

## Difficulties arising from new blood collection tubes for ethanol determination

Jennifer Schürenkamp<sup>\*</sup>, Angela Gasse, Heidi Pfeiffer, Helga Köhler

Universitätsklinikum Münster, Institut für Rechtsmedizin, Forensische Toxikologie,  
Röntgenstr. 23, D-48149 Münster

\*corresponding author jennifer.schuerenkamp@ukmuenster.de

---

**Aim:** In Germany, ethanol analysis has commonly been carried out in serum obtained from blood collection tubes that are made of glass. However, the police have recently started using blood collection tubes for blood withdrawal that are made of additive-free plastic. The aim of this work was to investigate the potential influence of different blood collection tubes on the analysis of blood alcohol concentrations. **Methods:** BD Vacutainer® Z glass tubes (REF368430), two types of plastic vacutainer tubes without additives (Vacutest® Kima no additive tubes (REF149430), Terumo Venosafe® Liquidraw (REF-VF-109SLI72)) and one type of plastic vacutainer tubes with additives (BD Vacutainer® CAT with silica (REF367896)) were applied for blood collection from ten test persons, who showed breath alcohol concentrations between 0.1 mg/l and 0.7 mg/l. The blood samples were centrifuged and the resulting supernatants were used for ethanol determination by HS-GC-FID following German guideline for blood alcohol analysis. **Results and Discussion:** The supernatants of the different blood sampling tubes showed a great variety in their macroscopic consistence within each test person. Supernatants of plastic tubes without additives were jellylike, as an indication for incomplete blood coagulation. Only after several times of strong agitation followed by centrifugation a liquid supernatant was obtained. Instead, the plastic tubes with addition of silica, imitating the interaction with the glass surface needed for complete blood coagulation, showed clear liquid supernatant similar to glass tubes. Despite different blood coagulation efficiency the blood alcohol concentration was unaffected by the kind of blood sampling tubes. **Conclusion:** Although blood alcohol concentrations were unaffected by the different sampling tubes, the recently used plastic tubes without additives are unsuitable for the preparation of clear liquid serum. Consequently, the laboratory handling (e.g. pipetting) is obviously hindered. Therefore, glass tubes or plastic tubes with clot activator like silica should be used for blood withdrawal.

### 1. Einleitung

Zur Blutalkoholbestimmung im Serum wurden in der Vergangenheit Blutentnahmeröhrchen bestehend aus Glas ohne Additiva (z.B. BD Vacutainer Z) eingesetzt. Neuerdings werden von verschiedenen Polizeidienststellen aufgrund der Nichtverfügbarkeit der altbewährten Glasröhrchen zur Blutentnahme Kunststoffröhrchen analog zu den Glasröhrchen ohne Additiva (Vacutest Kima „No additive“; Terumo Venosafe „Liquidraw“) eingesetzt. Kunststoffröhrchen ohne Additiva sind nach Herstellerinformation allerdings nicht für die primäre Blutentnahme, sondern als sekundäres Aufbewahrungsgefäß des Blutüberstands oder zur Probenasservierung von Blut verschiedenen biologischen Materialien geeignet [1,2].

Folge des Probenentnahmewechsels von Glas zu Kunststoff ohne Additiva war ein nach Zentrifugation wesentlich veränderter Blutüberstand (siehe Abb. 1). Anstelle des flüssigen, klaren Serums lag ein inhomogener, hochviskoser Blutüberstand vor, aus dem nur nach mehrfachen Aufschütteln und Zentrifugieren ein pipettierbarer Überstand resultierte.



Abb. 1. Unterschiede der Blutüberstände nach Zentrifugation bei Verwendung verschiedener Blutentnahmeröhrchen (links Glasröhrchen: BD Vacutainer Z; rechts Kunststoffröhrchen: Vacutest Kima „No additive“; Terumo Venosafe „Liquidraw“).

Ziel der Arbeit war es einerseits, den beobachteten Unterschied in der Gerinnung von Blut an Glas und Kunststoff zu erklären. Andererseits sollte untersucht werden, ob sich die aus den verschiedenen Blutentnahmesystemen nach Zentrifugation gewonnenen Blutüberstände in ihrer Blutalkoholkonzentration unterscheiden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Ursachenanalyse der unterschiedlichen Gerinnung

Zur Klärung des unterschiedlichen Gerinnungsverhaltens von Blut an Glas bzw. Kunststoff wurde eine Literaturrecherche durchgeführt. Zudem wurden die Oberflächen der verschiedenen Blutentnahmesysteme (BD Vacutainer Z, BD Vacutainer® CAT mit Silica, Vacutest Kima „No additive“ und Terumo Venosafe „Liquidraw“) elektronenmikroskopisch untersucht und mit den Ergebnissen der Literatursuche verknüpft.

### 2.2. Bestimmung der Blutalkoholkonzentration

Zehn verschiedenen Testpersonen, die Atemalkoholkonzentrationen zwischen 0,1 mg/l und 0,7 mg/l aufwiesen, wurden Blutproben mit jeweils vier verschiedenen Blutentnahmesystemen (BD Vacutainer Z, BD Kunststoff mit Silica, Vacutest Kima „No additive“ und Terumo Venosafe „Liquidraw“) entnommen. Der jeweilige Blutüberstand wurde gemäß Blutalkoholrichtlinie [3] in Vierfachbestimmung mit zwei unterschiedlichen headspace-gaschromatographischen Methoden untersucht.

## 3. Ergebnisse und Diskussion

Die intrinsische Blutgerinnungskaskade wird durch Kontakt des Blutes mit Oberflächen ausgelöst, indem eine Kontaktaktivierung des Hagemanfaktors (FXII) erfolgt. Die Aktivierung des Hagemanfaktors löst eine Kaskadenaktivierung zahlreicher Gerinnungsfaktoren aus, die in der Aktivierung von Prothrombin zu Thrombin mündet. Thrombin als Serinprotease wandelt Fibrinogen in Fibrinmonomere um, die dann polymerisieren und kovalente Quervernetzungen ausbilden. Nach Zentrifugation resultiert als Blutüberstand Serum.

Eine altbekannte Erklärung für die Blutgerinnung im Glas ist die Autoaktivierung des Hagemanfaktors durch Wechselwirkung mit negativ geladenen Oberflächen, wie zum Beispiel Glassilikat [4]. In neueren Untersuchungen wurde aber keine spezifische Adsorption des Hagemanfaktors an anionische Oberflächen im Vergleich zu anderen Proteinen festgestellt [5]. Die Kontaktaktivierung ist demnach auch an nicht-anionischen aber hydrophilen Oberflächen möglich. An hydrophoben Oberflächen hingegen findet eine generell höhere Adsorption von Plasmaproteinen, insbesondere dem in hohen Konzentrationen vorliegenden Fibrinogen sowie den Thrombozyten, statt, die die Oberfläche belegen und die Kontakthäufigkeit des Hagemanfaktors stark reduzieren [5,6]. Die geringere Kontaktaktivierung an hydrophoben Oberflächen führt zu einer verzögerten Thrombinfreisetzung und damit zu einer veränderten Fibrinogenation. Vogler et al. [5] zeigen die Abhängigkeit der Thrombinfreisetzung aus Plasma von der Größe der Kontaktfläche und Oberflächenchemie. Die Thrombinfreisetzung nimmt mit der Größe der zur Verfügung stehenden Kontaktfläche ( $78 \text{ mm}^2$ ,  $353 \text{ mm}^2$ ) und der Oberflächenhydrophilie (octadecyltrichlorosilanisiertes, aminopropyltriethoxysilanisiertes und unbehandeltes Glas) zu (Abb. 2).

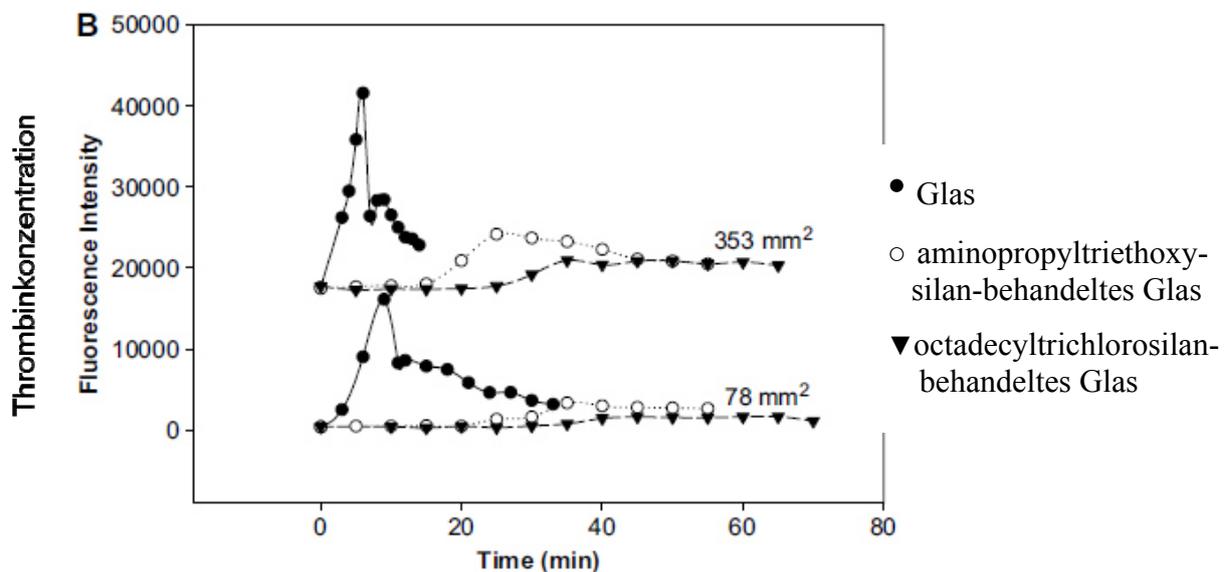


Abb. 2. Abhängigkeit der Thrombinfreisetzung aus Plasma von der Kontaktfläche und Oberflächenhydrophilie nach Vogler et al [5].

Bei Übertragung dieser Erkenntnisse auf den Wechsel der Blutentnahmesysteme von Glas zu Kunststoff ohne Additiva kann geschlussfolgert werden, dass die Kontaktaktivierung des Hagemanfaktors und damit die Thrombinfreisetzung in hydrophoben Kunststoffröhrchen im Vergleich zu Glasröhrchen reduziert ist.

Neben der Oberflächenchemie hat auch die Oberflächenstruktur, wenn auch in geringerem Ausmaß, Einfluss auf die Blutgerinnung. Chen et al. [7] haben eine Zunahme der Fibrinogenadsorption an strukturierten im Vergleich zu glatten Oberflächen, auch unter Berücksichtigung einer Flächenzunahme durch ihre strukturierte Oberfläche, festgestellt. Eine im Institut für Rechtsmedizin Münster durchgeführte elektronenmikroskopische Untersuchung der verschiedenen Entnahmesysteme (Abb. 3) zeigt für Glas erwartungsgemäß eine glatte Struktur. Die Kunststoffröhrchen hingegen zeigen inhomogene Oberflächenstrukturen, welche zusätzlich zur Oberflächenchemie die Fibrinogenanlagerung verstärken und damit die Kontaktfläche des Hagemanfaktors zur Kontaktaktivierung noch weiter reduzieren kann.

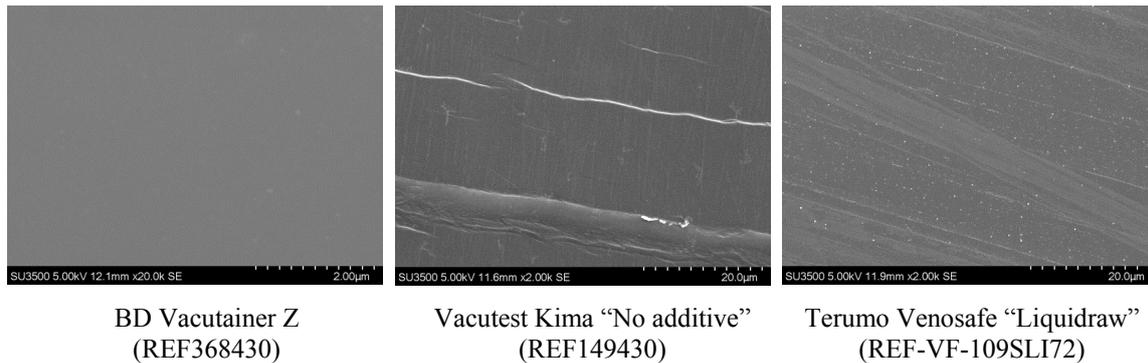


Abb. 3. Elektronenmikroskopische Aufnahmen der verschiedenen Blutentnahmesysteme.

Insgesamt ist das unterschiedliche Gerinnungsverhalten durch Unterschiede in der Oberflächenchemie und Oberflächenstruktur der Entnahmesysteme erklärbar. Die hydrophile und glatte Glasoberfläche führt zu einer geringeren Protein- bzw. Fibrinogenadsorption und gibt damit Raum zur Kontaktaktivierung des Hagemanfaktors für eine starke und schnelle Thrombinfreisetzung. Hydrophobe und strukturierte Kunststoffoberflächen hingegen verursachen eine hohe Protein- bzw. Fibrinogenadsorption, verringern damit die Kontakthäufigkeit des Hagemanfaktors mit der Oberfläche und verzögern und reduzieren letztendlich die Thrombinfreisetzung und damit die Gerinnung.

Um trotzdem Kunststoffröhrchen für die Gewinnung von Serum einsetzen zu können, sind Kunststoffröhrchen mit Gerinnungsaktivatoren (z. B. BD Vacutainer CAT mit Silica) im Handel, welche nunmehr zunehmend von der Polizei eingesetzt werden. Makroskopisch, aber im Elektronenmikroskop noch besser zu erkennen, sind die Silicapartikel fein auf die Kunststoffoberfläche aufgesprüht, imitieren die Glasoberfläche und stellen somit eine vollständige Gerinnung auch im Kunststoffröhrchen sicher (Abb. 4).



Abb. 4. Blutüberstand nach Zentrifugation im Kunststoffröhrchen mit Gerinnungsaktivator und elektronenmikroskopische Aufnahme des Entnahmesystems.

Zur Klärung, ob die unterschiedliche Gerinnung in den verschiedenen Blutentnahmesystemen Einfluss auf die Richtigkeit der Blutalkoholbestimmung hat, wurden von zehn Testpersonen Blutproben mit jeweils vier verschiedenen Blutentnahmesystemen entnommen und gemäß Blutalkoholrichtlinie auf ihren Ethanolgehalt untersucht. Die Blutalkoholkonzentrationen für die verschiedenen Blutentnahmesysteme jeder Testperson sind in aufsteigender Reihenfolge dargestellt (Abb. 5). Über den untersuchten Konzentrationsbereich konnte kein Unterschied in der Blutalkoholkonzentration zwischen Glas und Kunststoff mit oder ohne Additiva festgestellt werden. Die absolute Messabweichung der verschiedenen Entnahmesysteme beträgt maximal 0,03 ‰ und die relative Standardabweichung maximal 2,7 %. Die Streuung liegt damit innerhalb der zulässigen Messgenauigkeit.

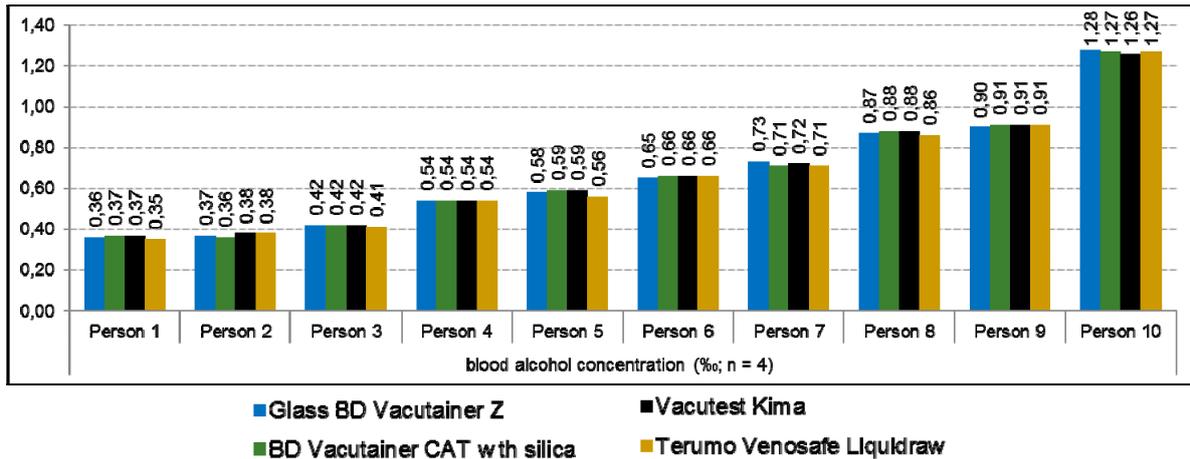


Abb. 5. Blutalkoholkonzentrationen in verschiedenen Blutentnahmesystemen von zehn Testpersonen.

#### 4. Schlussfolgerungen

Die beobachteten Unterschiede in der Blutgerinnung zwischen Glas- und Kunststoffröhrchen ohne Zusatz von Gerinnungsaktivatoren sind sowohl mit ihrer Oberflächenchemie als auch ihrer Oberflächenstruktur begründbar. Aufgrund der hydrophoben und strukturierten Oberfläche der Kunststoffröhrchen im Vergleich zum Glasröhrchen ist die Kontaktaktivierung des Hagemanfaktors, die Thrombinfreisetzung und damit die Fibrinbildung reduziert, was zu einer verzögerten und unvollständigen Gerinnung führt. Somit sind Kunststoffröhrchen ohne Zusatz von Gerinnungsaktivatoren zur Gewinnung von Serum ungeeignet. Auch wenn die Richtigkeit der Blutalkoholkonzentration in dem untersuchten Konzentrationsbereich, die an einem zehn Personen umfassenden Kollektiv überprüft wurde, durch die unterschiedlichen Blutentnahmesysteme nicht beeinträchtigt zu sein scheint, führt die unvollständige Gerinnung im Laboralltag zu erheblichen Problemen bei der Gewinnung eines pipettierbaren Blutüberstandes. Zur Sicherstellung einer vollständigen Gerinnung und der Gewinnung von Serum zur Blutalkoholbestimmung müssen dem Kunststoffröhrchen Silikapartikel als Gerinnungsaktivator zugesetzt werden.

#### 5. Referenzen

- [1] Vacutest Kima. Catalogue Vacuum blood/urine collection systems. DP72A.All3 rev. 2 - 2015. <http://www.kima.it/catalogs.php>; 2015; 34.
- [2] Produktinformation BD Vacutainer Serumröhrchen <http://www.bd.com/resource.aspx?IDX=24918>
- [3] Aderjan R, Daldrup T, Käferstein H, Krause D, Mußhoff F et al. Richtlinien zur Bestimmung der Blutalkoholkonzentration. Blutalkohol 2011;48:137-143.
- [4] Revak SD, Cochrane CG, Griffin JH. The binding and cleavage characteristics of human Hageman factor during contact activation. J Clin Invest 1977;59(6):1167-1175.
- [5] Vogler EA, Siedlecki CA. Contact activation of blood-plasma coagulation. Biomaterials 2009;30(10):1857-1869.
- [6] Sperling C, Fischer M, Maitz MF, Werner C. Blood coagulation on biomaterials requires the combination of distinct activation processes. Biomaterials 2009;30(27):4447-4456.
- [7] Chen H, Song W, Zhou F, Wu Z, Huang H et al. The effect of surface microtopography of poly(dimethylsiloxane) on protein adsorption, platelet and cell adhesion. Colloids Surf B Biointerfaces 2009;71(2):275-281.