

(12)

Patentschrift

(21) Anmeldenummer: A 1045/2007

(22) Anmeldetag: 06.07.2007

(45) Veröffentlicht am: 15.10.2009

(51) Int. Cl.⁸: **A61M 1/36**

(2006.01)

(56) Entgegenhaltungen:

EP 1 733 748 A1

EP 0 578 086 A1

(73) Patentinhaber:

TECHNOCLONE GESELLSCHAFT M.B.H.

A-1230 WIEN (AT)

(54) PLASMAFILTRATION

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Aufbereitung einer Blutplasmaprobe für die Bestimmung eines oder mehrerer Blutparameter, wobei das Blutplasma mittels Unterdruck von -50 mbar bis -1000 mbar, vorzugsweise -300 mbar bis -600 mbar durch ein Filter mit einer Durchlassgrenze zwischen 0,05 und 1,5 µm (Mikrometer), vorzugsweise zwischen 0,1 bis 1,2 µm (Mikrometer) gesaugt wird, wobei das Beaufschlagen des Filters mit Unterdruck zwischen 30 Sekunden und 30 Minuten dauert.

Die Erfindung betrifft auch eine Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens, die einen Filter (1, 19), einen hinter dem Filter (1, 19) angeordneten Auffangbehälter (4) und eine Vakuumpumpe (7) aufweist, wobei die Vakuumpumpe (7) mit dem Raum hinter dem Filter (1, 19) verbunden ist und unterhalb des Filters (1, 19) ein Kühlelement (20) zur Kühlung des Filtervorganges vorgesehen ist.

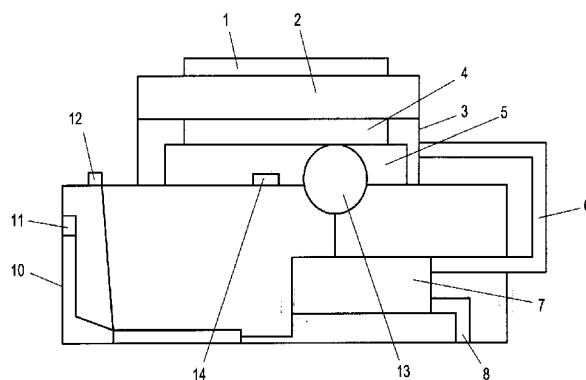


Fig. 1

Beschreibung

[0001] Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Aufbereitung einer Blutplasmaprobe für die Bestimmung eines oder mehrerer Blutparameter, wie z. B. Gerinnungsparameter und Thrombinparameter, die Erfindung bezieht sich auch auf eine Vorrichtung, mit der das Verfahren durchgeführt werden kann.

[0002] Aus der EP 1 733 748 A1 ist ein gattungsfremder, therapeutischen Zwecken dienender Filterapparat zur extrakorporalen Entfernung von Lipiden aus einem Plasma bekannt, wobei das von den Lipiden befreite Plasma wiederum den korpuskulären Bestandteilen des Blutes hinzugefügt wird. Dieser Apparat ist mit drei hintereinander geschalteten Filtern ausgestattet, denen jeweils spezifische Funktionen zukommen. Er weist auch eine peristaltische Pumpe auf, der eine Drucksteuervorrichtung nachgeschaltet ist, mittels welcher schädliche Auswirkungen auf die gesamte Apparatur einerseits und auf den Patienten andererseits vermieden werden sollen.

[0003] Die EP 0 578 086 A1 offenbart ebenfalls einen gattungsfremden Apparat und ein Verfahren zum Transfer von durch Zentrifugation getrennter Komponenten, beispielsweise Blutkomponenten, in eine Flüssigkeit, die sich in einem flexiblen Beutel befindet. Die treibende Kraft für den Transfer besteht in einer sich expandierenden und kontrahierenden Manschette, die Unter- und Überdruck erzeugen kann. Dieses Dokument offenbart lediglich den Transfer von Plasma rasch und unter sterilen Bedingungen aus dem Zentrifugationsbeutel in einen Plasmabeutel entweder durch Über- oder Unterdruck.

[0004] Zur Durchführung verschiedener Analysen ist es bekannt, zunächst aus dem Blut eines Patienten Plasma zu gewinnen. Dies erfolgt in den meisten Fällen durch Zentrifugation. Das dabei erhaltene Plasma bildet im Stand der Technik die Grundlage für verschiedene Labortests. Der Nachteil dieses Verfahrens besteht darin, dass im Blut vorhandene Mikropartikeln durch die Zentrifugation nicht selektiert werden, sondern im Plasma verbleiben. Es hat sich nun herausgestellt, dass diese Mikropartikeln die Messwerte bei der Bestimmung von diversen Blutparametern verfälschen.

[0005] Es besteht somit der Bedarf an einer Lösung dieses Problems, eine zuverlässige und reproduzierbare Bestimmung von Blutwerten zu erlangen, die von den Mikropartikeln nicht verfälscht sind.

[0006] Dieses Ziel wird mit einem Verfahren der eingangs genannten Art dadurch erreicht, dass das Blutplasma mittels Unterdruck von -50 mbar bis -1000 mbar, vorzugsweise -300 mbar bis -600 mbar durch ein Filter mit einer Durchlassgrenze zwischen 0,05 und 1,5 μm (Mikrometer), vorzugsweise zwischen 0,1 bis 1,2 μm (Mikrometer) gesaugt wird, wobei das Beaufschlagen des Filters mit Unterdruck zwischen 30 Sekunden und 30 Minuten dauert. Der Unterdruck wird vorliegendfalls von einem Absolutdruck von 1000 mbar weg gerechnet.

[0007] Die Erfindung betrifft weiters eine Vorrichtung zur Durchführung vorstehenden Verfahrens der eingangs genannten Art, die dadurch gekennzeichnet, dass die Vorrichtung einen Filter, einen hinter dem Filter angeordneten Auffangbehälter und eine Vakuumpumpe aufweist, wobei die Vakuumpumpe mit dem Raum hinter dem Filter verbunden ist, und dass unterhalb des Filters ein Kühlelement zur Kühlung des Filtrvorganges vorgesehen ist.

[0008] Durch den vorgesehenen Filter gelangt das Plasma in den Auffangbehälter, und die Vakuumpumpe ist so ausgelegt, dass auf der Hinterseite des Filters der Unterdruck erzeugt wird.

[0009] Bevorzugte Ausführungsformen beinhalten, dass der Auffangbehälter eine Mikrotiterplatte ist oder Eppendorf Tubes sind. Nach einem weiteren Merkmal der Erfindung sind der Filter, der Auffangbehälter und die Vakuumpumpe in einer gemeinsamen, aus einem auf einer Montageplatte montierten Gehäuse gebildeten Einheit integriert. Ferner ist das zur Kühlung des Filtrvorganges vorgesehene Kühlelement ein Peltierelement, das mit Kühlrippen thermisch verbunden ist.

[0010] Die Erfindung wird anhand der Zeichnung näher erläutert. Dabei zeigt

[0011] die Fig. 1 eine schematische Darstellung einer erfindungsgemäßen Vorrichtung,

[0012] die Fig. 2 eine erfindungsgemäße Vorrichtung im Detail.

[0013] Die Gewinnung von Plasma aus antikoaguliertem (Citrat 0,011mM) Vollblut erfolgt üblicherweise durch Zentrifugation nach DIN 58905 (15 min, bei mindestens 2500g). Das hierbei erhaltene Plasma wird als thrombozytenarmes Plasma (PPP) beschrieben und zur Durchführung von verschiedenen Labortests, insbesondere von Gerinnungsanalysen verwendet. In diesem PPP sind jedoch unterschiedliche Mengen an Mikropartikeln (membranöse Vesikel aus Zellen, 0.1 bis 1µm groß, in einer Anzahl von -4. 000 bis -60. 000/µl) enthalten, die verschiedene Gerinnungsteste beeinflussen, insbesondere die Thrombingenerierung. Es ist somit wünschenswert, für solche Laboranalysen mikropartikelfreies Plasma zu verwenden.

[0014] Mikropartikel können aus dem Plasma zwar durch Ultrazentrifugation des Plasmas ($100.000 \times g$ für 60 min¹) entfernt werden. Diese Prozedur ist jedoch zeitaufwendig und auch dadurch beeinträchtigt, dass nicht sichergestellt werden kann, dass beim Aufnehmen des mikropartikelfreien Plasmas unterschiedliche Mengen an Mikropartikel mit aufgenommen werden. Weiters sind Mikropartikel beschrieben, welche dieselbe Dichte wie Plasma haben und daher durch Zentrifugation nicht getrennt werden können². Für die Trennung von Plasma und Mikropartikeln allenfalls einsetzbare Filtrationseinheiten über welche eine größere Anzahl von Proben über Filterplatten in dazupassende Auffangplatten filtriert werden können sind zwar beschrieben, doch werden hierzu diese Filtrationseinheiten an die in Labors üblichen Membranvakuum-pumpen angeschlossen. Für die dazu nötigen Schlauchleitungen, Sicherheitsflaschen, die Pumpe selbst und Absperrhähnen wird relativ viel Platz gebraucht. Die für die Filtration verwendeten Parameter sind nicht standardisiert und bleiben dem Anwender überlassen.

[0015] Ziel der vorliegenden Erfindung ist es eine einfache Apparatur zu gestalten, die die rasche und standardisierte Trennung von Plasma und Mikropartikel gestattet.

[0016] In dem der Erfindung zugrunde liegenden Vorrichtung (Fig. 1) wird eine Filtrationseinheit bestehend aus einem Membranfilter, welches luftdicht auf einem Auffanggefäß aufliegt, so mit einer Vakuumpumpe verbunden, dass in dem Auffanggefäß ein Unterdruck entsteht, mit dessen Hilfe das Plasma durch den Membranfilter gesaugt wird und das Filtrat in dem Auffanggefäß erhalten wird. Die Dauer der Filtration wird durch eine mit der Vakuumpumpe verbundene Steuereinheit festgelegt und der Filtrationsdruck durch ein die Einstellung eines Ventils. Zur Kontrolle des Filtrationsdruckes ist in dem System ein Druckmesser eingebaut. Dadurch entsteht eine kompakte Bauweise, welche nur wenig Platz benötigt und durch die Festlegung von Zeit und Druck eine Standardisierung der Filtration ermöglicht. Die Vakuumpumpe ist unempfindlich gegenüber Flüssigkeiten und kann gegebenenfalls zusammen mit dem Schlauchsystem bei Bedarf mit einer Waschlösung gereinigt werden. Der Filteraufsatz und die Auffangplatte für die Proben können bei Bedarf über ein Peltierelement im Boden des Filteraufsatzes gekühlt werden.

[0017] Die Filtrationseinheit besteht aus einem Gehäuse mit seitlichen Abdeckungen, auf dem handelsübliche Filteraufsätze, z. B. von der Firma Pall, montiert werden können. Zur Stromversorgung der Pumpe und der übrigen Bauteile dient ein Netzgerät.

[0018] Das Gehäuse enthält folgende Bauelemente: Einen Schalter zum Starten des Filtrationsvorganges und eine Buchse zur Stromversorgung, eine Vakuumpumpe, die den Unterdruck für die Filtration erzeugt, Vakuumschläuche vom Filteraufsatz zur Pumpe und von der Pumpe zur Auslassöffnung, ein elektronisches Bauelement zur Steuerung der Vakuumpumpe. In einer bevorzugten Ausführung ist ein Peltierelement zur Kühlung des Filteraufsatzes vorgesehen, das mit einem elektronischen Bauelement zu seiner Steuerung dient. Weiters kann ein Axiallüfter zur Kühlung des Kühlkörpers in die Gehäusewand eingebaut sein, sowie ein elektronisches Bauelement zur Steuerung des Axiallüfters.

ABLAUFBESCHREIBUNG EINER FILTRATION:

[0019] Der Filteraufsatz wird mit Auffangplatte und Filterplatte bestückt. Die Proben werden in die Filterplatte pipettiert, der Startknopf wird gedrückt und die Filtration startet automatisch. Nach Ende der Filtration wird der Druckausgleichsknopf betätigt, der Filterplattenhalter kann abgehoben und die Auffangplatte mit den Proben entnommen werden.

[0020] Sollte es zu einer Verschmutzung des Filteraufsatzes, der Schläuche oder der Pumpe kommen, kann die Verschmutzung bei laufender Pumpe mit einer Waschlösung aus dem Filteraufsatz zur Auslassöffnung abgesaugt werden.

[0021] Die Fig. 1 zeigt in schematischer Weise eine erfindungsgemäße Plasmafiltriervorrichtung, deren Elemente in einer gemeinsamen, aus einer auf einer Montageplatte montiertem Gehäuse gebildeten Einheit integriert sind.

[0022] Eine einen Oberteil 2 und einen Unterteil 3 umfassende Filtrationseinheit ist fest mit einem Gehäuse 10 verbunden. Über einen im Gehäuse montierten Stecker 11 wird eine Pumpe 7 mit Strom (12V, Gleichstrom) versorgt.

[0023] Eine Auffangplatte 4 ist im Unterteil 3 der Filtrationseinheit auf einem Distanzblock 5 angeordnet, der Oberteil 2 der Filtrationseinheit auf die Auffangplatte 4 draufgesetzt. Darauf ist eine Filterplatte 1 mit den zu filtrierenden Proben gesetzt.

[0024] Durch Drücken eines Startknopfes 12 wird die Pumpe 7 gestartet, die über einen Vakuumschlauch 6 den Unterteil 3 der Filtrationseinheit evakuiert. Die Luft wird über einen Pumpenauslass 8 nach außen geleitet. Das erzeugte Vakuum wird über ein Manometer 13 angezeigt. Der Pumpvorgang wird über eine als Langzeittimer 9 ausgebildete Steuerung gesteuert. Nach Ablauf der fix eingestellten Zeit schaltet sich die Pumpe 7 ab. Danach wird ein Belüftungsknopf 14 gedrückt, wodurch das Vakuum aufgehoben wird. Die Filterplatte 1 kann zusammen mit dem Oberteil 2 abgenommen und die Auffangplatte 4 mit den Filtraten entnommen werden.

[0025] In Fig. 2 sind Aufbau von Filtereinheit und Vakuumeinheit der erfindungsgemäßen Vorrichtung zur Filterung von Blutplasma proben im Detail dargestellt. Am Boden der Filterplatte 1 befinden sich Filtermembranen 19, wobei jede der 96 Vertiefungen der Platte mit einer separaten Membran abgeschlossen ist. Die Filterplatte 1 und Auffangplatte 4 sind durch eine Gumdichtung 15 getrennt. Zwischen Oberteil 2 und Unterteil 3 des insgesamt ein Aluminiumgehäuse bildenden Filteraufsatzes befindet sich ebenfalls eine Dichtung 16. Der Unterteil 3 ist über den Vakuumschlauch 6 mit der Vakuumpumpe 7 verbunden, so dass der Bereich unterhalb des Filters mit Vakuum beaufschlagt werden kann. Über den Pumpenauslass 8 kann die Luft nach außen geleitet werden. Diese Verbindung kann durch einen Absperrhahn 17 getrennt werden. Im Normalbetrieb ist dieser Hahn geöffnet. Die als Langzeittimer 9 ausgebildete Steuerung ist über ein Kabel 18 mit dem eine Buchse bildenden Stecker 11 verbunden. Die Stromversorgung erfolgt über einen externen Trafo mit 12V Gleichstrom. Der Startknopf 12 ist ebenfalls über ein Kabel 18' mit dem Langzeittimer 9 verbunden.

[0026] Unterhalb des Filteraufsatzes ist ein Kühlelement 20 angeordnet, das vorzugsweise ein Peltierelement ist, das mit Kühlrippen thermisch verbunden ist und zur Einstellung einer bestimmten Temperatur für das zu filternde Plasma mit der Steuerung verbunden ist. Außerdem kann in nicht dargestellter Weise zum Wegblasen der vom Peltierelement erzeugten Wärme ein Ventilator vorgesehen sein. Über ein Interface, beispielsweise eine Tastatur können die Parameter für das Verfahren eingestellt werden.

BEISPIELE:

[0027] Wenn verschiedene normale Plasmen unter Zuhilfenahme des beschriebenen Gerätes von Mikropartikel getrennt werden, können typischerweise folgende Ergebnisse erhalten werden:

Probennummer	Mikropartikelgehalt unfiltriert	Mikropartikelgehalt filtriert	Prozent der entfernten Mikropartikel %
1	33.454	1.531	95,42%
2	6.976	1.177	83,12%
3	62.895	1.391	97,78%
4	3.248	741	77,16%
5	8075	1.494	81,49%
6	20.202	4.272	78,85%

[0028] Einsatz von Mikropartikel freiem Plasma für Gerinnungsanalysen:

[0029] Die folgende Tabelle zeigt verschiedene Parameter, wobei unter PPP die Ergebnisse aufgelistet sind, die sich auf das thrombozytenarme Plasma nach der Zentrifugation beziehen, und unter MPFP (micro particle filtered plasma) jene, die am gefilterten Plasma vorgenommen wurden:

Parameter	PPP	MPFP	Differenz
Fibrinogen mg/dl	285±73	290±74	Ns
aPTT (Reagenz 1) sec	38, 9±29	39, 5±2, 3	Ns
aPTT (Reagenz 2) sec	36, 9±3, 9	38, 2±3, 4	Ns
aPTT (Reagenz 3) sec	36, 0±3, 5	38, 2±3, 4	p<0,05
FVIII %	127±30	126±30	Ns
PT (Reagenz 1) %	113±19	114±22	Ns
PT (Reagenz 2) %	157±31	161±32	Ns
PT (Reagenz 3) %	110±11	113±14	Ns
TGA Peak Thrombin nM	331±40	222±26	p<0,05
TGA AUC nM thrombin	4163±29	3641±233	p<0,05
Lupus LCA Index	47, 4±7	34, 8±6	p<0,05

[0030] Aus diesen Daten ergibt sich, dass die Messung der Parameter, insbesondere einzelne Gerinnungsparameter wie aPTT, Thrombingenerierung (TGA) und Lupus-Teste durch das Vorhandensein von Mikropartikel stark beeinflusst werden. Die Abweichungen zeigen, dass durch die Erfindung zuverlässigere Ergebnisse erreicht werden können, die nicht mehr vom Gehalt des Blutes bzw. Plasmas an Mikropartikeln abhängen.

[0031] Mikropartikelfreies Plasma hergestellt mit einer erfindungsgemäßen Vorrichtung eignet sich ganz allgemein zum Einsatz in der Labordiagnostik, insbesondere in der Gerinnungsdiagnostik und zum Einsatz für die Bestimmung der Thrombingenerierung.

REFERENZLISTE:

[0032] (1) Jy W, Horstman LL, Jimenez JJ et al. Measuring circulating cell-derived microparticles. J Thromb Haemost. 2004; 2: 1842-1843.

[0033] (2) Horstman LL, Jy W, Jimenez JJ, Bidot C, Ahn YS. New horizons in the analysis of circulating cell-derived microparticles. Keio J Med. 2004; 53: 210-230.

[0034] Der Inhalt beider oben genannten Veröffentlichungen wird durch Bezugnahme vollständig in die vorliegende Beschreibung aufgenommen.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Aufbereitung einer Blutplasmaprobe für die Bestimmung eines oder mehrerer Blutparameter, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Blutplasma mittels Unterdruck von -50 mbar bis -1000 mbar, vorzugsweise -300 mbar bis -600 mbar durch ein Filter mit einer Durchlassgrenze zwischen 0,05 und 1,5 µm (Mikrometer), vorzugsweise zwischen 0,1 bis 1,2 µm (Mikrometer) gesaugt wird, wobei das Beaufschlagen des Filters mit Unterdruck zwischen 30 Sekunden und 30 Minuten dauert.
2. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Vorrichtung einen Filter (1, 19), einen hinter dem Filter (1, 19) angeordneten Auffangbehälter (4) und eine Vakuumpumpe (7) aufweist, wobei die Vakuumpumpe (7) mit dem Raum hinter dem Filter (1, 19) verbunden ist, und dass unterhalb des Filters (1, 19) ein Kühlelement (20) zur Kühlung des Filtrvorganges vorgesehen ist.
3. Vorrichtung nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Auffangbehälter (4) eine Mikrotiterplatte ist.
4. Vorrichtung nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Auffangbehälter (4) Eppendorf Tubes sind.
5. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 2 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Filter (1, 19), der Auffangbehälter (4) und die Vakuumpumpe (7) in einer gemeinsamen, aus einem auf einer Montageplatte montierten Gehäuse gebildeten Einheit (2, 3) integriert sind.
6. Vorrichtung nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Kühlelement (20) ein Peltierelement, das mit Kühlrippen thermisch verbunden ist.

Hierzu 2 Blatt Zeichnungen

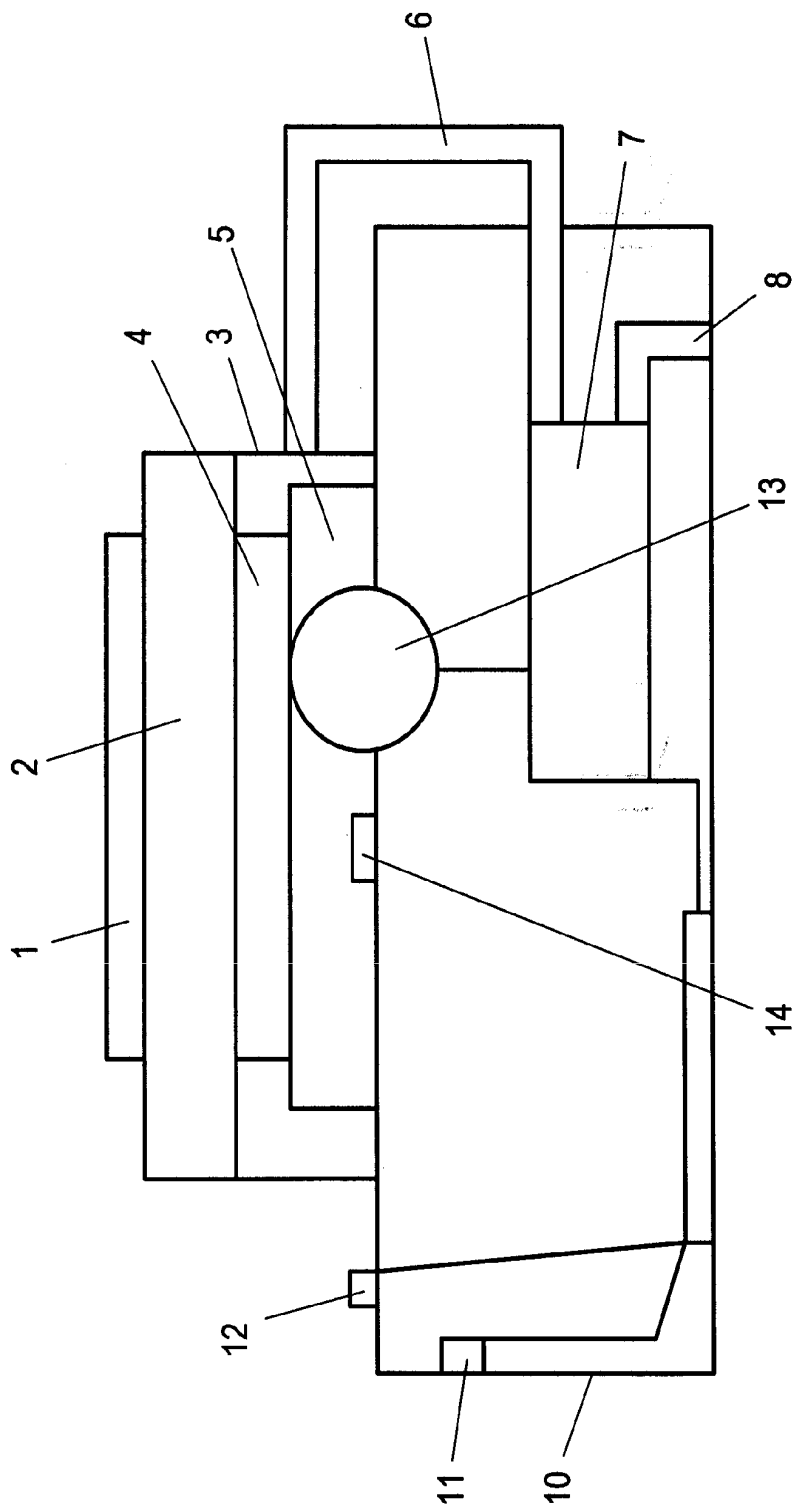


Fig. 1

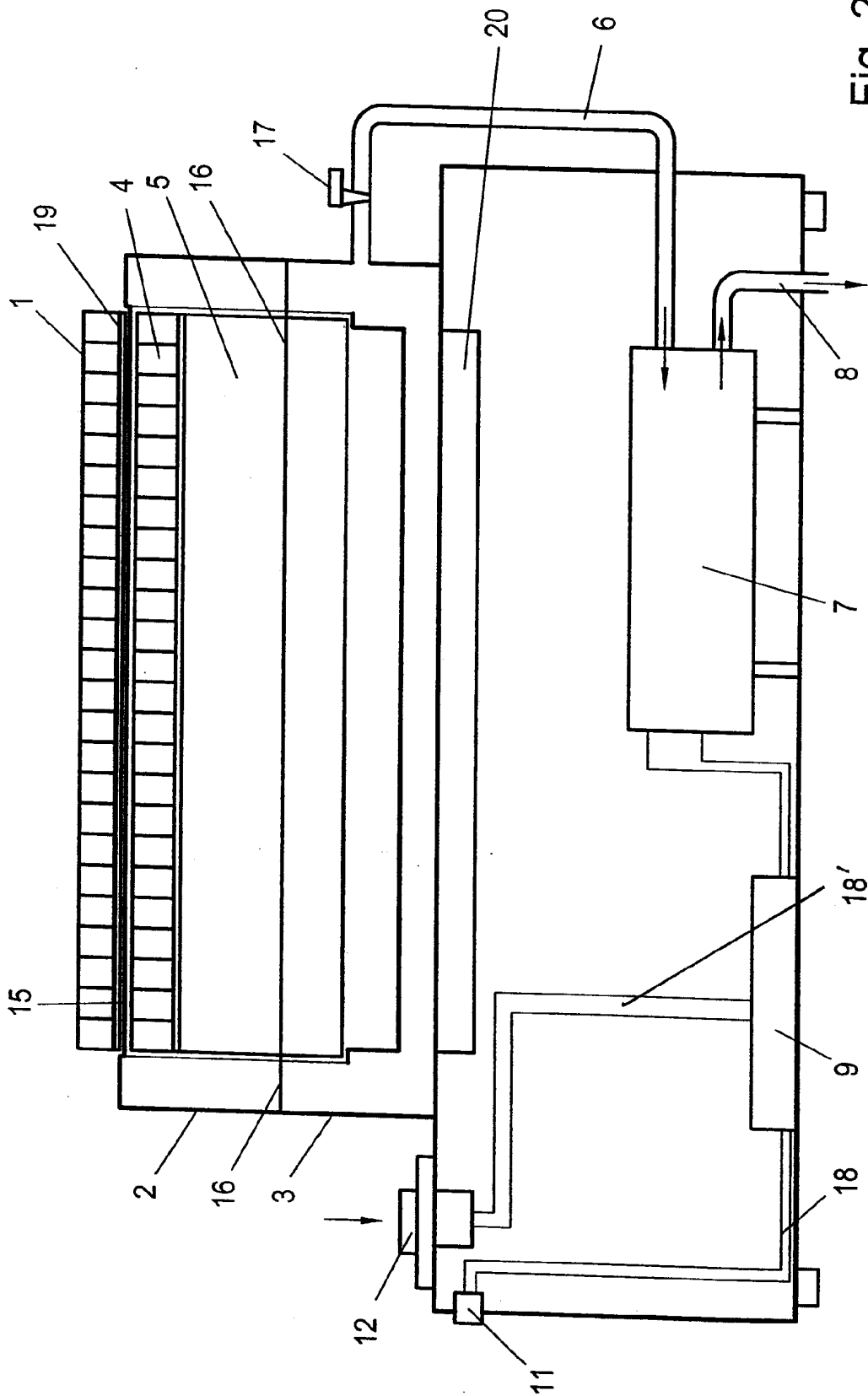


Fig. 2