

Bachelorproef

Paper-based multiplex devices voor de detectie
van lichaamsvloeistoffen

Hogeschool van Amsterdam

Tafelbergweg 51, 1105 BD Amsterdam

Dr. Annemieke van Dam

Stien Lambrechts

Departement Gezondheid, Design & Technologie

Bachelor Biomedische Laboratoriumtechnologie

Farmaceutische en Biologische Laboratoriumtechnologie

2024-2025

Voorwoord

Naar aanleiding van het afstuderen aan de professionele bachelor Biomedische Laboratoriumtechnologie met afstudeerrichting farmaceutische en biologische laboratoriumtechnologie diende gedurende 12 weken stage gevolgd te worden. De stage vond plaats aan de Hogeschool van Amsterdam (HvA). Deze thesis behandelt het onderzoek naar de samenvoeging van presumptieve testen tot de vorming van een multiplex paper-based device met beoogd doel de detectie van lichaamsvloeistoffen.

Echter was het niet mogelijk om deze stage af te ronden zonder de onmisbare hulp van enkele personen.

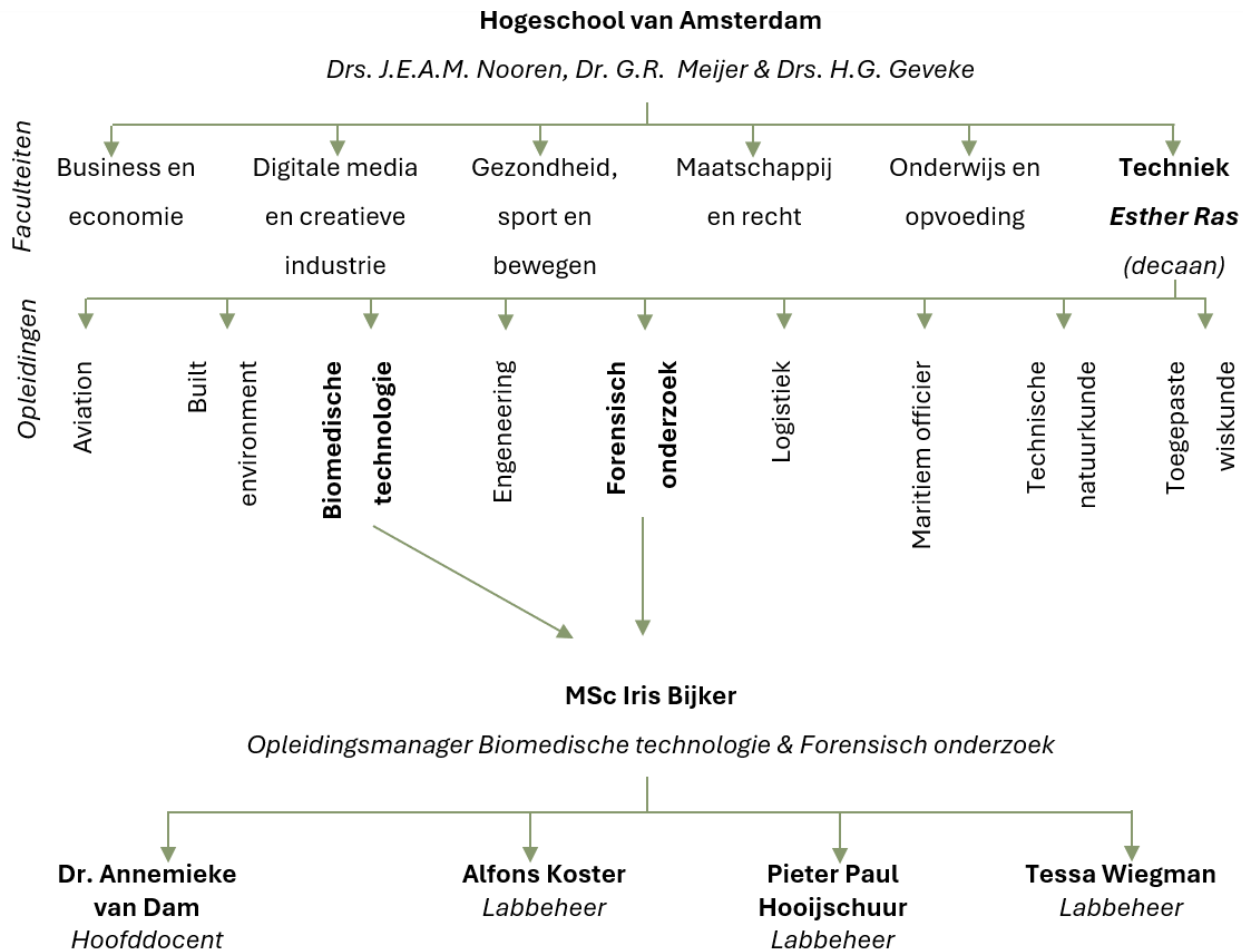
Graag zou ik Dr. Annemieke van Dam, mijn stagebegeleider, en Msc. Iris Blijker, opleidingsverantwoordelijke, bedanken voor de kans die ze mij gegeven hebben en de onvoorwaardelijke hulp bij de vormgeving van het verslag. Verder zou ik mevrouw Sofie Geeraerts willen bedanken om contacten met de HvA te leggen. Bedankt aan mevrouw An Roelandt voor het nalezen van de thesis en toevoegingen van diverse suggesties.

Tevens wil ik mijn dankbaarheid betuigen voor Alfons Koster, Pieter-Paul Hooijschuur en Tessa Wiegman. Zij stonden voor me klaar wanneer het project zich op een moeilijke baan bevond of wanneer materiaal besteld diende te worden. Verder maakten zij de algemene en dagelijkse werking in het labo zeer aangenaam.

Ook zou ik graag de andere stagiaires in de kijker willen zetten, in het bijzonder Emma van de Scheur, Bo Daenen en Suzanne van den Bosch. Bedankt om de stage aangenamer te maken door maandag-gebak-dag en de sfeer en steun in het labo.

Tot slot wil ik graag mijn ouders, Marylène Piron en Geert Lambrechts, bedanken om mij te steunen in dit avontuur in het buitenland. Bedankt mama om mijn scriptie na te lezen, dit geldt eveneens voor Maura Moens en Elisabeth Morrhey.

Organigram



Figuur 1: Organigram Biomedische technologie en Forensisch onderzoek, gekaderd in de gehele organisatie van de Hogeschool van Amsterdam

Inhoudsopgave

Voorwoord	2
Organigram	3
Inhoudsopgave	4
1. Afkortingen	6
2. Abstract (nl.)	7
3. Abstract (en.)	8
4. Inleiding en probleemstelling	9
5. Literatuuronderzoek	10
5.1. Detectie van lichaamsvloeistoffen	10
5.1.1. Bloed	10
5.1.2. Sperma	11
5.1.3. Speeksel	12
5.1.4. Urine	12
5.2. Multiplex paper-based microfluidica	13
6. Experimenten	15
6.1. Materiaal en methoden	15
6.1.1. Aanmaak reagentia	15
6.1.2. Verdunning lichaamsvloeistoffen	16
6.1.3. Gevoeligheid en werkzaamheid	17
6.1.4. Ontwerp en capaciteitsbepaling van devices met verschillend aantal reactievelden.	18
6.1.5. Bewaren	18
6.1.6. Ontdooien	18
6.1.7. Multiplex paper-based device	19
6.1.8. Speeksel: zetmeel-jodiumtest	19
6.2. Resultaten	22
6.2.1. Gevoeligheid en werkzaamheid	22

6.2.2.	Ontwerp en capaciteitsbepaling van devices met een verschillend aantal reactievelden	25
6.2.3.	Bewaren	26
6.2.4.	Ontdooien	26
6.2.5.	Multiplex paper-based device.....	27
6.2.6.	Speeksel: zetmeel-jodiumtest	28
6.3.	Discussie.....	31
6.3.1.	Gevoeligheid en werkzaamheid	31
6.3.2.	Ontwerp en capaciteitsbepaling van devices met verschillend aantal reactievelden	32
6.3.3.	Bewaren	32
6.3.4.	Ontdooien	32
6.3.5.	Multiplex paper-based device.....	32
6.3.6.	Zetmeel-jodiumtest	33
7.	Conclusie	34
8.	Aanbevelingen	35
9.	Referentielijst.....	36
10.	Bijlagen	40
10.1.	Tetrabasetest.....	40
10.1.1.	Houdbaarheid reagentia tetrabasetest.....	40
10.1.2.	Gevoeligheid tetrabasetest na verloop van tijd.....	40
10.2.	Zure fosfatasetest	42
10.2.1.	Houdbaarheid reagentia zure fosfatasetest	42
10.3.	Urine test.....	43
10.3.1.	Houdbaarheid DMAC-reagens	43
10.3.2.	Gevoeligheidsbepaling.....	43
10.4.	Paper-based devices	45
10.4.1.	Ontwerp en capaciteitsbepaling paper-based devices met één reactieveld	45
10.5.	Resultaten bewaren	48
10.6.	Zetmeel-jodiumtest.....	49

1. Afkortingen

AP	Acid phosphase – Zure fosfatase
dH ₂ O	Gedemineraliseerd water
DMAC	4-(Dimethylamino)cinnamaldehyde
FGP	Federale Gerechtelijke Politie
FZ	Fysiologisch zoutwater
LTWP	Labo voor Technische en Wetenschappelijke Politie
pd	Plaats delict
RT	Room temperature / kamertemperatuur
SOP	Standard operating procedure
TB	Tetrabase
(μ)PAD	(Microfluidic) paper-based analytical devices
VF	Verdunningsfactor



Samenvatting van *Paper-based multiplex devices voor de detectie van lichaamsvloeistoffen*

Stien Lambrechts

Dr. Annemieke van Dam

Mevr. An Roelandt

Achtergrond Presumptieve testen zijn snelle, goedkope en eenvoudige indicatieve testen die op een plaats delict uitgevoerd worden. Hedendaags dienen deze testen allemaal afzonderlijk gehanteerd te worden, dit kan resulteren in een reeks van vele testen om een uiteindelijke indicatie te verkrijgen. Hierdoor is minder sample over voor eventuele nabewerking.

Doel Deze studie richt zich tot de integratie van verschillende presumptieve testen tot één multiplex paper-based device. Hierbij wordt rekening gehouden met de individuele eigenschappen van de verschillende testen (tetrabase, zure fosfatase, zetmeel-jodium en DMAC-test).

Methode Door vier verschillende colorimetrische testen individueel te optimaliseren, konden eigenschappen zoals gevoeligheid, bewaring en houdbaarheid onderling vergeleken worden alvorens de testen samengevoegd werden. Gebruik makend van positieve controles (10^2 verdund bloed, zwarte thee, speeksel en urine) en dH_2O als negatieve controle werden de verschillende testen uitgevoerd. Het device werd aangemaakt door gebruik te maken van wax-printing om een hydrofobe barrière te creëren.

Resultaten Verkregen resultaten tonen aan dat de zetmeel-jodiumtest niet geschikt is voor een papieren test. Overige testen, betreffende de tetrabase, de zure fosfatase en de DMAC-test, kunnen samengevoegd worden. De resultaten tonen aan dat interpretatie na toevoeging van het sample onmiddellijk dient te gebeuren om vals positieve reacties te vermijden.

Conclusie Het is mogelijk om diverse testen succesvol te combineren door rekening te houden met individuele beperkingen. Echter is verdere optimalisatie nodig om huidige gebreken en onvolledigheden te verhelpen en te focussen op veldtoepassingen.



Resume of ***Paper-based multiplex devices for the detection of body fluids***

Stien Lambrechts

Dr. Annemieke van Dam

Mevr. An Roelandt

Background Presumptive tests are fast, cheap and simple indicative tests that are performed at a crime scene. Nowadays, these tests all must be performed separately, which can result in a series of many tests to obtain a final indication. This leaves less sample for possible post-processing.

Purpose The aim of this study is the integration of different presumptive tests into one multiplex paper-based device. To obtain this, the individual properties of the different tests (tetrabase, acid phosphatase, starch-iodine and DMAC-test) were taken into account.

Method By optimizing 4 different colorimetric tests individually, properties such as sensitivity, storage and shelf time could be compared before the tests could be combined. Using positive controls (10^2 diluted blood, black tea, saliva and urine) and dH_2O as a negative control, the different tests were performed. The device was created using wax printing to create a hydrophobic barrier.

Results Obtained results show that the starch-iodine test is not suitable for a paper test. Other tests, concerning the tetrabase, the acid phosphatase and the DMAC test can be combined. The results show that interpretation after addition of the substrate should be done immediately to avoid false positive reactions.

Conclusion It is possible to successfully combine various tests considering individual limitations. However, further optimization is needed to eliminate current shortcomings and incompleteness and to focus on field applications.

4. Inleiding en probleemstelling

Tegenwoordig zijn criminele feiten waarbij het Labo voor Technische en Wetenschappelijke Politie (LTWP) ter plaatse moet komen, haast en helaas niet meer weg te denken. In 2023 werden maar liefst 4529 tussenkomsten geregistreerd door de Federale Gerechtelijke Politie (FGP) Antwerpen. Deze tussenkomsten zijn gevarieerd: diefstallen, verdacht overlijden, (poging tot) doodslag of moord, ect. (Federale Gerechtelijke Politie Antwerpen, 2024). Op een crime scene of plaats delict (pd) worden vaak ongedefinieerde (gedroogde) vloeistoffen aangetroffen. Om een indicatie te krijgen over de aard van deze (al dan niet gedroogde) vloeistof, worden presumptieve testen uitgevoerd. Deze testen zijn eenvoudig, snel en goedkoop. Het nadeel is echter wel dat deze testen slechts van vermoedelijke aard zijn en dat bijgevolg geen eenduidig resultaat gevormd wordt. Eveneens kunnen interferenties optreden door andere stoffen die voor vals positieve en -negatieve resultaten zorgen. Maar deze testen zijn desalniettemin belangrijk om een inschatting te maken over de eventuele nabewerking van de aangetroffen vloeistof op de pd (Virkler & Lednev, 2009).

Momenteel worden de testen uitgevoerd met behulp van een filterpapier, een swab of een kant-en-klare teststrip. Deze testen dienen individueel uitgevoerd te worden waardoor het aantal testen kan oplopen bij een onbekende, aangetroffen vloeistof. Hoe meer testen uitgevoerd worden, hoe minder sample overblijft voor verder onderzoek in het labo. In dit onderzoek wordt nagegaan of er gebruik gemaakt kan worden van een multiplex paper-based device om meerdere presumptieve testen gelijktijdig uit te voeren wat leidt tot tijdsbesparing en minder gebruik van de aangetroffen stof (Cromartie et al., 2018; Deraney et al., 2016). Er zijn reeds studies uitgevoerd naar de vorming van een multiplex paper-based device maar voor andere toepassingen, zoals de indicatie van drugs (Musile et al., 2015). Aangezien presumptieve testen nog niet eerder toegepast zijn in een multiplex paper-based device, is de werking hiervan onder invloed van microfluidica onduidelijk. Daarom zal gedurende deze studie terug van nul af aan gestart worden om de bestaande testen te optimaliseren en te onderzoeken. Zo zullen bijvoorbeeld de gevoeligheid, bewaarcondities en bijhorende eigenschappen achterhaald worden. Nadien worden de verschillende testen samengebracht in één device en wordt dit geoptimaliseerd.

Samenvattend: gezien de voordelen die een multiplex paper-based device met zich mee kan brengen, is het belangrijk hier onderzoek naar te verrichten. Dit brengt ons tot de volgende onderzoeksvraag: Hoe kunnen verschillende presumptieve testen samengevoegd worden tot de vorming van een multiplex paper-based device voor de detectie van lichaamsvloeistoffen?

5. Literatuuronderzoek

5.1. Detectie van lichaamsvloeistoffen

De detectie van lichaamsvloeistoffen is een belangrijk gegeven dat afhankelijk is van (bio)chemische testen en kan een sleutelrol spelen bij de gerechtelijke veroordeling van een strafrechtelijk feit. Indien een overtuigingsstuk niet verplaatst kan worden en bijgevolg niet mee naar het labo genomen kan worden, dan worden op de pd reeds testen uitgevoerd. Momenteel worden forensische lichtbronnen, immunologische en presumptieve testen gebruikt. Presumptieve testen kunnen opgedeeld worden in twee categorieën; screening- en bevestigingstesten. Tijdens het uitvoeren van de screeningstesten zal geen eenduidig resultaat ontstaan, de testen zijn van vermoedelijke aard. Een positieve test kan veroorzaakt worden door het gewenste sample. Eveneens kan een vals positief resultaat verkregen worden door een foutief sample met dezelfde eigenschap als de gezochte lichaamsvloeistof. Een negatief resultaat van de test, is betrouwbaarder als de test een hoge gevoeligheid bezit. Zo kan een uiterst kleine, maar waarneembare concentratie, geen positief resultaat vertonen indien de test niet gevoelig genoeg is (Virkler & Lednev, 2009).

Het uitvoeren van aanwijzende of bevestigingstesten kan leiden tot de vernietiging van het genetisch materiaal. Het gebruiken van niet-destructieve testen is een mogelijke oplossing voor dit probleem. Na het uitvoeren van de test, is een eventuele nabewerking, zoals genetische bepaling, in het labo nog mogelijk.

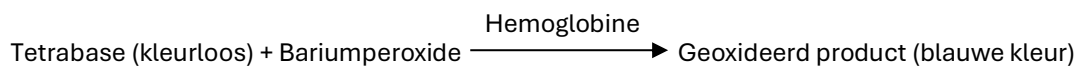
Enkele belangrijke lichaamsvloeistoffen en de gebruikte presumptieve test worden hieronder beschreven. Voor deze vloeistoffen bestaat eveneens een bevestigingstest, namelijk de Rapid Stain IDentification (RSID-test). De RSID-test is een voorbeeld van humaan-specifieke laterale flow immunochromatografische test, ontworpen voor forensische doeleinden. Het device bestaat uit een membraan dat omgeven wordt door een plastic huls. Er bestaan vier varianten in de test; specifiek voor bloed, sperma, speeksel en urine. Steunend op het sandwichassay principe, maken de diverse testen gebruik van antilichamen om een onderscheid te maken tussen een positief en een negatief resultaat. De positieve controle is intern ingebouwd en is af te lezen als een controlelijn. (Schweers et al., 2008; Sinelnikov et al., 2013).

5.1.1. Bloed

Bloed is een viskeuze, waterige oplossing die samengesteld is uit erythrocyten, leukocyten en trombocyten, goed voor 45 % van het totale volume. De resterende 55 % is een vloeistof die voornamelijk uit water bestaat, aangevuld met eiwitten en andere onopgeloste stoffen. Deze vloeistof wordt het bloedplasma genoemd. Bloed is onmisbaar in het menselijk lichaam en essentieel voor de vervulling van ettelijke rollen. Zo is het verantwoordelijk voor het transport van zuurstof en koolstofdioxide, voedingsstoffen en afvalstoffen en hormonen. Daarnaast speelt bloed ook een rol bij de regulatie van de temperatuur en het behouden van het inwendig milieu (Sanquin & De Praktijk natuurwetenschappelijk onderwijs, 2018).

Belangrijk is echter dat de erythrocyten hemoglobine bevatten. Hemoglobine is een eiwit dat verantwoordelijk is voor het transport van zuurstof en koolstofdioxide (Giardina et al., 1995). Het is een tetrameer, opgebouwd uit vier eiwitketens, bestaande uit twee α -globulineketens en twee β -globulineketens. Centraal bevindt zich een heemgroep, geconstrueerd uit een porfyринering en een centraal ijzerion (Baldwin, 1976). Hemoglobine speelt een sleutelrol in onderstaand beschreven test.

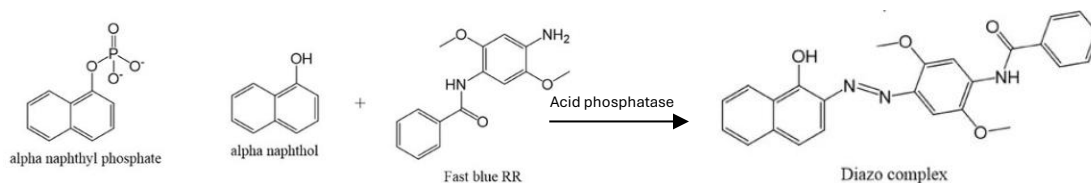
De tetrabasetest (TB) is een colorimetrische test die op basis van de peroxidase-activiteit in hemoglobine de aanwezigheid van bloed aantoonst. Om deze test uit te voeren, wordt gebruik gemaakt van een tetrabase oplossing, bestaande uit 4,4''-Methyleenbis(N,N-dimethylaniline). Deze stof is verantwoordelijk voor de onmiddellijke verkleuring van een kleurloos product naar een donkerblauwe kleur als gevolg van de interactie met bariumperoxide (BaO_2) en hemoglobine uit bloed, dat een peroxidase-activiteit bezit (*Identificatie van Bloed | Forensicon*, n.d.). Deze test is niet humaan-specifiek, dierlijk bloed bevat eveneens hemoglobine. Vals positieve reacties worden veroorzaakt door o.a. oxiderende metalen en chloorbevattende schoonmaakmiddelen. De vereenvoudigde reactievergelijking kan onderstaand waargenomen worden (Durnez, 2018).



5.1.2. Sperma

Sperma is een proteïnerijke vloeistof die spermatozoa in een semi-viskeuze vloeistof bevat. Het wordt aangemaakt door mannelijke voortplantingsorganen in verscheidene klieren. Zo'n 200 tot 500 miljoen spermatozoa worden aangemaakt in de testikels en via ejaculatie vrijgelaten. Het ejaculaat bevat een brede waaier aan toevoegingen. Zo zal bijvoorbeeld zuur fosfatase toegevoegd worden ter hoogte van de prostaat (Gupta & Kumar, 2017; Kumari, n.d.). Laatstgenoemde stof speelt een belangrijke rol in de forensische context. Het wordt gebruikt voor indicatieve testen van sperma (Virkler & Lednev, 2009).

De zure fosfatasetest (AP) is gebaseerd op de hydrolyse van α -naphthyl phosphate naar α -naphthol. In combinatie met Fast blue B salt, zal onder invloed van zure fosfatase, een roodruin gekleurd complex gevormd worden dat waarneembaar is met het blote oog (Lewis et al., 2013; Sharma et al., 2023). Een negatief resultaat vertoont geen verkleuring door de afwezigheid van AP. Aangezien AP ook aanwezig is bij sperma van bijvoorbeeld honden, is deze test niet humaan-specifiek (Hudson & Butler, 1950). Vals positieve reacties kunnen veroorzaakt worden door vaginale materialen, urine en sommige plantaardige materialen zoals thee (Lewis et al., 2013; Tirimanna, 1972; Virkler & Lednev, 2009).



Figuur 2: Mechanisme van de zure fosfatasetest overgenomen van Sharma et al., 2023

5.1.3. Speeksel

Speeksel is een heldere maar complexe vloeistof. Het is een samenstelling tussen exocriene afscheidingen van de speekselklier en de gingivale cerviculaire vloeistof, die geëxfolieerde orale epitheelcellen en micro-organismen bevat. De exocriene afscheiding is samengesteld uit een brede waaier van elektrolyten, enzymen, immunoglobuline, epitheelcellen, etc. (Saxena & Kumar, 2015; Upadhyay et al., 2023; Virkler & Lednev, 2009).

Speeksel wordt vaak aangetroffen op een pd indien er sprake is van suïcide. Tevens kan het teruggevonden worden op levenloze voorwerpen zoals peuken, blikjes of rietjes. Het nadeel is echter dat deze vloeistof kleurloos is en daardoor zeer moeilijk detecteerbaar is (Saxena & Kumar, 2015; Upadhyay et al., 2023).

Vele forensische testen steunen op de aanwezigheid van amylase in speeksel. Amylase is een enzym dat eveneens in de pancreas aanwezig is. In de mond reduceert het zetmeel tot maltose en uiteindelijk tot glucose.

De zetmeel-jodiumtest is gebaseerd op het ontkleuren van een gekleurde oplossing. Zetmeel gebonden aan jodium levert een blauwe/paarse kleur op. Deze kleur verdwijnt door de hydrolyse van de α -1,4-glycosidische bindingen door α -amylase, hierdoor wordt zetmeel gereduceerd tot meer eenvoudige suikers (Upadhyay et al., 2023). De test is niet humaan-specifiek aangezien andere dieren, planten en micro-organismen amylase kunnen produceren en daardoor vals positieve resultaten ontstaan (Peyrot des Gachons & Breslin, 2016).

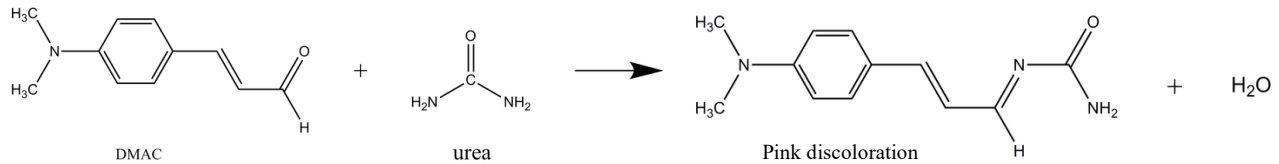
Zetmeel-iodine complex (blauw) $\xrightarrow{\alpha\text{-amylase}}$ oligosachariden met variërende lengte (kleurloos)

5.1.4. Urine

Urine is een doorgaans lichtgele, heldere vloeistof die beschouwd kan worden als het biologisch afvalmateriaal in een organisme. In de nieren worden onoplosbare afvalstoffen samengebracht met het overtollige water dat via de urethra het lichaam verlaat. Urine is een vloeistof met een hoog belang bij het diagnosticeren van pathologieën. Zo kan zowel macro- als microscopisch onderzoek afwijkingen detecteren (Bouatra et al., 2013; Channe et al., 2024).

Eveneens kan urine beschouwd worden als één van de betrouwbaardere lichaamsvloeistoffen voor de detectie van drugs. Om die reden bestaan reeds multiplex paper-based devices om snel en eenvoudig op meerdere drugs te kunnen screenen. Het creëren van een presumptieve test zou een bijdrage kunnen leveren, zodat urine niet verloren gaat en verdere drugstesten uitgevoerd kunnen worden. Tegenwoordig bestaan ook ettelijke colorimetrische testen die gebruikt worden om een pathologie aan te tonen. Deze testen zijn niet relevant in een forensische context aangezien de urine, teruggevonden op een pd, niet automatisch een pathologie vertoont en bijgevolg geen indicatie kan geven dat het weldegelijk over urine gaat (Safavieh et al., 2012).

De para-dimethylaminocinnamaldehyde (DMAC) test steunt op de aanwezigheid van ureum in urine waarbij een reactie kan optreden met DMAC, resulterend in een roze verkleuring dat een positief resultaat indiceert. De DMAC-test is echter niet specifiek voor urine omdat het eveneens vals positieve resultaten kan vertonen bij andere lichaamsvloeistoffen zoals speeksel, zweet, sperma en vaginale vloeistof (Ong et al., 2012). Hier is ureum in mindere mate aanwezig dus reageert het minder snel. De test is niet humaan-specifiek aangezien ureum kan aangetroffen worden in urine van o.a. dieren (Yang & Bankir, 2005).



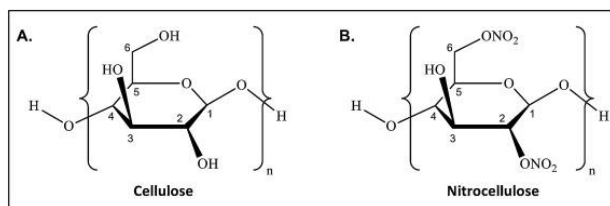
Figuur 3: Mechanisme achter de DMAC-test overgenomen van (Farrugia et al., 2012)

5.2. Multiplex paper-based microfluidica

De microfluidische papier-gebaseerde analytische apparaten (μPAD) zijn sinds afgelopen decennium in opmars. Dit door hun lage kost en hun eenvoudig fabricageproces. Door de kleine omvang van de μPAD's, zijn de apparaten eveneens draagbaar. Om een test uit te voeren is slechts een minimale hoeveelheid sample nodig. μPAD kunnen eveneens gebruikt worden bij diverse toepassingen in zowel het biochemisch, chemische en medische veld (Dungchai et al., 2010; Espinosa et al., 2022a; Li et al., 2012).

Microfluidica is de wetenschap die het gedrag van vloeistoffen en gassen op een uiterst kleine schaal bestudeert. Bij microfluidica zijn oppervlaktespanningen, samen met co- en adhesie dominant ten opzichte van overige krachten die aanwezig zijn; dit leidt tot het ontstaan van de capillaire werking. De capillaire werking heeft het vermogen om een vloeistof, tegen de zwaartekracht in, doorheen het poreuze membraan te laten diffunderen totdat een evenwicht bereikt wordt met de neerwaartse kracht, zonder de invloed van externe factoren (Cottet & Renaud, 2020; Li et al., 2012). Deze werking berust bijgevolg op een samenspel van drie verschillende krachten; cohesie, adhesie en oppervlaktespanning. Om de werking tot uiting te laten komen, is het essentieel dat de adhesie - de aantrekkingskracht tussen de vloeistofmoleculen en het oppervlak - sterker is dan de cohesiekracht, de aantrekkingskracht tussen de moleculen onderling. Hierdoor ontstaat een concave meniscus, die gekenmerkt wordt door de oppervlaktespanning, de cohesie en de adhesie (Helmenstine, 2022).

Papier is een verweven netwerk van geperste cellulosevezels dat afhankelijk van de uitgevoerde samenperskracht, een andere poriëngrootte krijgt. Het verkregen poreus membraan zorgt ervoor dat de capillaire werking kan plaatsvinden. Cellulose is hydrofiel van aard door de aanwezige hydroxylgroepen. Naast cellulose papier kan eveneens gebruik gemaakt worden van nitrocellulose papier. Dit ontstaat door het nitreren van cellulose of het vervangen van de hydroxylgroep door een nitraatgroep. Nitrocellulose heeft een verhoogde affiniteit voor proteïnebindingen en zal daarom ingeschakeld worden voor western blot. Eveneens kan het gebruikt worden voor presumptieve testen waarbij hydroxylgroepen interferenties kunnen veroorzaken (Nishat et al., 2021).



Figuur 4: Verschil cellulose en nitrocellulose op chemisch niveau overgenomen van (Nishat et al., 2021)

Om te vermijden dat de vloeistof door het gehele membraan diffundeert, wordt het papier voorzien van enerzijds een fysische afbakening door sneden, uitgevoerd door een laserbehandeling of anderzijds een chemische patroonvorming door het gebruik van hydrofobe inkt. De hydrofobe barrière kan gecreëerd worden door een fysieke afzetting van een hydrofoob reagens, zoals het dichten van de vezels door het smelten en printen van was-filamenten. Een andere mogelijkheid is de chemische modificatie van de vezeloppervlakten, deze irreversibele reactie zorgt voor het verwijderen van de hydroxylgroepen van cellulose waardoor het zijn hydrofiële eigenschap verliest. De aangebrachte vloeistof kan bijgevolg binnen de opgelegde beperkingen blijven (Dungchai et al., 2010; Li et al., 2012).

In het begrip ‘multiplex paper-based microfluidics device’, verwijst het woord multiplex naar de combinatie van verschillende testen, dit allemaal met het gemeenschappelijk doel van het detecteren van een onbekend sample. Zo kunnen verschillende presumptieve testen gekoppeld worden, waarbij slechts eenmalig het sample toegevoegd dient te worden. Ieder kanaal van de test bevat een reactie die specifiek is voor een bepaalde lichaamsvloeistof, zonder dat onderling interferenties kunnen optreden. Op deze manier kan efficiënter te werk gegaan worden (Musile et al., 2015).

Afhankelijk van de noden van testen die aangebracht worden op het apparaat, kan het design aangepast worden. Het eenvoudigste design bestaat uit verschillende kanalen met een reactieveld met in het midden een gemeenschappelijke plaats voor het aanbrengen van de te onderzoeken stof. Gekoppeld aan de eigenschappen van een individuele test, kan er een toevoeging zijn van extra reactievelden.

Tevens kunnen ettelijke soorten testen uitgevoerd worden met behulp van de paper-based apparaten. De meest voorkomende technieken zijn colorimetrische, chemoluminescentie-, elektrochemische en fluorescentie assays. De colorimetrische detectie zorgt voor een eenvoudige interpretatie van de resultaten. Bij de aanwezigheid van een specifiek sample in een te onderzoeken stof, zal een kleurverandering optreden in het reactieveld. Net zoals bij presumptieve testen, kan ook hier een sample met gelijkaardige eigenschappen de oorzaak zijn van een vals positief resultaat. Deze eenvoudige testen hebben echter wel een hoge detectielimiet, veroorzaakt door een lage gevoeligheid. De gevoeligheid is afhankelijk van de gebruikte testen in het apparaat (Espinosa et al., 2022).

Wanneer een multiplex paper-based device vergeleken wordt met een presumptieve test, zijn er veel gelijkenissen te vinden, maar ook enkele verschillen. Beide testen dienen om uitsluitend een indicatie te verkrijgen van de gevonden substantie. De testen zijn eenvoudig, snel en goedkoop, hiernaast zijn deze zo ontworpen dat ze meegenomen kunnen worden naar de pd. Zoals de naam het zegt, kan bij een multiplex device, een sample gelijktijdig aan meerdere testen onderworpen worden. Dit is het grootste voordeel t.o.v. de klassieke presumptieve testen (Cromartie et al., 2018). Tevens wordt de nodige hoeveelheid sample geminimaliseerd (Deraney et al., 2016).

Op papier lijkt dit een veelbelovende techniek die vele voordelen met zich mee kan brengen. Aangezien het nooit eerder uitgevoerd werd, draagt het veel onbeantwoorde vragen met zich mee over bijvoorbeeld de werking, gevoeligheid en bewaaromstandigheden. Door verschillende insteken te onderzoeken, tracht deze scriptie een beeld te schetsen over de mogelijkheden en beperkingen die een multiplex paper-based device met zich meebrengt. In deze studie wordt een eerste aanzet uitgewerkt tot het samenvoegen van de TB-test, de AP-test, de zetmeel-jodiumtest en de DMAC-test.

6. Experimenten

6.1. Materiaal en methoden

Om een multiplex paper-based device te ontwerpen, dienden de eigenschappen, zoals werking, gevoeligheid en bewaarcondities van verschillende bestaande presumptieve testen achterhaald te worden met betrekking tot cellulose papier. Er werden vier verschillende testen uitgewerkt voor de detectie van bloed, sperma, speeksel en urine. Volgens Virkler en Lednev (2009) zijn dit vloeistoffen die het meest frequent worden aangetroffen op de pd, Harbison en Fleming (2016) laten urine weg uit deze lijst.

6.1.1. Aanmaak reagentia

Onderstaande reagentia werden aangemaakt in een zuurkast.

6.1.1.1. TB-test

Voor het uitvoeren van de tetrabasetest dienden twee verschillende oplossingen aangemaakt te worden. Eerst werd 0,5 g 4,4''-Methyleenbis (N,N-dimethylaniline), gekend als tetrabase (Fluka) opgelost in 10 ml azijnzuur 100 % (CH_3COOH) (Supelco). Na het homogeniseren werd dit aangelengd tot 100 ml met gedemineraliseerd water (dH_2O). Voor de aanmaak van de tweede oplossing werd, 5 g bariumperoxide (BaO_2) opgelost in 10 ml azijnzuur 100 %. Ook hier werd na het homogeniseren aangelengd tot 100 ml met dH_2O . Beide aangemaakte reagentia werden bewaard bij 4 °C in een van licht afgesloten fles.

6.1.1.2. AP-test

Om de zure fosfatasetest uit te voeren, werden twee verschillende stockoplossingen gemaakt. De eerste stockoplossing werd aangemaakt door 0,1 ml azijnzuur 100 % (CH_3COOH) (Supelco) samen te voegen met 0,9 ml dH_2O . Vervolgens werd 0,4 g natriumacetaat trihydraat ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_5$) (Supelco) toegevoegd, gevolgd door 0,02 g Fast blue B salt ($\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_2\text{Cl}_2 \cdot \text{ZnCl}_2$) (Sigma-Aldrich). Alvorens het homogeniseren werd 1,2 ml dH_2O toegevoegd. Nadien werd de tweede stockoplossing bereid. Hiervoor diende 0,08 g 1-naphthyl phosphate disodium salt (Sigma-Aldrich) opgelost te worden in 1 ml dH_2O . Beide oplossingen werden, afgesloten van licht, bewaard bij 4 °C.

De werkoplossing werd bereid door de samenvoeging van 1 ml stockoplossing 1 met 0,1 ml stockoplossing 2. Dit werd aangelengd met 9 ml dH_2O alvorens het te bewaren bij 4 °C in een van licht afgesloten Falcon tube.

6.1.1.3. DMAC-test

Voor het uitvoeren van de DMAC-test werd 0,02 g DMAC, 4-(Dimethylamino)cinnamaldehyde (Sigma Aldrich) afgewogen en opgelost in 25 ml ethanol 100 % ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) (Supelco), de bekomen concentratie bedroeg 0,2 % (w/v). Aangezien het gehalte DMAC in de reagentia een invloed zou kunnen hebben op de gevoeligheid van de test (Ong et al., 2012), werd een tweevoudige verdunningsreeks aangemaakt tot een eindconcentratie van 0,025 %.

Het reagens werd afgewerkt door 2,7 ml van de verdunning (A, B, C of D) aan te lengen met 300 μl zoutzuur 37 % (HCl) (Supelco). Het overige gedeelte van de verdunningsreeks werd in de koelkast bewaard.

6.1.2. Verdunning lichaamsvloeistoffen

6.1.2.1. Bloed

Gedurende de testen met het bloed werd steeds met hetzelfde sample gewerkt. Om de gevoeligheid van de diverse testen te bepalen, werd bij aanvang een seriële verdunning gemaakt volgens onderstaande tabel (1). Deze verdunningsreeks werd eveneens aangemaakt door fysiologisch zoutwater (FZ) (0,9 % NaCl, Supelco) als oplosmiddel te hanteren.

Tabel 1: Tienvoudige seriële verdunningsreeks bloed met behulp van gedemineraliseerd water

	Verdunning	Bloedoplossing (μl)	dH_2O (μl)
A	10^0	500 uit stock	0
B	10^1	50 A	450
C	10^2	50 B	450
D	10^3	50 C	450
E	10^4	50 D	450
F	10^5	50 E	450
G	10^6	50 F	450

6.1.2.2. Sperma

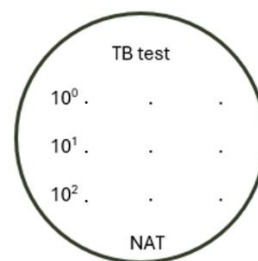
Gezien de beperkte hoeveelheid verkregen sperma, werd er voornamelijk gewerkt met zwarte thee. Een theeblad bevat net zoals sperma, ook zure fosfatase (Tirimanna, 1972). Thee zal hierdoor eveneens een positief resultaat vertonen bij het uitvoeren van de zure fosfatasetest, meer bepaald een vals positief resultaat. Om deze reden werd eveneens de werkzaamheid van het de AP-test nagegaan met zwarte thee. Met de beperkte hoeveelheid sperma die aanwezig was, werd een tweevoudige seriële verdunningsreeks aangemaakt totdat het spermasample 8192 keer verdund werd met dH₂O (13 maal verdund met verdunningsfactor (VF) gelijk aan 2).

6.1.2.3. Urine

Tevens werd voor het midstream urinesample een tweevoudige seriële verdunningsreeks aangemaakt tot een eindconcentratie van 1/512.

6.1.3. Gevoeligheid en werkzaamheid

Om de gevoeligheid van de verschillende testen na te gaan, werd de 'natte' en 'droge' methode gehanteerd. De droge methode werd uitgevoerd door de verdunningen van de lichaamsvloeistoffen in triplo aan te brengen op een filtreerpapier. Dit werd gedroogd bij kamertemperatuur. Bij de natte methode werd direct na het spotten van de lichaamsvloeistoffen, het reagens toegevoegd.



Figuur 5: Voorbeeld opstelling tetrabasetest, natte methode

Onderstaande tabel geeft een overzicht van de gebruikte volumes, specifiek voor de bijhorende test. Voor de TB-test, met oplosmiddel FZ, werd enkel de natte methode uitgevoerd.

Tabel 2: Overzicht gespot volume voor de gevoeligheidsbepaling

Test	Gespot volume lichaamsvloeistof voor volledige verdunningsreeks (µl)	Gespot volume oplossing 1 (µl)	Gespot volume oplossing 2 (µl)
TB (oplosmiddel dH ₂ O)	1 druppel	1 druppel	1 druppel
TB (oplosmiddel FZ)	1,5	1,5	1,5
AP	1,5	1,5	/
DMAC (0,2 % w/v)	1,5	1,5	/
DMAC (0,1 % w/v)	1,5	1,5	/
DMAC (0,05 % w/v)	1,5	1,5	/
DMAC (0,025 % w/v)	1,5	1,5	/

Om na te gaan hoelang de reagentia werkzaam was, werd iedere dag, na de aanmaak, een positieve controle en negatieve controle (dH₂O) uitgevoerd (bijlage 10.1.1., 10.2.1. en 10.3.1.).

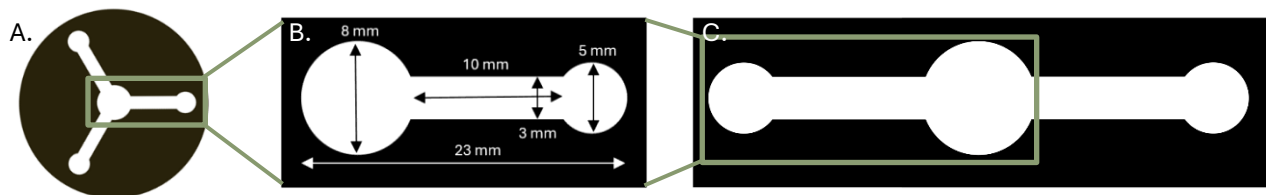
Tabel 3: Overzicht gebruikte positieve controles per experiment

	TB-test	AP-test	DMAC-test
Positieve controle	10 ² -bloedverdunning	Zwarte thee	Urine

Naast het dagelijks testen van de werkzaamheid, was het eveneens essentieel om op regelmatige basis na te gaan of de test nog de beoogde gevoeligheid bezat. Dit werd gedaan door de TB-test op dag 27, 47 en 70 uit te voeren.

6.1.4. Ontwerp en capaciteitsbepaling van devices met verschillend aantal reactievelden.

Gebruikmakend van het programma Inkscape werden de paper-based devices ontworpen. Alvorens het uiteindelijk ontwerp gehanteerd werd, werden eenvoudigere devices aangemaakt met minder reactievelden. Gebaseerd op de eigenschappen afgeleid uit de studie van Espinosa et al. in 2022 werd het device met één reactieveld ontworpen (figuur 6B). Dit had een kanaal met breedte 3 mm en lengte 10 mm. Het grootste reservoir kreeg een grootte van 8 mm, dit stond eveneens vermeld in aangehaald artikel. Als gevolg van volumebeperkingen bij de aanwezige pipetten, werd een diameter van 5 mm toegewijd aan het kleinste reservoir. Vervolgens werd het ontwerp geprint op cellulosepapier (Whatman 1 CHR, 200 x 200) met behulp van de Xerox COLORQUBE 8570DN volgens de ter beschikking gestelde standard operating procedure (SOP). Om de impregnatie van de was in het papier te garanderen, werd het device, ingepakt in bakpapier, zevenmaal door een warm lamineermachine gehaald. Vanuit het device met één reactieveld werden de duplex- (gespiegeld t.o.v. het middelpunt) en multiplex device (-120 en + 120° gedraaid rond het middelpunt) aangemaakt.



Figuur 6: Het tot stand komen van de duplex (C) en multiplex (A) paper-based device uit een design met één reactieveld (B)

Om de capaciteit van de verschillende devices te bepalen werd gebruik gemaakt van de kleurstof Orange G ($C_{16}H_{10}N_2Na_2O_7S_2$) (Merck). De oranje kleurstof zorgde ervoor dat de vloeistof zichtbaar doorheen het membraan zou kunnen fungeren. Een gedetailleerde uitwerking van de capaciteitsbepaling kan teruggevonden worden in bijlage (10.4.1).

6.1.5. Bewaren

Gezien het feit dat de testen niet onmiddellijk na aanmaak gebruikt worden op een pd, was het essentieel om een manier van bewaren te achterhalen. Met behulp van het duplex device (TB en AP gecombineerd) (ontwerp figuur 6C) werd nagegaan of invriezen beschouwd kon worden als een goede bewaringsmethode. Hiervoor werd 1 μ l AP-reagens gespot aan de ene kant van het duplex device en 0,5 μ l TB-reagens samen met 0,5 μ l bariumperoxide aan de andere kant. In totaal werden 54 devices gemaakt die verpakt werden per 9. De testen werden uitgevoerd op dag 1, dag 3, dag 6, dag 8 en dag 10. Ten gevolge van tijdsgebrek werd het bewaren van de DMAC-test niet nagegaan.

6.1.6. Ontdooien

Aangezien de testen ingevroren werden, diende eveneens nagegaan te worden of het ingevroren reagens na ontdooien nog werkzaam bleef. Ten gevolge van een variabel tijdsinterval tussen het vertrek naar de pd en de eigenlijke spooropname, werden de testen uitgevoerd voor volgende tijdstippen; 5', 10', 15', 30', 45', 1u, 1u30, 2u, 2u30, 3u, 3u30, 4u, 4u30, 5u.

Hiervoor werd gebruik gemaakt van het duplex device (ontwerp figuur 6C), en een single device (ontwerp figuur 6B). Deze werden gespot zoals aangehaald in 6.1.5. In totaal werden 126 duplex devices gemaakt die verpakt werden per 9 in aluminiumfolie. Na het ontdooien, waarbij de devices nog verpakt bleven in folie, werden volgens voorgeschreven tijdstip onderstaande testen uitgevoerd.

Tabel 4: Uitvoeren van 9 testen op voorgeschreven tijdstip

Aantal testen	Toegevoegde controle	Target test	Toegevoegd volume (µl)
3	Bloed (10^2 -verdunding)	TB	35
3	Zwarte thee	AP	35
3	dH ₂ O	Negatieve controle	35

Op het single device werd 1 µl DMAC-reagens gespot, hiervan werden 84 stuks aangemaakt die verpakt werden per 6. Op voorgeschreven tijdstippen werden telkens 3 positieve controles (urine) en 3 negatieve controles (dH₂O) uitgevoerd, met een te spotten volume van 20 µl.

6.1.7. Multiplex paper-based device

Met behulp van het multiplex device werd nagegaan of/en wanneer een vals positieve reactie ontstaat voor de drie relatievelden. 13 testen (3 positieve controles voor ieder verschillend reactieveld + 3 negatieve controles + 1 test voor sperma [1/4]) werden voorbereid door 0,5 µl van het TB-reagens samen met bariumperoxide in een reactieveld te spotten, in een ander reactieveld werd 1 µl DMAC-reagens gespot en tot slot werd in het overige reactieveld 1 µl AP-reagens gespot. Na het toevoegen van de positieve controles (tabel 3) werd gedurende 10 minuten de kleurverandering geobserveerd.

6.1.8. Speeksel: zetmeel-jodiumtest

De zetmeel-jodiumtest is een test die normaal niet op papier wordt uitgevoerd, daarom was het van uiterst belang om de condities te optimaliseren in proefbuizen alvorens een poging ondernomen werd om deze in een device te plaatsen.

6.1.8.1. Reagentia

Het jodiumreagens werd aangemaakt door 0,1 g jodium (I) (BVDA) samen te voegen met 0,2 g kaliumjodide (KI) (Alfa Aesar), hieraan werd 10 ml dH₂O toegevoegd. Dit werd gehomogeniseerd. Vanaf hier werd een seriële verdunningsreeks aangemaakt met VF gelijk aan 2 totdat in totaal 32 maal verdund werd.

De verdunningsreeks van maiszetmeel (Duryea) werd in twee delen aangemaakt. Vanuit een oplossing met concentratie 0,1 g/100 ml werd een seriële verdunningsreeks aangemaakt met VF gelijk aan 2 tot een eindconcentratie van 0.003125 g/100 ml. Ook werd vanuit een concentratie van 1 g/100 ml een seriële verdunningsreeks (VF = 2) aangemaakt tot een eindconcentratie van 0,5 g/100 ml. Aangezien zetmeel niet goed oplosbaar was in water, werd dit steeds gevortext alvorens het overgebracht werd naar de volgende verdunning.

6.1.8.2. Oriënterende test

Om een eerste indicatie te verwerven bij welke concentratiecombinatie van de jodium- en zetmeeloplossing een blauwpaars gekleurd complex gevormd kon worden, werd op een filtreerpapier onderstaande opstelling gespot. Er werd eerst 1,5 µl zetmeeloplossing gespot waar 1,5 µl jodiumoplossing aan toegevoegd werd. Hieraan werd uiteindelijk 3 µl speeksel toegevoegd.

Tabel 5: Overzicht oriënterende zetmeel-jodiumtest op filtreerpapier

Zetmeelverduunning	Jodiumverduunning						
	Verduunning →	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
	Concentratie (g/100 ml) ↓						
	1						
	0,5						
	0,1						
	0,05						
	0,025						
	0,0125						
	0,00625						
	0,003125						

6.1.8.3. Test in proefbuizen

Aan de hand van de resultaten verkregen uit bovenstaande methode werd besloten om verder te werken met een zetmeeloplossing 0,5 g/100 ml aangezien hier een blauwpaars complex gevormd werd. Hiermee werd de proef uitgevoerd in proefbuizen. Er werd 200 µl zetmeel-oplossing samengevoegd met 200 µl jodiumoplossing. Eens het complex gevormd was, werd 600 µl speeksel toegevoegd. Dit werd iedere 5 minuten gedurende 40 minuten gevortex.

6.1.8.4. Test op papier

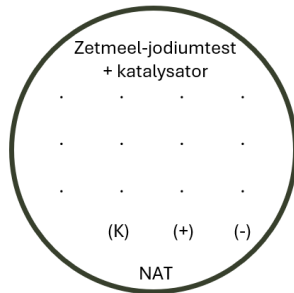
Met de bevindingen die afgeleid konden worden uit de test met de proefbuizen, werd de test voor een eerste maal op filtreerpapier volgens de natte en droge methode uitgevoerd. In de eerste kolom werd uitsluitend het blauwe complex gevormd door 1 µl van beide oplossingen te spotten op een filtreerpapier. In kolom 2 werd 3 µl speeksel toegevoegd en als negatieve controle werd het speeksel vervangen door dH₂O (kolom 3).

6.1.8.5. Invloed katalysator

Aangezien de resultaten op papier niet dezelfde resultaten vertoonden als in de proefbuizen, werd nagegaan of de toevoeging van een katalysator al dan niet een positief effect had op de reactietijd van de zetmeel jodiumtest. Hiervoor werden volgende concentraties alfa-amylase (Still Spirits) aangemaakt; 0,36 g/l, 0,32 g/l, 0,30 g/l, 0,28 g/l, 0,26 g/l en 0,22 g/l.

100 µl zetmeeloplossing (0,5 g/100 ml) werd samengevoegd met 100 µl jodiumoplossing die 32x verdund werd. Hieraan werd 500 µl van de alfa-amylase oplossing aan toegevoegd. Eveneens werd een sample gemaakt waarbij speeksel werd toegevoegd i.p.v. de katalysator, dit ter vergelijking in reactieduur. Bij de negatieve

controle werd dH₂O gebruikt. Uiteindelijk werd er nagegaan of het een invloed had op de papieren testen door een vergelijking te maken van een negatieve controle, een test met speeksel, een test met alfa-amylase en een testveld uitsluitend bestaande uit zetmeel en jodium. Telkens werd 1,5 µl gespot van de verschillende oplossingen. Figuur 7 geeft een overzicht weer van de opstelling. Aangezien eerdere resultaten aangetoond hadden dat geen onderscheid gemaakt kon worden tussen de natte en droge methode, werd enkel de natte methode gehanteerd.



Figuur 7: Opstelling papieren test, kolom 1 = zetmeel + jodium; kolom 2 = toevoeging katalysator; kolom 3 = toevoeging speeksel; kolom 4 = toevoeging dH₂O

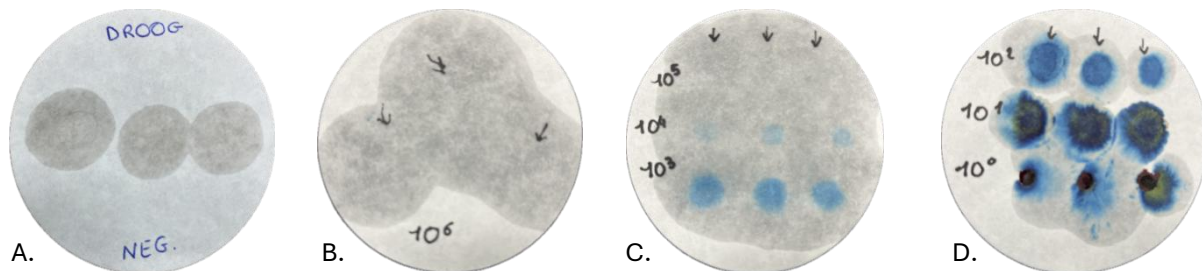
6.2. Resultaten

Alvorens een multiplex paper-based device gecreëerd kon worden, werden de eigenschappen van de tetrabasetest, de zure fosfatasetest, de zetmeel-jodiumtest en DMAC-test bepaald. Deze resultaten werden geanalyseerd en vervolgens werden de optimale eigenschappen van iedere test vergeleken om deze samen te voegen in één test.

6.2.1. Gevoeligheid en werkzaamheid

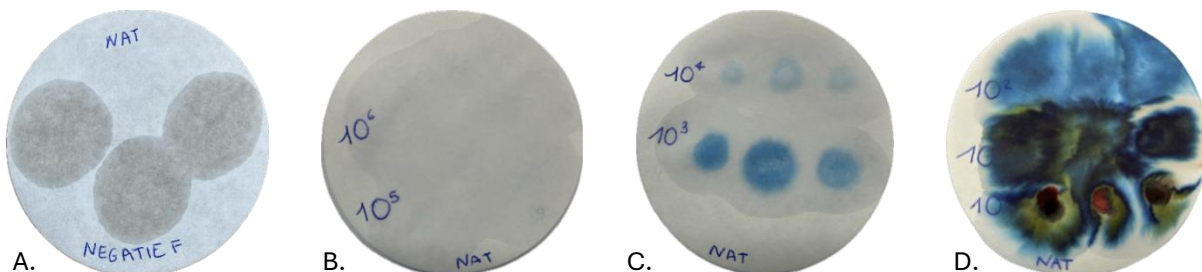
6.2.1.1. TB-test

Onderstaande figuur (8) vertoont de resultaten verkregen door de droge methode. Het gebruikte oplosmiddel toebehorend aan deze resultaten was dH_2O . Er kon waargenomen worden dat geen verkleuring aanwezig was bij de negatieve controle, een 10^6 - en 10^5 -verdunding. Een blauwe kleur was aanwezig bij de overige resultaten. Het onverdunde en het tienmaal verdunde bloed vertonen eveneens in de kern een groengelige kleur.



Figuur 8: Gevoeligheidsbepaling tetrabasetest waarbij het bloed verdund werd met gedemineraliseerd water en gespot werd volgens de droge methode (in triplo); A = negatieve controle (dH_2O); B = 10^6 verdunding; C = 10^3 , 10^4 en 10^5 verdunding; D = 10^0 , 10^1 en 10^2 verdunding

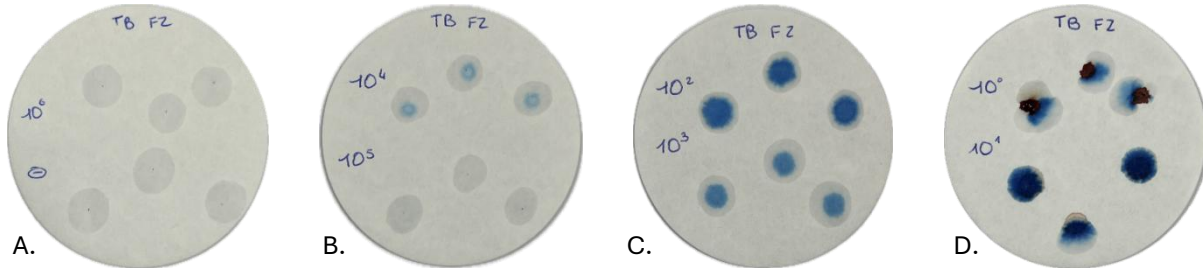
Figuur 9 beschrijft de resultaten behorend bij de natte test met dH_2O als oplosmiddel. Ook hier was eveneens geen verkleuring aanwezig bij de negatieve controle, de 10^6 - en 10^5 -verdunding. Een blauwe verkleuring was te zien bij overige resultaten. Naast de blauwe verkleuring was bij 10^1 - en onverdunde bloedoplossing ook een groengele verkleuring te observeren.



Figuur 9: Gevoeligheidsbepaling tetrabasetest waarbij het bloed verdund werd met gedemineraliseerd water en gespot werd volgens de natte methode (in triplo); A = negatieve controle (dH_2O); B = 10^6 en 10^5 verdunding; C = 10^3 en 10^4 verdunding; D = 10^0 , 10^1 en 10^2 verdunding

Om het effect van het verdunningsmiddel na te gaan, werd een verdunningsreeks van bloed aangemaakt met fysiologisch zoutwater als oplosmiddel. Hiermee werd reeds genoemde test opnieuw uitgevoerd.

Zowel de aan- als afwezigheid van een blauwe kleur (figuur 10) was identiek aan de hierboven beschreven resultaten. Echter was de groengele verkleuring eerder beperkt bij de 10^1 -verdunding en het onverdunde sample. Het gebruikte oplosmiddel was fysiologisch zoutwater.

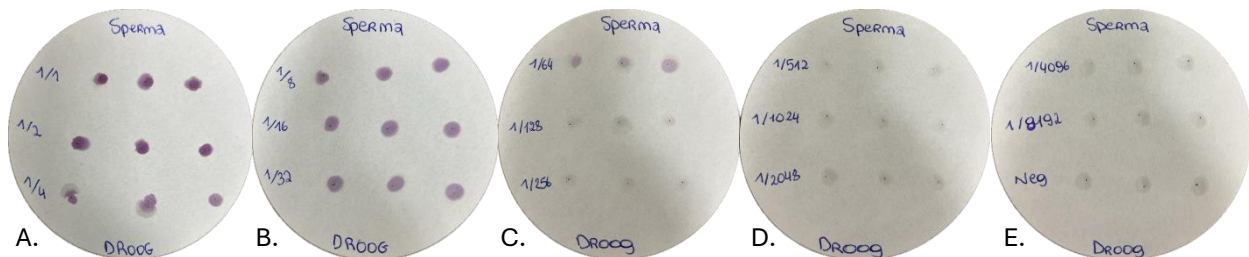


Figuur 10: Gevoeligheidsbepaling tetrabasetest waarbij het bloed verdund werd met fysiologisch zoutwater en gespot werd volgens de natte methode (in triplo); A = negatieve controle (dH_2O) en 10^6 verdunning; B = 10^4 en 10^5 verdunning; C = 10^2 en 10^3 verdunning; D = 10^0 en 10^1 verdunning

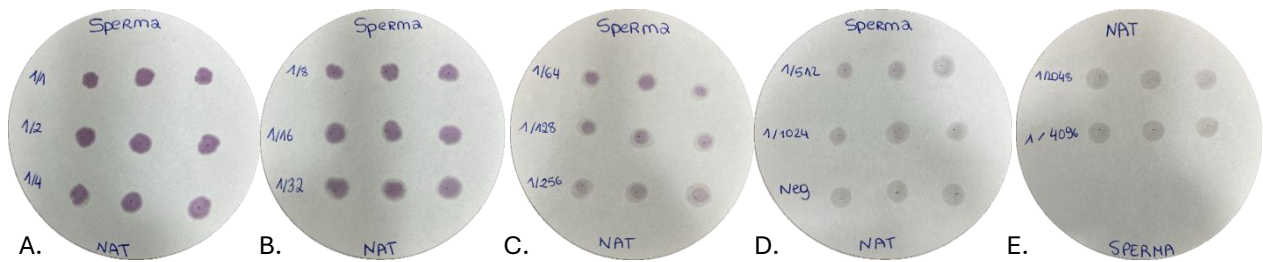
Eveneens werd getest hoelang het reagens bruikbaar bleef na aanmaak, in totaal werden 77 metingen uitgevoerd die een bevredigend resultaat vertoonden; de positieve test resulteerde in blauwe verkleuring, de negatieve test vertoonde de afwezigheid van een kleurverandering. De intensiteit van het positieve resultaat nam gedurende deze tijd niet af (figuur 17, bijlage 10.1.1). De gevoeligheid op willekeurige dagen vertoonden eveneens dezelfde resultaten verkregen bij de gevoeligheid getest op dag 0 (figuur 18-23, bijlage 10.1.2.).

6.2.1.2. AP-test

Net zoals bij de tetrabasetest werd de gevoeligheid van het reagens bepaald door enerzijds de natte en anderzijds de droge methode uit te voeren in triplo. De droge methode vertoonde een paarse verkleuring tot het originele spermasample 128 keer verdund werd. Voor de overige verdunningen kon geen kleurverandering waargenomen worden. De intensiteit van de paarse kleur nam af naarmate de verdunning toenam. Deze afname van intensiteit was eveneens zichtbaar bij de natte methode. Hier kon een verkleuring waargenomen worden tot een 1024 maal verdunning. De negatieve controle vertoonde voor beide methodes geen verkleuring.

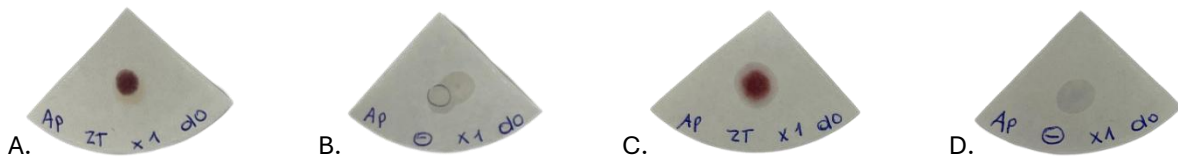


Figuur 11: Gevoeligheidsbepaling zure fosfatasetest waarbij het sperma verdund werd met gedemineraliseerd water en gespot volgens de droge methode (in triplo); A = $1/1$, $1/2$ en $1/4$ verdunning; B = $1/8$, $1/16$ en $1/32$ verdunning; C = $1/64$, $1/128$, $1/256$ verdunning; D = $1/512$, $1/1024$, $1/2048$ verdunning; E = $1/4096$, $1/8192$ verdunning en negatieve controle (dH_2O)



Figuur 12: Gevoeligheidsbepaling zure fosfatasetest waarbij het sperma verdund werd met gedemineraliseerd water en gespot volgens de natte methode (in triplo); A = 1/1, 1/2 en 1/4 verdunning; B = 1/8, 1/16 en 1/32 verdunning; C = 1/64, 1/128, 1/256 verdunning; D = 1/512 en 1/1024 verdunning en negatieve controle (dH_2O); E = 1/2048 en 1/4096 verdunning

Door de beperkte beschikbaarheid van sperma werd de werkzaamheid volgens de natte en droge methode eveneens bepaald voor zwarte thee. Er kon waargenomen worden dat een roodbruine verkleuring optrad bij de aanwezigheid van zwarte thee. De verkleuring bleef afwezig bij het gebruik van dH_2O .

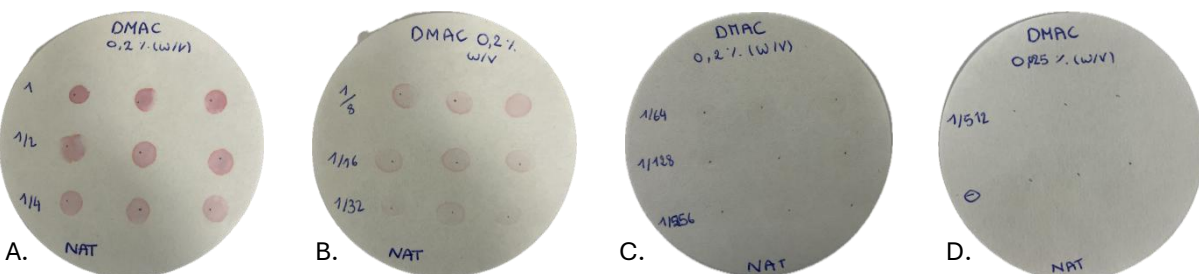


Figuur 13: Resultaten zure fosfatasetest met zwarte thee als positieve controle en dH_2O als negatieve controle: A = positieve controle, droge methode; B = negatieve controle, droge methode; C = positieve controle, natte methode; D = negatieve controle, natte methode

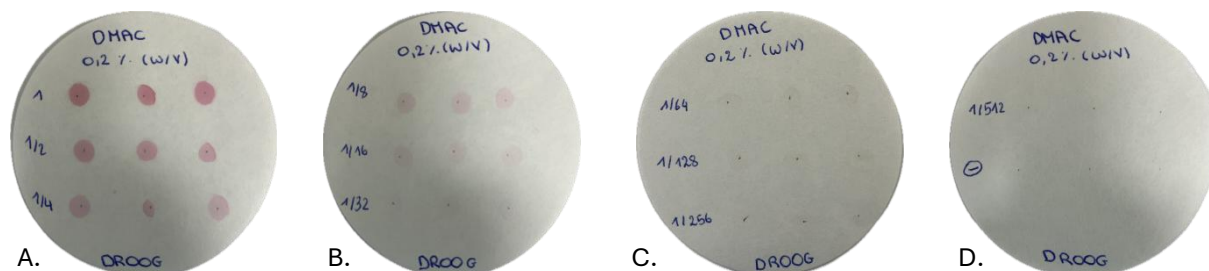
Wanneer nagegaan werd hoelang het reagens bruikbaar bleef na aanmaak, kon opgemerkt worden dat de intensiteit van de verkregen roodbruine kleur afnam in verloop van tijd. Op dag 37 werd geen verkleuring meer waargenomen. Het reagens vertoonde vanaf dag 7 eveneens een bruine neerslag (figuur 24 & 25, bijlage 10.2.1.).

6.2.1.3. DMAC-test

De gevoeligheid werd eveneens bepaald voor de DMAC-test. Dit werd bepaald voor een midstream gelegenhedsurinesample. De resultaten met de beste gevoeligheid kunnen in onderstaande figuren bestudeerd worden. Zowel de droge als natte methode vertoonden voor een 0,2 % (w/v) een duidelijke verkleuring tot een 32 maal verdunning. In het lab kon eveneens een lichte verkleuring geobserveerd worden tot een 128 maal verdunning. Naarmate de urine verder verdund werd, nam de intensiteit van de roze kleur af totdat uiteindelijk geen verkleuring waargenomen kon worden. De negatieve controle vertoont geen verkleuring.



Figuur 14: Gevoeligheidsbepaling DMAC (0,2 % w/v) waarbij het gelegenhedsample urine verdund werd met gedemineraliseerd water en gespot volgens de natte methode (in triplo); A = 1/1, 1/2 en 1/4 verdunning; B = 1/8, 1/16 en 1/32 verdunning; C = 1/64, 1/128, 1/256 verdunning; D = 1/512 verdunning en negatieve controle (dH_2O)



Figuur 15: Gevoeligheidsbepaling DMAC (0,2 % w/v) waarbij het gelegenhidsample van urine verdund werd met gedemineraliseerd water en gespot volgens de droge methode (in triplo); A = 1/1, 1/2 en 1/4 verdunning; B = 1/8, 1/16 en 1/32 verdunning; C = 1/64, 1/128, 1/256 verdunning; D = 1/512 verdunning en negatieve controle (dH₂O)

Overige figuren, gespot met een minder gevoelig reagens, zijn terug te vinden in bijlage (figuur 27-32, bijlage 10.3.2.). Tevens nam hierbij de roze verkleuring af tot op het punt dat de urine niet meer gedetecteerd kon worden. Bij het reagens met concentratie 0,025 % (w/v) kon voor zowel de natte als de droge methode een 8 maal verdunning als eindpunt van de verkleuring vastgesteld worden. Voor de 0,05 % (w/v) oplossing kon de verkleuring geobserveerd worden totdat de urine 16 keer verdund werd. Bij de 0,1 % (w/v) lag het omslagpunt bij 1/32^e. De observaties werden gemaakt in het labo, de lichtinval op de figuren belemmerd de mogelijkheid tot interpretatie.

De werkzaamheid van het reagens werd getest t.e.m. dag 9. Gedurende de 9 dagen nam de intensiteit van de kleurreactie niet af (figuur 26, bijlage 10.3.1.).

6.2.2. Ontwerp en capaciteitsbepaling van devices met een verschillend aantal reactievelden

In bijlage (10.4.) kan een overzicht waargenomen worden van de resultaten bekomen bij het ontwerpen en de capaciteitsbepalingen van de devices met verschillend aantal reactievelden.

Vooraleer zevenmaal gelamineerd werd, werd getest of één- of vijfmaal lamineren voldoende was. Hierbij kon waargenomen worden dat bij éénmaal lamineren de vloeistof zich doorheen het membraan fungeerde. Bij vijfmaal was dit in mindere mate/amper aanwezig. Bij zevenmaal was dit afwezig.



Figuur 16: Achterkant device na spotten van 10 µl na éénmaal te lamineren

Onderstaande tabel (6) biedt een overzicht van de bepaalde volumes die verder gebruikt gaan worden bij overige testen. Belangrijk, aangezien de TB-test gebruik maakt van 2 verschillende reagentia, wordt 0,5 µl van beide toegevoegd in het kleinste reservoir.

Tabel 6: Overzicht te spotten volume in verschillende devices voor experimenten die volgen

# reactievelden	Te spotten volume onbekende vloeistof in grootste reservoir (µl)		Capaciteit kleinste reservoir (µl)
1	20		1
2	35		1
3	55		1

6.2.3. Bewaren

De bewaring van de TB- en AP-test werd nagegaan tot 10 dagen na aanmaak. De resultaten in triplo vertoonden gelijkende resultaten. Onderstaande tabel (7) toont de vergelijking tussen dag 1 en dag 10. Na de toevoeging van zwarte thee, verkleurde het testveld (AP) tot een roodbruine verkleuring. De toevoeging van bloed zorgde voor een donkerblauwe verkleuring in het testveld van de TB-test. Beide substraten reageren enkel met hun beoogde test. Overige resultaten, gelijkaardig met opgelijste resultaten, kunnen in bijlage 10.5. waargenomen worden. De negatieve test vertoont geen verkleuring voor beide reactievelden.

Tabel 7: Vergelijking resultaten na toevoeging positieve controle nadat het device 1 of 10 dagen bewaard werd in de vriezer

	Positieve controle AP	Positieve controle TB	Negatieve controle
Dag 1			
Dag 10			

6.2.4. Ontdooien

Vooraleer nagegaan werd of de testen nog werkzaam waren na het ontdooien, werd de kleurverandering van beide reagentia geobserveerd. Na 30 minuten kon een roodbruine kleurverandering geobserveerd worden in het reactieveld waar de AP-test gespot werd. Deze bleef echter minimaal. Gedurende de vijf geteste uren trad geen kleurverandering op bij de TB-test.

De negatieve controle vertoonde geen kleurverandering. Deze kleurverandering was wel aanwezig bij de positieve controles. Bij zowel de TB- als de AP-test kon de kleurverandering, blauw voor bloed en roodbruin voor zwarte thee waargenomen worden. De intensiteit bleef gedurende de vijf geteste uren constant.

Tabel 8: Resultaten ontdooien (tijdstippen: 5 min., 1 uur, 2 uur, 3 uur, 4 uur en 5 uur) van de verschillende testen na toevoeging van positieve controle voor AP en TB

	5 min	1 uur	2 uur	3 uur	4 uur	5 uur
TB						
AP						

Gedurende de eerste 4 uren bij de DMAC-test, kon geen kleurverandering waargenomen worden, daarna resulteerde de toevoeging van de negatieve controle in een gele kleur. Opmerkelijk, bij de DMAC-test nam de intensiteit toe naarmate de tijd vorderde, alle verschillende testen vertoonden direct een lichtroze/gele kleurverandering. Wanneer de devices gedroogd waren aan kamertemperatuur, veranderde de lichte kleur naar een intens roze kleur. De gele kleur verdween.

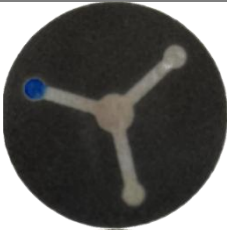
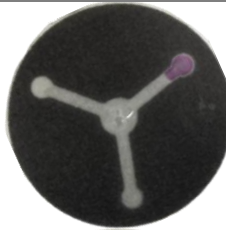
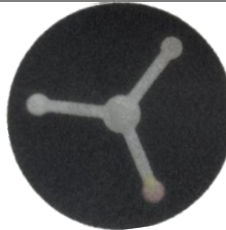
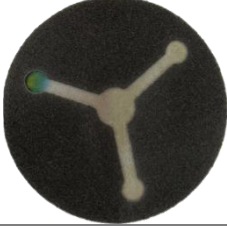
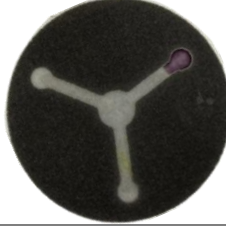
Tabel 9: Resultaten ontgooien (tijdstippen: 5 min., 5 min droog, 2 uur, 3 uur, 4 uur en 5 uur) van de verschillende testen na toevoeging van positieve controle voor DMAC

	5 min	5 min na droog	2 uur	3 uur	4 uur	5 uur
DMAC						

6.2.5. Multiplex paper-based device

Onderstaande tabel biedt een overzicht van de verkregen resultaten op tijdstip 0 en tijdstip 10.

Tabel 10: Resultaten test met betrekking tot multiplex paper-based devices na toevoeging verschillende positieve controles, waargenomen direct na toevoeging en na 10 minuten

t=	TB	AP (thee)	AP (sperma 1/4)	DMAC
0				
10				

De toevoeging van bloed vertoonde enkel een reactie met de TB-test. De bijhorende blauwe verkleuring trad onmiddellijk op, na verloop van tijd veranderde de blauwe verkleuring naar een geelgroenige kleur. De additie van zwarte thee induceerde een onmiddellijke roodbruine verkleuring bij het testveld van AP. Een groene verkleuring verscheen na 1 minuut bij het testveld van DMAC. Sperma reageerde onmiddellijk met het testveld van AP, wat resulteerde in een paarse verkleuring. In tegenstelling tot zwarte thee, de vals positieve van sperma, trad geen verkleuring op bij het testveld van DMAC. Tot slot werd urine toegevoegd, deze reactie induceerde een onmiddellijke roze verkleuring met het DMAC-testveld. Het testveld van AP verkleurde vanaf 15 seconden, deze intensiteit nam toe naarmate de tijd vorderde. De verkleuring van het DMAC-testveld werd enkel intenser aan de rand. Eens het testveld volledig gedroogd was, kwam de DMAC-verkleuring meer tot zijn recht.

6.2.6. Speeksel: zetmeel-jodiumtest

Alvorens de zetmeel-jodiumtest omgezet zou kunnen worden naar een test die past binnen het multiplex paper-based device, was het noodzakelijk om de werking te optimaliseren in proefbuizen.

6.2.6.1. Oriënterende test

Bijlage 10.6.1. toont de test die uitgevoerd werd op een filtreerpapier. Hierbij kon geobserveerd worden dat het blauw complex enkel gevormd werd bij de 1 en 0,5 % (w/v) zetmeeloplossing en dus niet waarneembaar was bij de lagere concentraties. De jodiumoplossing vertoonde van zichzelf een geeloranje kleur, deze kleur belemmerde de visualisatie van het eventueel gevormde blauwpaarse complex.

6.2.6.2. Test in proefbuizen

Vooraleer het speeksel werd toegevoegd aan de verschillende proefbuizen, kon een blauwpaarse korrel op de bodem van de reageerbuizen waargenomen worden. Naarmate een hogere jodiumconcentratie gebruikt werd, was meer blauwpaarse neerslag zichtbaar op de bodem. De toevoeging van speeksel leidde tot een zichtbare vermindering van de blauwpaarse kleur in de emulsie bij de lagere concentraties jodium. Eveneens speelde de concentratie van de jodiumoplossing een rol in het visualiseren van dit complex, bij de hoge concentratie kon de kleurverandering niet waargenomen worden. Deze interpretatie betreffende de afname van de blauwe kleur, is waarneembaar in onderstaande tabel.

Tabel 11: Verloop van blauwpaarse kleurverandering na verloop van tijd bij de stockoplossing jodium en 1/32 verdunning

Tijd (min)	zonder speeksel	0	15	25	40
[I]					
[I]/32					

6.2.6.3. Test op papier

Aangezien het mogelijk was om een kleurloze oplossing te verkrijgen bij de proefbuizen, werd, in dezelfde concentraties, de test uitgevoerd op filtreerpapier. Hierbij werd gebruik gemaakt van zowel de natte als de droge methode. In onderstaande tabel kan de test na verloop van tijd waargenomen worden. Naarmate de tijd vorderde, kon in geen enkele kolom een afname van de blauwpaarse kleur, noch het verdwijnen van het complex geobserveerd worden.

Tabel 12: Visueel verloop van blauwpaarse kleurverandering bij droge en natte methode op filtreerpapier waarbij gebruik gemaakt werd van een 0,5 % (w/v) zetmeeloplossing en een 1/32-verdunning van jodium

Tijd (min)	0	15	35
Natte methode			
Droge methode			

6.2.6.4. Invloed katalysator

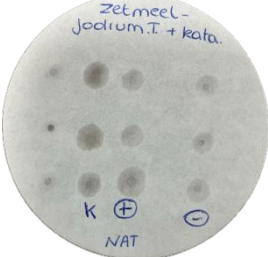
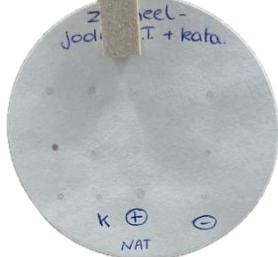
Om na te gaan of een katalysator een positieve invloed had op de reactieduur, werden verschillende concentraties alfa-amylase toegevoegd i.p.v. speeksel. Onderstaande tabel geeft het resultaat weer dat bekomen werd na 40 minuten. De normale test, zonder toevoeging van alfa-amylase vertoonde amper/geen blauwpaarse neerslag. Alle andere reactiebuizen waarbij alfa-amylase werd toegevoegd, toonden na 40 minuten nog steeds restanten van een blauwpaars complex. De negatieve controle bezat aan het einde van de test het meeste neerslag. In vergelijking met de start van de test nam deze hoeveelheid neerslag niet af. Visueel kon een toename van de neerslag geobserveerd worden naarmate de alfa-amylase meer verdund werd. Dit is moeilijk te zien in onderstaande tabel aangezien het complex, afhankelijk van de reactiebuis, meer geconcentreerd op een eenzelfde plek lag en niet verspreid over de volledige oppervlakte. Toch kan een opmerkelijk verschil in hoeveelheid neerslag tussen 0,36 g/l en 0,22 g/l waargenomen worden.

Tabel 13: Blauwpaarse kleurverandering na 40 minuten door toevoeging van het enzym alfa-amylase in verschillende concentraties waarbij een vergelijking gemaakt wordt tussen de negatieve controle en de traditionele zetmeel-jodiumtest met toevoeging speeksel

Concentratie (g/l)	Negatieve controle	Speeksel	0,36	0,32	0,30	0,28	0,26	0,22
Tijd (min)								
40								

Ondanks dat het resultaat niet voldeed aan vooropgestelde hypothese werd toch nagegaan of een katalysator op papier wel een positieve invloed op de reactietijd kon hebben. Naarmate de tijd vorderde kon ook hier in geen enkele kolom een afname van de blauwpaarse kleur, noch het verdwijnen van het complex gezien worden.

Tabel 14: Visueel verloop van blauwpaarse kleurverandering bij natte methode op filtreerpapier waarbij gebruik gemaakt werd van een 0,5 % (w/v) zetmeeloplossing en een 1/32-verdunning van jodium en waar gekeken werd of de toevoeging van alfa-amylase een invloed had

Tijd (min)	0	15	35
Natte methode			

6.3. Discussie

In dit onderzoek werd achterhaald of verschillende presumptieve testen samengevoegd konden worden tot een multiplex paper-based device. Hiervoor werd gebruik gemaakt van de tetrabasetest, de zure fosfatasetest, de zetmeel-jodiumtest en tot slot de DMAC-test.

Gedurende het volledige onderzoek vertoonde de negatieve controle nooit een kleurreactie. Hieruit kan worden afgeleid dat de bekomen resultaten betrouwbaar zijn en als juist geïnterpreteerd mogen worden. Eveneens werd in triplo gewerkt, hetgeen resulteerde in identieke resultaten, daardoor konden bekomen resultaten niet als toevallig beschouwd worden.

6.3.1. Gevoeligheid en werkzaamheid

Een blauwe verkleuring, verkregen door de toevoeging van bloed, induceert een positief resultaat voor de tetrabasetest die veroorzaakt wordt door de omzetting van tetrabase met bariumperoxide in aanwezigheid van hemoglobine tot een geoxideerd product (blauw) (Durnez, 2018). De TB-test vertoonde voor zowel de natte als droge methode een gevoeligheid van een 10^4 -verdunning. Deze resultaten zijn in lijn met de studie van Durnez in 2018 waar gesuggereerd wordt dat de gevoeligheid van de TB-test afhankelijk is van de ondergrond en de detectielimiet zich ter hoogte van een 10^4 -verdunning bevindt. De oplossingen die nodig zijn om de TB-test uit te voeren blijven na aanmaak minstens 77 dagen bruikbaar waarbij de gevoeligheid niet afneemt met de tijd. Tegen de verwachtingen in, heeft FZ geen bevorderende invloed op de gevoeligheid van de TB-test. Volgens Moritz, 2019 heeft FZ bevorderende eigenschappen om het isotoon milieu te behouden waardoor celafbraak tegengegaan wordt. Het gebruik van FZ als oplosmiddel is voornamelijk van belang bij het bepalen van de DNA-concentratie (Ludmila, 2023).

De gemeten detectielimiet voor de zure fosfatasetest werd bij de natte methode vastgesteld bij een 1042 maal verdunning, deze lag lager bij de droge methode, namelijk een 128 maal verdunning. De paarse verkleuring, een indicatie voor een positief resultaat van de AP-test, is veroorzaakt door de omzetting van 1-naphthyl phosphate disodium salt samen met Fast blue B salt tot een diazo verkleuring onder invloed van zuur fosfatase afkomstig van sperma (Lewis et al., 2013). Het gebruik van een andere methode bij de AP-test, kan leiden tot een lagere gevoeligheid (Redhead & Brown, 2013). Volgens Steinman in 1995 is het essentieel om de spermavlek te bevochtigen alvorens de test wordt uitgevoerd, dit kan eveneens de oorzaak zijn van de verschillende detectielimieten. Het reagens bleef gedurende 37 dagen werkzaam maar de intensiteit nam af naarmate de tijd vorderde, hierbij was zwarte thee verantwoordelijk voor de omzetting van het reagens, dit bevatte eveneens AP (Tirimanna, 1972). Het reagens wordt beschouwd als minder stabiel, en kan bijgevolg slechts enkele dagen, afgesloten van licht, in de koeling bewaard worden (Henningson & Kosikowski, 1959).

De roze kleur, verkregen na de toevoeging van urine, ontstaat door de reactie van het DMAC met ureum (Farrugia et al., 2012; Ong et al., 2012). Bij de DMAC-test (0,2 % w/v) werd de detectielimiet vastgesteld bij een 128 maal verdunning van het sample. De gevoeligheid is afhankelijk van de gebruikte concentratie DMAC (Ong et al., 2012). Verkregen bevindingen bevestigen dit standpunt. Het reagens is minstens 9 dagen houdbaar, verder onderzoek zal moeten uitwijzen of dit langer bewaard kan worden.

Echter dient een kanttekening geplaatst te worden bij de bepaalde gevoeligheid. De gevoeligheid is afhankelijk van een specifieke stof aanwezig in de lichaamsvloeistoffen. Zo reageert de TB-test met hemoglobine, de AP-test met zuur fosfatase en de DMAC-test met ureum. Deze stoffen kunnen variëren binnen verschillende stalen van verschillende donoren. Om de globale gevoeligheid te verkrijgen is het noodzakelijk om vervolgonderzoek uit te voeren met lichaamsvloeistoffen waar de concentratie van de specifieke stof in kwestie gekend is. De schommelende concentratie metabolieten kan ervoor zorgen dat de interpretatie bemoeilijkt wordt waardoor vals positieve en negatieve resultaten afgelezen kunnen worden.

6.3.2. Ontwerp en capaciteitsbepaling van devices met verschillend aantal reactievelden

Verkregen bevindingen suggereren dat onvoldoende lamineren nefast werkt op de impregnatie van de wax in het filtreerpapier. Door zevenmaal te lamineren, kan de gevormde barrière als optimaal beschouwd worden. De te spotten hoeveelheid sample is afhankelijk van het gebruikte ontwerp (Espinosa et al., 2022a). Om een reactie te kunnen veroorzaken, dient het sample in overmaat aangebracht te worden; 20 µl voor single device, 35 µl voor duplex device en 55 µl voor multiplex device. De reactievelden hebben een capaciteit van 1 µl.

6.3.3. Bewaren

Aangezien het belangrijk is om meerdere devices in één keer aan te maken en deze te kunnen stockeren, werden de devices bevroren en ontdooid tot en met 10 dagen. Gekregen resultaten suggereren dat zowel de TB- als de AP-test na 10 dagen, in bevroren toestand bewaard, nog werkzaam zijn aangezien deze testen de verwachte kleur vertonen, vermeld zoals bij 6.3.1. Invriezen beïnvloedt de bewaring van de devices niet.

6.3.4. Ontdooien

Gebaseerd op de waarnemingen verkregen bij de AP-, TB-, en de DMAC-test kan dezelfde interpretatie gegeven worden aan de kleurveranderingen zoals bij 6.3.1. De TB- en AP-test blijft gedurende 5 uur na ontdooien stabiel, aangezien de intensiteit in de resultaten gelijkend blijft. De DMAC-test kan afgelezen worden t.e.m. 4 uur alvorens de negatieve controle een gele kleur aanneemt, dit is de oorspronkelijke kleur van het DMAC-reagens.

6.3.5. Multiplex paper-based device

Bij het uitvoeren van de test m.b.v. het multiplex paper-based device werd waargenomen dat bloed enkel met de TB-test reageert, resulterend in een blauwe verkleuring. De urine reageerde zowel met de AP-test als de DMAC-test. Naast ureum bevat de urine eveneens zure fosfatase, het actieve bestandsdeel van de AP-test

(Scott & Huggins, 1942). Net zoals urine reageerde de zwarte thee ook met de DMAC-test. Het reactieveld bij de DMAC-test nam een groene kleur aan. Deze bevindingen zijn eveneens bewezen door Ong et al in 2011. De oorzaak hiervan zou te wijten kunnen zijn aan het feit dat zwarte thee proanthocyanidine bevat en dat met DMAC reageert tot een groen complex (Feliciano et al., 2012; Luximon-Ramma et al., 2005). De resultaten bekomen bij de sperma testen, wijken af van vooropgestelde hypothese, er werd verwacht dat sperma eveneens zou kleuren bij de DMAC-test aangezien dit ook ureum bevat (Srivastava et al., 1984). Dit is niet het geval en kan te wijten zijn aan het feit dat het sample te sterk verdund is. Echter ligt de concentratie ureum lager in sperma dan in urine. Net zoals bij de gevoeligheidstesten is de reactie afhankelijk van het oorspronkelijke sample en hun werkelijke waarde. Met deze bevindingen in het achterhoofd wordt het mogelijk om een onderscheid te maken tussen sperma en thee. Om vals positieve reacties te vermijden, moet het toestel direct na de toevoeging van het sample afgelezen worden.

6.3.6.Zetmeel-jodiumtest

Het beoogde doel van de zetmeel-jodiumtest was het creëren van een presumptieve test waarmee de aanwezigheid van speeksel in een sample achterhaald kon worden. Er werd verwacht dat het blauwpaarse complex, gevormd door de combinatie van jodium en zetmeel, afgebroken zou worden door de aanwezigheid van alfa-amylase in speeksel. De test in de proefbuizen vertoont veelbelovende resultaten aangezien na 40 minuten de neerslag niet meer aanwezig was in de proefbuis. Dit wil zeggen dat het zetmeel gehydrolyseerd is in kleinere afbraakproducten, waardoor het complex tevens wordt afgebroken (Rick & Stegbauer, 1974).

Aangezien de test werkzaam is in een proefbuis, wordt verwacht dat deze test ook werkzaam zou zijn op papier. De verkregen resultaten voldoen niet aan vooropgestelde hypothese. Een mogelijke oorzaak is dat er niet gewerkt werd in een vochtig milieu, dat wel aanwezig was bij de testen met de proefbuizen. Na verloop van tijd droogt het speeksel waardoor de afbraak niet meer verdergezet kan worden. Eveneens kan het veroorzaakt worden door een te trage werking van alfa-amylase in speeksel.

Om laatstgemelde reden uit te sluiten, werd de test herhaald waarbij gebruik gemaakt werd van het aangekochte enzym alfa-amylase. Dit enzym wordt gebruikt bij het brouwen van bier om het zetmeel te kunnen reduceren (Enevoldsen, 1978). De uitvoering van dit experiment resulteerde eveneens niet in beoogde resultaten. De test zonder gebruik te maken van alfa-amylase werkte sneller. Dit kan veroorzaakt zijn door het incorrect gebruik van het enzym. Volgens de fabrikant zou het de oplossing waaraan alfa-amylase toegevoegd diende te worden, zich tussen de 65 en 80 °C moeten bevinden. Dit was echter niet mogelijk, aangezien de test later omgezet zou worden naar een test op papier (*Enzyme Alpha-Amylase – Still Spirits*, n.d.).

De uitvoering van het experiment resulteerde niet in de verwachte uitkomsten, wat duidt op een niet-succesvolle poging om de zetmeel-jodiumtest om te zetten in een papieren test. Toekomstig onderzoek zal moeten achterhalen of een andere methode bestaat die geschikt is voor het multiplex paper-based device.

7. Conclusie

In dit onderzoek is nagegaan of verschillende presumptieve testen samengevoegd kunnen worden tot een multiplex paper-based device. Om een antwoord te schetsen werd de tetrabase, de zure fosfatase, de DMAC en zetmeel-jodiumtest individueel geoptimaliseerd. Hierbij werd rekening gehouden met de gevoeligheid, de houdbaarheid van het reagens en het bewaren en ontdooien van de test. Uiteindelijk werden de testen samengevoegd.

Na het observeren van de resultaten kan besloten worden dat de zetmeel-jodiumtest geen geschikte test is om te transformeren van de test in proefbuis naar een papieren test. Deze test werkt als enige test niet op basis van het kleuren van het reactieveld maar op het ontkleuren ervan.

Het multiplex paper-based device, betreffende de TB-, AP- en DMAC-test, kunnen samengevoegd worden. Momenteel kan nog geen gecombineerde conclusie getrokken worden voor het bewaren van het device voor de verschillende reactievelden. De gevoeligheid van het device is afhankelijk van de individuele gevoeligheid van de testen afzonderlijk. De TB- en AP-test kunnen maximaal 10 dagen bewaard worden. Onze gecombineerde bevindingen suggereren dat het device tot maximaal 4 uur gebruikt kan worden na ontdooien alvorens kleurreacties optreden bij de negatieve controles. Eveneens dienen de resultaten onmiddellijk afgelezen te worden alvorens vals positieve reacties leiden tot foutieve interpretaties.

8. Aanbevelingen

Gezien het feit dat deze scriptie slechts een eerste aanhef is tot het ontwikkelen van een paper-based device, is een vervolgonderzoek aangewezen. Eerst en vooral dient de gevoeligheid bepaald te worden met een bijhorende concentratie. Dit kan uitgevoerd worden door de gebruikte stalen eerst te (laten) analyseren op de het gewenste actieve stof zoals hemoglobine, ureum en zure fosfatase. De gevoeligheid kan vervolgens achterhaald worden met reeds beschreven methode.

Aangezien de AP-test voornamelijk met zwarte thee uitgevoerd werd, is het zeker en vast interessant om de experimenten met sperma te doorlopen. Op deze manier kunnen eventuele onderliggende beperkingen achterhaald worden. Ook kon het AP-reagens omschreven worden als een instabiel complex. Om de houdbaarheid van het reagens in zijn geheel te bekijken, werd het aangemaakte reagens op dag 2 ingevroren. Dit kan ontdooid worden en de beschreven methodes kunnen herhaald worden.

Als gevolg van tijdsgebrek, dient de houdbaarheid van de bevroren DMAC-test nog nagegaan te worden. Dit kan tevens uitgebreid worden de met TB- en AP-test om na te gaan of de limiet van bewaren langer dan 10 dagen is.

Een andere interessante insteek die nagegaan kan worden, is de applicatie van een gemengd sample. Hierbij wordt gekeken of de testen voor meerdere testvelden een positief resultaat kunnen leveren. Echter dient rekening gehouden te worden met het optreden van vals positieve reacties en hun bijhorende tijdstippen.

Verder is het niet gelukt om de test voor speeksel aan het paper-based device toe te voegen. Afhankelijk naar wensen, kan eventueel een andere test ontwikkeld worden. Tevens kunnen testen voor andere lichaams-vloeistoffen (zoals vaginale vloeistof) toegevoegd worden aan het device.

Tot slot is het van praktisch belang om de applicatie methode te achterhalen. Eveneens kan gekeken worden naar verschillende ondergronden, bijvoorbeeld textiel en (niet-) poreuze ondergronden. Momenteel is de test werkzaam voor vloeistoffen die aangetroffen worden. Echter komt het voor dat een vloeistof, zoals speeksel bij zelfmoord, al opgedroogd is wanneer het afstappingsteam ter plaatste aankomt. Hiervoor zou de vloeistof opgelost kunnen worden in een kleine hoeveelheid dH_2O en overgebracht worden met een kleine pipet naar het device. In dit geval wordt het device best verpakt in een aluminium omhulsel met een kleine pipet.

9. Referentielijst

- Baldwin, J. M. (1976). Structure and function of haemoglobin. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 29(C), 225–320. [https://doi.org/10.1016/0079-6107\(76\)90024-9](https://doi.org/10.1016/0079-6107(76)90024-9)
- Bouatra, S., Aziat, F., Mandal, R., Guo, A. C., Wilson, M. R., Knox, C., Bjorn Dahl, T. C., Krishnamurthy, R., Saleem, F., Liu, P., Dame, Z. T., Poelzer, J., Huynh, J., Yallou, F. S., Psychogios, N., Dong, E., Bogumil, R., Roehring, C., & Wishart, D. S. (2013). The Human Urine Metabolome. *PLOS ONE*, 8(9), e73076. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0073076>
- Channe, R., Manderiya, H., Chauhan, T., Mishra, A., Bhatnagar, P., Puri, A., & Mahalakshmi, N. (2024). Urine. *Fundamentals of Forensic Biology*, 145–155. https://doi.org/10.1007/978-981-99-3161-3_10
- Cottet, J., & Renaud, P. (2020). Introduction to microfluidics. *Drug Delivery Devices and Therapeutic Systems*, 3–17. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819838-4.00014-6>
- Cromartie, R. L., Wardlow, A., Duncan, G., & Mccord, B. (2018). Development of a Microfluidic Device (μ PADs) for Forensic Serological Analysis. *Analytical Methods*. <https://doi.org/10.1039/x0xx00000x>
- Deraney, R. N., Mace, C. R., Rolland, J. P., & Schonhorn, J. E. (2016). Multiplexed, Patterned-Paper Immunoassay for Detection of Malaria and Dengue Fever. *Analytical Chemistry*, 88(12), 6161–6165. <https://doi.org/10.1021/ACS.ANALCHEM.6B00854>
- Dungchai, W., Chailapakul, O., & Henry, C. S. (2010). A low-cost, simple, and rapid fabrication method for paper-based microfluidics using wax screen-printing. *Analyst*, 136(1), 77–82. <https://doi.org/10.1039/C0AN00406E>
- Durnez, G. (2018). *Bloedvlekkentest met tetrabase voor forensische doeleinden*.
- Enevoldsen, B. S. (1978). Degradation of Starch bij Amylase in beer. *Journal of the Japanese Society of Starch Science*, 25(2), 89–99. <https://doi.org/10.5458/JAG1972.25.89>
- Enzyme Alpha-Amylase – Still Spirits*. (n.d.). Retrieved March 28, 2025, from <https://www.stillspirits.com/products/enzyme-alpha-amylase>
- Espinosa, A., Diaz, J., Vazquez, E., Acosta, L., Santiago, A., & Cunci, L. (2022a). Fabrication of paper-based microfluidic devices using a 3D printer and a commercially-available wax filament. *Talanta Open*, 6, 100142. <https://doi.org/10.1016/J.TALO.2022.100142>
- Farrugia, K. J., Bandey, H., Bleay, S., & NicDaéid, N. (2012). Chemical enhancement of footwear impressions in urine on fabric. *Forensic Science International*, 214(1–3), 67–81. <https://doi.org/10.1016/J.FORSCIINT.2011.07.020>
- Federale Gerechtelijke Politie Antwerpen. (2024). *Jaarverslag 2023 - Federale Gerechtelijke Politie Antwerpen*. <https://sway.cloud.microsoft/wpG93lCo4pt5vACA?ref=Link>
- Feliciano, R. P., Shea, M. P., Shanmuganayagam, D., Krueger, C. G., Howell, A. B., & Reed, J. D. (2012). Comparison of Isolated Cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) Proanthocyanidins to Catechin and

- Procyanidins A2 and B2 for Use as Standards in the 4-(Dimethylamino)cinnamaldehyde Assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(18), 4578–4585. <https://doi.org/10.1021/jf3007213>
- Giardina, B., Messina, I., Scatena, R., & Castagnola, M. (1995). The Multiple Functions of Hemoglobin. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 30(3), 165–196. <https://doi.org/10.3109/10409239509085142>
- Gupta, S., & Kumar, A. (2017). The Human Semen. *Basics of Human Andrology*, 163–170. https://doi.org/10.1007/978-981-10-3695-8_11
- Harbison, S., & Fleming, R. (2016). Forensic body fluid identification: state of the art. *Research and Reports in Forensic Medical Science*, 11. <https://doi.org/10.2147/RRFMS.S57994>
- Helmenstine, An. (2022, February 27). *Capillary Action – What It Is and How It Works*. <https://sciencenotes.org/capillary-action-what-it-is-and-how-it-works/>
- Henningson, R. W., & Kosikowski, F. V. (1959). Chemical Stability of Indicators and Substrate-Indicators Used for the Detection of Phosphatase Activity. *Journal of Dairy Science*, 42(8), 1294–1303. [https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302\(59\)90733-7](https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302(59)90733-7)
- Hudson, P. B., & Butler, W. W. S. (1950). A Study of The Enzyme Acid Phosphatase and its Possible Role in Intermediary Carbohydrate Metabolism of the Prostate Gland and its Secretion in Dog and Man. *The Journal of Urology*, 63(2), 323–333. [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(17\)68771-8](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(17)68771-8)
- Identificatie van bloed | Forensicon. (n.d.). Retrieved February 22, 2025, from <https://www.forensicon.nl/identificatie-van-bloed/>
- Kumari, A. (n.d.). *Composition of Semen*.
- Lewis, J., Baird, A., McAlister, C., Siemieniuk, A., Blackmore, L., McCabe, B., O'Rourke, P., Parekh, R., Watson, E., Wheelhouse, M., & Wilson, N. (2013). Improved detection of semen by use of direct acid phosphatase testing. *Science & Justice*, 53(4), 385–394. <https://doi.org/10.1016/J.SCIJUS.2013.04.009>
- Li, X., Ballerini, D. R., & Shen, W. (2012). A perspective on paper-based microfluidics: Current status and future trends. *Biomicrofluidics*, 6(1), 011301. <https://doi.org/10.1063/1.3687398>
- Ludmila, A. (2023). Sodium Chloride as a Swabbing Solution for DNA Collection from Latent Fingerprints. *Journal of Forensic Research*, 15(4).
- Luximon-Ramma, A., Bahorun, T., Crozier, A., Zbarsky, V., Datla, K. P., Dexter, D. T., & Aruoma, O. I. (2005). Characterization of the antioxidant functions of flavonoids and proanthocyanidins in Mauritian black teas. *Food Research International*, 38(4), 357–367. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2004.10.005>
- Moritz, M. L. (2019). Why 0.9% saline is isotonic: understanding the aqueous phase of plasma and the difference between osmolarity and osmolality. *Pediatric Nephrology*, 34(7), 1299–1300. <https://doi.org/10.1007/S00467-018-4084-2/METRICS>

- Musile, G., Wang, L., Bottoms, J., Tagliaro, F., & McCord, B. (2015). The development of paper microfluidic devices for presumptive drug detection. *Analytical Methods*, 7(19), 8025–8033.
<https://doi.org/10.1039/C5AY01432H>
- Nishat, S., Jafry, A. T., Martinez, A. W., & Awan, F. R. (2021). Paper-based microfluidics: Simplified fabrication and assay methods. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 336, 129681.
<https://doi.org/10.1016/J.SNB.2021.129681>
- Ong, S. Y., Wain, A., Groombridge, L., & Grimes, E. (2012). Forensic identification of urine using the DMAC test: A method validation study. *Science & Justice*, 52(2), 90–95.
<https://doi.org/10.1016/J.SCIJUS.2011.07.007>
- Peyrot des Gachons, C., & Breslin, P. A. S. (2016). Salivary Amylase: Digestion and Metabolic Syndrome. *Current Diabetes Reports*, 16(10), 1–7. <https://doi.org/10.1007/S11892-016-0794-7/METRICS>
- Redhead, P., & Brown, M. K. (2013). *The acid phosphatase test two minute cut-off: An insufficient time to detect some semen stains*. <https://doi.org/10.1016/j.scijus.2012.09.004>
- Rick, W., & Stegbauer, H. P. (1974). α -Amylase Measurement of Reducing Groups. *Methods of Enzymatic Analysis*, 885–890. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-091302-2.50074-8>
- Safavieh, M., Ahmed, M. U., & Zourob, M. (2012). Colorimetric assay for urinary track infection disease diagnostic on flexible substrate. <https://doi.org/10.1117/12.2001487>, 8412, 53–58.
<https://doi.org/10.1117/12.2001487>
- Sanquin, & De Praktijk natuurwetenschappelijk onderwijs. (2018). *Bloed en Afweer Naslagwerk*.
- Saxena, S., & Kumar, S. (2015). Saliva in forensic odontology: A comprehensive update. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology : JOMFP*, 19(2), 263. <https://doi.org/10.4103/0973-029X.164549>
- Scott, W. W., & Huggins, C. (1942). The Acid Phosphatase Activity of Human Urine, an Index of Prostatic Secretion1. *Endocrinology*, 30(1), 107–112. <https://doi.org/10.1210/ENDO-30-1-107>
- Sharma, L., Kahandal, A., Kanagare, A., Kulkarni, A., & Tagad, C. K. (2023). The multifaceted nature of plant acid phosphatases: purification, biochemical features, and applications. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 38(1). <https://doi.org/10.1080/14756366.2023.2282379>
- Srivastava, A., Chopra, S. K., & Dasgupta, P. R. (1984). Biochemical Analysis of Human Seminal Plasma II. Protein, Non-Protein Nitrogen, Urea, Uric Acid and Creatine. *Andrologia*, 16(3), 265–268.
<https://doi.org/10.1111/J.1439-0272.1984.TB00281.X>,
- Steinman, G. (1995). Rapid spot tests for identifying suspected semen specimens. *Forensic Science International*, 72(3), 191–197. [https://doi.org/10.1016/0379-0738\(95\)01703-L](https://doi.org/10.1016/0379-0738(95)01703-L)
- Tirimanna, A. S. L. (1972). Acid phosphatases in the tea leaf. *Experientia*, 28(6), 633.
<https://doi.org/10.1007/BF01944944/METRICS>

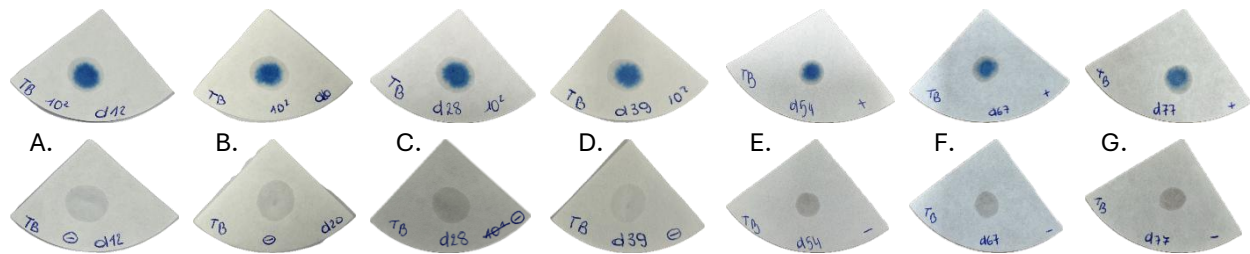
- Upadhyay, M., Shrivastava, P., Verma, K., & Joshi, B. (2023). Recent advancements in identification and detection of saliva as forensic evidence: a review. *Egyptian Journal of Forensic Sciences*, 13(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/S41935-023-00336-3/TABLES/4>
- Virkler, K., & Lednev, I. K. (2009). Analysis of body fluids for forensic purposes: From laboratory testing to non-destructive rapid confirmatory identification at a crime scene. *Forensic Science International*, 188(1–3), 1–17. <https://doi.org/10.1016/J.FORSCIINT.2009.02.013>
- Yang, B., & Bankir, L. (2005). Urea and urine concentrating ability: new insights from studies in mice. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 288(5). <https://doi.org/10.1152/AJPRENAL.00367.2004>

10. BIJLAGEN

10.1. Tetrabasetest

10.1.1. Houdbaarheid reagentia tetrabasetest

Om de werkzaamheid van het TB-reagens na te gaan, werd gedurende 77 dagen een positieve (10^2 -verdunding) en negatieve controle (dH₂O) uitgevoerd. Alle resultaten konden beschouwd worden als uniform. De negatieve controle resulteerde nooit in een blauwe verkleuring. De blauwe verkleuring bij de positieve controle bleef constant.



Figuur 17: Houdbaarheid van tetrabasetest, positieve en negatieve controle na 12 (A), 20 (B), 28 (C), 39 (D), 54 (E), 60 (F) en 74 (G) dagen

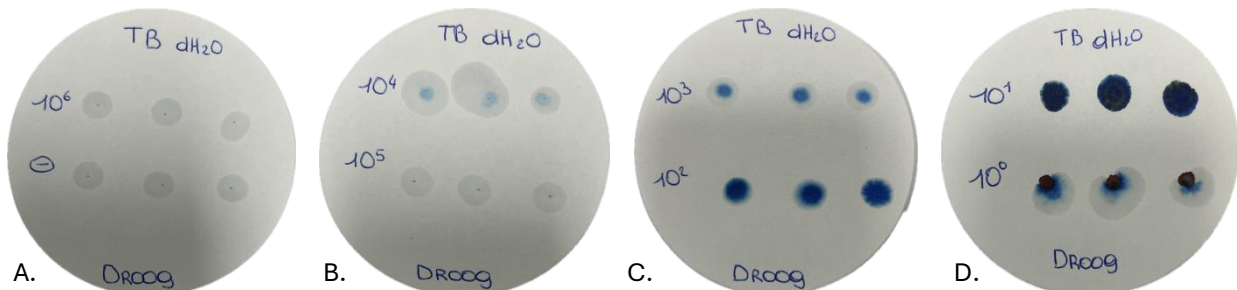
10.1.2. Gevoeligheid tetrabasetest na verloop van tijd

10.1.2.1. Materiaal en methode

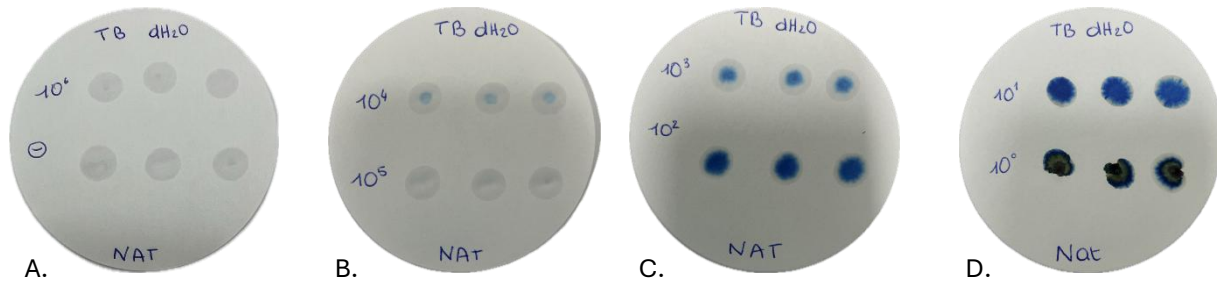
Naast de werkzaamheid van de TB-test was het echter ook belangrijk om op regelmatige basis na te gaan of de test nog de beoogde gevoeligheid bezat. Daarom werden op verschillende, willekeurige dagen, zowel de natte als droge methode uitgevoerd zoals beschreven werd in 6.1.3. Hierbij werd telkens 1,5 μ l van beide reagens aangebracht op een 1,5 μ l gedroogde of natte bloedvlek.

10.1.2.2. Resultaten

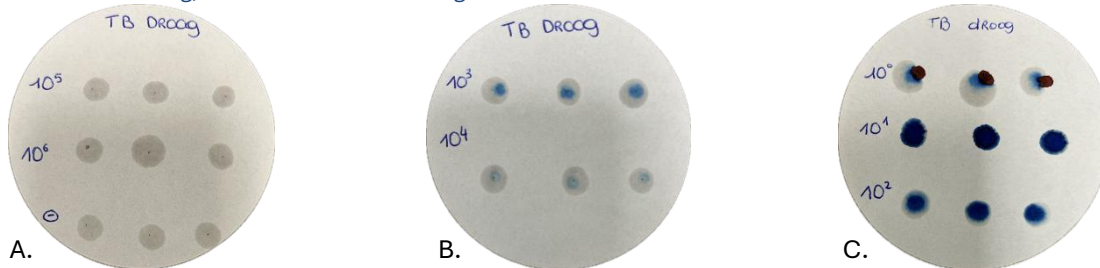
In onderstaande figuren kon een blauwe verkleuring waargenomen worden tot en met een 10^4 -verdunding, ongeacht het tijdstip van het uitvoeren van de testen. Resultaten met een grotere verdunningsfactor en de negatieve controle vertoonden geen verkleuring, dit gold voor zowel de droge als natte methode.



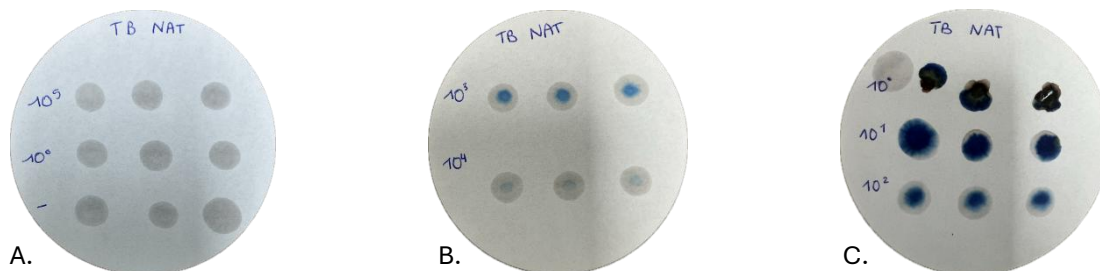
Figuur 18: Gevoeligheidsbepaling tetrabasetest (dag 29) waarbij het bloed verdund werd met gedemineraliseerd water en gespot werd volgens de droge methode (in triplo); A = negatieve controle (dH₂O) en 10^6 verdunning; B = 10^4 en 10^5 verdunning; C = 10^2 en 10^3 verdunning; D = 10^0 en 10^1 verdunning



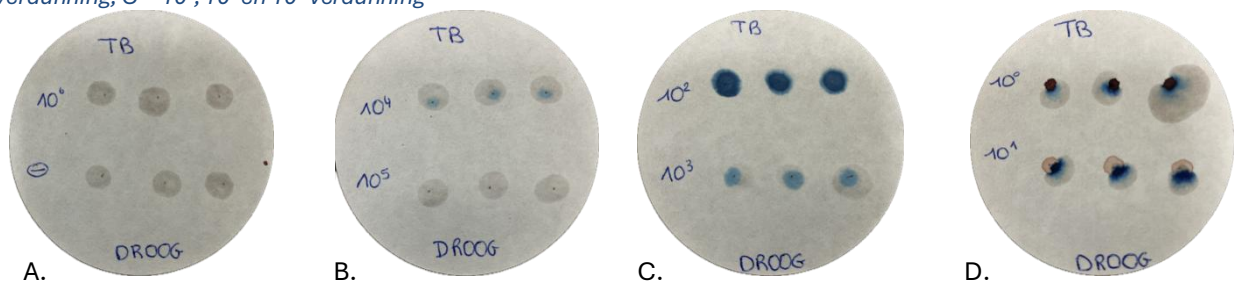
Figuur 19: Gevoeligheidsbepaling tetrabasetest (dag 29) waarbij het bloed verdund werd met gedemineraliseerd water en gespot werd volgens de natte methode (in triplo); A = negatieve controle (dH₂O) en 10⁶ verdunning; B = 10⁴ en 10⁵ verdunning; C = 10² en 10³ verdunning; D = 10⁰ en 10¹ verdunning



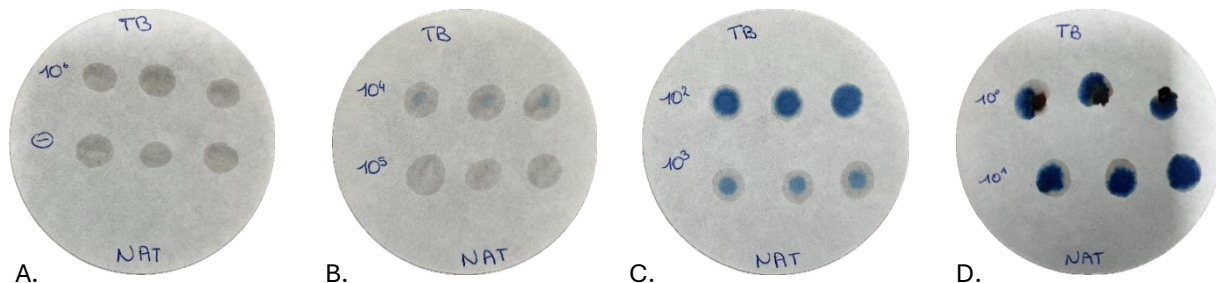
Figuur 20: Gevoeligheidsbepaling tetrabasetest (dag 47) waarbij het bloed verdund werd met gedemineraliseerd water en gespot werd volgens de droge methode (in triplo); A = negatieve controle (dH₂O), 10⁶ en 10⁵ verdunning; B = 10⁴ en 10³ verdunning; C = 10², 10¹ en 10⁰ verdunning



Figuur 21: Gevoeligheidsbepaling tetrabasetest (dag 47) waarbij het bloed verdund werd met gedemineraliseerd water en gespot werd volgens de natte methode (in triplo); A = negatieve controle (dH₂O), 10⁶ en 10⁵ verdunning; B = 10⁴ en 10³ verdunning; C = 10², 10¹ en 10⁰ verdunning



Figuur 22: Gevoeligheidsbepaling tetrabasetest (dag 70) waarbij het bloed verdund werd met gedemineraliseerd water en gespot werd volgens de droge methode (in triplo); A = negatieve controle (dH₂O) en 10⁶ verdunning; B = 10⁴ en 10⁵ verdunning; C = 10² en 10³ verdunning; D = 10⁰ en 10¹ verdunning



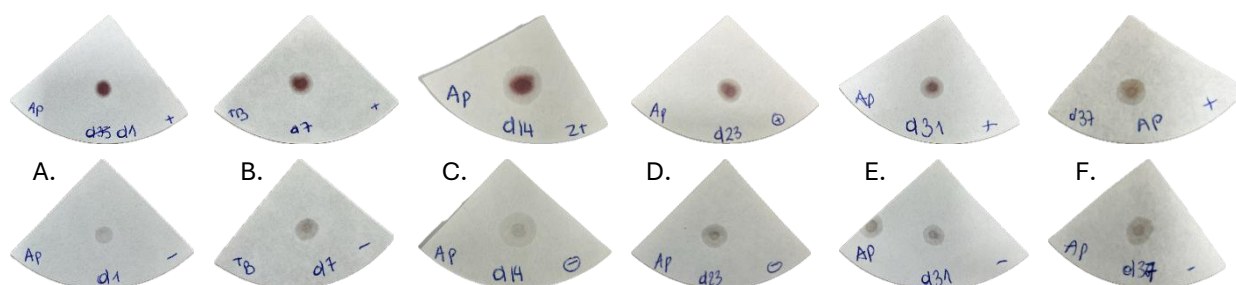
Figuur 23: Gevoeligheidsbepaling tetrabasetest (dag 70) waarbij het bloed verdund werd met gedemineraliseerd water en gespot werd volgens de natte methode (in triplo); A = negatieve controle (dH₂O) en 10⁶ verdunning; B = 10⁴ en 10⁵ verdunning; C = 10² en 10³ verdunning; D = 10⁰ en 10¹ verdunning

10.2. Zure fosfatasetest

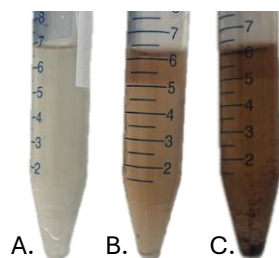
10.2.1. Houdbaarheid reagentia zure fosfatasetest

Om de werkzaamheid van het reagens, gebruikt voor de zure fosfatasetest, na te gaan, werd dagelijks, na de aanmaak, een vereenvoudigde test uitgevoerd. Dit werd gedaan door 1,5 µl positieve controle (zwarte thee) in contact te brengen met 1,5 µl van het AP-reagens op een filterpapier. Eveneens werd een negatieve controle (dH₂O) uitgevoerd.

Opmerkelijk was dat het reagens van een lichtbruine, transparante vloeistof veranderde naar een bruine emulsie (figuur 25). Hierdoor nam de werkzaamheid van de test af. Naarmate de tijd meer verstreek, werd het gekleurde oppervlak, dat een positief resultaat induceerde, steeds kleiner en minder intens. Na 37 dagen kon geen kleurverandering meer waargenomen worden bij een positieve controle. Als gevolg van de kleurverandering van het reagens, kon vanaf dag 7, bruine neerslag waargenomen worden op het filterpapier in het AP-reagens bij de negatieve controle.



Figuur 24: Houdbaarheid van zure fosfatasetest, positieve en negatieve controle na 1 (A), 7 (B), 14 (C), 23 (D), 30 (E) en 37 (F) dagen

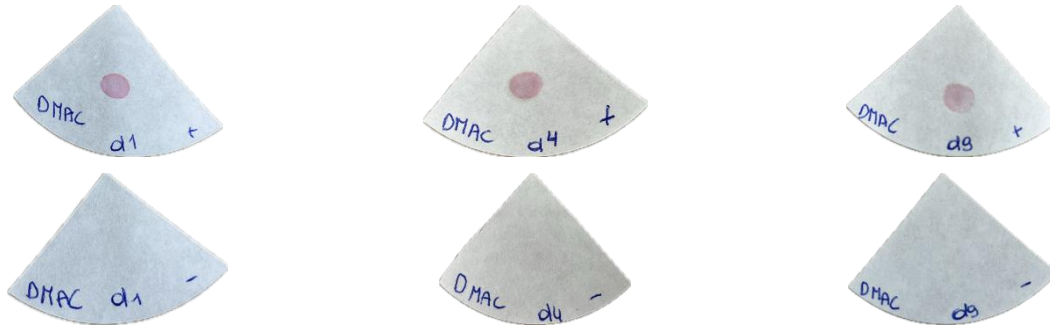


Figuur 25: Verandering AP reagens vanaf dag 0 (A) tot 4 (B) en 7 (C) dagen

10.3. Urine test

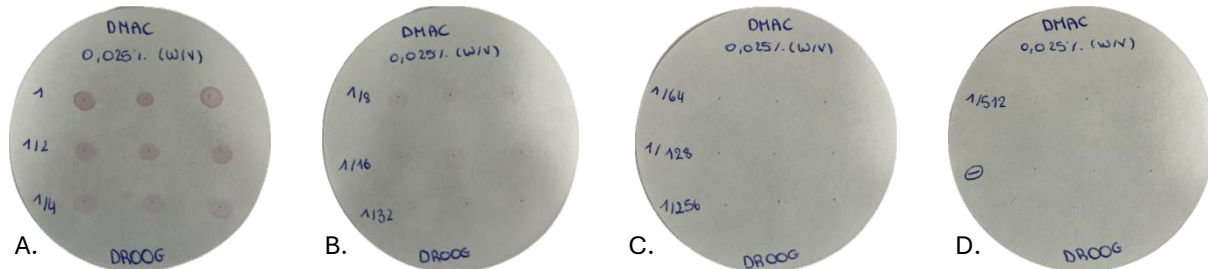
10.3.1. Houdbaarheid DMAC-reagens

De houdbaarheid van de DMAC-test werd eveneens achterhaald door iedere dag een test uit te voeren voor de positieve controle (urine) en een negatieve controle (dH₂O). Aangezien deze test aan het einde van de stage aangemaakt werd, konden slechts metingen genomen worden tot dag 9. Gedurende de 9 dagen nam de kleurreactie niet af in intensiteit.

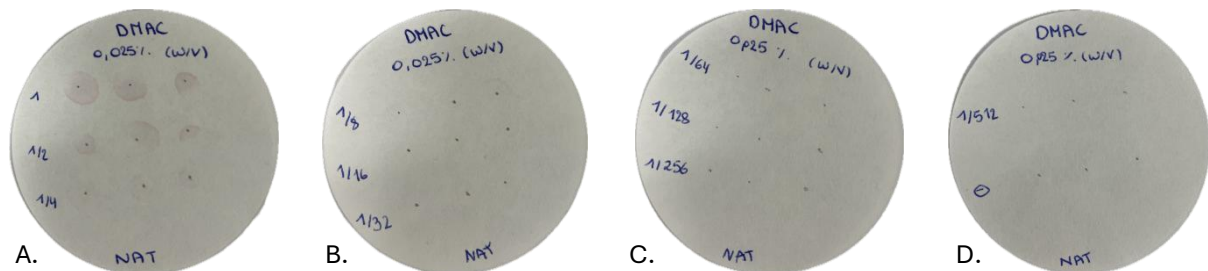


Figuur 26: Houdbaarheid van DMAC-test, positieve en negatieve controle na 1 (A), 7 (B) en 9 (C) dagen

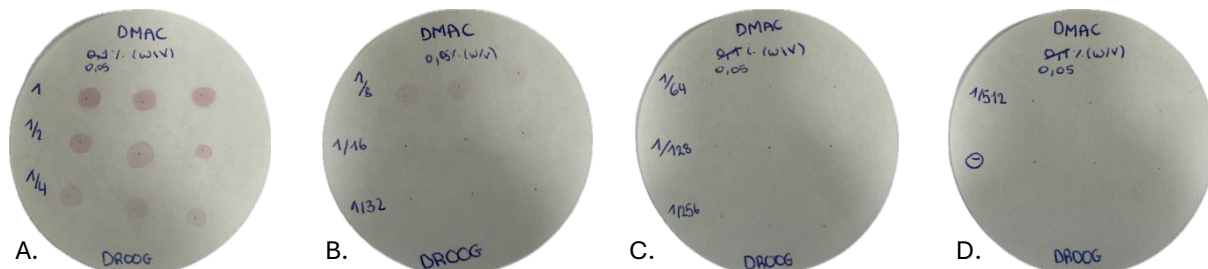
10.3.2. Gevoeligheidsbepaling



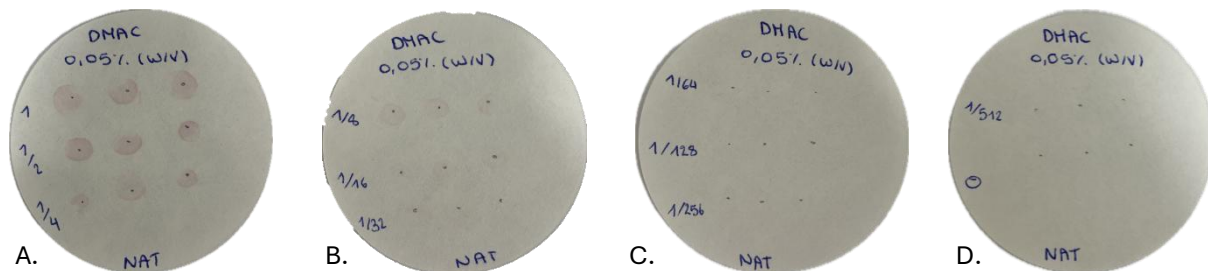
Figuur 27: Gevoeligheidsbepaling DMAC (0,025 % w/v) waarbij het gelegheidsample urine verdund werd met gedemineraliseerd water en gespot volgens de droge methode (in triplo); A = 1/1, 1/2 en 1/4 verdunning; B = 1/8, 1/16 en 1/32 verdunning; C = 1/64, 1/128, 1/256 verdunning; D = 1/512 verdunning en negatieve controle (dH₂O)



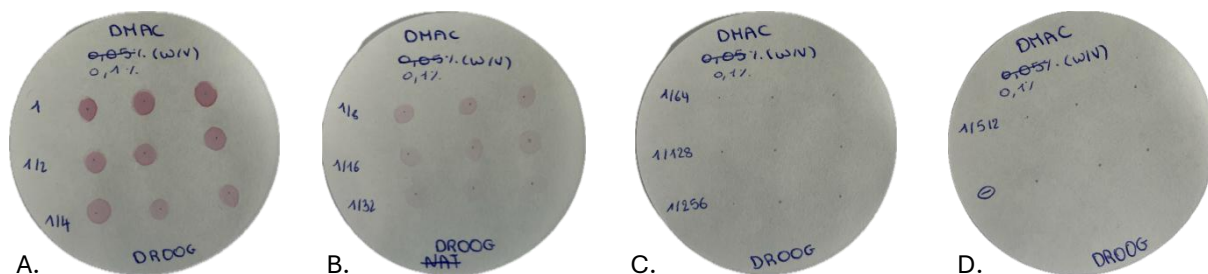
Figuur 28: Gevoeligheidsbepaling DMAC (0,025 % w/v) waarbij het gelegheidsample urine verdund werd met gedemineraliseerd water en gespot volgens de natte methode (in triplo); A = 1/1, 1/2 en 1/4 verdunning; B = 1/8, 1/16 en 1/32 verdunning; C = 1/64, 1/128, 1/256 verdunning; D = 1/512 verdunning en negatieve controle (dH₂O)



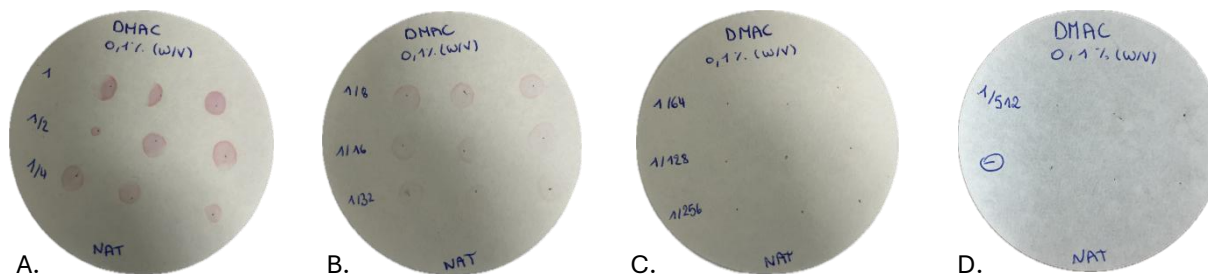
Figuur 29: Gevoeligheidsbepaling DMAC (0,05 % w/v) waarbij het gelegheidsample urine verdund werd met gedemineraliseerd water en gespot volgens de droge methode (in triplo); A = 1/1, 1/2 en 1/4 verdunning; B = 1/8, 1/16 en 1/32 verdunning; C = 1/64, 1/128, 1/256 verdunning; D = 1/512 verdunning en negatieve controle (dH₂O)



Figuur 30: Gevoeligheidsbepaling DMAC (0,05 % w/v) waarbij het gelegheidsample urine verdund werd met gedemineraliseerd water en gespot volgens de natte methode (in triplo); A = 1/1, 1/2 en 1/4 verdunning; B = 1/8, 1/16 en 1/32 verdunning; C = 1/64, 1/128, 1/256 verdunning; D = 1/512 verdunning en negatieve controle (dH₂O)



Figuur 31: Gevoeligheidsbepaling DMAC (0,1 % w/v) waarbij het gelegheidsample urine verdund werd met gedemineraliseerd water en gespot volgens de droge methode (in triplo); A = 1/1, 1/2 en 1/4 verdunning; B = 1/8, 1/16 en 1/32 verdunning; C = 1/64, 1/128, 1/256 verdunning; D = 1/512 verdunning en negatieve controle (dH₂O)



Figuur 32: Gevoeligheidsbepaling DMAC (0,1 % w/v) waarbij het gelegheidsample urine verdund werd met gedemineraliseerd water en gespot volgens de natte methode (in triplo); A = 1/1, 1/2 en 1/4 verdunning; B = 1/8, 1/16 en 1/32 verdunning; C = 1/64, 1/128, 1/256 verdunning; D = 1/512 verdunning en negatieve controle (dH₂O)

10.4. Paper-based devices

Alvorens het uiteindelijke multiplex paper-based device gevormd werd, werden eerst ontwerpen gemaakt, gebruikt en geoptimaliseerd met minder reactievelden. Dit omdat op deze manier fouten vanaf het begin uit het ontwerp gehaald kunnen worden en de testen accurater kunnen verlopen.

10.4.1. Ontwerp en capaciteitsbepaling paper-based devices met één reactieveld

10.4.1.1. Eén reactieveld

Om het te spotten volume te bepalen, werd gebruik gemaakt van de kleurstof Orange G. Hierbij werd het geprinte device slechts éénmaal gelamineerd. De oranje kleurstof zou ervoor zorgen dat de vloeistof zichtbaar doorheen het membraan zou kunnen fungeren. Er werd 7,5 μl , 8,5 μl en 10 μl gespot in het grootste reservoir. Het kleinste reservoir werd voorzien van 1,2 μl oplossing.

Tabel 15: Resultaten eerste poging tot bepalen van het te spotten volume voor testen met één reactieveld

Gespot volume (μl)	Voorkant device	Achterkant device
7,5		
8,5		
10		

Bovenstaande tabel toont de resultaten verkregen bij een eerste onderneming tot het bepalen van het te spotten volume. Er kon waargenomen worden dat de oranje vloeistof zich niet uitsluitend door de opgelegde barrière migreerde. Eveneens werd waargenomen dat de vloeistof zich ook op de papieren ondergrond probeerde te verspreiden. De migratie doorheen het cellulose membraan is te verklaren door het onvoldoende verhitten van de wax, aangebracht met de Xerox printer.

Om net vermelde problemen te vermijden, werd het protocol herschreven. Alvorens nagegaan kon worden wat het ideale aan te brengen volume was, werd het geprinte device op de verwarmplaat gelegd om de impregnatie te optimaliseren. Vervolgens werd de papieren ondergrond vervangen door een plastieken ondergrond. Opnieuw werd een inschatting gemaakt van het aan te brengen volume. De gespotte volumes bedroegen 8, 9, 10, 11, 12 en 13 μl .

Tabel 16: Resultaten tweede poging tot bepalen van het te spotten volume voor testen met één reactieveld

Gespot volume (μl)	Voorkant device	Gespot volume (μl)	Voorkant device	Gespot volume (μl)	Voorkant device
8		10		12	
9		11		13	

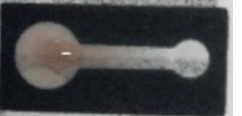
Zoals in bovenstaande tabel waargenomen kon worden, was de volledige oppervlakte pas bedekt vanaf 11 μl . Bij deze test was de vloeistof niet doorheen het membraan gemigreerd. Eveneens was geen overdracht en opname op de ondergrond waar te nemen.

Afgeleid uit bovenstaande resultaten kan besloten worden dat minstens 11 μl van de te onderzoeken stof aangebracht dient te worden.

Toegepast op de tetrabasetest

Met dit resultaat in het achterhoofd werd de TB-test uitgevoerd. Eerder werd al aangetoond dat met 1,2 μl reagens het kleine reservoir gevuld kon worden, dit werd verlaagd naar 1 μl aangezien de fout groter zou zijn als er tweemaal 0,5 μl gespot zou worden voor twee reagentia. Om die reden werd 0,5 μl van zowel reagens 1 als 2 op elkaar aangebracht. Vervolgens werd 11, 12 en 13 μl bloed (10^2) aangebracht op 3 verschillende teststrips.

Tabel 17: Resultaten tetrabasetest met bepaald volume voor één reactieveld

Gespot volume (μl)	Voorkant device	Gespot volume (μl)	Voorkant device	Gespot volume (μl)	Voorkant device
11		12		13	

In bovenstaande tabel kan gezien worden dat het toegevoegde volume het volledige device kan bevochtigen, echter kan ook waargenomen worden dat de roze kleur tot de helft van het device aanwezig was. De reactie vertoonde geen verkleuring. Dezelfde test werd eveneens uitgevoerd waarbij 20 μl van een 10^2 -bloedverdunding werd aangebracht. Hierbij trad een verkleuring op naar een donkerblauwe kleur in het reactieveld.



Figuur 33: Resultaat tetrabasetest met de toevoeging van 20 μl 10^2 -bloedverdunding

Vooropgestelde hypothese veronderstelde dat bij een 10^2 -verdunding een omslag van een kleurloos naar een blauw product zou optreden. Dit is in bovenstaande test niet het geval bij 11, 12 en 13 μl . Dit kan te wijten zijn

aan de roze kleur die niet tot het einde van het device aanwezig was. Die roze kleur is afkomstig van de rode bloedcellen. In die rode bloedcellen zit hemoglobine. Deze hemoglobine zal een reactie aangaan met het kleurloze TB-reagens.

Om een tetrabasetest uit te voeren moet de te onderzoeken stof in een grotere hoeveelheid aangebracht worden op het grootste reservoir. De optimale hoeveelheid bedraagt 20 µl sample. De capaciteit van het kleinste reservoir werd gelijkgesteld aan 1 µl

10.4.1.2. Twee reactievelden

Het device werd na het printen vijfmaal gelamineerd, ingepakt in bakpapier om de complicaties van 10.4.1.1. te vermijden. Achteraf werd het te spotten volume opnieuw bepaald door gebruik te maken van Orange G opgelost in dH₂O. Er werd 25 µl, 30 µl en 35 µl gespot in het grootste reservoir.

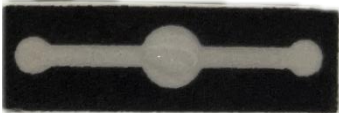
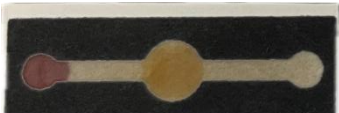
Tabel 18: Resultaten bepalen van het te spotten volume voor testen met twee reactievelden

Gespot volume (µl)	Voorkant device	Gespot volume (µl)	Voorkant device	Gespot volume (µl)	Voorkant device
25		30		35	

Afgeleid uit bovenstaande tabel kon waargenomen worden dat 25 µl sample onvoldoende was om het volledige device te bevochtigen. De overige twee testen hebben voldoende vloeistof om doorheen het volledige membraan te migreren. Met de eerder verkregen resultaten in het achterhoofd, werd beslist om 35 µl te gebruiken zodat er zeker voldoende sample kon reageren met de testvelden.

10.5. Resultaten bewaren

Tabel 19: Resultaten bewaren van devices in diepvries gedurende 10 dagen na de toevoeging van positieve controles

	Positieve controle AP	Positieve controle TB	Negatieve controle
Dag 1			
Dag 3			
Dag 6			
Dag 8			
Dag 10			

10.6. Zetmeel-jodiumtest

Zetmeelverduunning	Jodiumverduunning						
	Verduunning →						
	Concentratie (g/100 ml)	1/32	1/16	1/8	1/4	1/2	1
	↓						
	1						
	0,5						
	0,1						
	0,05						
	0,025						
	0,0125						
	0,00625						
	0,003125						

