) leicht verkippt, etwas überbestimmt. Der Vergleich der beiden Lösungen zeigt somit eine Veränderung des Reagents auf. Da laut Datenblatt die Lagerung lichtgeschützt erfolgen muss, kann hier auf einen eventuellen Einfluss der Lichteinstrahlung rückgeschlossen werden.

Es kann somit festgestellt werden, dass bei der Messung am Photometer Shimadzu mit Hilfe der HICN- Methode eine Zeitabhängigkeit für die Bestimmung des fHb- Wertes besteht. Diese Differenz ist aber nicht auf eine Veränderung der Plasma- Probe zurückzuführen, sondern auf eine Veränderung des HICN- Reagents, siehe Abbildung 46.

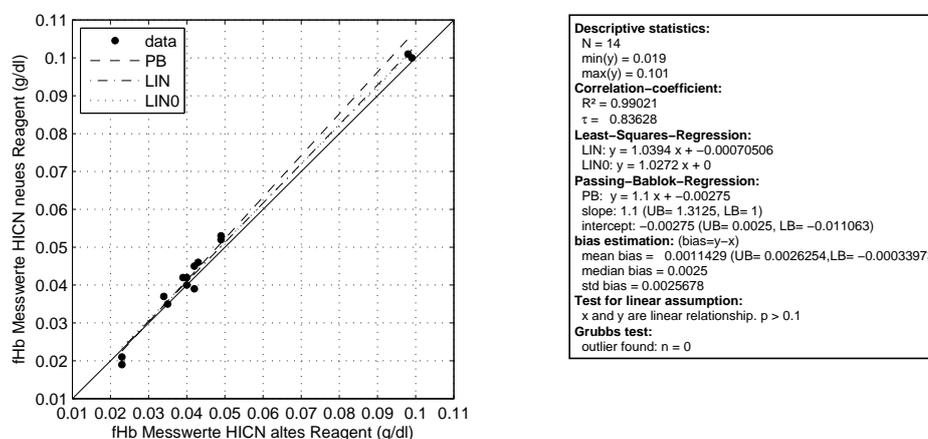


Abbildung 46: Vergleich HICN- Reagent alt zu HICN- Reagent neu

10.6 Ergebnis der Referenzmessungen

Das Lyophilisat- Pulver ist nicht geeignet für die Referenzbildung bei weiteren fHb- Messungen. Bei allen durchgeführten Messungen schneidet die Probenherstellung mit humanem Plasma und Erythrozyten aus Vollblut besser ab.

Es wird daher von weiteren Vermessungen mit dem Lyophilisat- Pulver abgesehen. Diese Methode dient nicht als zuverlässige Referenz, da viele Unsicherheitsfaktoren zu berücksichtigen sind:

- eine eventuelle Verunreinigung des Pulvers,
- eine nicht vollständige Auflösung des Pulvers in NaCl
- und ein Rückstand von festen Bestandteilen in der Lösung.

11 Interferenten- Untersuchung

Im Zuge der Diplomarbeit sollte zusätzlich eine Interferentenuntersuchung durchgeführt werden, die alle relevanten Interferenten des **cobas b 211** Systems einschließt. Eine bereits vorhandene Interferentenliste kann dazu herangezogen werden [Sch10].

Grundsätzlich gibt es in der Oxymetrie bei der Vermessung der Blutgase Beeinflussungen, die sich negativ auf das Messergebnis auswirken. Die gemessene Konzentration von tHb in Vollblut kann, aufgrund des Vorhandenseins eines Farbstoffes in dem zu untersuchenden Probenvolumen, stark überbestimmt werden.

Als Interferenten werden jene Stoffe bezeichnet (Farbstoffe, Lipide, Plasma- Expander) die dem Patienten in medizinischer Therapie, bei Untersuchungen oder bei Operationen verabreicht werden können. Diese Stoffe können dabei aber das Blut (Matrix) und die Blutgase beeinflussen.

In verschiedenen Literaturquellen wie z.B.: [BB94], [Mal97] werden allgemeine Störfaktoren, wie

- Lipide (Trübung bei fotometrischer Analyse),
- Bilirubin (Störung von Indikatorreaktionen),
- Paraproteine (Trübung bei fotometrischer Analyse, monoklonale Komponenten, M-Gradient),
- kreuzreagierende Komponenten bei immunchemischen Verfahren (z.B. Arzneimittel-Metabolite),
- humane anti- Maus- Antikörper (Störung von IA),
- Antikoagulanzen (Serum- Elektrophorese, S- K, S- Fe),
- Infusionslösungen (verdünntes Serum),
- Bakterien, Hefen,
- und andere Pharmaka (z.B. Benzylpenicilline bei Proteinbestimmung)

aufgelistet.

Weiters kann Sulf- Hämoglobin auch als Interferent angesehen werden. Da Sulf- Hämoglobin praktisch nicht mehr als Messparameter auftritt, wird bei den neuen Multiparameteranalysen dieser Parameter nicht mehr berücksichtigt. Daher wird dieser bei eventuellem Vorhandensein bei den gängigen Messmethoden nicht mehr richtig erkannt [Wea97], [CLS10].

Auch Hydroxocobalamin kann bei Gabe als therapeutisches Medikament Interferenzen bei anderen Hämoglobin- Fraktionen verursachen [Gea07].

11.1 Auswahl der Interferenten

Die Auswahl der zu untersuchenden Interferenten erfolgt nach einer internen Interferentenliste [Sch10]. Das Augenmerk ist auf jene Interferenten gelegt, die die photometrischen Methoden besonders beeinflussen. Es werden somit 16 Interferenten vermessen und werden folgend angeführt:

- Lipidem mit der Konzentration $c = 10 \text{ mg/ml}$,
- Omegaven mit der Konzentration $c = 5 \text{ mg/ml}$,
- Lipofundin 20% mit der Konzentration $c = 10 \text{ mg/ml}$,
- Haes- Steril 10% mit einer Verdünnung von 1:1 (1 Teil Plasma, 1 Teil Interferent),
- Gelofusin 4% mit einer Verdünnung von 1:1,
- Voluven 6% mit einer Verdünnung von 1:1,
- SMOF- lipid 20% mit der Konzentration $c = 10 \text{ mg/ml}$,
- Intralipid 20% mit der Konzentration $c = 10 \text{ mg/ml}$,
- Propofol 2% mit der Konzentration $c = 0.11 \text{ mg/ml}$,
- Methylenblau, Konzentrationsreihe von $c = 30$, $c = 10$, $c = 3 \text{ mg/l}$,
- Indocyaningrün mit der Konzentration $c = 5 \text{ mg/l}$,
- Evans- Blau mit der Konzentration $c = 5 \text{ mg/l}$,
- Beta- Carotin mit der Konzentration $c = 3.7 \text{ } \mu\text{mol/l}$,
- Hydroxocobalamin, Konzentration von $c = 0.9 \text{ mg/ml}$ vermessen,
- und total- Protein gestellt mit Albumin mit der Konzentration von $c = 12 \text{ g/dl}$

11.2 Durchführung

Der typische Vorgang der Probenpräparation läuft wie folgt ab. Das zur Verfügung stehende Vollblut von zwei Vacutainer- Röhren, ca. 20 ml, wird bei 3000 U/min für zehn Minuten zentrifugiert. Das Plasma wird daraufhin abgehoben und aufgeteilt. Die erste Hälfte des Plasmas, die spätere Interferenzprobe, wird mit dem jeweiligen Interferenten gespickt. Der zweiten Hälfte des Plasmas, der späteren Referenzprobe, wird das gleiche Volumen an NaCl 0.9 % zugegeben. Beide Proben werden mit Luftsauerstoff gesättigt. Während der Zeit in der die Proben homogenisiert werden, sollen die PS- Röhren zwei- bis dreimal geöffnet werden, siehe 6.6. Anschließend werden die Proben am **cobas b 211** System vermessen. Als Referenzmessung dient wahlweise die AHD- Methode als auch die HICN- Methode am Photometer Shimadzu.

Die Referenz- und die Interferenzprobe werden alternierend je fünfmal am **cobas b 211** System und einmal mit der Referenzmethode vermessen.

11.3 Auswertung

Die Charakterisierung des Interferenteneinflusses am **cobas b 211** System und am Photometer Shimadzu erfolgt bei allen Interferenten zufriedenstellend. Die Differenz von Referenz- zu Interferenzmessung ist je nach Interferenten unterschiedlich groß, siehe Tabelle 10.

Bezeichnung Interferent	Interferent-Konzentration c	Δ Abweichung Int. zu Ref. cobas b 211 g/dl	Δ Abweichung Int. zu Ref. Photometer g/dl	relevante Interferenten
Lipidem	10 mg/ml	0.130	0.173	x
Omegaven	5 mg/ml	0.045	0.707	x
Lipofundin 20%	10 mg/ml	0.034	0.618	x
Haes- Steril 10%	1:1	0.020	0.003	
Gelofusin 4%	1:1	0.000	0.010	
Voluven 6%	1:1	0.012	0.014	
SMOF- lipid 20%	10 mg/ml	0.086	0.521	x
Intralipid 20%	10 mg/ml	0.094	0.519	x
Propofol 2%	0.11mg/ml	0.002	0.053	x
Methylenblau	0,03 mg/ml	0.824	0.489	x
Indocyaningrün	5 mg/l	0.010	0.002	x
Evans- Blau	5 mg/l	0.068	0.023	Exote
Beta- Carotin	3.7 μ mol/l	0.012	0.001	
Hydroxocobalamin	0.9 mg/ml	0.702	0.632	Exote
total- Protein	12 g/dl	0.128	0.132	
Bilirubin	20 mg/dl	0.003	0.160	x

Tabelle 10: Auswahl der relevanten Interferenten

Bei den Proben, die der Gruppe von Plasma- Expandern zuzuschreiben sind, besteht kein Bedarf an der Erstellung einer Korrekturfunktion am **cobas b 211** System, da der Einfluss der Interferenten gering ist.

Bei den Proben, die der Gruppe der Lipide zuzuschreiben sind, ist der Einfluss der Interferenten höher, aber weiterhin geringer als der Einfluss auf die Referenzmethode. Somit ist auch hier kein Bedarf an der Erstellung einer Korrekturfunktion am **cobas b 211** System gegeben.

Bei den Proben, die der Gruppe der Farbstoffe/Kontrastmittel zuzuschreiben sind, gibt es unterschiedliche Beeinflussungen. Indocyaningrün beeinflusst nur leicht, Methylenblau hingegen sehr stark.

Somit kann man sagen, dass beim Großteil (sieben von neun) der relevanten Interferenten die Vermessung am **cobas b 211** System weniger beeinflusst ist als die am Photometer

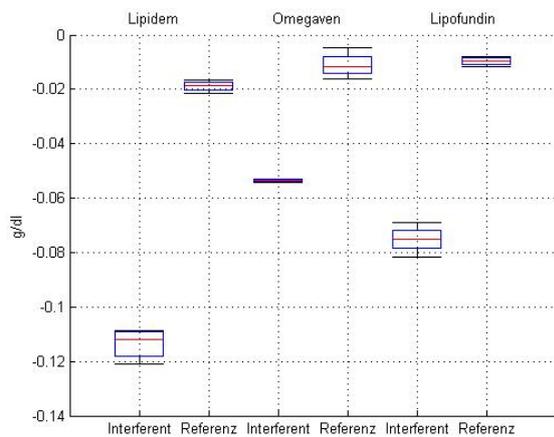


Abbildung 47: Lipidem, Omegaven, Lipofundin

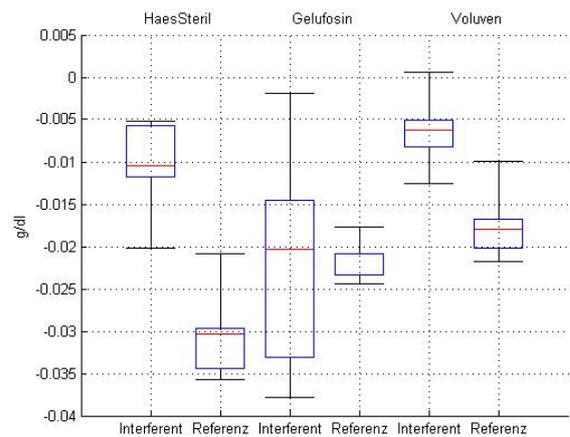


Abbildung 48: Haes- Steril, Gelufosin, Voluven

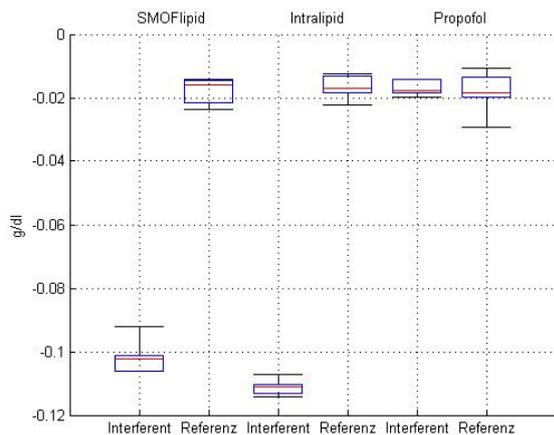


Abbildung 49: SMOF- Lipid, Intralipid, Propofol

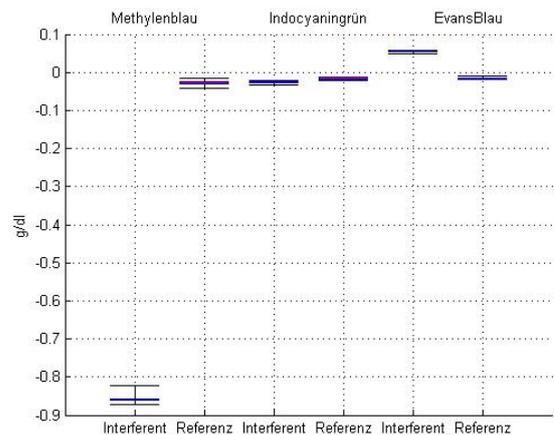


Abbildung 50: Methylenblau, Indocyaningrün, Evans- Blau

Shimadzu. Ausnahmen bilden der Interferent Indocyaningrün, der am **cobas b 211** System im Vergleich zum Photometer leicht überbestimmt wird, und weiters der Interferent Methylenblau. Dieser stört das Messergebnis sehr stark, er wird sehr stark überbestimmt. Daher wird eine mathematische Korrektur vorgesehen. Diese ist in Kapitel 8.10 genauer beschrieben.

Weiters zeigt der starke Interferenten- Einfluss am Photometer Shimadzu die Schwäche der HICN- Methode bei lipämischen Proben auf.

In den Abbildungen 47 bis 50 ist ein Teil der Box- Plot Darstellungen der Interferenten- untersuchung abgebildet. Es wird der Vergleich der Interferenz- zur Referenzmessung der untersuchten Interferenten am **cobas b 211** System dargestellt.

12 Diskussion

12.1 Probenherstellung der fHb- Reihen

Die Probenherstellung der fHb- Reihen erfolgt nach den in Kapitel 6.1 näher beschriebenen Varianten. Es ist bei allen Varianten darauf zu achten, eine sehr genaue Arbeitsweise einzuhalten und damit Fehler beim Probenherstellen zu vermeiden.

Es soll hier auch auf die Fehlereinflüsse, die das Probenstellen erschwert haben, hingewiesen werden. Eine Referenzmethode mit Hilfe des Lyophilisat- Pulvers konnte nicht erstellt werden, da man keine genau Aussage über die Reinheit des Pulvers treffen kann. Weiters kann die Matrix des destillierten Wassers anstelle von humanem Plasma Probleme bereiten. Eine Verlängerung der Zeitdauer der Homogenisierung der Probe liefert keine Verbesserung der Messergebnisse.

12.2 Beschreibung der typischen Darstellung der Messergebnisse

Bei der Auswertung der Vergleichsmessungen werden die Referenzmesswerte, meist Messergebnisse des Photometers, gegen die **cobas b 221** System Werte aufgetragen. Es wird ein Scatterplot ausgeführt, die y- Achse stellt die Ist- Konzentration des **cobas b 221** Systems, die x- Achse stellt die Soll- Konzentration des freien Hämoglobins der HICN- Methode am Photometer Shimadzu dar.

Je näher die Werte an der Identitätslinie, der Geraden mit der Steigung 1 durch den Nullpunkt, des Plots liegen, desto besser stimmen die beiden Messsysteme überein. Umso besser ist die Accuracy des Systems. Als Maß für die Reproduzierbarkeit, die Precision, wird die Streuung der Messpunkte auf der jeweiligen Achse verglichen. Je höher die Reproduzierbarkeit des Systems ist, desto kleiner ist auch der Streubereich auf der zugeordneten Ordinate.

Eine alternative Darstellung der Messergebnisse kann mit Hilfe des Bland- Altman- Plots erfolgen [Bla86]. Da dieser Vergleich zweier Messmethoden in der Sensorentwicklung aber nicht verbreitet ist, wurde nicht auf diese Art der Darstellung zurückgegriffen.

12.3 Messperformance cobas b 221 System

Die größte Herausforderung war es, die gute Messperformance des **cobas b 221** Systems im Bereich von 4 bis 20 g/dl tHb in den Bereich von 0.001 bis 0.4 g/dl fHb zu übertragen. In Abbildung 51 ist der Unterschied typischer Absorptionen von tHb und fHb dargestellt. Abbildung 52 zeigt den Ausschnitt des Bereichs der fHb- Konzentrationen gemessen am **cobas b 221** System mit einer 100 μm Küvette.

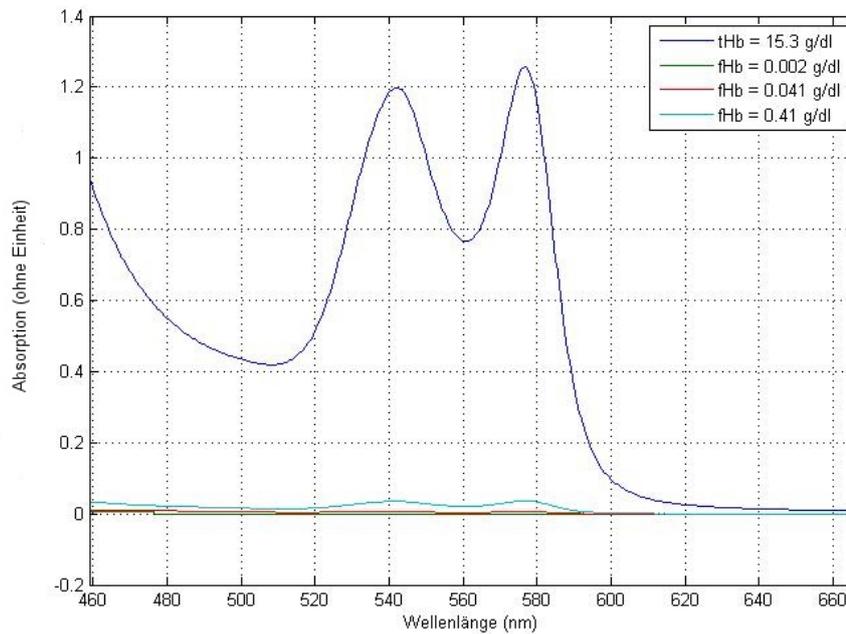


Abbildung 51: Unterschied der Absorptionskurven von tHb und fHb

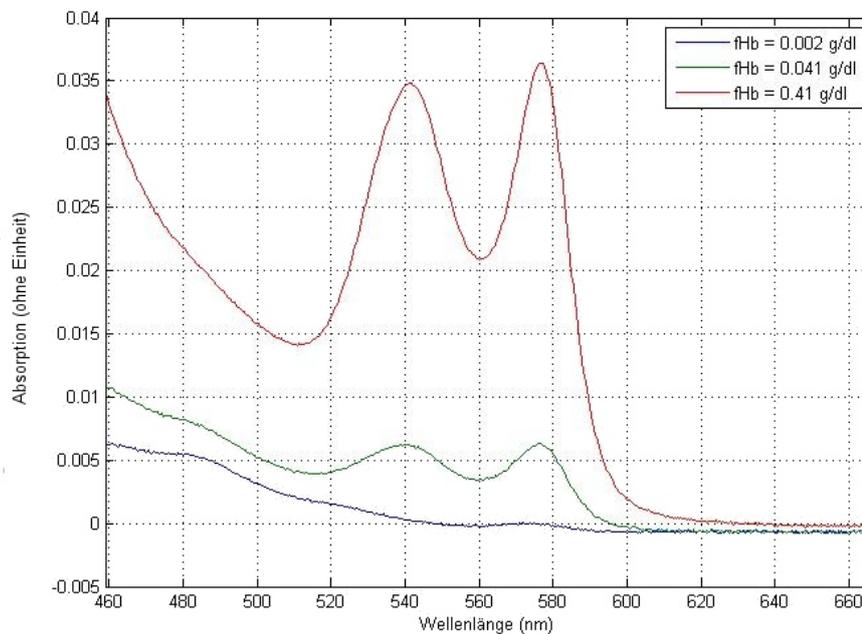


Abbildung 52: Ausschnitt des Bereichs der fHb- Konzentrationen

Ein weiteres Ziel der Arbeit war es, Aussagen über die Accuracy (absolute Richtigkeit der Messwerte) und der Precision (Reproduzierbarkeit der Messwerte) von fHb im tiefen Messbereich des **cobas b 221** Systems treffen zu können. Zu diesem Zweck werden die

Proben sowohl am **cobas b 221** System als auch an einem Referenzsystem (Photometer Shimadzu) vermessen und die Ergebnisse der beiden Systeme verglichen. Die Messergebnisse des Referenzsystems wurden als Sollwerte angesehen, welche als Bezugswerte für die Bewertung der Accuracy galten.

Wie in der Vergleichsstudie in Kapitel 7.4 auch bemerkt wurde, gelten diese Erkenntnisse nur bedingt für Proben mit zugefügten Interferenten.

Grundsätzlich konnte eine gute Linearität und Accuracy der Messwerte bei allen Methoden ab einer Konzentration des fHb- Wertes größer 4 g/dl gezeigt werden. Im fHb- Bereich von 0 bis 4 g/dl konnte je nach gestellter Probenart (Erythrozyten oder lyophilisierte Erythrozyten in Blutplasma, in NaCl, in NaOH) eine gute Linearität, bzw. keine Linearität gezeigt werden, vergleiche Kapitel 9.4 und Kapitel 9.8.

Die Reproduzierbarkeit der Messwerte im sehr tiefen Messbereich, von 0 bis 50 mg/dl konnte nicht ausreichend beschrieben werden, da die Messwerte sehr stark streuen, siehe Kapitel 9.9.

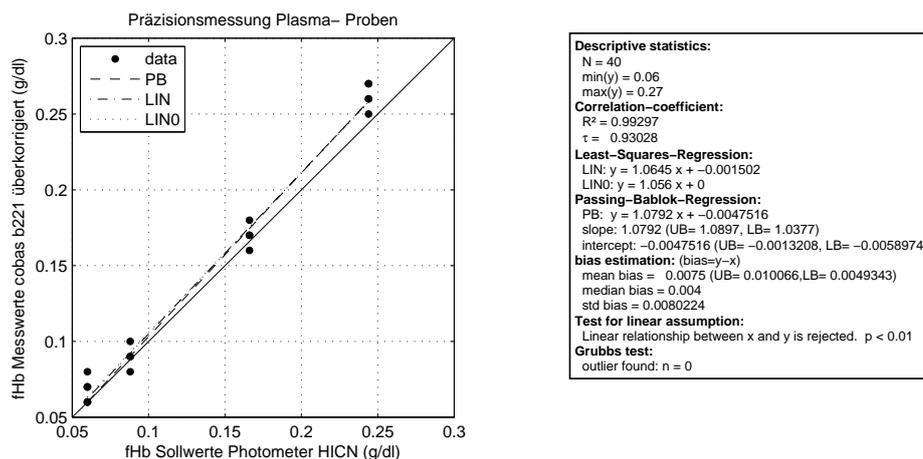


Abbildung 53: Messdaten, herangezogen für Präzisionsauswertung

Für die Messreihe in Abbildung 53 wurden natürliche Plasmaproben mit Erythrozyten auf einen höheren fHb- Wert gestellt, um eine zuverlässigere Berechnung der Standardabweichung der jeweiligen Messwerte durchzuführen. Diese beträgt nach 10 wiederholten Messungen je Messpunkt 0.006 g/dl. Somit sieht man, dass der Forderung nach einem Messbereich von 0.005 bis 0.4 g/dl mit der vorhandenen Messhardware im **cobas b 221** System nicht nachgekommen werden kann.

12.4 Vergleichsmessungen cobas b 221 System mit HemoCue®

Ein zusätzlicher Vergleich der Messperformance des **cobas b 221** Systems mit einem Gerät eines externen Anbieters wurde ebenfalls durchgeführt. Das Gerät HemoCue® ist ein „Low- cost- System“ zur Messung des freien Hämoglobins in Plasmaproben als Mikroprobe. Die Erkennung der Parameter erfolgt auch hier nach der photometrischen Er-

fassung. Das Gerät ist schon in Kapitel 8.5.1 näher beschrieben.

Das Probenhandling ist mit dem des **cobas b 221** Systems gleichzusetzen. Die Messdauer ist zwar bedeutend kürzer, die Korrektheit der Messergebnisse im Bereich von 0.0 bis 0.05 g/dl ist aber nicht gegeben. Dieser Aspekt ist auch im Benutzerhandbuch angeführt. Die Vermessung der Messpunkte von 0.15 bis 0.35 g/dl erfolgten an beiden zu untersuchenden Systemen und zusätzlich am Photometer als Referenzgerät.

Der Vergleich HemoCue[®] gegen Photometer und **cobas b 221** System gegen Photometer zeigt, dass das HemoCue[®] zwar eine bessere Precision aufweisen kann, siehe Abbildung 54, die Messwerte am **cobas b 221** System aber weniger verkippt sind, die Accuracy also besser ist, siehe Abbildung 55.

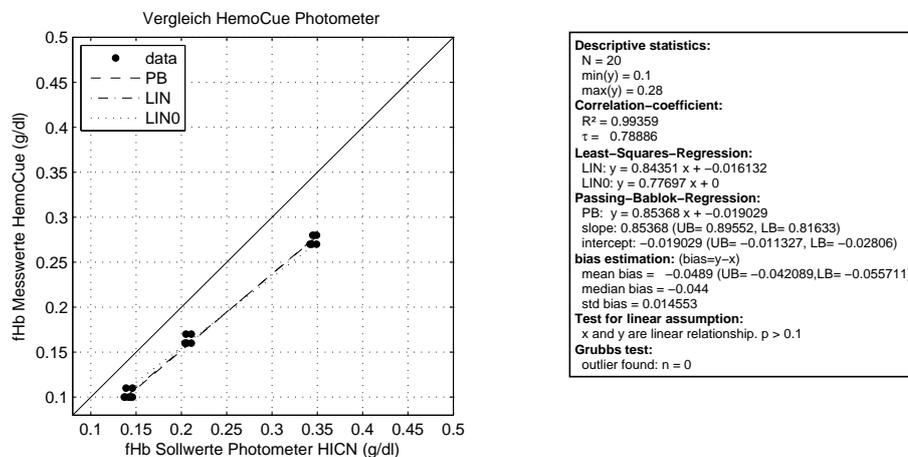


Abbildung 54: Vergleich HemoCue[®] gegen Photometer

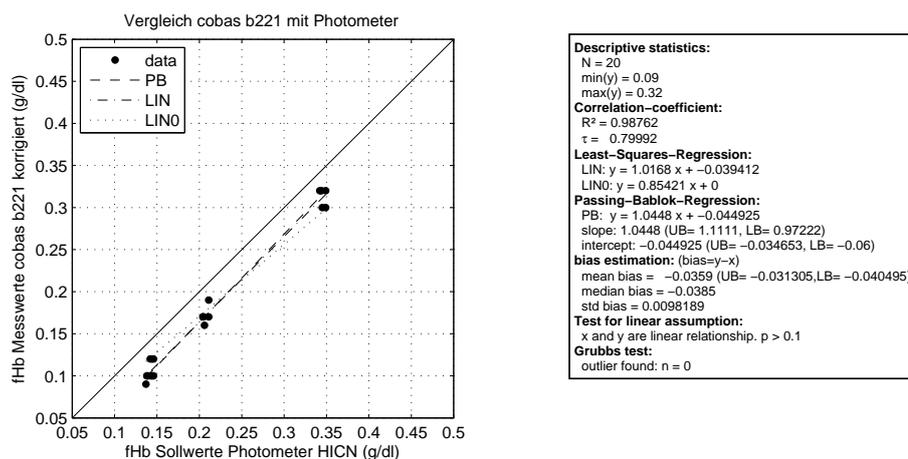


Abbildung 55: Vergleich **cobas b 221** System gegen Photometer

12.5 Schichtdickenadaptation

Durch die hohe Anzahl der Messdurchläufe konnte rasch festgestellt werden, dass die Messungen von geringen fHb- Konzentrationen in der Auflösungsgrenze des Systems liegen, also die Unterscheidung von zwei verschiedenen Konzentrationen nicht mehr korrekt möglich ist. Der Signal- Rausch- Abstand im tiefen Konzentrationsbereich stellte sich somit als ein kritischer Parameter heraus.

Es muss aufgrund der drei Parameter Schichtdicke der Küvette, Konzentration des Inhaltstoffes und Intensität der Lichtquelle eine Anpassung erfolgen. Die Konzentration soll vermessen werden und da laut Pflichtenheft am vorhandenen Messsystem keine Hardware-Adaptierung durchgeführt werden sollte, kann sowohl die Lichtintensität der Halogenlampe als auch die Schichtdicke der Küvette des **cobas b 221** Systems, die mit $100\ \mu\text{m}$ vorgegeben ist, nicht verändert werden.

Die Vermessung sehr geringer Konzentrationen von fHb am Standardsystem des **cobas b 221** Systems kann somit nicht korrekt erfolgen. Um zu zeigen, welche Auflösungen möglich sind, erfolgte nach Absprache eine Anpassung der Schichtdicke der Küvette. Die Durchführung einer Anpassung der Lichtintensität stellte sich als schwieriger heraus.

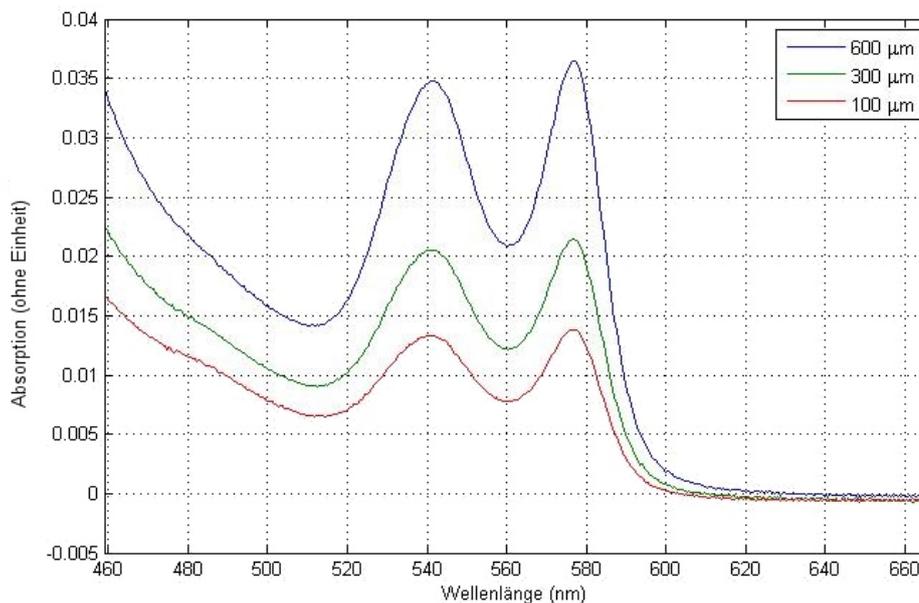


Abbildung 56: Absorption eines Analyten bei unterschiedlicher Schichtdicke

In Abbildung 56 ist die Absorptionskurve eines Analyten bei unterschiedlichen Schichtdicken dargestellt. Die Adaptierung der Schichtdicke erfolgt in zwei Schritten. Zuerst wird die Schichtdicke auf $300\ \mu\text{m}$ erhöht. Es kann gezeigt werden, dass sich die Auflösungsgrenze bis in den Bereich von $0.0047\ \text{g/dl}$ verbessert. Wird die Schichtdicke bis auf $600\ \mu\text{m}$ erhöht, kann weiters gezeigt werden, dass sich die Auflösungsgrenze bis in den Bereich von $0.0016\ \text{g/dl}$ verbessert, siehe auch Kapitel 12.9.

12.6 Wellenlängen- Variation

Wie schon in Kapitel 8.7 angesprochen, werden als Standard die Wellenlängenblöcke 510 bis 534 nm, 549 bis 570 nm und 582 bis 660 nm in der Multikomponentenanalyse verwendet. Durch eine Verwendung aller Wellenlängen von 459 bis 660 nm sowie die Beschränkung der verwendeten Wellenlängen auf den Bereich der Spitzenabsorptionen (534 bis 549 nm und 570 bis 582 nm) konnte keine Verbesserung der Messperformance im tiefen fHb- Bereich erreicht werden.

Bei der Erstellung der Korrekturfunktion Methylenblau wurden diese Variationen auch durchgeführt. Es wurde zusätzlich versucht, ganz speziell den Bereich der Spitzenabsorption von Methylenblau auszusparen, siehe auch 12.8.

12.7 Vergleich der Regressionsanalysen

Zu Beginn der Messreihen wurde festgestellt, dass im Konzentrationsbereich von 0.001 bis 0.05 g/dl fHb des Messbereiches negative Werte ausgegeben werden. Der Algorithmus der Multikomponentenanalyse und der „OLS“- Methode missinterpretiert einen eventuellen Matrixeffekt in diesem Messbereich.

Dieser Offset, diese Messverfälschung kann mit Hilfe zweier verschiedener Adaptionmöglichkeiten des Algorithmus ausgebessert werden. Zum einen kann eine einfache Offset-Korrektur vorgenommen werden, die aber auch die Messwerte im höheren Messbereich um diesen Wert verfälscht anzeigt. Der ermittelte Wert entspricht aber bei Messwerten ab 4 g/dl nur 0.05 bis 0.1 Prozent des Messwertes und fällt somit im höheren Konzentrationsbereich nicht im selben Maße ins Gewicht wie im tiefen.

Zum anderen besteht die Möglichkeit der Korrektur dieser falsch- negativen Werte anhand des Einsetzens der „NNLS- Regression“. In Kapitel 8.8 werden die „OLS“- und „NNLS“- Methode beschrieben. Der grundlegendste Unterschied der Methoden ist der, dass bei der „NNLS“- Methode keine Gewichtung der negativen Werte stattfindet.

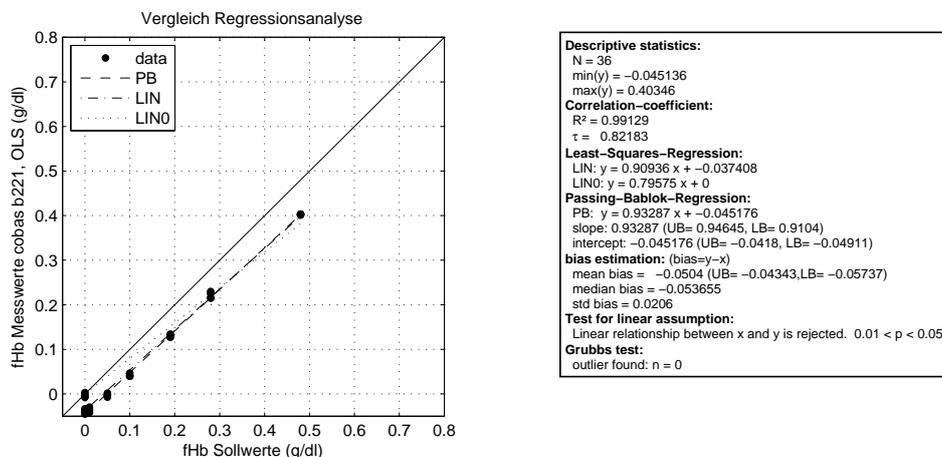


Abbildung 57: Messwerte aus 9.2, Berechnung mit „OLS“- Methode

In Abbildung 57 wird der Datensatz mit Hilfe der „OLS“ Regression ausgewertet, in Abbildung 58 wird der gleiche Datensatz mit der „NNLS“- Methode berechnet. Man kann sehr gut den Unterschied der berechneten fHb- Werte im tiefen fHb Messbereich erkennen.

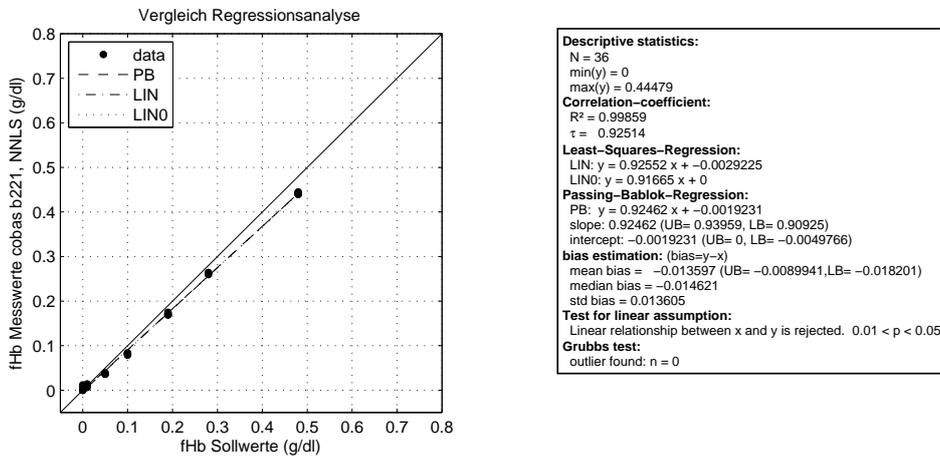


Abbildung 58: Messwerte aus 9.2, Berechnung mit „NNLS“- Methode

12.8 Bewertung der Korrekturfunktion Methylenblau

Die Erstellung einer Korrekturfunktion des Interferenten Methylenblau erfolgt wie in Kapitel 8.10 beschrieben. Die Funktionsfähigkeit konnte in einer externen Studie, siehe Kapitel 12.10, überprüft werden. Der Einfluss von Methylenblau kann unabhängig von der Konzentration in der Probe kompensiert werden. Alle anderen Messparameter werden nur in einem sehr geringen Maße beeinflusst.

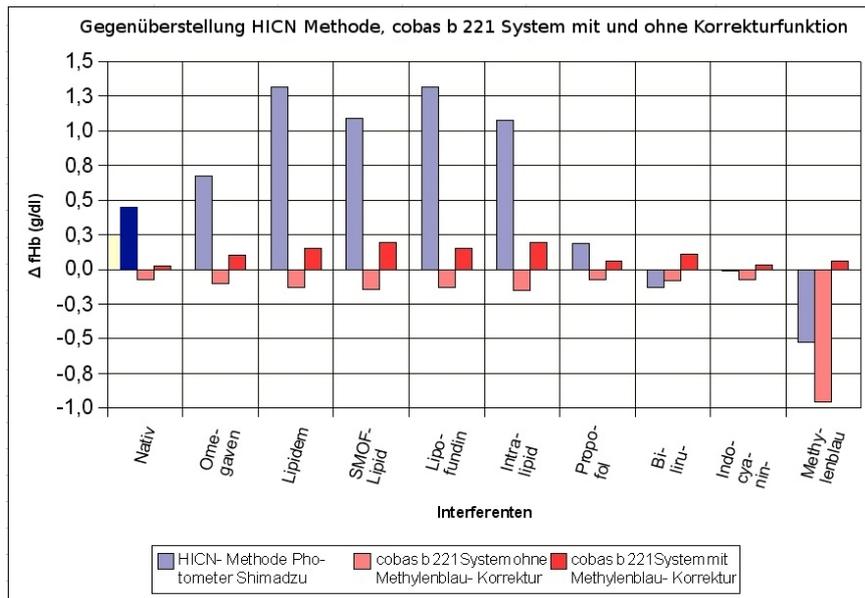


Abbildung 59: Darstellung der Funktionalität der Methylenblaukorrektur

In Abbildung 59 wird die Standard- Software des **cobas b 221** Systems mit der erstellten Software der Korrekturfunktion und der HICN- Methode bei einer Interferenten- Untersuchung verglichen. Der erste Wert ganz links im Bild ist der Sollwert, dieser sollte unabhängig vom zugefügten Interferenten von beiden Software- Varianten und der HICN- Methode korrekt bestimmt werden. Hier sieht man sehr gut die Schwachstellen der HICN- Methode bei lipämischen Proben. Bei der Vermessung der Probe mit zugefügtem Methylenblau und der nachfolgenden Berechnung mit der Standardsoftware treten große Probleme auf. Die Korrekturfunktion kompensiert den Methylenblau einfluss sehr gut und alle anderen Messwerte werden nur leicht überbestimmt.

12.9 Detection Limit, Auflösungsgrenze

Die genaue Bestimmung der Auflösungsgrenze erfolgte nach der Berechnung laut [NCC01], siehe auch Kapitel 7.8. Es konnten sowohl das Limit of Blank (LOB) als auch das Limit of Detection (LOD) bestimmt werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 60 graphisch dargestellt und in der Tabelle 11 angeführt. Man kann sehr gut erkennen, wie sich die erhöhte Schichtdicke positiv auf das LOB und LOD auswirkt.

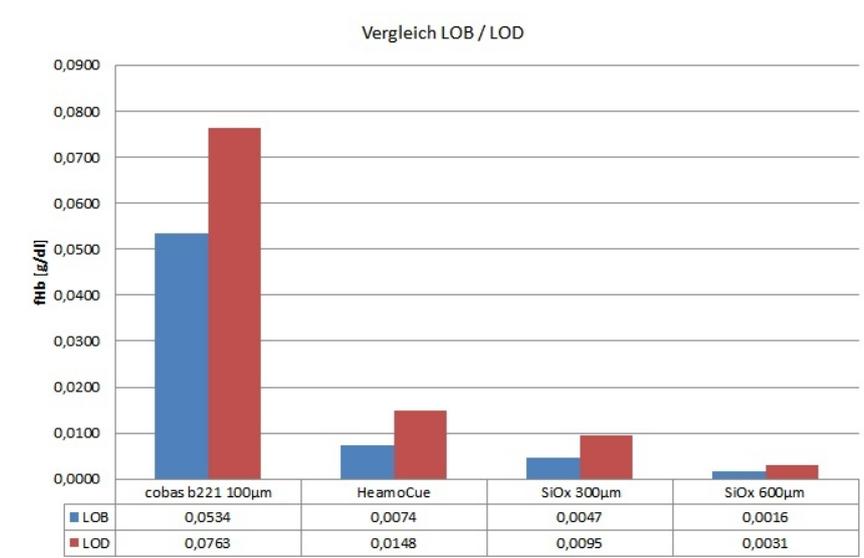


Abbildung 60: Vergleich LOB und LOD bei unterschiedlichen Schichtdicken

	cobas b 221 100 µm	Haemo Cue	SiOx 300 µm	SiOx 600 µm
LOB	0.0534	0.0074	0.0047	0.0016
LOD	0.0763	0.0148	0.0095	0.0031

Tabelle 11: Ergebnisse der LOB- und LOD- Berechnung

12.10 Externe Studie fHb

In der externen Studie wurden Ringversuchsproben, Linearitätsproben und Proben mit zugefügten Interferenten vermessen. Diese Studie diente vor allem dazu, zu zeigen, dass

das **cobas b 221** System im Vergleich zu den Mitbewerbern Interferenzen- unabhängiger ist. Weiters sollte gezeigt werden, dass die Korrekturfunktion Methylblau auch unter Real- Bedingungen korrekt arbeitet. In Abbildung 61 ist die gute Linearität im Vergleich zur Photometer HICN- Methode aufgetragen.

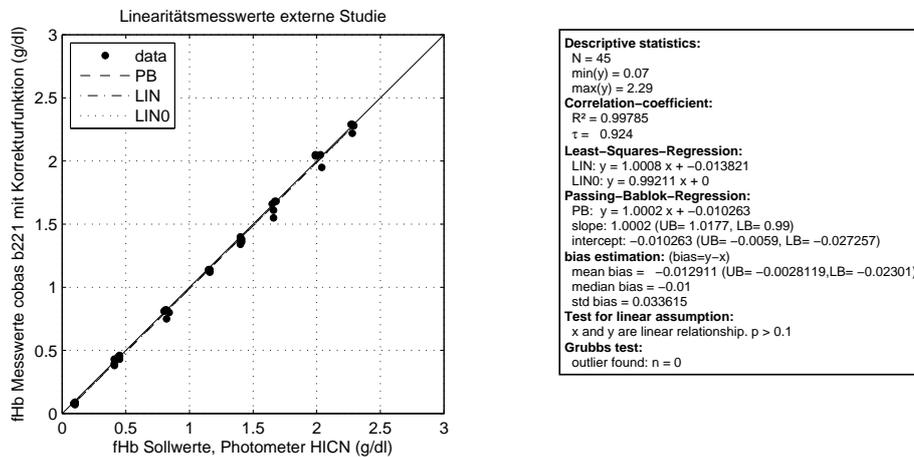


Abbildung 61: Messergebnisse der Linearitätsmessung der externen Studie

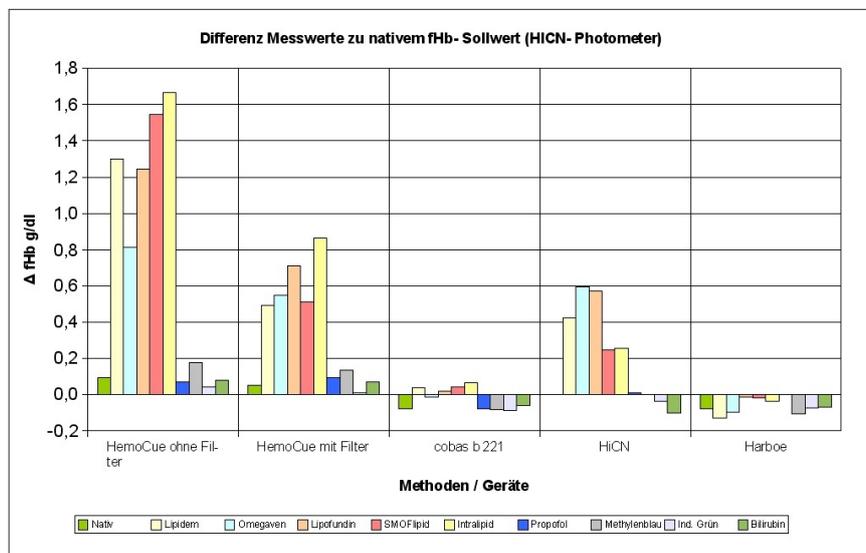


Abbildung 62: Vergleich der Interferenzeinflüsse bei verschiedenen Messmethoden

Alle geforderten Punkte konnten positiv abgeschlossen werden. In Abbildung 62 ist der Vorteil gegenüber den anderen getesteten Methoden bei auftretenden Interferenzen dargestellt und deutlich zu erkennen. Die Messung der Harboe- Methode schneidet nach dieser Bewertung gleich gut wie das **cobas b 221** System ab. Allerdings wurde aber ein Probenpräparationsschritt durchgeführt, der nicht der Vorgabe des Studienprotokolls entsprach und somit konnten diese Werte nicht zur Analyse herangezogen werden.

13 Resumee

Eine Literaturstudie zum Thema fHb konnte positiv abgeschlossen werden. Die Suche von Publikationen bereits vorhandener Referenzmethoden und bereits verwendeter Messmethoden wurde ebenfalls durchgeführt. Aufgrund der Vielzahl an verschiedenen Messmethoden wurde die Suche auf photometrische und abgewandelte photometrische Methoden begrenzt.

Das Finden und Charakterisieren einer Referenzmethode für freies Hämoglobin konnte positiv abgeschlossen werden. Die Cyanmethemoglobin- Methode am Photometer Shimadzu stellte sich zwar als aufwändig, aber sehr genau heraus.

Ein Methodenvergleich der HICN- (Cyanmethemoglobin) Methode mit der AHD- (Alkalisches Hämatin Detergens) Methode ergab eine zum Teil bessere Performance der AHD- Methode. Aufgrund der Empfehlung der NCCLS und breiten Akzeptanz wird aber weiterhin mit der HICN- Methode gearbeitet.

Die Charakterisierung des vorhandenen Algorithmus und der Performance des IST- Zustandes ist erfolgt. Nach der Analyse der Messergebnisse wurden Adaptierungen des Algorithmus der Entwicklungssoftware durchgeführt. Es erfolgte eine Implementierung einer neuen Regressionsanalyse, der „non- negative- least- squares“- Methode.

Die Charakterisierung dieser veränderten Methoden wurde zum Teil im gesamten Wellenlängenbereich von 459 bis 660 nm, in den Standard- Wellenlängenblöcken wie auch in stark begrenzten Wellenlängenbereichen durchgeführt.

Es wurde auch eine Ermittlung und Charakterisierung relevanter Interferenzen durchgeführt und daraus resultierend konnte eine Korrekturfunktion für den Parameter Methylenblau erstellt werden. Diese Korrekturfunktion wurde auch in einer externen Studie auf ihre Funktionalität untersucht.

Das Limit of Blank sowie das Limit of Detection konnten nach der Literatur aus [NCC01] bestimmt werden.

Die Forderung, keine hardwareseitigen Veränderungen durchzuführen, musste eingehalten werden. Für zufriedenstellende Messergebnisse im tiefen Konzentrationsbereich von fHb sollte aber die Schichtdicke erhöht werden. Durch die Vergrößerung der Schichtdicke auf bis zu 600 μm wird zwar mehr Probenvolumen benötigt, was einen Einsatz in der Praxis eventuell ausschließen könnte, die Auflösungsgrenze kann dadurch aber stark verbessert werden.

Zum Abschluss der Arbeit konnte, unter Zuhilfenahme zusätzlicher Messreihen an einem Entwicklungsmesstand, die Messperformance mit erhöhten Schichtdicken der Küvette charakterisiert werden.

14 Geräte, Materialien

Abschließend ist eine Auflistung aller im Laufe dieser Diplomarbeit angewendeten Programme, verwendeten Geräte und auch der benötigten Verbrauchsmaterialien angeführt.

14.1 Programme

- Matlab® R2011a Version 7.12.0
- Blutkalkulator v1.0

14.2 Verwendete Geräte

- cobas b 221 System, Seriennummer 1004, Software 7.05- 0729
- cobas b 221 System, Seriennummer 5653, Software 7.02- 07813
- Analytische Präzisionswaage Mettler AE 260 Delta Range, Equ.Nr. 1000637
- Shimadzu Photometer, UV 2101 PC
UV- VIS Scanning Spectrometer A30- 03- 0004- 21
- Radiometer ABL 800
- Hettich Zentrifuge Universal 16A 48158
- Proben- Roller der Firma AVL Medizintechnik
- Laborbedarfs- Materialien (Spatel, Pipetten, Tips)
- HemoCue® Plasma- Low- Photometer, SNr. 120307
- externer Hämolsator, tHb/SO₂ Blut- Hämolysevorrichtung, VD0379
- Vortex- Rüttler

14.3 Reagenzien und Materialien

- Humanblut, abgetrenntes Human- Plasma, verschiedene Spender
- Filtermaterial Whatman 1842- 047 GMF 2 μ m
- Filter Device Paradisc™ 25 GF/F Disposable Filter Device, Polypropylene Housing
0.7 μ m GF/F Glas Microfiber Media Cat.Nr. 6825- 2517 Lot.Nr. V476
- Hämoglobin Reagenz, Cyanhämglobin Methode nach DIN 58931, EDMA 1301020100
- Hämoglobin, Human, Lyophilized Powder, 10g Prod. Nr. H7379
- NaCl 0.9% Fresenius, physiologische Kochsalzlösung
- destilliertes H₂O, Reinstwasser

- Terumo[®] Syringe 2.5 ml
- Terumo[®] Syringe 10 ml
- ClinChek[®]- Control, 8812- 8814, Ch.B. 731
- ClinChek[®]- Control, 8912- 8914, Ch.B. 826

Literatur

- [AB98] HemoCue AB. Gebrauchsanleitung, Plasma/Low Hb Photometer, 1998.
- [AE53] Riemann W. III Allen E. Determining only one compound in a mixture: short spectrophotometric method. *Anal. Chem.*, 25:1325–1331, 1953.
- [Bac06] K. Backhaus. *Multivariate Analysemethoden, eine anwendungsorientierte Einführung*. SpringerLink, Berlin, 2006.
- [BB94] R. Bednar and P.M. Bayer. Freies Hämoglobin im Plasma - Vergleich zweier spektralphotometrischer Methoden Bilirubin als Störfaktor. *Lab. med.*, 18:196, 1994.
- [Böc97] J. Böcker. *Spektroskopie*, volume 1. Vogel Verlag und Druck, 1997.
- [BD75] G.B. Blakeney and A.J. Dinwoodie. A spectrophotometric scanning technique for the rapid determination of plasma hemoglobin. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 8:96–102, 1975.
- [Bla86] Altman Bland. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. 1986.
- [Bra64] G. Braunitzer. The molecular weight of haemoglobin. *Bibl. Haematol.*, 18:59, 1964.
- [Bre11] University Bremen. Das Lambert- Beer'sche Gesetz, 2011.
- [Cam41] R. D. Campbell. Haemoglobinometry. *Br Med J.*, 2:747, 1941.
- [CLS10] CLSI. Blood Gas and pH Analysis and Related Measurements. *Approved Guideline - Second Edition*, 2010. CLSI document C46-A2.
- [Cri68] C. M. Cripps. Rapid method for the estimation of plasma haemoglobin levels. *Journal Clin. Path.*, 21:110–2, 1968.
- [Dia91] Sigma Diagnostics. Plasma hemoglobin: Quantitative, colorimetric determination in plasma at 600 nm. *St. Louis, MO: Sigma Diagnostics*, Procedure No. 527:167–173, April 1991.
- [Dia98] Roche Diagnostics. Manual - cobas b 221 Blood Gas system. 1998.
- [EP99] Council of European Publishing. Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components., 1999.
- [Esb02] K.H. Esbensen. *Multivariate Data Analysis: in Practice : An Introduction to Multivariate Data Analysis and Experimental Design*. Camo Process AS, 5th edition, 2002.
- [Esb04] K. H. Esbensen. A simple spectrophotometric method for the quantification of residual haemoglobin in platelet concentrates. *Vox Sanguinis*, 87:264–271, 2004.

- [fCLS94] National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Reference and Selected Procedures for the Quantitative Determination of Hemoglobin in Blood; Approved Standard-Third Edition*, volume 3. NCCLS document, H15-A3 edition, 1994.
- [Fea92] V.F. Fairbanks et al. Methods for measuring plasma hemoglobin in micromolar concentration compared. *Clin. Chem.*, 38:132–140, 1992.
- [fTM69] American Society for Testing Materials. Manual on Recommended Practices in Spectrophotometry. *Philadelphia: ASTM*, 3, 1969.
- [FW42] E.B. Flink and C.J. Watson. A Method for the Quantitative Determination of Hemoglobin and Related Hemo Pigments in Feces, Urine and Blood Plasma. *J. biolog. Chemie*, 146, 1942.
- [Gea85] SW. Golf et al. Correction of catalytic activities of aspartate aminotransferase, lactat dehydrogenase, acid phosphatase and potassium concentration in haemolytic plasma by determination of haemoglobin concentration with direct spectrophotometry. *J Clin Chem Biochem*, 23:585, 1985.
- [Gea07] H. Gurlain et al. Interference of methylenblau with CO- Oxymetrie hemoglobin measurement during cyanide and smoke inhalation treatments. *Ann Emerg Med*, 49:802–805, 2007.
- [Gei79] Wissenschaftliche Tabellen Geigy. Teilband Hämatologie und Humangenetik. *Geigy*, 8, 1979.
- [Har59] M. Harboe. A method for determination of hemoglobin in plasma by near-ultraviolet- spectrophotometry. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 11:66–70, 1959.
- [Hea74] R. J. Henry et al. Clinical chemistry - Principles and technics. 2, 1974.
- [Hof11] E. Hoffmann. Optische Spektroskopie, TU Braunschweig, 2011.
- [Kea81] S. E. Kahn et al. An evaluation of a spectrophotometric scanning technique for measurement of plasma hemoglobin. *Am. J. Clin. Lab. Sci.*, 11:126–31, 1981.
- [Leh11] Lehmann. Anästhesiologie - Forschung und Fortbildung e.V. 2011.
- [LH74] C. L. Lawson and R.J. Hanson. *Solving Least Squares Problems*. Chapter 23. Prentice- Hall, 1974. p. 161.
- [Mal97] R. A. Malinauskas. Plasma Hemoglobin Measurement Techniques for the in Vitro Evaluation of Blood Damage caused by Medical Devices. *Artificial Organs Blackwell Science, Inc.*, 21(12):1255–1267, 1997.
- [Mea81] G. L. Moore et al. A micromodification of the Drabkin hemoglobin assay for measuring plasma hemoglobin in the range of 5 to 2000 mg/dl. *Biochem. Med.*, 26:167–173, 1981.
- [Mea92] T. Morikawa et al. The application of the SLS-Hb method to animal blood. *Sysmex Int.*, 2(1):56, 1992.

- [Mie69] S. E. Miederer. Ein Beitrag zur Pathogenese der Hämolyse-Niere. *Brunns Beitr. klin. Chir.*, 217:661–665, 1969.
- [NCC01] NCCLS. *Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation; Approved Guideline*. NCCLS document, EP17-A edition, 1991.
- [Neu11] F. Neudel. Erfassung der Hämolyse mittels optischer Reflexionsspektroskopie, 2011.
- [Pin68] J. Pintera. The protective influence of haptoglobin on hemolytic kidney. *Folia haemat.*, 90:82, 1968.
- [Por62] G. A. Porter. Spectrophotometric method for quantitative plasma hemoglobin resulting from acute hemolysis. *J. Clin. Lab. Med.*, 60:339–348, 1962.
- [Pra98] Prahl. <http://omlc.ogi.edu/spectra/hemoglobin/hemestruct>. 1998.
- [RM04] Müller J. Rudolf M. *Multivariate Verfahren. Eine praxisorientierte Einführung mit Anwendungsbeispielen in SPSS*. Hogrefe Verlag GmbH + Co., 2004.
- [RPH05] Braun J. Renz-Polster H., Krautzig S. *Basislehrbuch Innere Medizin*. 3. ISBN 3-437-41052-0, 2005.
- [Rue10] H. Ruether. personal communication. 2010.
- [Sch08] M. Schlaminger. Entwicklung eines Oxymeter - Moduls mit integriertem Hämolytator zur Bestimmung von Hämoglobinderivaten im Vollblut. *Institut für Medizintechnik TU Graz, Roche Diagnostics Graz*, 1:1–145, 2008.
- [Sch10] B. Schaffar. personal communication, 2010.
- [Sea77] J. C. Standefer et al. Use of tetramethylbenzidine in plasma hemoglobin assay. *Clin. Chem.*, 23:749–751, 1977.
- [Sea86] F. G. Soloni et al. Plasma hemoglobin determination by recording derivative spectrophotometry. *Am. J. Clin. Pathol.*, 85:342–347, 1986.
- [Shi54] G. Y. Shinowara. Spectrophotometric studies on blood serum and plasma. *Am. J. Clin. Pathol.*, 24:696–710, 1954.
- [ST07] Schmidt and Thews. *Physiologie des Menschen*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 26 edition, 2007.
- [Sta67] Standard. International standard for haemoglobinometry. *J. Clin. Pathol.*, 20:791–792, 1967.
- [Sta96] ICSH Standard. Recommendations for reference method for haemoglobinometry in human blood (ICSH standard 1995) and specifications for international haemoglobinocyanide standard (4th edition). *Clin. Pathol.*, 49:271–274, 1996.
- [Tea01] K. Tapernon et al. Qualitätskontrolle der Hämolyserate von Erythrozytenkonzentraten: Ringversuch zur Bestimmung von freiem Hämoglobin. *Anästhesiol. Intensivmed. Notfallmed. Schmerzther.*, page 36, 2001.

-
- [Tie87] N. W. Tietz. Fundamentals of clinical chemistry (3rd. ed). *WB Saunders*, pages 804–805, 1987.
- [vA70] O. W. van Assendelft. Spectrophotometry of haemoglobin derivatives. *Springfield, IL: Charles C. Thomas*, 1970.
- [Van96] G. Vanzetti. An azidmethemoglobin method for hemoglobin determination in blood. *J. Lab. Clin. Med.*, 67:116–26, 1996.
- [VSea86] H. Von Schenck et al. Evaluation of HemoCue, a new device for determining hemoglobin. *J. Clin. Chem.*, 32:526–529, 1986.
- [Wea97] C. Wu et al. A case of sulfhemoglobinemia and emergency of sulfhemoglobin with an OSM3 CO-Oximeter. *Clin Chem*, 43:162–166, 1997.
- [Wea06] E. Wollmer et al. Allgemeine und spezielle Anämiediagnostik. *Internist 47*, page 1269, 2006.
- [wik11a] wikipedia. http://de.wikipedia.org/wiki/Methode_der_kleinste_n_Quadrate. *Methode der kleinsten Quadrate*, 11.09.2011.
- [wik11b] wikipedia. http://de.wikipedia.org/wiki/Lambert-Beersches_Gesetz. *Das Lambert-Beer'sche Gesetz*, 14.09.2011.
- [Win81] M. M. Wintrobe. Clinical hematology. *Lea and Febiger*, 8, 1981.
- [Zea84] R. Zander et al. Alkaline haematin D-575, a new tool for the determination of haemoglobin as an alternative to the cyanhaemoglobin method. I. Description of the method. *Clinica Chimica Acta*, 136:83–93, 1984.
- [Zea89] R. Zander et al. Comparison of method-related errors: The Determination of Haemoglobin as Cyanhemoglobin or as Alkaline Haematin D-575. *J. Clin. Chem. Biochem.*, 27:185–189, 1989.
- [ZL89] R. Zander and W. Lang. The determination of Haemoglobin as Cyanhaemoglobin or as Alkaline Haematin D-575, Comparison of Methode- Related Errors. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 27(4):185–189, 1989.
- [ZvA75] W. G. Zijlstra and O. W. van Assendelft. Extinction coefficients for use in equations for the spectrophotometric analysis of haemoglobin mixtures. *Anal. Biochem.*, 69:43–48, 1975.