

Aus dem Institut für Laboratoriumsmedizin,
Klinische Chemie und Pathobiochemie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Auswirkungen von Störfaktoren und Einflussgrößen
auf die Ergebnisse laboratoriumsdiagnostischer Methoden

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicinalium (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dipl.-Biochem. Peter Hoffmann

aus Berlin

Datum der Promotion: 25.06.2017

Inhaltsverzeichnis

Kurzdarstellung	Seite 1
1. Einleitung	Seite 3
2. Zielstellung	Seite 6
3. Methodik	Seite 7
3.1 Urinanalytik.....	Seite 7
3.2 Einfluss von DNA-Isolationsmethoden auf Sequenzierungsergebnisse.....	Seite 7
3.3 Aufreinigung kleinster DNA-Mengen.....	Seite 7
3.4 Einflussgröße hochgradige Entzündung.....	Seite 8
4. Ergebnisse	Seite 9
4.1 Urinanalytik.....	Seite 9
4.2 Einfluss von DNA-Isolationsmethoden auf Sequenzierungsergebnisse.....	Seite 11
4.3 Aufreinigung kleinster DNA-Mengen.....	Seite 12
4.4 Einflussgröße hochgradige Entzündung.....	Seite 12
5. Diskussion	Seite 15
6. Literaturverzeichnis	Seite 18
7. Eidesstattliche Versicherung und Anteilserklärung	Seite 20
8. Ausgewählte Publikationen	Seite 22
8.1 Evaluation of the iChem [®] Velocity urine chemistry analyzer in a hospital routine laboratory.....	Seite 22
8.2 Choice of plasmid preparation kit influences sequencing results.....	Seite 27
8.3 Desalting minimal amounts of DNA for electroporation in <i>E. coli</i> : A comparison of different physical methods.....	Seite 29
8.4 Diagnostic testing for a high-grade inflammation: parameter dynamics and novel markers.....	Seite 32
Lebenslauf	Seite 39
Publikationsliste	Seite 41
Danksagung	Seite 43

Kurzdarstellung

Einleitung: Für eine zuverlässige, qualitätsgesicherte Diagnostik ist es sehr wichtig, mögliche Einflussgrößen und Störfaktoren einer laboratoriumsmedizinischen Untersuchung zu erkennen. Störfaktoren müssen minimiert werden, Einflussgrößen sind bei der Beurteilung von Messergebnissen zu berücksichtigen. In dieser Arbeit wurden sowohl manuelle, als auch eine automatisierte routinediagnostische Methode auf das Vorhandensein von Störfaktoren untersucht. Die Auswirkungen einer hochgradig entzündlichen Erkrankung als Einflussgröße für etablierte und neue laboratoriumsmedizinische Parameter wurden analysiert.

Methodik: Die Richtigkeit der Messungen des Urinchemie-Analysators iChem Velocity wurde getestet und mit den Ergebnissen des Clinitek Atlas verglichen. Es wurde untersucht, ob RNA- und Proteinrückstände in DNA-Präparationen die Leseweite oder den Lesefehleranteil bei DNA-Sequenzierungen beeinflussen. Des Weiteren wurde analysiert, mit welcher Methode kleinste Mengen an DNA optimal aufgereinigt werden können. Der Anstieg und das Absinken der Parameter C-reaktives Protein, Procalcitonin, Leukozyten- und Thrombozytenzahl, Granularitäts-Index und δ -Hämoglobin während einer hochgradig entzündlichen Erkrankung wurden untersucht.

Ergebnisse: Der iChem Velocity detektierte Hämoglobin und Leukozyten mit einer AUC von 0,73 und 0,78. Bei der Analyse von 257 Urinproben traten 19 falsch-negative Messungen von Erythrozyten und 32 falsch-negative Leukozytenbestimmungen auf. Versuche zum Vergleich verschiedener DNA-Isolationsmethoden ergaben, dass in den Präparationen verbliebene Proteinrückstände mit dem Auftreten von Lesefehlern bei einer anschließenden DNA-Sequenzierung korrelierten ($r = 0,63$). Bei der Aufreinigung von Plasmid-DNA erzielte die Verwendung einer Säule mit Silika-Membran die besten Resultate in DNA-Rückgewinnung und Zeitaufwand. Es wurden Parameter-Verlaufskurven für Entstehung und Abklingen einer Entzündung erstellt.

Schlussfolgerungen: In der weiteren Entwicklung des iChem Velocity sollte die Sensitivität erhöht werden. DNA-Präparationen für Sequenzierungsreaktionen sollten frei von Proteinrückständen sein. Die optimale Reinigungsmethode für Plasmid-DNA ist eine Säule mit Silika-Membran. Die Parameterkurven geben Aufschluss über den am besten geeigneten Zeitrahmen für die Entzündungsdiagnostik.

Abstract

Background: Reliable, quality assured diagnostics require the detection of potential interferents and influencing variables. The presence of interferents has to be minimized, and influencing variables have to be taken into account when assessing measurement results. In this study, manual as well as automated routine diagnostic methods were examined for the presence of interferents. The effects of a high-grade inflammation as influencing variable for established and novel laboratory medicine parameters were analyzed.

Methods: The accuracy of the urine chemistry analyzer iChem Velocity was tested and compared with the results of a Clinitek Atlas. It was investigated if RNA and protein remainders in DNA preparations affect the read length or the percentage of reading errors made during DNA sequencing. In addition, it was analyzed which method provides optimal results for the purification of small amounts of DNA. The increase and decrease of the parameters C-reactive protein, procalcitonin, leukocyte and thrombocyte count, granularity index, and δ -hemoglobin were examined during a high-grade inflammation.

Results: The iChem Velocity detected hemoglobin and leukocytes with an AUC of 0.73 and 0.78. During the analysis of 257 urine samples, 19 false negative measurements of erythrocytes and 32 false negative results for leukocytes occurred. Experiments comparing different DNA isolation methods showed, that protein remainders in the DNA preparations correlated with the occurrence of reading errors during subsequent DNA sequencing ($r = 0.63$). For the purification of plasmid DNA, using a micro column with silica membrane achieved the best results in DNA recovery and time requirement. Trajectories for the parameters' dynamics during the onset and resolution of an inflammation were calculated.

Conclusions: The sensitivity of the iChem Velocity should be increased in the ongoing development process. DNA preparations for sequencing reactions should be free of protein contaminants. The ideal purification method for plasmid DNA is a column with silica membrane. The parameter trajectories show the most suitable time frame for inflammation diagnostics.

1. Einleitung

Unter Störfaktoren versteht man Einflüsse auf eine laboratoriumsmedizinische Untersuchung, die das Untersuchungsverfahren stören und zu Veränderungen des Analyseergebnisses führen. Dies können z.B. Stoffwechselprodukte von Medikamenten sein oder Veränderungen am Probenmaterial durch eine ungeeignete Probenvorbereitung für die Messung. Einflussgrößen sind Charakteristika eines Patienten, die *in vivo* Messparameter beeinflussen, beispielsweise das Alter oder bestehende Erkrankungen. Die für alle medizinischen Laboratorien geltende "Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen" [1] hat zum Ziel gesetzt, Einflussgrößen und Störfaktoren in der Präanalytik zu minimieren, sowie Störeinflüsse auf die Untersuchungen zu erkennen und zu minimieren. Bisherige Kontrollverfahren der Qualitätssicherung konzentrieren sich hauptsächlich auf den Analysenvorgang, wodurch in den letzten Jahrzehnten das Auftreten von analytischen Fehlern deutlich reduziert werden konnte. 60% bis 70% der heutigen Fehler in der Laboratoriumsdiagnostik haben nun eine präanalytische Ursache [2]. Die "Working Group on Laboratory Errors and Patient Safety" der International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine fordert daher eine verbesserte Standardisierung und Überwachung der präanalytischen Phase. Insbesondere manuell durchgeführte komplexe Probenvorbereitungen sind mit einem hohen Fehlerrisiko behaftet.

Eine Möglichkeit, die Standardisierung im präanalytischen Bereich zu verbessern, bietet die Automatisierung. Für die Umstellung auf ein automatisiertes Verfahren könnte zum Beispiel die Urinanalyse geeignet sein. Das manuelle Mikroskopieren von Harnsedimenten ist aufwändig und erfordert in der Probenvorbereitung das Zentrifugieren, Dekantieren und Resuspendieren des Urins. IRIS Diagnostics bietet einen neuen Analyseautomaten für die Urinchemie an, der mit einem Gerät zur Urinmikroskopie kombiniert werden kann. Bei dieser Automaten-Kombination wird der iChem Velocity mit den zu analysierenden Urinproben beladen, nach der Teststreifen-Untersuchung werden pathologische Proben automatisch zum iQ200 transportiert und mikroskopisch untersucht. Die Leistungsfähigkeit des iQ200 Flowzytometers wurde bereits mehrfach untersucht und in diversen Publikationen bestätigt. Zum Einfluss von präanalytischen Störfaktoren auf das Messergebnis des iChem Velocity Urinchemie-Analysators wurden von anderen Wissenschaftlern bislang keine Berichte publiziert. Ich führte daher Untersuchungen zur

Evaluierung dieses neuen Gerätes durch. Der Artikel „Evaluation of the iChem[®] Velocity[™] Urine Chemistry Analyzer in a hospital routine laboratory“ [3] beschreibt die dabei erzielten Ergebnisse.

Die DNA-Sequenzierung ist eine molekulardiagnostische Methode, die zunehmend in der Routinediagnostik eingesetzt wird. In der präanalytischen Phase ist hierzu eine Isolation der DNA aus dem Probenmaterial notwendig. Bei der Herstellung und Sequenzierung von Kontrollmaterial (DNA-Plasmiden) für die interne Qualitätssicherung fiel in unserem Laboratorium eine Häufung von nicht auswertbaren Sequenzierungen auf. In den Current Protocols in Molecular Biology wird darauf hingewiesen, dass eine Vielzahl von Zellbestandteilen und Reagenzien als Störfaktoren bei der Didesoxysequenzierung interferieren können, beispielsweise Verunreinigungen mit RNA [4]. Daraufhin wurde experimentell untersucht, ob die Methode der DNA-Isolierung Auswirkungen auf die Qualität des Sequenzierungsergebnisses hat. Die Ergebnisse dieser Analysen wurden in dem Artikel „Choice of plasmid preparation kit influences sequencing results“ [5] veröffentlicht.

Eine weitere präanalytische Problematik von DNA-Proben trat ebenfalls bei der Herstellung von Kontrollmaterial für die interne Qualitätssicherung auf: die DNA-haltige Lösung sollte von Salzen befreit werden. Dazu stehen verschiedene Methoden zur Verfügung, wie die Präzipitation mit Natriumacetat und Ethanol, Gelfiltration, Dialyse oder die Verwendung einer Mini-Säule mit Silika-Membran. Der Artikel „Desalting minimal amounts of DNA for electroporation in *E. coli*: a comparison of different physical methods“ [6] schildert die experimentelle Evaluierung dieser vier Reinigungsmethoden.

Das Einsetzen einer Entzündungsreaktion führt zur Veränderung vieler Parameter im menschlichen Körper. Um die Entstehung einer möglicherweise lebensbedrohlichen systemischen Entzündung frühestmöglich erkennen zu können, muss bekannt sein, welche Messgrößen sich besonders schnell in Reaktion auf die Entzündung ändern und somit für die Diagnostik geeignet sind. Die Konzentrationsänderungen von C-reaktivem Protein (CRP) und Procalcitonin nach einer Operation [7] und bei Patienten mit einer Sepsis [8] wurden bereits untersucht. In den genannten Studien wurde beobachtet, dass sich die Konzentration des Procalcitonins im Blut schneller änderte als die CRP-Konzentration. Bei Patienten mit

postoperativen Komplikationen stieg die Procalcitonin-Konzentration am ersten Tag nach der Operation an. Nach dem Behandlungsbeginn von Patienten mit einer Sepsis sank die Procalcitonin-Konzentration innerhalb eines Tages ab. Veränderungen in der CRP-Konzentration wurden nach ein bis zwei Tagen gefunden. Aufgrund der großen Bedeutung der Parameterdynamik für die Beurteilung neuer diagnostischer Biomarker wurde in dieser Arbeit eine hochgradige Entzündungsreaktion als Einflussgröße für zwei neue Entzündungsparameter untersucht und mit der Dynamik etablierter Entzündungsmarker verglichen. Zur Untersuchung auf das Vorliegen einer Entzündung werden von den behandelnden Ärzten häufig die Bestimmung von C-reaktivem Protein und ein Blutbild angefordert, seltener die Messung der Procalcitonin-Konzentration. Obwohl die Leukozytenzahl ein unspezifischer Parameter ist [8], findet sie immer noch Berücksichtigung bei Therapieentscheidungen. Ein vielversprechender neuer Leukozyten-basierter Parameter ist der Granularitäts-Index [9]. Bei schweren bakteriellen Infektionen zeigen sich in neutrophilen Granulozyten basophile Granula, die sogenannte toxische Granulierung [10]. Das Ausmaß der Granulierung kann mit einem Hämatologieautomaten bestimmt werden, indem nach Anfärbung der neutrophilen Granulozyten das Seitwärtsstreulicht gemessen wird. Zur einfacheren Beurteilung der Streulichtmenge vergleichen die Hämatologieautomaten der Firma Sysmex die Messwerte mit den Ergebnissen einer Referenzpopulation und kalkulieren daraus den Granularitäts-Index: Ein Granularitäts-Index von Null entspricht einem Messwert innerhalb einer Standardabweichung vom Mittelwert der Referenzpopulation. Positive Werte zeigen eine Hypergranulierung an, negative Werte eine Hypogranulierung.

Der zweite zu untersuchende neue Entzündungsparameter war das δ -Hämoglobin, die Differenz zwischen dem Hämoglobingehalt der Retikulozyten und dem Hämoglobingehalt der Erythrozyten. Bei systemischen Entzündungsreaktionen verursacht freigesetztes IL-6 eine vermehrte Transkription von Hepcidin in den Hepatozyten und dessen Freisetzung in den Blutkreislauf [11]. Hepcidin bindet an das Transmembranprotein Ferroportin, woraufhin der Eisen-Transporter endozytiert und abgebaut wird. In Folge dessen wird weniger Eisen über das Duodenum aufgenommen und weniger im Körper gespeichertes Eisen freigesetzt. Dieser Mangel an Eisen kann die Synthese des Hämoglobins stören, der Hämoglobingehalt neu gebildeter Retikulozyten verringert sich. Das Auftreten einer solchen Hämoglobinsynthesestörung ist an sinkenden δ -Hämoglobin-Werten erkennbar. Die Ergebnisse dieser Arbeit zum Verhalten der Parameter Granularitäts-Index und δ -Hämoglobin unter dem Einfluss einer hochgradigen Entzündung wurden im Journal "Clinical Chemistry and Laboratory Medicine" publiziert [12].

2. Zielstellung

Das übergeordnete Ziel der hier vorgestellten Arbeiten war es, präanalytische Einflüsse, Einflussgrößen und Störfaktoren zu erkennen und zu minimieren. Dabei sollten sowohl eine automatisierte, als auch manuelle laboratoriumsmedizinische Analyseverfahren untersucht werden.

Es war ein Teilziel meiner Arbeit zu überprüfen, ob sich (teil)-mechanisierte Analysesysteme für die Urinuntersuchung in der Erkennung bekannter Störfaktoren der Urinanalyse unterscheiden und ob diese Unterschiede einen Einfluss auf die Ergebnisse der Urinuntersuchungen und ihre Bewertung haben. Als Beispiel wählte ich den Störfaktor Ascorbinsäure im Urin, der den Nachweis von Glukose, Erythrozyten/Hämoglobin und Bilirubin im Urin stört, wobei falsch-negative Ergebnisse erzielt werden können. Dazu wurde der iChem Velocity Urinchemie-Analysator (IRIS Diagnostics) mit dem bisher in unserem Laboratorium verwendeten Clinitek Atlas (Siemens Healthcare Diagnostics) verglichen. Es sollte festgestellt werden, ob sich beide Analysesysteme in der Erkennung des oben genannten Störfaktors unterscheiden und ob dies potentiell zu falsch-negativen Ergebnissen führt.

Zur Untersuchung, ob die Methode der DNA-Isolierung während der Präanalytik Auswirkungen auf die Qualität von Sequenzierungsergebnissen hat, sollten Reagenzien von sieben verschiedenen Herstellern getestet werden. Die Reinheit der Plasmid-Präparationen war durch die Konzentrationsbestimmung von DNA, RNA und Proteinen zu evaluieren. Die Beurteilung der Qualität der DNA-Sequenzierung sollte anhand des Prozentsatzes von Lesefehlern und der Leseweite erfolgen.

Im dritten Abschnitt der Arbeit sollten an einem geeigneten Beispiel Methoden der Minimierung von Störfaktoren untersucht werden. Hierfür wurde der Vergleich von Natriumacetat-Ethanol-Fällung, Gelfiltration, Dialyse und Säule mit Silika-Membran zur Beseitigung störender Salz-Verunreinigungen aus DNA-Proben gewählt. Es sollte bewertet werden, welche Methode bei geringem Zeitaufwand und Kosten die größtmögliche Menge an gereinigter DNA ergibt.

Der Stellenwert von Einflussgrößen sollte im vierten Abschnitt der Arbeit am Beispiel des Einflusses einer hochgradig entzündlichen Erkrankung auf die Dynamik der zwei neuen zellulären Parameter Granularitäts-Index und δ -Hämoglobin untersucht werden. Hierbei sollte ermittelt werden, ab welchem Zeitpunkt mit Hilfe dieser Parameter eine systemische Entzündungsreaktion diagnostiziert werden kann.

3. Methodik

3.1 Urinanalytik

257 zufällig ausgewählte Proben Mittelstrahlurin wurden mit dem Clinitek Atlas (Siemens Healthcare Diagnostics), iChem Velocity (IRIS Diagnostics) und iQ200 (IRIS Diagnostics) analysiert. Zur Bestimmung der Präzision in Serie wurden eine Probe, die durch Mischen pathologischer Proben erhalten wurde, und der Urin einer gesunden Person zehnfach repetitiv gemessen. Die Zellzahl (Erythrozyten/Leukozyten) wurde mikroskopisch durch Untersuchung des Harnsediments in einer Zählkammer ermittelt: Das Harnsediment wurde durch 10 Minuten Zentrifugation bei 200 g aus 6 mL Urin gewonnen. 5 mL Urin wurden dekantiert, das Sediment in dem verbleibenden 1 mL resuspendiert und in einer Fast-Read 102 Zählkammer (Hycor Biomedical) bei 400facher Vergrößerung manuell mikroskopiert. Ein pathologischer Befund wurde definiert als über 5 Erythrozyten/ μL oder über 10 Leukozyten/ μL im unzentrifugierten Urin. Diese mikroskopische Einstufung der Proben als pathologisch oder unauffällig wurde bei der Erstellung der Receiver-operating characteristic (ROC) Graphen zu Grunde gelegt.

3.2 Einfluss von DNA-Isolationsmethoden auf Sequenzierungsergebnisse

Chemisch kompetente Zellen der Stämme *Escherichia coli* TOP10 und *E. coli* DH5 α wurden mit den Plasmiden pUC19 oder pET-28a transformiert. Zur Plasmid-Isolierung wurden jeweils $1,9 \times 10^9$ c.f.u. in 1 mL Flüssigkultur verwendet. Folgende Reagenzien wurden getestet: illustra plasmidPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare), PureLink Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen), NucleoSpin Plasmid Kit (Macherey–Nagel), peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I C-Line (Peqlab), PureYield Plasmid Miniprep System (Promega), QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) und Zippy Plasmid Miniprep Kit (Zymo Research). Die Konzentration von DNA, RNA und Proteinen in den Präparationen wurde mit einem Qubit Fluorometer unter Verwendung des Quant-iT dsDNA BR Assays, Quant-iT RNA Assays und Quant-iT Protein Assays (Invitrogen) gemessen. Die DNA-Sequenzierung erfolgte mit dem GenomeLab DTCS Quick Start Kit und dem CEQ 8800 Genetic Analysis System (Beckman Coulter).

3.3 Aufreinigung kleinster DNA-Mengen

Für die Experimente wurde eine zu reinigende DNA-Lösung wie folgt simuliert: 15 pg/ μL oder 1 ng/ μL pUC19 Plasmid-DNA, 1x T4 DNA Ligase Puffer (New England Biolabs) und 20 U/ μL

T4 DNA Ligase (New England Biolabs). Jede Aufreinigung wurde mit 10 μ L dieser Mischung durchgeführt. Zur DNA-Präzipitation wurden 1 μ L 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5,2) und 25 μ L Ethanol zugegeben. Nach 30 Minuten Inkubation bei -20 °C wurde die DNA durch Zentrifugation bei 20.800 g pelletiert und ein- bis dreimal mit einer 7:3 Ethanol-Wasser-Mischung gewaschen. Die Gelfiltration erfolgte mit 55 mg Sephadex G-50 (Sigma-Aldrich). Für die Dialyse gegen destilliertes Wasser wurden Nitrocellulose-Filter (Millipore) mit einer Porengröße von 0,025 μ m verwendet. Die Aufreinigung durch eine Mini-Säule mit Silika-Membran wurde mit dem GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) nach Herstellerangaben durchgeführt. Im Anschluss an die Reinigung wurden elektrokompetente *E. coli* DH5 α mit der gereinigten DNA elektroporiert. Dabei wurden die Volumina so gewählt, dass sich bei verlustfreier Aufreinigung der DNA maximal 1 ng bzw. 3 pg in den Elektroporationsansätzen hätten befinden können. Die transformierten Zellen wurden auf LB-Ampicillin-Agar ausplattiert und nach 12 Stunden Inkubation bei 37 °C gezählt.

3.4 Einflussgröße hochgradige Entzündung

In einer retrospektiven Studie wurden hämatologische und klinisch-chemische Messwerte von 53.968 Patienten der Charité – Universitätsmedizin Berlin analysiert. Patienten, deren CRP-Konzentration während des Krankenhausaufenthalts von unter 40 mg/L auf Werte über 100 mg/L anstiegen, wurden in die Kohorte "Entzündungsentstehung" aufgenommen. Die Kohorte "Entzündungsabklingen" bestand aus Patienten, deren CRP-Konzentration von über 100 mg/L auf Werte unterhalb von 40 mg/L absank. Insgesamt wurden die Krankheitsverläufe von 1.084 Patienten in die Studie eingeschlossen. Für die zeitlichen Verläufe der Parameter CRP, Procalcitonin, Leukozyten- und Thrombozytenzahl, Granularitäts-Index und δ -Hämoglobin wurden Locally weighted scatterplot smoothing (LOWESS)-Kurven mit SPSS Statistics Version 22 (IBM Deutschland GmbH) erstellt.

4. Ergebnisse

4.1 Urinanalytik

Tabelle 1 Auf Ascorbinsäure positiv getestete Proben

Proben-Nummer	Ascorbinsäure iChem Velocity	Blut Clinitek Atlas	Blut iChem Velocity	Erythrozyten Zählkammer	Erythrozyten iQ200 ^a
27	++	0	0	-	-
39	++	0	0	-	2 / μ L
55	+	0	0	-	7 / μ L
56	+	0	0	0-5/ μ L	16 / μ L
69	+	0	Spuren	-	-
95	+	0	0	-	3 / μ L
109	+	0	0	-	9 / μ L
112	+	0	0	-	3 / μ L
113	+	Spuren	Spuren	-	9 / μ L
149	++	0	0	-	18 / μ L
171	+	0	0	-	7 / μ L
186	+	0	0	-	5 / μ L
198	+	++	Spuren	31-50/ μ L	131 / μ L
199	++	+++	+++	>50/ μ L	1752 / μ L
205	++	0	0	-	13 / μ L
266	++	0	0	-	3 / μ L

Tabelle 1 vergleicht die Messergebnisse für die Erythrozytenzahl in Proben, bei denen Ascorbinsäure detektiert wurde. In gelb unterlegt sind zwei mit den Analyseautomaten falsch-negativ bestimmte Proben. 0 bzw. - : negativ, + bis +++: semiquantitative Kategorien zur Ascorbinsäurekonzentration bzw. Erythrozytenzahl, ^a iQ200 Referenzbereich Erythrozyten: < 16/ μ L

Während der iChem Velocity Ascorbinsäure detektieren konnte und somit eine Erkennung von potentiell falsch-negativen Ergebnissen ermöglichte, konnte der Clinitek Atlas dies nicht. Die Auswertung der Analyseergebnisse zeigte, dass in 16 von 257 Urinproben Ascorbinsäure nachweisbar war (Tabelle 1).

Tabelle 2 Übereinstimmung der iChem Velocity und Clinitek Atlas Ergebnisse

Parameter	Übereinstimmung	
	gleiche Kategorie ^a	± 1 Kategorie
Bilirubin	93%	99%
Erythrozyten	67%	93%
Glukose	94%	99%
Ketonkörper	89%	98%
Leukozyten	77%	95%
pH	91%	99%
Protein	73%	96%
Urobilinogen	85%	100%

^a Kategorien der Teststreifen waren z.B. „negativ“, „Spuren“, „+“, „++“ und „+++“

Tabelle 3 Präzision des iChem Velocity und Clinitek Atlas bei serieller Messung einer pathologischen Probe

Parameter	Häufigkeit der Resultate gleicher Kategorie	
	iChem Velocity	Clinitek Atlas
Bilirubin	100%	100%
Erythrozyten	50%	70%
Glukose	100%	100%
Ketonkörper	100%	100%
Leukozyten	60%	60%
Nitrit	80%	80%
pH	100%	90%
Protein	80%	70%
Urobilinogen	100%	100%

Die finale Publikation ist erhältlich bei www.degruyter.com: Hoffmann P, Hoffmann C, Ziebig R, Zimmermann M. Evaluation of the iChem[®] Velocity urine chemistry analyzer in a hospital routine laboratory. Clin Chem Lab Med 2011;49:509-13.

Tabellen 2 und 3 fassen weitere Daten zusammen, die sich bei der Messung der jeweils identischen Urinprobe mit beiden Teststreifen-Automaten ergeben haben. Fünf von 257 Urinproben wurden von beiden Geräten mit unterschiedlichem Ergebnis auf Nitrit getestet. Ein McNemar-Test zeigte, dass diese Abweichung durch den Zufall erklärbar ist ($p = 1,00$). ROC Graphen ergaben für den iChem Velocity eine Area under the curve (AUC) von 0,73 für den Nachweis von Erythrozyten im Urin und 0,78 für Leukozyten. Der Clinitek Atlas erzielte eine AUC von 0,86 für Erythrozyten und 0,85 für Leukozyten. Im Vergleich mit den Ergebnissen der automatischen Zellzählung durch den iQ200 analysierte der iChem Velocity 19 Proben falsch-negativ für Erythrozyten und 32 Proben falsch-negativ für Leukozyten. Mit dem Clinitek Atlas

wurden 25 Proben falsch-negativ für Erythrozyten und 16 Proben falsch-negativ für Leukozyten gemessen.

4.2 Einfluss von DNA-Isolationsmethoden auf Sequenzierungsergebnisse

Tabelle 4 Masse von DNA, RNA und Proteinen in den Plasmid-Präparationen, Leseweiten und Lesefehler der anschließenden DNA-Sequenzierung

Firma	DNA ^a [µg]	RNA [ng]	Protein [µg]	Leseweite [bp]	Lesefehler [%] ^b
GE Healthcare	2.55* (1.72-2.87)	147** (140-189)	0 (0-0)	782 (742-793)	3.0 (1.3-4.0)
Invitrogen	1.78 (1.36-2.32)	110 (0-136)	0 (0-2.58)	0 ^c (0-801)	100 ^c (3.2-100)
Macherey-Nagel	2.16 (1.29-2.51)	100 (83.0-143)	0 (0-1.77)	812** (765-834)	4.3 (1.9-5.6)
Peqlab	2.37 (1.63-2.65)	323** (148-440)	0 (0-0)	799** (732-810)	3.8 (0.8-7.5)
Promega	2.18 (1.80-2.92)	134** (125-187)	0 (0-0)	697 (656-766)	1.8** (0.8-2.9)
Qiagen	2.72** (1.65-3.13)	80.0 (70.0-92.0)	0 (0-0)	765 (710-787)	1.6* (0.7-5.0)
Zymo Research	1.57 (0.90-2.48)	128 (110-142)	0 (0-0)	771 (768-774)	2.4 (1.7-3.0)

^a Angegeben sind jeweils der Median, Minimal- und Maximalwert, signifikante Unterschiede zu anderen Präparationen sind markiert mit * $p < 0.05$ oder ** $p < 0.01$, ^b prozentualer Anteil der Lesefehler bezogen auf die Leseweite, ^c Wenn die Analyse der Rohdaten keine Identifizierung der Basen ermöglichte, wurde eine Leseweite von Null und ein Lesefehler von 100 % vermerkt

Mit freundlicher Genehmigung von Springer Science + Business Media: Biotechnology Letters, Choice of plasmid preparation kit influences sequencing results, 32, 2009, p. 422, Hoffmann P, Hoffmann C, Weimann A, Table 1.

Die Analyseergebnisse der verschiedenen Plasmid-Präparationen sind in Tabelle 4 aufgelistet. Durch Kruskal-Wallis-Tests gefolgt von Dunn's multiple comparison Tests wurden signifikante Unterschiede in den Eigenschaften der Präparationen aufgedeckt. Zwischen dem Vorhandensein von Protein-Kontaminationen und dem Auftreten von Lesefehlern bei der Sequenzierung wurde eine Spearman Rang Korrelation von $r = 0,63$ ($p = 0,02$) gefunden.

4.3 Aufreinigung kleinster DNA-Mengen

Die Entsalzung der DNA-Lösung war mit allen verwendeten Methoden erfolgreich. Abbildung 1 illustriert, wie viel Plasmid-DNA nach der Aufreinigung noch vorhanden war.

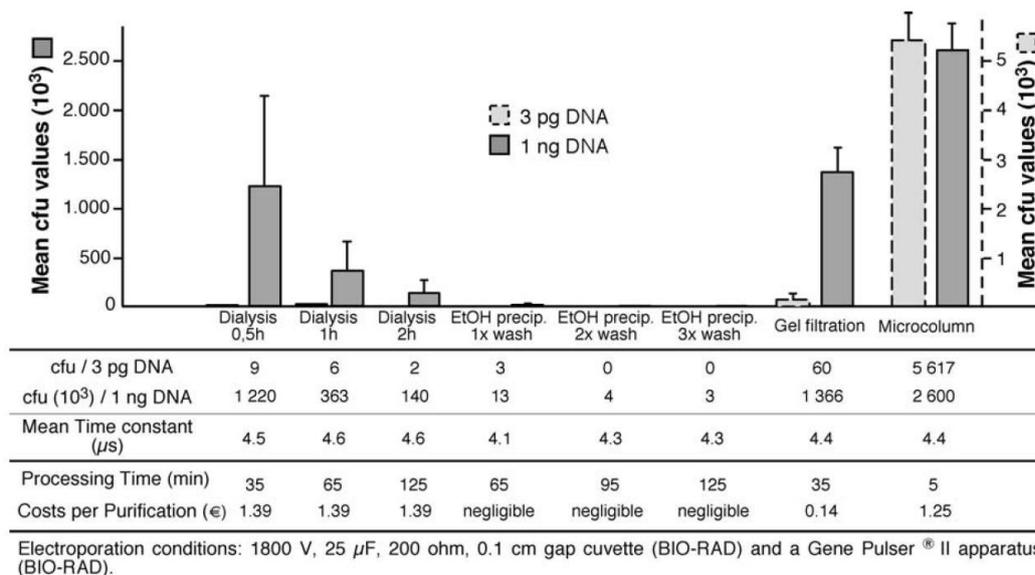


Abbildung 1: Vergleich der Transformationseffizienz nach Anwendung verschiedener DNA-Aufreinigungsmethoden

Mit freundlicher Genehmigung von Springer Science + Business Media: Biotechnology Letters, Desalting minimal amounts of DNA for electroporation in *E. coli*: a comparison of different physical methods, 27, 2005, p. 1004, Schlaak C, Hoffmann P, May K, Weimann A, Figure 1.

4.4 Einflussgröße hochgradige Entzündung

Die Parameterkurven in Abbildung 2 zeigen, dass in der Kohorte "Entzündungsentstehung" bereits bei der Einlieferung in das Krankenhaus die Konzentrationen von CRP und Procalcitonin, sowie der Granularitäts-Index die Obergrenze der jeweiligen Referenzbereiche überschritten hatten. Die Thrombozytenzahl der Patienten sank nach 24 Stunden auf Werte unterhalb des Referenzbereiches ab. Erst nach sechs Tagen zeigte sich in den δ-Hämoglobin Messwerten ein verminderter Hämoglobingehalt der Retikulozyten. Die LOWESS-Kurve der Leukozytenzahlen blieb während der gesamten Beobachtungsdauer von sieben Tagen innerhalb des Referenzbereiches.

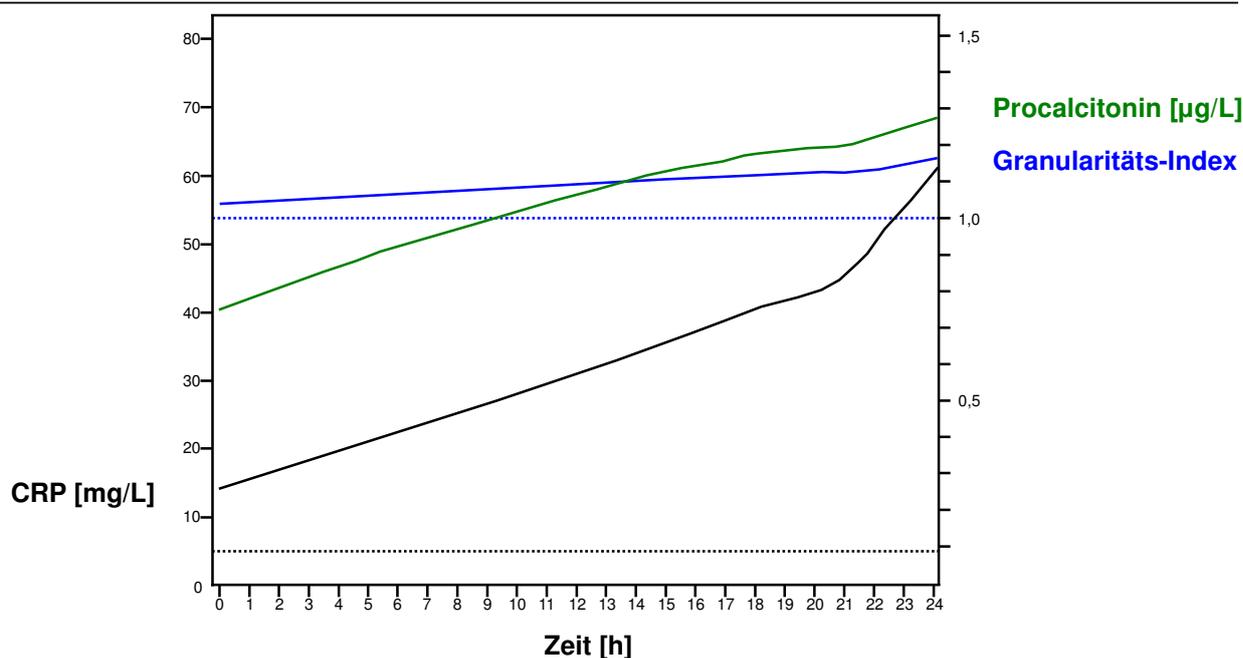


Abbildung 2: Parameterdynamik unter dem Einfluss einer beginnenden hochgradig entzündlichen Erkrankung
 Die Kurven wurden mit der Locally weighted scatterplot smoothing (LOWESS)-Methode berechnet. Die unterbrochenen Linien markieren die Obergrenzen der Referenzbereiche (0 µg/L Procalcitonin; Granularitäts-Index 1; 5 mg/L CRP). CRP: C-reaktives Protein

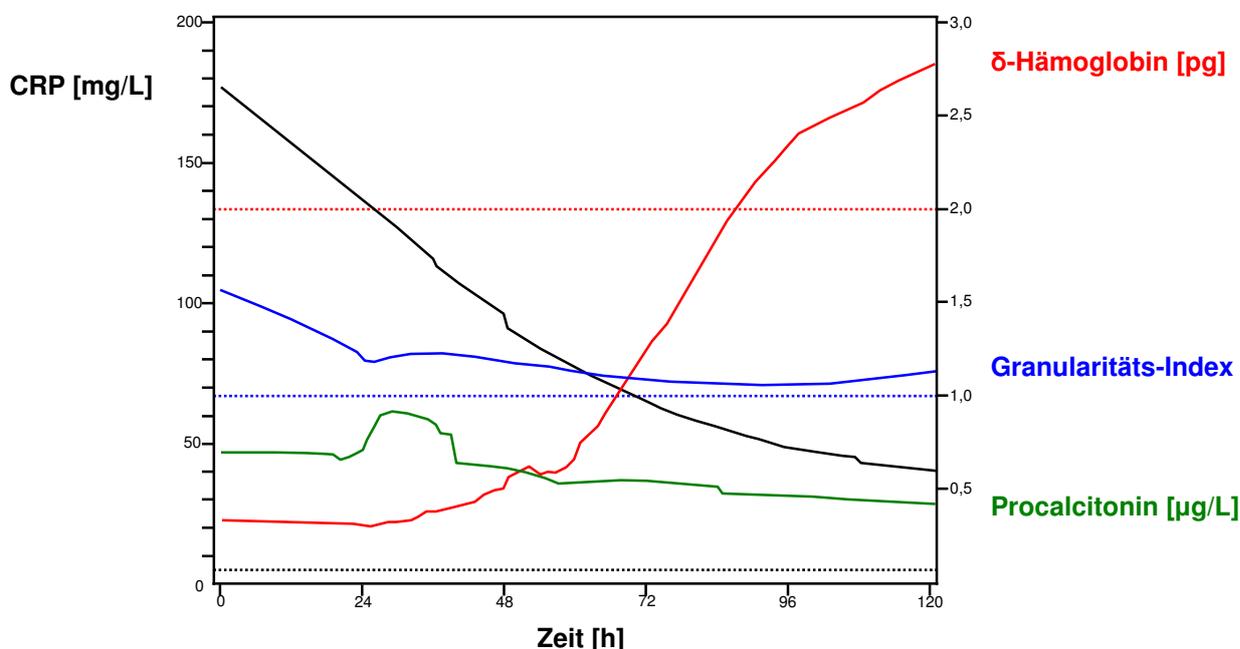


Abbildung 3: Parameterdynamik unter dem Einfluss einer abklingenden hochgradig entzündlichen Erkrankung
 Die Kurven wurden mit der Locally weighted scatterplot smoothing (LOWESS)-Methode berechnet. Die unterbrochenen Linien markieren die Obergrenzen der Referenzbereiche (0 µg/L Procalcitonin; Granularitäts-Index 1; 5 mg/L CRP), bzw. die untere Grenze (2 pg δ-Hämoglobin). CRP: C-reaktives Protein

Abbildung 3 zeigt, dass bei beginnender Heilung einer hochgradig entzündlichen Erkrankung in den ersten 24 Stunden die CRP-Konzentration und der Granularitäts-Index erkennbar sinken. Eine Verringerung der Procalcitonin-Konzentration geschieht nur in geringem Maße. Von allen beobachteten Parametern normalisierte sich innerhalb einer Woche nur δ -Hämoglobin von pathologischen Werten auf Messergebnisse innerhalb des Referenzbereiches. Die LOWESS-Kurven der Leukozyten- und Thrombozytenzahlen der Kohorte "Entzündungsabklingen" verliefen während des gesamten Beobachtungszeitraumes von einer Woche innerhalb des Referenzbereiches.

5. Diskussion

Bei dem Vergleich der Messergebnisse des iChem Velocity und des Clinitek Atlas traten die größten Diskrepanzen bei der Bestimmung von Hämoglobin (Erythrozyten), Protein und Leukozyten-Esterase im Urin auf. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Lott *et al.* [13], als sie den Clinitek Atlas mit dem Clinitek 200+ verglichen. Die Evaluation der Sensitivität und Spezifität des iChem Velocity und des Clinitek Atlas für Hämoglobin und Leukozyten-Esterase im Urin wies bei beiden Geräten leichte Defizite auf. Eine mögliche Erklärung sind Substanzen im Urin, welche die Analyse stören, wie Ascorbinsäure oder Medikamente (z.B. Antibiotika). Die Nachweisreaktion für Hämoglobin beruht auf der Oxidation eines Farbindikators. Die reduzierenden Eigenschaften der Ascorbinsäure können zu einer Rückreaktion des gebildeten Farbstoffs führen und so falsch-niedrige oder falsch-negative Ergebnisse verursachen [14]. Brigden *et al.* konnten zeigen, dass 22,8% der Urinproben einer Normalbevölkerung positiv für Ascorbinsäure waren. Eine moderate Aufnahme von Ascorbinsäure (250 mg/Tag) führte zu einer Ascorbinsäurekonzentration von 310 mg/L im Urin [15]. Mit dem iChem Velocity können Urinproben auf das Vorhandensein von Ascorbinsäure getestet werden: von 257 untersuchten Urinen enthielten 16 Proben Ascorbinsäure. Bei zwei dieser Proben ergab die Hämoglobin-Analyse ein falsch-negatives Resultat. Ein Mangel an Sensitivität bei der Urinchemie-Analyse hat zur Folge, dass falsch-negativ gemessene Proben nicht für die anschließende automatische mikroskopische Untersuchung ausgewählt werden. Bei der Weiterentwicklung dieses neuen Automaten wäre es daher wünschenswert, wenn die Firma besonderes Augenmerk auf eine Verbesserung der Sensitivität legen würde.

Kommerziell erhältliche Reagenzien zur Plasmid-Präparation werden heutzutage in vielen molekular-genetischen Laboratorien eingesetzt. Unsere Experimente konnten zeigen, dass die Wahl der Reagenzien die Qualität einer anschließenden DNA-Sequenzierung beeinflussen kann. Die Leseweite wurde dabei weder durch RNA- noch durch Protein-Kontaminationen in den Plasmid-Präparationen verringert. Das Auftreten von Lesefehlern korrelierte jedoch mit der Proteinkonzentration in den Präparationen. Meiner Meinung nach ist eine akkurate Sequenzierung wichtiger als eine fehlerbehaftete große Leseweite. In unserem Laboratorium entschieden wir uns deshalb für die Verwendung des QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen), der die höchste DNA-Ausbeute, Reinheit und die geringsten Lesefehler aufwies. Thompson und

Kollegen [16] beobachteten ebenfalls Schwierigkeiten bei der Sequenzierung von Plasmiden. Sie fanden eine Korrelation zwischen Sequenzierproblemen und dem Vorliegen der DNA in Supercoil-Form.

Aufgrund der geringen verwendeten DNA-Mengen und Volumina wurde bei dem Vergleich der DNA-Entsalzungsmethoden keine photometrische Meßmethode eingesetzt. Stattdessen wurden *E. coli* Bakterien mit den von Salzen befreiten DNA-Lösungen elektroporiert und die Anzahl der erhaltenen transformierten Bakterien als Maß für den DNA-Gehalt genutzt. Die Zeitkonstante des elektrischen Pulses während der Elektroporation gab Aufschluss über den Erfolg der Entsalzung, da sie dem Produkt aus Widerstand und Kapazität des Stromkreises entspricht [17]. Der Widerstand hängt dabei von der Leitfähigkeit der Probe ab, also auch von ihrem Salzgehalt. Zur Aufreinigung von DNA-Mengen im Pikogramm-Bereich eignete sich eine Mini-Säule mit Silika-Membran am Besten, alle anderen getesteten Methoden waren sehr verlustreich. Bei Erhöhung der zu reinigenden DNA auf Nanogramm-Mengen erzielten neben der Mini-Säule mit Silika-Membran auch die Gelfiltration und Dialyse eine gute Rückgewinnung der gereinigten DNA. Für eine erfolgreiche Natriumacetat-Ethanol-Fällung waren die eingesetzten DNA-Mengen möglicherweise zu gering und es hätten die Präzipitation unterstützende Substanzen wie z.B. Glykogen verwendet werden müssen. Der Zeitaufwand für den Einsatz der Mini-Säule war sehr gering, allerdings kostete eine Aufreinigung 1,25 €. Für die Aufreinigung einiger Nanogramm DNA stellt die Gelfiltration eine kostengünstigere Alternative dar.

Bei der Beurteilung der LOWESS-Kurven zur Parameterdynamik unter dem Einfluss einer hochgradig entzündlichen Erkrankung war zu berücksichtigen, dass die CRP-Konzentrationen Teil der Einschlusskriterien gewesen sind. Für die CRP-Konzentration ergaben sich daher idealisierte Verläufe, frei von den Daten der Patienten, die möglicherweise trotz des Vorliegens einer systemischen Entzündung CRP-Konzentrationen unter 100 mg/L aufwiesen. Dies könnte beispielsweise Patienten mit einer Leberschädigung betreffen, die dadurch eine eingeschränkte Syntheseleistung für das Akute-Phase-Protein CRP hatten. Die in den Einschlusskriterien vorgegebenen CRP-Konzentrationen für Beginn und Ende der Beobachtung hatten möglicherweise zur Folge, dass die von Reith *et al.* gefundene schnellere Dynamik des Procalcitonins im Vergleich zum CRP [7] nicht bestätigt werden konnte. In den Untersuchungen von Reith wurde ein operativer Eingriff als Auslöser der Entzündungsreaktion gewählt. Dies

hatte den Vorteil, dass der genaue Zeitpunkt bekannt war, zu dem eine körperliche Reaktion eintreten würde und bereits vor dem Einsetzen der Entzündung Blutproben entnommen werden konnten. In der von mir durchgeführten Studie wurden die Kohorten so gewählt, dass jegliche Ursache einer systemischen Entzündung berücksichtigt werden konnte. Bereits bei der ersten Einsendung von Blutproben zur Entzündungsdiagnostik durch die behandelnden Ärzte ergaben sich für die Parameter CRP, Procalcitonin und Granularitäts-Index Werte oberhalb der Referenzbereiche. Neben den etablierten Entzündungsmarkern CRP und Procalcitonin scheint auch der Granularitäts-Index für eine frühe Diagnostik geeignet zu sein. Die Erkennung einer einsetzenden Besserung war anhand der Werte des Granularitäts-Index ebenfalls innerhalb der ersten 24 Stunden möglich. Ähnlich wie das Procalcitonin zeigt der Granularitäts-Index einen sehr flachen Verlauf der LOWESS-Kurven, Start- und Endpunkt liegen dicht beieinander. Dies erschwert die Erkennung von Änderungen im Entzündungsstatus des Patienten. Eine Verbesserungsmöglichkeit würde darin bestehen, den Granularitäts-Index anders als von Le Roux *et al.* definiert [9] zu kalkulieren, mit dem Ziel den auftretenden Wertebereich zu vergrößern. Der Verlauf der LOWESS-Kurve von δ -Hämoglobin lässt sich durch den größeren Wertebereich im Vergleich zum Granularitäts-Index leichter interpretieren. Allerdings wird der Nutzen dieses neuen Parameters dadurch eingeschränkt, dass es mehr als 24 Stunden dauert, bis sich eine Veränderung des Entzündungsstatus auf die Hämoglobinbeladung der Retikulozyten auswirkt. Über die in dieser Arbeit gefundene geringe diagnostische Aussagekraft der Leukozytenzahl wurde bereits von anderen Autoren berichtet: Beispielsweise errechneten Castelli und Kollegen für die Diagnose und Überwachung einer Sepsis bei Patienten auf einer Intensivstation ROC Graphen mit einer AUC von 0,60 für Leukozyten ($p > 0,05$) und 0,62 für neutrophile Granulozyten ($p < 0,05$) [8]. Da bei der Anfertigung eines Blutbildes mit den Hämatologie-Automaten der Firma Sysmex die Parameter Granularitäts-Index und δ -Hämoglobin problemlos mitbestimmt werden können, wäre dies eine nützliche Ergänzung des Blutbildes um zwei neue funktionelle zelluläre Biomarker.

Die Ergebnisse dieser Arbeit können durch die Berücksichtigung von Einflussgrößen, die Verringerung von Störfaktoren und die Senkung der Turn-around time von Probeneingang zur Befundübermittlung zu einer Verbesserung der Patientenversorgung beitragen und helfen, die Anforderungen an ein Routinelaboratorium bezüglich Wirtschaftlichkeit, Effizienz und Qualität zu erfüllen.

6. Literaturverzeichnis

- 1 Bundesärztekammer. Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen. Bundesärztekammer, 2013. (Accessed August 22, 2014, at http://www.bundesaerztekammer.de/downloads/Rili-BAeK-Labor_092013.pdf)
- 2 Lippi G, Chance JJ, Church S, Dazzi P, Fontana R, Giavarina D, Grankvist K, Huisman W, Kouri T, Palicka V, Plebani M, Puro V, Salvagno GL, Sandberg S, Sikaris K, Watson I, Stankovic AK, Simundic AM. Preanalytical quality improvement: From dream to reality. *Clin Chem Lab Med* 2011;49:1113-26.
- 3 Hoffmann P, Hoffmann C, Ziebig R, Zimmermann M. Evaluation of the iChem[®] Velocity urine chemistry analyzer in a hospital routine laboratory. *Clin Chem Lab Med* 2011;49:509-13.
- 4 Slatko BE, Heinrich P, Nixon BT, Eckert RL. Preparation of templates for DNA sequencing. *Curr Protoc Mol Biol* 2001;Chapter 7:Unit7.3.
- 5 Hoffmann P, Hoffmann C, Weimann A. Choice of plasmid preparation kit influences sequencing results. *Biotechnol Lett* 2010;32:421-2.
- 6 Schlaak C, Hoffmann P, May K, Weimann A. Desalting minimal amounts of DNA for electroporation in *E. coli*: A comparison of different physical methods. *Biotechnol Lett* 2005;27:1003-5.
- 7 Reith HB, Mittelkotter U, Debus ES, Kussner C, Thiede A. Procalcitonin in early detection of postoperative complications. *Dig Surg* 1998;15:260-5.
- 8 Castelli GP, Pognani C, Cita M, Stuardi A, Sgarbi L, Paladini R. Procalcitonin, C-reactive protein, white blood cells and SOFA score in ICU: Diagnosis and monitoring of sepsis. *Minerva Anestesiol* 2006;72:69-80.
- 9 Le Roux G, Vlad A, Eclache V, Malanquin C, Collon JF, Gantier M, Schillinger F, Peltier JY, Savin B, Letestu R, Baran-Marszak F, Fenaux P, Ajchenbaum-Cymbalista F. Routine diagnostic procedures of myelodysplastic syndromes: Value of a structural blood cell parameter (neut-x) determined by the Sysmex XE-2100. *Int J Lab Hematol* 2010;32:e237-43.
- 10 Kugel MA, Rosenthal N. Pathologic changes occurring in polymorphonuclear leukocytes during the progress of infections. *Am J Med Sci* 1932;183:657-67.
- 11 Ganz T, Nemeth E. Hepcidin and iron homeostasis. *Biochim Biophys Acta* 2012;1823:1434-43.

-
- 12 Hoffmann C, Hoffmann P, Zimmermann M. Diagnostic testing for a high-grade inflammation: Parameter dynamics and novel markers. *Clin Chem Lab Med* 2014; DOI 10.1515/cclm-2014-0482 (epub ahead of print).
 - 13 Lott JA, Johnson WR, Luke KE. Evaluation of an automated urine chemistry reagent-strip analyzer. *J Clin Lab Anal* 1995;9:212-7.
 - 14 Zweig MH, Jackson A. Ascorbic acid interference in reagent-strip reactions for assay of urinary glucose and hemoglobin. *Clin Chem* 1986;32:674-7.
 - 15 Brigden ML, Edgell D, McPherson M, Leadbeater A, Hoag G. High incidence of significant urinary ascorbic acid concentrations in a west coast population – implications for routine urinalysis. *Clin Chem* 1992;38:426-31.
 - 16 Thompson M, Aukema K, O'Bryan D, Rader S, Murray B. Plasmid sonication improves sequencing efficiency and quality in the Beckman Coulter CEQ system. *Biotechniques* 2008;45:327-9.
 - 17 Dower WJ, Miller JF, Ragsdale CW. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* 1988;16:6127-45.

7. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Peter Hoffmann, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Auswirkungen von Störfaktoren und Einflussgrößen auf die Ergebnisse laboratoriumsdiagnostischer Methoden“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an den ausgewählten Publikationen entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen

Peter Hoffmann hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Hoffmann P, Hoffmann C, Ziebig R, Zimmermann M. Evaluation of the iChem Velocity urine chemistry analyzer in a hospital routine laboratory. Clin Chem Lab Med 2011;49:509-13.

Beitrag im Einzelnen:

Planung der Experimente, Auswertung der Ergebnisse, Erstellung der Tabellen und Graphen, Verfassen des Manuskripts

Publikation 2: Hoffmann P, Hoffmann C, Weimann A. Choice of plasmid preparation kit influences sequencing results. Biotechnol Lett 2010;32:421-2.

Beitrag im Einzelnen:

Planung und Durchführung der Experimente, Auswertung der Ergebnisse, Verfassen des Manuskripts

Publikation 3: Schlaak C, Hoffmann P, May K, Weimann A. Desalting minimal amounts of DNA for electroporation in E. coli: a comparison of different physical methods. Biotechnol Lett 2005;27:1003-5.

Beitrag im Einzelnen:

Planung und Durchführung der Experimente, Auswertung der Ergebnisse, Mitarbeit bei der Erstellung des Manuskripts

Publikation 4: Hoffmann C, Hoffmann P, Zimmermann M. Diagnostic testing for a high-grade inflammation: Parameter dynamics and novel markers. Clin Chem Lab Med 2014; DOI 10.1515/cclm-2014-0482 (epub ahead of print).

Beitrag im Einzelnen:

Planung und Durchführung der Studie, statistische Auswertung und Interpretation der Ergebnisse, Erstellung der Tabellen und Graphen, Verfassen des Manuskripts

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift des Doktoranden

8. Ausgewählte Publikationen

Hoffmann P, Hoffmann C, Ziebig R, Zimmermann M.

Evaluation of the iChem[®] Velocity[™] Urine Chemistry Analyzer in a hospital routine laboratory

Clin Chem Lab Med. 2011 Mar;49(3):509-13.

<https://dx.doi.org/10.1515/CCLM.2011.065>

Hoffmann P, Hoffmann C, Weimann A.

Choice of plasmid preparation kit influences sequencing results

Biotechnol Lett. 2010 Mar;32(3):421-2.

<https://dx.doi.org/10.1007/s10529-009-0157-4>

Schlaak C, Hoffmann P, May K, Weimann A.

Desalting minimal amounts of DNA for electroporation in *E. coli*: a comparison of different physical methods

Biotechnol Lett. 2005 Jul;27(14):1003-5.

<https://dx.doi.org/10.1007/s10529-005-7867-z>

Hoffmann C, Hoffmann P, Zimmermann M.

Diagnostic testing for a high-grade inflammation: parameter dynamics and novel markers

Clin Chem Lab Med. 2015 Mar;53(4):541-7.

<https://dx.doi.org/10.1515/cclm-2014-0482>

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsliste

Originalarbeiten

C. Hoffmann, **P. Hoffmann** and M. Zimmermann. “Diagnostic testing for a high-grade inflammation: parameter dynamics and novel markers”, Aug. 2014, Clin. Chem. Lab. Med., DOI 10.1515/cclm-2014-0482 (epub ahead of print)

P. Hoffmann, C. Hoffmann, R. Ziebig and M. Zimmermann. “Evaluation of the iChem Velocity Urine Chemistry Analyzer in a hospital routine laboratory”, Mar. 2011, Clin. Chem. Lab. Med., 49: 509-513

A. Weimann, A. Rieger, M. Zimmermann, M. Gross, **P. Hoffmann**, H. Slevogt and L. Morawietz. “Comparison of six immunohistochemical markers for the histologic diagnosis of neoplasia in Barrett’s esophagus”, Nov. 2010, Virchows Arch., 457: 537-545

C. Hoffmann, **P. Hoffmann**, A. Lun, C. Büning, F. Hiepe, H.U. Scherer, E. Steinhagen-Thiessen and A. Weimann. “Is there a role for mannan-binding lectin in the diagnosis of inflammatory bowel disease?”, Apr. 2010, Immunogenetics, 62: 231-235

P. Hoffmann, C. Hoffmann and A. Weimann. “Choice of plasmid preparation kit influences sequencing results”, Mar. 2010, Biotechnol. Lett., 32: 421-422

C. Schlaak, **P. Hoffmann**, K. May and A. Weimann. “Desalting minimal amounts of DNA for electroporation in *E. coli*: a comparison of different physical methods”, Jul. 2005, Biotechnol. Letters, 27: 1003-1005

Abstracts / Poster

P. Hoffmann, C. Hoffmann, O. Meyer, A. Reinhardt, S. Götze, W. Weigel, H. Eickhoff, R. Tauber and P.H. Seeberger. “A glycan microarray for the detection of carbohydrate specific antibodies in human serum”, Sep. 2014, 1st German Congress of Laboratory Medicine, Mannheim

C. Hoffmann, **P. Hoffmann** and M. Zimmermann. “Granularity index and delta hemoglobin: two novel cellular markers for inflammation diagnostics”, Sep. 2014, 1st German Congress of Laboratory Medicine, Mannheim

C. Hoffmann, **P. Hoffmann**, P.O. Wafula, O. Meyer, A. Reinhardt, S. Götze, S. Horn, S. Fischer, W. Weigel, H. Eickhoff, R. Tauber and P.H. Seeberger. “Glycan microarrays - a novel tool to detect carbohydrate specific antibodies in human serum”, Sep. 2014, 47th Annual Meeting of the German Society for Transfusion Medicine and Immunohaematology e.V., Dresden

P. Hoffmann, C. Hoffmann, P.O. Wafula, R. Tauber, A. Reinhardt, S. Götze, P.H. Seeberger, S. Horn, S. Fischer, H. Eickhoff and W. Weigel. “Glycan Array Diagnostics (The GlycArDiag Project)”, Sep. 2013, Microarray World Congress, San Diego

C. Hoffmann, **P. Hoffmann**, A. Reinhardt, S. Götze, O. Meyer, A. Weimann, M. Berger, R. Tauber, P. H. Seeberger, H. Eickhoff and W. Weigel. "Development of a glycan-based microarray platform for early diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia", Mar. 2012, 6th Glycan Forum, Berlin

P. Hoffmann. "Reduced turn-around time through urinalysis automation with the iChem Velocity urine chemistry analyzer and iQ 200 urine microscopy system", Sep. 2010, DGKL Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Mannheim

C. Hoffmann, **P. Hoffmann** and A. Weimann. "The DNA diagnostics chip "Thrombophilia": evaluating the genetic predisposition for thromboembolic complications", Feb. 2010, Status Seminar Chip Technologies, Sequencing and Functional Genomics, Frankfurt

P. Hoffmann, C. Hoffmann, U. Harnack and A. Weimann. "Expression analysis of alpha- and gamma-protocadherins in murine embryonic stem cells during a neuro-epithelial differentiation", Sep. 2008, DGKL Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Mannheim

C. Hoffmann, **P. Hoffmann** and A. Weimann. "Development of an IVD-chip for the evaluation of a genetic predisposition for thrombophilia", Sep. 2008, DGKL Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Mannheim

C. Schlaak, **P. Hoffmann** and A. Weimann. "Optimizing the Yield of Ligated Plasmid DNA Prior to Electroporation in *E. coli* ", Sep. 2005, GBM-Jahreskongreß, Berlin

Vorträge

P. Hoffmann. "Development of a diagnostic glycan based microarray for heparin induced thrombocytopenia", Nov. 2012, 8th Symposium From Bench to Bedside , Dortmund

Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Rudolf Tauber bedanken, der mir ermöglicht hat, diese Arbeit im Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Pathobiochemie anzufertigen. Des Weiteren möchte ich mich bei all den Kollegen und Kolleginnen bedanken, mit denen ich in den letzten Jahren produktiv und gerne zusammen gearbeitet habe. Hierzu zählen vor allem Herr Dr. Zimmermann, Herr Dr. Lun, Frau Dr. Ziemer und die Mitarbeiter der EDV Abteilung, die mir stets bei schwer auszuwertenden Datensätzen beigestanden haben. Herrn Dr. Weimann danke ich für die Begleitung meiner ersten Schritte in der Laboratoriumsmedizin. Weiterhin bedanke ich mich bei meinem Vater, der mir das Studium ermöglicht hat.