

■ Heute verfügbare Analysenmethoden zur Bestimmung von Laborparametern in Blut und Urin nutzen Farbreaktionen oder immobilisierte Enzyme.

Die schnelle Messung von Blut- und Urinparametern in der Medizin bildet eine wesentliche Grundlage der ärztlichen Diagnostik. Die Spanne reicht von der individuellen „point-of-care-testing“- (POCT)-Glucosemessung des Diabetikers über die patientennahe Sofortdiagnostik in der Klinik bis zur kontinuierlichen Überwachung lebenswichtiger Blutparameter auf der Intensivstation. Hinzu kommt die zunehmende Bestimmung von Gesundheitsparametern als Dienstleistung des Apothekers.

OLIVER KLEIN*, GAMZE HOSAFICI*,
WERNER MÄNTELE* UND GERHARD OREMEK**

Reagenzienfreie Bestimmung von Laborparametern

Die heute verfügbaren Analysenmethoden für Blut- und Urinparameter umfassen so genannte POCT-Geräte, die Teststreifen mit immobilisierten Enzymen oder Farbreaktionen nutzen, sowie Analysenautomaten für größeren Probandendurchsatz, die eine Kombination mehrerer Reagenzien erfordern. Während in gut überwachten Analysenlabors Qualitätsstandards in der Regel eingehalten werden, zeigen Ringversuche bei POCT-Geräten häufig erhebliche Abweichungen bei der Bestimmung von Absolutwerten, die nicht toleriert werden können. Diese Abweichungen liegen überwiegend an der char-

genspezifischen Empfindlichkeit der verwendeten Reagenzien und Testsysteme und in geringerem Umfang an der Bedienung durch den Labormitarbeiter. Gerade die schnelle, genaue Vor-Ort-Bestimmung der Blutparameter ist aber häufig wichtig, da bei Einschicken der Proben zu Zentrallabors aufgrund der Zeitspanne bis zur Vorlage der Ergebnisse therapeutische Entscheidungen unter Umständen erst zu spät getroffen werden können.

Eine Alternative zur chemischen Bestimmung der Inhaltsstoffe von Blut und anderen Körperflüssigkeiten mittels Reagenzien, Enzymen und Farbreaktionen bietet die direkte spektroskopische Analyse. Da direkte spektroskopische Methoden unabhängig von Reagenzien arbeiten, entfallen aufwändige Rekalibrierungen.

Die Infrarotspektroskopie nutzt Licht im Wellenlängenbereich von etwa 1 bis 20 Mikrometer, wobei der hier eingesetzte Teil von 3 bis 20 Mikrometern als mittleres Infrarot (MIR) bezeichnet wird. In diesem

Bereich zeigen Moleküle charakteristische Absorptionen, die zur Identifikation und zur Quantifizierung genutzt werden können. Sie haben ihre Ursache in den Schwingungen der Atome eines Moleküls relativ zueinander. Bei diesen Schwingungen kann Infrarotlicht absorbiert werden. Die Absorptionen sind so hochspezifisch für die Struktur eines Moleküls, dass sie auch als „molekularer Fingerabdruck“ bezeichnet werden. Aufgrund dieser Eigenschaften von Molekülen hat die IR-Spektroskopie einen festen Platz in der chemischen Analytik. Die heute etablierte Methode, die man als Fourier-Transform-IR-Spektroskopie (FTIR) bezeichnet, wurde im vorliegenden Beispiel zur Quantifizierung der Blut- und Urinparameter verwendet. Hierbei werden Moleküle in wässriger Lösung untersucht, sodass erst die Probleme der starken Wasserabsorption gelöst werden

DIE AUTOREN

Haben spezielle Mikro-ATR-Vorrichtungen eingesetzt, um reagenzienfrei Laborparameter in Blut und Urin zu bestimmen:
G. Hosafici, O. Klein,
W. Mäntele und G.
Oremek (v.l.n.r.).



*O. Klein, *G. Hosafici, *W. Mäntele, Johann-Wolfgang-Goethe-Universität, Institut für Biophysik, 60438 Frankfurt am Main

**G. Oremek, Klinikum der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität, 60590 Frankfurt am Main

Tabelle 1: Vorhersagefehler für Komponenten von Vollblutproben

mg/dl	RMSECV	Klinischer Normalbereich	Bereich des Datensatzes
Glukose (Vollblut/NaF)	7,6	55 – 115	20 – 340
Albumin	148	3500 – 5000	1000 – 6000
Triglyceride	19,7	< 200	0 – 1700
Harnstoff	4,4	5 – 50	10 – 220
Cholesterol	15	< 200	35 – 360
Gesamteiweiß	322	6600 – 8700	2000 – 11000
Hämoglobin	234	12000 – 18000	8000 – 17000
Immunglobulin G	122	700 – 1600	300 – 1900

Tabelle 2: Vorhersagefehler der Kalibriermodelle für Urin

mg/dl	RMSECV	Normalbereich	Bereich des Datensatzes
Harnstoff	78	847 – 2967	97 – 2416
Kreatinin	9,8	30 – 220*	10 – 252
Harnsäure	5	37 – 92	2 – 89
Anorg. Phosphat	4	40 – 136	1 – 134
Schwefel (als Na ₂ SO ₄)	4,4	100 – 200	0 – 200
Ketonkörper – Hydroxybuttersäure-Acetoacetat	20,4 - 13,4 - 7,6	0-300-140-140	0-300-140-140
Ammoniak	2,9	0-100	0-100

mussten. Dazu wählte man eine spezielle Technik, die als abgeschwächte Totalreflexion (ATR) bekannt ist und sehr einfache Probenmessungen ermöglicht (s. Abb.2). Bei dieser Technik wird der IR-Strahl mittels Totalreflexion durch einen Kristall geführt, analog zu einem Lichtleiter. An den Kontaktstellen mit der Probe kann der IR-Strahl eine geringe Wegstrecke in diese eindringen. Die Absorption der Moleküle in der Lösung ergibt ein IR-Spektrum, aus dem wiederum Identität und Konzentration der Moleküle bestimmt werden können.

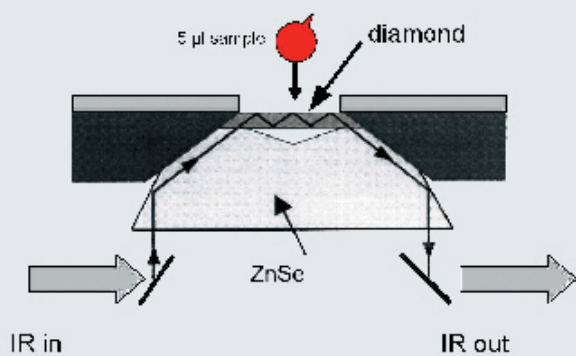
Auch wenn dieses Prinzip zunächst einfach klingt: Plasma, Blut oder andere Körperflüssigkeiten stellen eine komplexe Matrix dar, in der die gleichzeitige Variation verschiedener Parameter erfasst werden muss. Bei der Variation nur eines Parameters, z.B. der Glukose, würde es ausreichen, die Absorption eines spezifischen Infrarotsignals zu messen und daraus über eine Kalibrierung die Konzentration zu bestimmen. Für die Auswertung der Spektren bei der gleichzeitigen Variation der Konzentrationen verschiedener Inhaltsstoffe, die sich in der Regel in ihren Spektralbeiträgen zumindest teilweise überlappen, müssen mathematische Verfahren („multivariate Analysen“) entwickelt werden. Bei diesen Verfahren werden die IR-Spektren eines Referenzdatensatzes – Pro-

ben mit bekanntem Analyseergebnis – vermessen und die Variation der Parameter spektralen Merkmalen zugeordnet. Die Referenzdaten müssen die zu analysierenden Parameter in einer breiten Variation von „Normalproben“ und pathologischen Proben repräsentieren. Nach Analyse dieser Daten können dann Vorhersagen für unbekannte Proben getroffen werden.

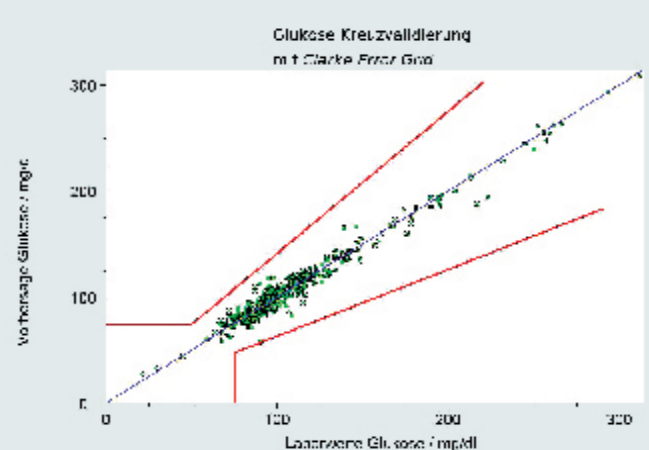
Ergebnisse

Im vorliegenden Fall wurden 400 Vollblutproben bei Wellenlängen zwischen etwa fünf und zwölf Mikrometern IR-Spektren aufgenommen. Diese Proben wurden vorab mit klassischen Referenzmethoden im klinischen Labor analysiert. Für acht Komponenten (Gesamteiweiß, Albumin, Glukose, Harnstoff, Cholesterol, Triglyceride, Hämoglobin und Immunglobulin G) wurden Kalibriermodelle erstellt.

Die Erstellung des Kalibriermodells für Glukose in den Vollblutproben gestaltete sich dabei schwierig, da aufgrund der Zeitverzögerung zwischen der Laboranalyse der Probe in der Universitätsklinik und der Messung der Infrarotspektren im Institut der während dieser Zeit stattfindende Glukosemetabolismus (Glukolyse) zu verringerten Glukosewerten bei der spektralphotometrischen Messung gegenüber den Referenzwerten führte. Um dieses Problem zu lösen, wurden die Vollblutproben sofort



2 ATR-optische Messvorrichtung für Mikroblutproben: Bei der ATR- Technik (Abgeschwächte Totalreflexion) wird der IR-Strahl mittels Totalreflexion durch einen ZnSe-Kristall mit Diamant-Schicht geführt. Er kann an den Kontaktstellen mit der Probe eine geringe Strecke in diese eindringen. Die Absorption der Moleküle in der Lösung ergibt ein austretendes IR-Spektrum, anhand dessen Identität und Konzentration der Moleküle in der Probe bestimmt werden können.



3 Reagenzienfreie Blutglukosebestimmung mit Clarke-Error-Grid (rot): Alle Vorhersagewerte im Bereich von etwa 20 mg/dl bis über 300 mg/dl liegen deutlich innerhalb des Clarke-Error-Grids zur Bewertung der Anwendbarkeit in der Klinik.

nach der Probennahme mit NaF behandelt. Dadurch wurde der Glukosemetabolismus gestoppt, und die Glukosekonzentration blieb unverändert. Hämoglobin liegt nur im Inneren der roten Blutkörperchen vor, jedoch nicht im Blutplasma. Um eine homogene Konzentrationsverteilung des Hämoglobins in der Probe zu erreichen, wurden die Blutzellen hierbei vorab mit Ultraschall aufgeschlossen.

Die Standardfehler der Vorhersagen der Kalibriermodelle (RMSECV) für alle acht Komponenten sind in Tabelle 1 zusammen mit dem Normalbereich für gesunde Patienten und dem Gesamtbereich der Kalib-

rierung gezeigt. Besonders hervorzuheben ist, dass die Vorhersage der Konzentrationen über diesen gesamten Bereich (normal und pathologisch) möglich ist. Auch im Urin ist die Vorhersage von verschiedenen diagnostisch bedeutsamen Inhaltsstoffen gelungen. In Tabelle 2 sind die im Urin bestimmbaren Parameter zusammen mit dem Standardfehler der Vorhersagergebnisse angegeben.

Diskussion

Der Einsatz der Infrarotspektroskopie für die Bestimmung von Blut- und Urinparametern ist nicht neu. In Publikationen

wurde beispielsweise über die Bestimmung von Cholesterin, Gesamtprotein und Glukose aus Plasma berichtet. Eine Gemeinsamkeit dieser Arbeiten war jedoch, dass getrocknete Proben verwendet wurden, um das Problem der Wasserabsorption zu umgehen. Diese Vorgehensweise beinhaltet weitere Arbeitsschritte zur Probenvorbereitung wie das präzise Auftragen der Proben auf ein Trägermaterial, gefolgt von definiertem Trocknen und dem Einstellen einer definierten Luftfeuchte, zusätzliche Prozeduren, die die Attraktivität einer reagenzienfreien Untersuchungsmethode deutlich reduzieren. Darüber hinaus führt

das Vermessen von getrockneten Proben zu vermehrter Inhomogenität und zu Nichtlinearitäten bei der Konzentrationsbestimmung, die die Einsatzmöglichkeiten weiter reduzieren. Die überwiegende Zahl der bisher publizierten Arbeiten muss daher als proof-of-principle gewertet werden und wurde noch nicht im klinischen Laboralltag getestet. Die hier vorgestellte Studie zeigt, dass die Methode im Alltag eines klinischen Großlabors auch bei extremer Varianz der Parameter stabile und reproduzierbare Ergebnisse mit einer Genauigkeit liefert, die den klinischen Qualitätsstandards entsprechen und eine belastbare Basis für Entscheidungen des Arztes liefern. Als Beispiel sei die Blutglukosebestimmung erwähnt (s. Abb. 2). Alle Vorhersagewerte im Bereich von etwa 20 mg/dl bis über 300 mg/dl liegen deutlich innerhalb des Clarke-Error-Grid zur Bewertung der Anwendbarkeit in der Klinik. Diese Genauigkeit und Reproduzierbarkeit wird mit einer einmal vorgenommenen Kalibrierung erzielt; eine Rekalibrierung ist bei dieser optischen Methode nicht notwendig. Ein besonderer Vorteil des Verfahrens ist, dass Gesamtprotein und Albumin separat bestimmt werden können. Dies wurde durch Kalibrierproben von Patienten, die am nephrotischen Syndrom leiden, möglich. Bei diesem Krankheitsbild variieren der Gesamtproteinanteil und der Albuminanteil separat, während sie üblicherweise kovariant sind. Dieser Erfolg zeigt wiederum die Notwendigkeit eines sorgfältigen „Datendesigns“ für die Kalibrierproben.

Neben den hier vorgestellten acht Parametern, die in klinisch hinreichender Qualität aus Vollblut oder Plasma bestimmt werden können ist die Messung weiterer Parameter möglich und wird derzeit statistisch abgesichert.

Messung von Schwellenparametern

Zusätzlich zu den quantitativ bestimmten Parametern in Blut- und Urinproben wurden so genannte „Schwellenparameter“ definiert. Sie können bei Überschreiten einer bestimmten Konzentration registriert werden und als Hinweise auf bestimmte Krankheitsbilder interpretiert werden. In Urinproben kann Glucose ab etwa 10 bis 20 mg/dl und Albumin ab etwa 100 bis 150 mg/dl detektiert werden. Eine Über-

schreitung des Schwellenparameters Glucose (in Urin) weist auf eine Überschreitung der Nierenschwelle hin, eine Überschreitung bei Albumin auf eine Makroalbuminurie.

Grenzen der Messmethode

Es kann nicht erwartet werden, dass alle klinisch relevanten Parameter mit der hier vorgestellten Methode quantitativ analysiert werden können. Obwohl es problematisch ist, eine absolute Nachweisgrenze für bestimmte Stoffe anzugeben, kann der Bereich unter einem ppm in komplexen Proben als unmöglich angesehen werden. Grundsätzlich können jedoch Anreicherungsverfahren mit der hier vorgestellten Detektion gekoppelt werden. Aufgrund des physikalischen Prinzips der IR-Spektroskopie kann auch kein Nachweis von Ionen wie Kalium, Natrium oder anderen nichtmolekularen Ionen erfolgen. Dieser Nachteil wird jedoch durch die Selektivität und den Wegfall jeglicher Probenpräparation aufgewogen.

Perspektiven

Für die vorliegenden Untersuchungen wurden spezielle Mikro-ATR-Vorrichtungen

für die manuelle Messung eingesetzt, mit denen Proben volumina bis hinunter zu fünf µl vermessen werden können. Dies erlaubt eine Blutentnahme mit einer Glaskapillare und reduziert den Aufwand für Verbrauchsmaterialien und das Entsorgen von Probenresten. In dieser Form kann diese Methode in der patientennahen Sofortdi-

agnostik, z.B. auf der Station, im OP oder ggf. bei der Patientenberatung in der Apotheke eingesetzt werden. Für den Durchsatz größerer Probenmengen im klinischen Labor kann ein spezieller Probengeber verwendet werden, der eine automatische Probenzuführung und Messung auf definierte Weise gestattet. Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen die entscheidenden Vorteile der patentierten reagenzienfreien Bestimmung wesentlicher klinischer Laborparameter. Insbesondere der steigende Kostendruck im Gesundheitswesen lässt Labormethoden, die ohne Verbrauchsmittel auskommen, geringe Probenmengen benötigen und wenig Bedienungsaufwand erfordern, höchst attraktiv erscheinen. 

Weitere Informationen:

www.laborpraxis.de



InfoClick

207671

- Der Fachartikel: Clinical chemistry without reagents? An infrared spectroscopic technique for determination of clinically relevant constituents of body fluids
- Hier finden Sie einen Fernsehbeitrag über das Verfahren
- Die Beschreibung des Patents beim Europäischen Patentamt

Tel. +49 (0) 69 / 79 84 64 12

