

Physiologische Assays in einem DVD Player am Beispiel der Messung des Hämatokrit

Physiological assays within a DVD Player demonstrated by measurement of the hematocrit

J. Burger¹, D. Mark¹, G. Roth², C. Müller³, R. Zengerle^{1,2}, F. von Stetten^{1,2}, Y. Park⁴

¹ HSG-IMIT, Wilhelm-Schickard-Straße 10, 78052 Villingen-Schwenningen, Deutschland

² Universität Freiburg, Institut für Mikrosystemtechnik - IMTEK, Lehrstuhl Anwendungsentwicklung, Georges-Köhler-Allee 106, 79110 Freiburg, Deutschland

³ Universität Freiburg, Institut für Mikrosystemtechnik - IMTEK, Lehrstuhl Prozesstechnologie, Georges-Köhler-Allee 103, 79110 Freiburg, Deutschland

⁴ LG Electronics Inc. (LGE), 360-5 Yatap-Dong, Sungnam-Si Kyunggi-Do, 463-828, Korea

Zusammenfassung

Die Bestimmung des Hämatokrits (Erythrozytengehalt im Blut) mit zentrifugal mikrofluidischen Bio-Disks [1] in einem low-cost DVD Player wurde bereits in früheren Arbeiten untersucht [2,3]. Nun strukturieren wir konventionelle DVD Halbscheiben aus Massenproduktionsprozessen und Bonden diese zu mikrofluidischen Bio-DVD's. Somit kann der Standard DVD-Player sowohl als Zentrifuge zur mikrofluidischen Prozessierung als auch zur Detektion der Ergebnisse mit dessen integrierter Opto-Elektronik verwendet werden. Der Hämatokrit gibt unter anderem Aufschluss über den Wasserhaushalt des Patienten oder den Erythrozytenanteil im Blut. Er wird häufig im Rahmen von point-of-care Tests neben anderen Parametern in der Notfallmedizin, in Dopingtests oder vor Blutspenden ermittelt. Somit stellt diese Arbeit einen weiteren Schritt hin zu kompletten DVD-basierten point-of-care Tests dar und bietet eine Grundlage für die Implementierung weiterer Assays.

Summary

Earlier works demonstrate the centrifugal microfluidic processing of a hematocrit (erythrocyte fraction of whole blood) assay with a Bio-Disk [1] in a low-cost DVD player [2,3]. Now conventional DVD halfslides from mass production processes are structured and bonded to microfluidic Bio-DVDs permitting both centrifugal processing by the standard DVD player and readout of the results by its integrated optics. Hematocrit determination provides rapid information about e.g. water balance, erythrocyte status and is frequently used aside other parameters in point-of-care testing as emergency diagnostics, doping tests or prior to blood donation. Thus, this work is a further step towards complete DVD based point-of care testing and may trigger the implementation of further tests.

Einleitung

Zur Verwirklichung zukünftiger low-cost point-of-care Tests mit mobilen, autarken Systemen bietet der weltweit verbreitete DVD Player eine sehr gute Basis. Bisherige Arbeiten nutzten den DVD Player als portable Zentrifuge für individuell hergestellte Substrate, konnten den Aspekt der Detektion von Ergebnissen der Assays jedoch nicht mit der integrierten Opto-Elektronik des DVD Players realisieren. Unsere Aufgabe ist nun sowohl die Anpassung der Bio-Disk in geometrischer und optischer Hinsicht an das DVD-Format als auch die Parametrierung eines Standard DVD Players zur Datenerfassung und Datenauswertung mittels eines angebundnen PC's. Damit wäre die Bio-DVD mit den etablierten Fertigungsverfahren hergestellt ein low-cost Einwegartikel, der mit dem DVD Player als kompaktem low-cost System allen biotechnischen und wirtschaftlichen Anforderungen von physiologischen Assays für point-of-care Tests genügen würde.

Technologie

Die Bio-DVD (Abb. 1) besteht aus zwei 0,6 mm dicken Polycarbonat-Halbscheiben mit einem Aussendurchmesser von 120 mm und einem Bohrungsdurchmesser von 15 mm. Die oben liegende Halbscheibe hat eine Al-gesputterte Reflektionsschicht und besitzt einen Track zur Steuerung und Fokussierung des DVD Player Lesekopfes.



Abb. 1 Bio-DVD zur Hämatokritbestimmung aus 2 Standard DVD Polycarbonat-Halbscheiben gebondet

In die unten liegende, unbeschichtete, transparente Halbscheibe werden die mikrofluidischen Strukturen zum blasenfreien Befüllen [4] und Dosieren des Messkanales zur Hämatokritbestimmung gefräst (Abb. 2).

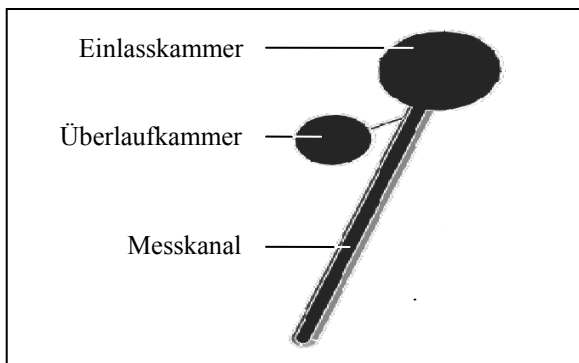


Abb. 2 Mikrofluidische Hämatokritstruktur zur blasenfreien Befüllung und Dosierung des Messkanales mittels Überlaufkammer

Danach werden die Grate entlang der Kanten der Kanäle durch stirnseitiges Andrücken der Halbscheibe auf eine Polierscheibe oder in einem Ultraschallbad entfernt. Die Al-gesputterte Halbscheibe wird mit dem niedrig viskosen und transparenten Klebstoff Wepuran Gießharz VT 3402 KK-NV durch Spincoating im Reinraum homogen beschichtet und danach auf die untere Halbscheibe aufgewälzt.

Anschließend kommt die lose gebondete Bio-DVD zur Entfernung eingeschlossener Luftblasen in eine Vakuumkammer und wird zuletzt von oben für 3 Minuten dynamisch durch eine Düse mit Stickstoff unter 2-3 bar Druck beaufschlagt. Nach der Entnahme aus der Kammer werden die Halbscheiben mit einem Zapfen an der Bohrung zentrisch ausgerichtet und anschließend bei 70 °C ausgehärtet. Mit einem Laserschneider werden nun die Einlassbohrungen (Abb. 4) und die Entlüftungsöffnungen in den Deckel gebrannt. Ein DVD Player (Abb. 3) mit einer 650 nm Laserdiode dient nun sowohl als drehzahlgesteuerte Zentrifuge zur Durchführung mikrofluidischer Operationen und der Blutsedimentation, als auch als optischer Detektor mit hoher Auflösung. Unter Rotation wird die Bio-DVD mit dem Lesekopf von außen nach innen abgetastet und zunächst der radiale Beginn der Kanäle ermittelt. Der Sensor wird nun sukzessive nach innen gefahren. Pro Zustellung werden 3 komplette Rotationen erfasst, gemittelt und zur Speicherung auf einen PC übertragen. Nach jeder Datenübertragung wird der Lesekopf auf die nächste Position gefahren, bis der Phasenübergang zwischen Blutzellen und Blutplasma erreicht wird.



Abb. 3 Versuchsstand DVD Player mit Rechner

Experimentelle Ergebnisse

Zur Messung des Hämatokrits werden 8-10 µl Vollblut durch die Einlassbohrungen in der oberen Halbscheibe in die Einlasskammern der Bio-DVD einpipettiert. Die Bio-DVD wird in den DVD Player eingelegt und mit 10 Hz/s auf eine Drehfrequenz von 65 Hz beschleunigt. Während dieses Beschleunigungsvorganges findet bereits das Dosieren mittels Überlaufkanal und Überlaufkammer auf 6,3 µl Vollblut im Messkanal statt. Im Laufe von maximal weiteren 5 Minuten sedimentieren dann die zellulären Blutbestandteile aufgrund von Zentrifugalkräften (Abb. 4).

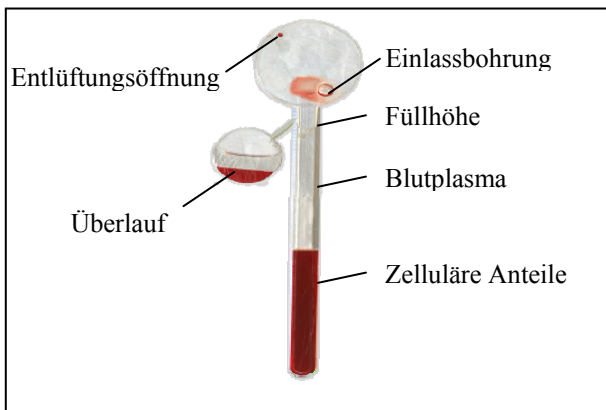


Abb. 4 Blutzellsedimentation im Messkanal und in der Überlaufkammer nach dem Zentrifugieren.

Danach beginnt die eigentliche Messung des Hämatokrits mit dem Lesekopf des DVD Players. Sie basiert auf den unterschiedlichen Absorptionswerten der zellulären Anteile des Blutes, vorwiegend der roten Blutkörperchen und des Blutplasmas für elektromagnetische Wellen mit 650 nm Wellenlänge. Die geringere Intensität des durch die Al-gesputterte obere Halbscheibe reflektierten Laserlichtes im Bereich der zellulären Anteile (Abb. 5, links) führt zu einem um 100-150 mV niedrigeren Spannungssignal als im Bereich des Blutplasmas (Abb. 5, rechts).

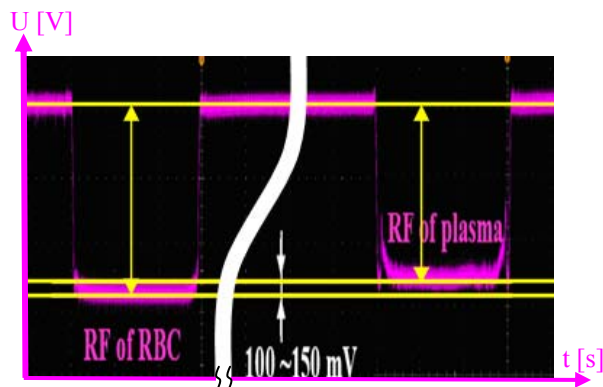


Abb. 5 Spannungspegeldifferenz durch unterschiedliche Absorptionswerte der zellulären Blutanteile (RBC, links) und des Blutplasmas (rechts)

Damit lässt sich beim radialen Scannen des Messkanales die Phasengrenze zwischen den zellulären Anteilen des Blutes und dem Blutplasma durch den Spannungssprung präzise erkennen. Der Hämatokrit kann nun als Verhältnis der Füllhöhe des Messkanales mit zellulären Blutbestandteilen zur gesamten Messkanallänge berechnet werden. (Abb. 6).

Schlussfolgerung

Im Vergleich zu bisher untersuchten Methoden [2, 3] erlaubt die hohe Sensitivität der Detektionsoptik eines

DVD Players die präzise Ermittlung des Hämatokrit durch Absorptionsmessungen mit der Standard 650 nm DVD Laserdiode. Die Erfassung und Auswertung der Daten kann flexibel mit einem PC erfolgen. Die angewandten Fertigungsmethoden für die Strukturierung der Halbscheiben und das Bonden der Bio-DVD sind für die Herstellung von Prototypen in geringen Stückzahlen geeignet. Die vergleichsweise hohen Rauheitswerte der gefrästen Strukturen verursachen allerdings einen hohen Rauschpegel des Signals. Durch lithographisch und galvanisch hergestellte Einsätze für Spritzprägewerkzeuge ließe sich dieser Nachteil beseitigen und gleichzeitig eine kostengünstige Massenfertigungsmethode als Basis für weitverbreitete Anwendungen im Bereich der physiologischen Diagnostik schaffen. Somit würde das System Bio-DVD alle eingangs erwähnten Anforderungen an ein portables und autarkes point-of-care System für physiologische Assays erfüllen.

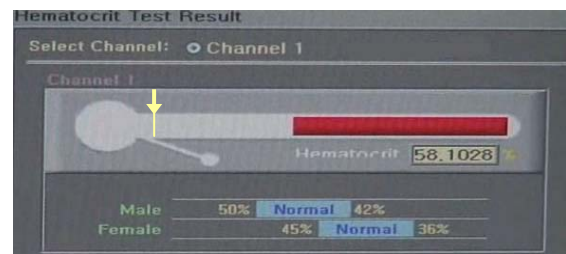


Abb. 6 Darstellung des gemessenen Hämatokrit als Verhältnis der Füllhöhe der zellulären Anteile (roter Bereich) zur gesamten Füllhöhe (Pfeil).

Literatur

- [1] Ducree, J.; Haeberle, S.; Lutz, S.; Pausch, S.; von Stetten, F.; Zengerle, R.: The centrifugal microfluidic Bio-Disk platform. In *J. Micromech. Microeng.* (2007) 17: 103-115 doi: 10.1088/0960-1317/17/7/S07
- [2] Riegger, L.; Grumann, M.; Steigert, J.; Lutz, S.; Steinert, C. P.; Müller, C.; Viertel, J.; Prucker, O.; Rühle, J.; Zengerle, R.; Ducrée, J.: Single-step centrifugal hematocrit determination on a 10-\$ processing device. In *Biomed Microdevices* (2007) 9:795-799 DOI 10.1007/s10544-007-9091-1
- [3] Riegger, L.; Steigert, J.; Lutz, S.; Streule, W.; Zengerle, R.; Ducrée, J.: Automated hematocrit measurement and patient data labelling by a commercial DVD-writer with a low-cost optical add-on. In *Proceedings of the 11th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences μ TAS*, Paris, France (2007); pp. 1249-1251
- [4] Riegger, L.; Grumann, M.; Brefka, T.; Steigert, J.; Steinert, C. P.; Brenner, T.; Zengerle, R.; Ducrée, J.: Bubble-free Priming Of Blind Capillaries For High-accuracy Centrifugal Hematocrit Measurements. In *Proceedings of μ TAS 05 conference*, Boston, USA, (2005); pp. 796-798