



NORGE

(19) [NO]

STYRET FOR DET
INDUSTRIELLE RETTSVERN

[B] (12) **UTLEGNINGSSKRIFT** (11) Nr. 165365

(51) Int. Cl.⁵ G 01 N 33/52, 33/50,
C 12 Q 1/00, 1/54

(83)

(21) Patentsøknad nr. **860487**
(22) Inngivelsesdag 11.02.86
(24) Løpedag 11.02.86
(62) Avdelt/utskilt fra søknad nr.

(71)(73) Søker/Patenthaver **MILES INC.**,
1127 Myrtle Street,
Elkhart, IN 46514, US.

(86) Internasjonal søknad nr. -
(86) Internasjonal inngivelsesdag -
(85) Videreforingsdag -
(41) Alment tilgjengelig fra 27.06.86
(44) Utlegningsdag 22.10.90
(72) Oppfinner **PAUL HEMMES, Wilkhart, IN,**
IBRAHIM A. ISMAIL, Wilkhart,
IN, MARK T. SKARSTEDT, Elkhart,
IN, ADAM ZIPP, Goshen, IN, US.

(74) Fullmektig Bryns Patentkontor A/S, Oslo.

(30) Prioritet begjært 26.02.85, US, nr 705711.

(54) Oppfinnelsens benevnelse **FORSØKSINNRETNING MED HOLDBARHETSKONTROLL.**

(57) Sammendrag Forsøksinnretning for undersøkelse av holdbarhet, hvori holdbarheten av en forsøkssammensetning for bestemmelsen av en anlytt av interesse kan bestemmes ved enkelt å fukte innretningen med vanlig vann. Holdbarhets-forsøksinnretningen kan fremstilles i tre utgaver: En kontroll- eller kalibreringsinnretning, en indre kontrollinnretning og en selv-indikerende innretning. Ureagert anlytt, eller en analog derav, kan inkorporeres i en begrenset definert del av en tørket bærermatrix som er inkorporert med en forsøkssammensetning for å tilveiebringe en forsøksinnretning med indre kontroll. Når den fuktes med vann indikerer en positiv optisk respons, vanligvis farge, at forsøkssammensetningen kan tilveiebringe en holdbar påvisning for anlytten. Forsøksinnretningen med indre kontroll kan spesielt fordelaktig anvendes av diabetikere i hjemmet, hvor en negativ forsøksrespons ellers kunne være forårsaket av den ønskede kontrollen av brukerens betingelser, eller på grunn av nedbrytning av en forsøkssammensetning på grunn av ufordelaktige lagringsbetingelser.

(56) Anførte publikasjoner USA (US) patent nr. 4529704, 4517301, 3920580.

Foreliggende oppfinnelse vedrører en forsøksinnretning med holdbarhetskontroll for bestemmelse av en analytt innbefattende:

a) en bæreratriks; og

b) en reagenssammensetning for bestemmelse av en analytt, inkorporert idet vesentlige uniformt med bæreratriksen, hvor reagenssammensetningen er i stand til å tilveiebringe en detekterbar, optisk respons ved fuktig av den forsøkspreparat-inkorporerte bæreratriksen med en vandig oppløsning av analytten som skal bestemmes.

Enhets-, faststoff-forsøksinnretninger som er nyttige for bestemmelsen av en rekke analytter av diagnostisk interesse benyttes i stort omfang på sykehus, i kliniske laboratorier og på legekontorer. Etter fremstilling forpakkes disse forsøksinnretningene og transporteres bort fra fabrikantens kontrollerte lagringsanlegg. Hver forpakning kan deretter bli utsatt for forskjellige belastninger, som f.eks. varme, fuktighet og lys, som på negativ måte kan påvirke holdbarheten av forsøkspreparatet. Det er derfor ønskelig å ha en forsøksinnretning som på hensiktsmessig måte kan undersøkes av brukeren for å fastslå om forsøkspreparatet fremdeles vil gi en positiv påvisning av den aktuelle analytten. Siden glukose-undersøkelser ofte utføres hjemme av relativt utrenede personer, er det spesielt ønskelig å ha en glukose-forsøksinnretning som gir brukeren en mulighet til å undersøke holdbarheten av preparatet.

Holdbarheten av forsøkspreparater inkorporert med diagnostiske forsøksinnretninger er hittil blitt undersøkt med en separat tilveiebrakt kontroll-sammensetning. Kontroll-sammensetningen inneholder analytten som er reaktiv med forsøkspreparatet eller en analog analytt som lett reagerer med vann, slik at analytten dannes (f.eks. meget lett hydrolyserte estere av den reaktive analytten eller en analog derav). Kontroll-preparatet kan være tilgjengelig i flytende form, klart til bruk, eller i pulverisert form som, etter

165365

2

oppløsning i en forhåndsbestemt mengde vann, danner en
kontrolloppløsning av kjent konsentrasjon. U.S. patent nr.
3,920,580 gir eksempler på flytende kontrolloppløsninger som
er nyttige for bestemmelse av holdbarheten av faststoff-
forsøksinnretningene.

Tilgjengelige er også kontroll-forsøksinnretninger hvori en
bærmatriks er inkorporert med kontroll-sammensetningen.
Kontrollinnretningen avgir en kjent mengde analytt, eller
analog derav, i en forhåndsbestemt mengde vann, eller egnet
oppløsningsmiddel, slik at det dannes en kontrolloppløsning
av kjent konsentrasjon. Et eksempel på en slik kontroll-
forsøksinnretning er vist i U.S. patent nr. 4,234,316.

U.S. patent nr. 4,365,970 beskriver et prøvepreparatglass og
en fremgangsmåte for påvisning av skjult blod. Preparat-
glasset er utformet for anvendelse med fekale prøver.
Preparatglasset består av front- og bakpanel som dekker et
stykke papir impregnert med guajak-indikator. Ved en viss
avstand fra panelåpningen utformet for påføring av prøven,
finnes det et kontrollområde bestående av en positiv og en
negativ kontrollinnretning for hemoglobin. Den positive
kontrollinnretningen er et område impregnert med hemin, den
reaktive delen av hemoglobinet som er analytten av interesse.
Den negative kontrollinnretningen er et definert område av
det guajak-impregnerte papiret som ikke er ment å komme i
kontakt med prøven. Når prøven er påført på preparatglasset
fremkalles forsøkspapiret med en peroksydoppløsning. Den
positive kontrollinnretningen skal utvikle en blå farge og
den negative kontrollinnretningen skal forbli fargeløs;
avvikelser fra dette mønsteret indikerer en nedbrytning av
det guajak-impregnerte papiret. Det guajak-impregnerte
papiret vil ikke tilveiebringe en detekterbar respons når det
bringes i kontakt med vann i nærvær av analytten. Heller
ikke er det indikatorimpregnerte papiret, eller delen av
indikatorpapiret som i tillegg er inkorporert med hemin,
istand til å tilveiebringe en detekterbar respons når de
fuktes med vann.

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer en forsøksinnretning med holdbarhetskontroll av den innledningsvis omtalte typen som er kjennetegnet ved at den videre innbefatter

c) ureagert analytt, eller en analog derav, inkorporert i minst en del av den forsøkspreparat-inkorporerte bærer-matriksen, ved en konsentrasjon som er tilstrekkelig for å tilveiebringe en detekterbar, optisk respons i den dobbelt inkorporerte bærmatriksen ved fukting av matriksen med vann.

Fig. 1 viser to av de mulige konfigurasjonene for en forsøksinnretning for holdbarhet som er nyttig som en indre kontrollinnretning. Fig. 1a viser indre kontrollinnretninger i to konfigurasjoner etter fukting med vann uten analytten. Figur 1b viser de samme forsøksinnretningen etter kontakt med en prøve inneholdende en analytt-konsentrasjon som tilveiebringer en detekterbar respons som er større enn den som tilveiebringes ved analytt-konsentrasjonen innbefattet i matriksen. Dersom den detekterbare responsen er synlig, vil utseendet av den indre kontroll-delen av matriksen (vist stiplet) ikke adskille seg fra utseendet av hele bærmatriksen.

Fig. 2 viser noen mulige konfigurasjoner av en selvindikerende innretning. I figurene 2a-c er det analytt-inkorporerte området synlig, slik det ville være dersom den detekterbare responsen var farge og innretningen var fuktet med vann som ikke inneholdt analytten. Figurene 2a og 2b viser forskjellige mulige konfigurasjoner hvor den enkelte bærer er inkorporert med ureagert analytt ved forskjellige konsentrasjoner og i forskjellige mønstre på bærmatriksen inkorporert med forsøkssammensetningen. Fig. 2c viser flere bærere festet til et enkelt bærende element, hver inneholder en indre kontroll-del av uomsatt analytt ved forskjellige konsentrasjoner. I fig. 2c er analytten inkorporert i form av et tall. Fig. 2d viser innretningen fra 2c etter kontakt med en prøve inneholdende en analytt-konsentrasjon som

165365

tilvelebringer en detekterbar respons større enn den som tilvelebringes av analytt-konsentrasjonen inkorporert i kontrollområde 3, men mindre enn den som tilvelebringes ved konsentrasjonen av analytt inkorporert på kontrollområde 4. Dersom den detekterbare responsen er farge, kan kontrollområde 4 visuelt adskilles fra bakgrunnsresponsen som er utviklet, innenfor den normale avlesningstiden for forsøksinnretningen, på resten av matriksen.

Forsøksinnretningen for undersøkelse av holdbarhet kan tilvelebringes som en kontrollinnretning når den ureagerte analytten er inkorporert i det vesentlige uniformt med hele den forsøkssammensetning-inkorporerte matriksen. Når den ureagerte analytten er inkorporert med en begrenset definert del av den forsøkspreparat-impregnerte bæreren blir innretningen for bestemmelse av holdbarhet en indre kontrollinnretning. Den indre kontrollinnretningen er istand til å tilvelebringe en detekterbar, optisk respons når den fuktes med vann, hvilket indikerer holdbarheten av den inkorporerte forsøkssammensetningen. Det indre kontrollområdet påvirker ikke anvendelsen av en slik innretning ved bestemmelse av analytten i en vandig, flytende prøve. Ved inkorporering av den ureagerte analytten, eller en analog derav, ved forskjellige konsentrasjoner i et stort antall begrenset definerte deler av den forsøkspreparat-inkorporerte matriksen, kan en selv-indikerende innretning tilvelebringes. De inkorporerte analytt-konsentrasjonene kan velges slik at de er klinisk signifikante konsentrasjoner av analytten. En selv-indikerende innretning kan også tilvelebringes ved å forbinde et stort antall interne kontrollinnretninger, hver inkorporert med en forskjellig inkorporert analytt-konsentrasjon, til et bærerelement.

Spesielt tilvelebringer én utførelse av oppfinnelsen en indre kontroll- og selv-indikerende innretning for bestemmelsen av glukose. En slik innretning er spesielt nyttig for det store

antallet diabetiske pasienter som daglig undersøker glukose-nivået i urinen hjemme.

Kommersielt tilgjengelige forsøksinnretninger er ment som éngangsinnretninger. Selv om de fleste innretninger av denne typen er utformet for anvendelse med en spesiell kroppsvæskeprøve, så som urin, blod, serum, saliva eller cerebrospinalvæsker, kan en hvilken som helst vandig prøve undersøkes. Det samme gjelder for innretningene ifølge foreliggende oppfinnelse.

Undersøkelse av en enkelt innretning for påvisning av holdbarhet ved fukting med vann indikerer holdbarheten av forsøkspreparatet inkorporert deri, og ventes å indikere holdbarheten av andre forsøksinnretninger på brukerens hender som er lagret under de samme eller tilsvarende betingelser. F.eks. vil undersøkelse av en holdbarhetsinnretning tatt fra en flaske av tilsvarende innretninger lagret i et medisinskap på badrom, dersom den er positiv, indikere holdbarheten av de andre forsøksinnretningene i flasken. Disse andre innretningene, dersom de er av den indre kontroll- eller selv-indikerende typen, kan dermed benyttes for å bestemme konsentrasjonen av analytt i en vandig prøve.

Forsøksinnretningen med holdbarhetskontroll ifølge oppfinnelsen kan fremstilles ved å inkorporere ureagert analytt, eller en analog derav, med en bæreratriks som er inkorporert med en forsøkssammensetning som er reaktiv med analytten av interesse. Forsøksinnretningen for undersøkelse av holdbarhet kan fremstilles i tre utgaver, avhengig av arealet inkorporert med ureagert analytt, konsentrasjonen av ureagert analytt og konfigurasjonen eller antallet av analyttinkorporerte matriksen som benyttes for en enkelt innretning. Forsøksinnretningen for bestemmelse av holdbarheten indikerer holdbarhet av forsøkssammensetningen når en detekterbar respons dannes når innretningen fuktes med vanlig vann eller en vandig prøve som ikke inneholder analytten av interesse.

Dersom forsøkssammensetningen er ødelagt, slik at den ikke lenger kan produsere en respons på analytten, vil det ikke forekomme noen detekterbar respons når innretningen fuktes med vann. Nærværet av denne detekterbare responsen er en positiv indikasjon på at forsøksinnretningen, og også enhver forsøksinnretning lagret sammen med denne, kan tilveiebringe en holdbarhetspåvisning for analytten. Når en hjemmebruker bringer en prøve i kontakt med en diagnostisk forsøksinnretning er den foretrukne "normal"-indikasjonen ofte en negativ eller en "intet innhold av analytt" respons. Dette gjelder spesielt for diabetikere hvor normale urinkonsentrasjoner av glukose skal være svært lave. Med de nåværende innretninger vil hjemmebrukeren ofte undre seg på om prøven virkelig var ekte negativ, som ønsket, eller om den diagnostiske forsøksinnretningen var ødelagt på grunn av lagringsbetingelser og ikke lenger istand til å tilveiebringe en detekterbar respons.

Innretningen for bestemmelse av holdbarhet kan fremstilles som en kontrollinnretning ved å inkorporere i det vesentlige hele den forsøkspreparat-inkorporerte bæreren med den ureagerte analytten eller en analog derav. En slik forsøksinnretning kan være inkorporert i en flaske eller et større antall vanlige omsatt diagnostiske forsøksinnretninger som inneholder bare forsøkspreparatet, som vil bli lagret under tilsvarende betingelser av den endelige brukeren. Undersøkelse av denne kontroll-forsøksinnretningen ved å bringe den i kontakt med vann og observere den detekterbare responsen visuelt eller instrumentelt, forsikrer brukeren om at andre innretninger, innkjøpt samtidig og lagret under tilsvarende betingelser, vil tilveiebringe en holdbar påvisning av analytten av interesse.

En spesielt hensiktsmessig utførelse av holdbarhetsforsøksinnretningen er en intern kontrollinnretning, hvori den ureagerte analytten eller en analog derav er inkorporert med en begrenset definert del av den forsøkssammensetning-

inkorporerte bæreren. Brukeren kan være forsikret om at båndet tilveiebringer en holdbar påvisning av analytten siden en detekterbar respons dannes i en definert begrenset del av innretningen, selv når den fuktes av en negativ prøve dersom forsøkssammensetningen er holdbar. En indre kontrollforsøksinnretning kan benyttes som en diagnostisk forsøksinnretning fordi den inkorporerte analytten, eller en analog av analytten, ikke påvirker innretningens evne til å analysere en vandig prøve.

En selv-indikerende forsøksinnretning kan også fremstilles ifølge foreliggende oppfinnelse. En forsøkssammensetning-inkorporert bærer kan inkorporeres med analytten, eller en analog derav, i én eller flere konsentrasjoner, på separate definerte deler av bæreren. Selv om den selv-indikerende innretningen kan virke som en holdbarhetsforsøksinnretning, kan den tilveiebringe langt mer informasjon. Når den bringes i kontakt med en prøve inneholdende analytten kan konsentrasjonsområdet for analytten bestemmes ved å sammenligne den detekterbare responsen dannet i, i det vesentlige, hele innretningen med responsen i de områdene som er inkorporert med analytten, eller en analog derav. Den selv-indikerende innretningen er spesielt nyttig når den detekterbare optiske responsen er farge, slik at responsene kan bestemmes visuelt. En slik innretning kan med fordel anvendes for å tillate øyeblikkelig fastsettelse av det normale kliniske området for analytten.

En selv-indikerende innretning kan også fremstilles ved å benytte flere indre kontroll-matrikser festet til en enkelt bærerdel. Ureagert analytt kan inkorporeres på et begrenset definert område av hver matriks, i forskjellige konsentrasjonsnivåer. Når innretningen bringes i kontakt med en prøve kan konsentrasjonsnivået av prøven bedømmes til å ligge mellom den høyeste inkorporerte analytt-konsentrasjonen hvori den detekterbare responsen i kontrollområdet hovedsakelig ikke kan skilles fra resten av den omsatte matriksen og

inkorporert analytt-konsentrasjon av matriksen hvori den detekterbare responsen i kontrollområdet kan skilles fra den detekterbare responsen fra bakgrunnen.

5 Det finnes mange diagnostiske analytter som undersøkes rutinemessig i kliniske laboratorier. Generelt innbefatter disse kroppsanalytter, mikroorganismer, toksiner og legemidler. Kroppsanalytter av interesse innbefatter kolesterol og triglyserider, hvite blodceller, røde blodceller, ketoner, 10 urea, urinsyre, proteiner og glukose. Nærværet av et overskudd av en hvilken som helst av disse analyttene i visse kroppsvæsker indikerer anormale kroppsfunksjoner. På samme måte kan tilstedeværelsen eller fraværet av visse enzymer som normalt finnes i kroppen benyttes som en indikasjon på 15 anormal kroppsfunksjon. Vanlige enzymanalytter innbefatter laktat-dehydrogenase; kreatinin-kinase, glutaminsyre-oksalddiksyre-transaminase og glutaminsyre-pyrodruesyre-transaminase. Det er også blitt stadig vanligere å undersøke kroppsnivåene av visse terapeutiske legemidler så som 20 teofyllin, fenobarbital og litium, og narkotiske stoffer som morfin, heroin og marijuana.

I tillegg til analyttene av interesse innenfor det medisinske området er andre analytter, så som toksiner og gjødningsstoff-komponenter, av spesiell interesse for miljøundersøkelser. 25 En forsøksinnretning for undersøkelse av holdbarhet har spesiell anvendelse når undersøkelsen er sporadisk og/eller forsøksinnretningene lagres i lange tidsrom under ikke-ideelle lagringsbetingelser.

30 Selv om store klasser av analytter kan bestemmes med enhetsforsøksinnretninger i fast tilstand og inkorporeres med slike forsøksinnretninger til dannelsen av forsøksinnretninger for holdbarhet, er diagnostiske forsøksinnretninger for kroppsvæske-analytter mest utbredte og er følgelig de analyttene 35 som benyttes i eksemplene i foreliggende beskrivelse. F.eks. er en vanlig diagnostisk påvisning bestemmelsen av

glukosenivået i blod eller urin. De på det nåværende tidspunkt tilgjengelige glukose-påvisningsinnretningene er basert på en forsøkssammensetning innbefattende glukose-oksydase og et indikatorsystem så som peroksydase og et indikatorsystem så som peroksydase og kromogen indikator. Siden glukose-oksydase er reaktiv bare med en spesiell form av glukose, β -D-glukose, må holdbarhetsforsøksinnretningen innbefatte den formen, eller en analog derav, som analytt, eller glukosen må være inkorporert på en måte som tillater mutarotasjon til den påkrevde formen. Dersom en blanding av α - og β -D-glukose er inkorporert i oppløsning eller suspensjon, må man omhyggelig velge et oppløsningsmiddel som tillater den nødvendige mutarotasjonen eller som støtter β -formen. Egnede oppløsningsmidler innbefatter dimetylformamid, pyridin, 2-metoksyetanol og metoksy-2-propanol.

Den ureagerte analytten, eller en analog derav, må være inkorporert med bærermatrixen i en konsentrasjon som er tilstrekkelig til å tilveiebringe en detekterbar optisk respons når innretningen fuktes med ledningsvann eller destillert vann som ikke inneholder analytten.

Den detekterbare responsen kan være fluorescens eller farge. Formen av den optiske responsen er avhengig av reaksjonsmekanismen for forsøkssammensetningen og ikke av analytten som er inkorporert deri. I en foretrukket utførelse er den optiske responsen farge som kan detekteres i innretningen visuelt eller ved reflektansavlesning med et spektrofotometer så som "Ames Seralyzer reflectance photometer" tilgjengelig fra Miles Laboratories, Inc., Elkhart, Indiana.

Forsøksinnretningene som er utformet for å bestemme en spesiell analytt er ofte basert på kinetiske reaksjoner hvor et kolorimetrisk slutt punkt bestemmes en angitt tid etter kontakt med prøven. Dette tidspunktet, kalt den normale avlesningstiden for forsøksinnretningen ifølge oppfinnelsen, velges vanligvis ved et tidspunkt som tilveiebringer den

165365

10

største fargeadskillelsen med konsentrasjonsnivåene av prøve-analytt som innretningen er utformet for å bestemme. Den inkorporerte, ureagerte analytten ifølge foreliggende oppfinnelse bør tilveiebringe en detekterbar, optisk respons innenfor den normale avlesningstiden for bæreren inkorporert med forsøkssammensetningen. F.eks. har en glukose-påvisningsinnretning som nå er tilgjengelig, en normal avlesningstid på mindre enn ca. 2 minutter, fortrinnsvis 1 minutt eller mindre.

Bærermatriksen kan være et hvilket som helst stoff som er istand til å inkorporeres med komponentene av forsøkssammensetningen, så lenge som det er i det vesentlige inert med hensyn til forsøkssammensetningen, porøst og/eller absorberende overfor den vandige prøven som skal undersøkes. Uttrykket "bærermatriks" refererer til enten absorberende eller ikke-absorberende matrikser som er uoppløselige i, og opprettholde sin strukturelle integritet, når de eksponeres for vann eller for andre fysiologiske væsker. Egende absorberende matrikser som kan benyttes innbefatter papir, cellulose, tre, syntetisk harpiks, ull, vevde og uvevde stoff o.l. Ikke-absorberende matrikser innbefatter glassfiber, polymerfilmer, fordannede eller mikroporøse membraner og organo-plastmaterialer som polypropylen o.l.

Det skal derfor bemerkes at ved fremstillingen av en forsøksinnretning ifølge foreliggende oppfinnelse kan alle slike bærermatrikser anvendes, såvel som andre matrikser. Matriksen kan innbefatte et system som fysisk omslutter en hvilken som helst av, eller alle disse bestanddelene, så som polymere mikrokapsler som brytes ved kontakt med en vandig oppløsning. F.eks. kan den ureagerte analytten holdes separert fra forsøkssammensetningen inne i den samme bærermatriksen uten vekselvirkning inntil matriksen bringes i kontakt med en vandig prøve. Matriksen kan også innbefatte et lagformet system hvori hver komponent av sammensetningen er homogent kombinert i en flytende eller halvflytende

tilstand, som senere herder, derved omsluttet bestanddelen inntil fukting med en vandig prøve. Andre matriksutførelser kan anvendes, innbefattet anvendelsen av kommersielt tilgjengelige, på forhånd fremstilte, porøse membraner eller mikroporøse membraner dannet ved teknikker som fase-inversjon. Polymerfilm-matrikser, så som filmer fremstilt av latekssammensetninger basert på latekspolymer-suspensjoner, f.eks. kopolymeren av styren og butadien i forholdet 60:40, eller andre naturlige eller syntetiske polymerer eller blandinger derav. Eksempler på slike filmsammensetninger kan finnes i U.S. patent nr. 3,630,957 og 4,312,834.

En enhets-forsøksstrimmel eller forsøksinnretning i fast tilstand kan fremstilles ved inkorporering av en bærer-matriks, med tørking mellom inkorporeringstrinnene. Når en hel blodprøve undersøkes, kan en forsøkspreparat-inkorporert bærer belegges for å tillate at overskytende prøve kan vaskes eller tørkes av før inkorporering av den ureagerte analytten.

Inkorporering av forsøkspreparatet kan utføres ved en hvilken som helst fremgangsmåte så som utspredning, spraying eller dypping, en prosess som ofte kalles impregnering, som tillater bærer-matriksen å inkorporeres med en holdbar forsøkssammensetning som er reaktiv med analytten av interesse.

Analytten, eller en analog derav, som er reaktiv med forsøkspreparatet, kan inkorporeres med den forsøkspreparat-inkorporerte bærer-matriksen ved en hvilken som helst fremgangsmåte som vil forhindre for tidlig vekselvirkning med forsøkspreparatet, men tillate i det vesentlige øyeblikkelig vekselvirkning mellom analytten og forsøkspreparatet når bæreren fuktes med vann. Dette kan utføres på en rekke måter, innbefattet mikro-innkapsling av analytten og avsetning på den tørkede bæreren som på forhånd er inkorporert med forsøkspreparatet; vanlige anvendte trykketeknikker så som jet-trykking; eller ved kontrollert avsetning

av en oppløsning eller suspensjon av analytten, eller en reaktiv analog derav, i et tørket, ikke-vandig organisk oppløsningsmiddel. Dersom oppløsningen eller suspensjonen inkorporeres i det vesentlige uniformt med hele den tørkede forsøkspreparat-inkorporerte bæreren dannes en holdbarhets-
5 forsøksinnretning som er nyttig som en kontroll- eller kalibreringsinnretning.

En forsøksinnretning som er nyttig for undersøkelse av holdbarhet som en indre kontrollinnretning, kan dannes ved
10 inkorporering av ureagert analytt, eller en analog derav, med en begrenset definert del av den tørkede forsøkspreparat-inkorporerte bæreren. Inkorporering kan utføres ved en hvilken som helst av fremgangsmåtene angitt ovenfor. Selv om
15 man tidligere mente at kapillarvirknigen av en bærer, spesielt en papirbærer, ville spre den ureagerte analytten over hele matriksen, er det funnet at en oppløsning eller suspensjon kan kontrolleres, slik at den tillater inkorporering med et begrenset definert område etter ønske.
20 Oppløsningen eller suspensjonen kan plasseres på den tørkede bæreren med en sprøyte, pipette e.l. innretning som er istand til å avlevere en kontrollert mengde av oppløsning eller suspensjon.

Det er spesielt foretrukket å inkorporere analytten, eller en analog derav, i en oppløsning, siden konsentrasjonen av analytten som er inkorporert lettere kan kontrolleres når en ekte oppløsning benyttes. I ethvert tilfelle, enten en oppløsning eller en suspensjon benyttes, må det legges vekt
25 på anvendelse av ikke-vandige organiske oppløsningsmidler som er tørket (dvs. er frie for vann). Dersom vann fremdeles finnes i oppløsningsmiddelet kan den forsøkspreparat-inkorporerte bæreren fuktes under inkorporeringen av analytten og forårsake for tidlig vekselvirkning mellom
30 forsøkspreparatet og analytten. Fremgangsmåter for tørking av organiske oppløsningsmidler er velkjente for organiske kjemikere.

Arealet for inkorporering av den ureagerte analytten kan være av en hvilken som helst hensiktmessig geometrisk form, f.eks. halvparten av matriksen, en bokstav, eller tall eller et punkt. Det er foretrukket at den indre kontroll-delen er en fin kontrasterende linje eller et lite punkt på matriksen for at den optiske responsen av den indre kontrollen ikke skal påvirke den optiske responsen i resten av innretningen når innretningen benyttes med en vandig, flytende prøve som en påvisning for bestemmelsen av den aktuelle analytten.

Konsentrasjonen av inkorporert, ureagert analytt kan velges etter ønske. Det er foretrukket å velge en lav konsentrasjon av analytt som vil tilveiebringe en detekterbar, optisk respons når den fuktes med vann, men hvis respons blir i det vesentlige uadskillelig fra forsøkspreparat-responsen ved kontakt med en prøve som inneholder en analytt-konsentrasjon som er tilnærmet lik eller høyere enn konsentrasjonen av den inkorporerte analytten.

En selv-indikerende innretning kan dannes ved inkorporering av to eller flere begrensede, definerte deler av en forsøkspreparat-inkorporert bærer med forskjellige ureagerte analytt-konsentrasjoner. Av praktiske grunner, på grunn av størrelsen av forsøksinnretningene som normalt anvendes, kan en enkelt bærer-matriks fortrinnsvis være inkorporert med to forskjellige konsentrasjoner av ureagert analytt ved forskjellige definerte områder av den tørkede bæreren. Dersom flere konsentrasjonsmarkører er ønsket kan en større bærer benyttes, eller flere bærere, hver inkorporert med en forskjellig konsentrasjon av ureagert analytt, festes til et bære-element, slik at det tilveiebringes en enhets-forsøksinnretning.

Med en analytt av klinisk interesse er det spesielt foretrukket at den optiske responsen som tilveiebringes av konsentrasjonene som benyttes svarer til den optiske responsen av klinisk signifikante konsentrasjoner, så som den nedre og

165365

øvre enden av det såkalt normale kliniske området for analytten; dette gir brukeren en rask, hensiktsmessig indikasjon på om ytterligere undersøkelse er påkrevet. Konsentrasjonen av analytten må velges omhyggelig for å tilveiebringe en detekterbar, optisk respons som er ekvivalent med den som sees i en klinisk prøve. Denne konsentrasjonen kan bestemmes eksperimentelt og ligger vanligvis meget nær, men noe under, den konsentrasjonen av analytt som ønskes i en klinisk prøve.

F.eks. kan det være ønskelig å ha en selv-indikerende innretning for glukosenivået i urin, fremstilt slik at brukeren vil vite om prøveverdiene som oppnås ligger innenfor et spesifikt område, f.eks. 30 til 100 mg/dl. Vanlig tilgjengelige glukoseforsøksinnretninger består generelt av en bæreratriks inkorporert med glukose-oksydase og et indikatorsystem så som peroksydase og 3,3',5,5'-tetrametylbenzidin. Den selv-indikerende forsøksinnretningen kan fremstilles ved inkorporering av en slik glukoseforsøksinnretning med en lav konsentrasjon av analytt som tilveiebringer en detekterbar, optisk respons når den fuktes med vann. Når en andre innretning fremstilt på denne måten bringes i kontakt med en urinprøve som inneholder 30 milligram pr. desiliter (mg/dl) glukose er den optiske responsen uadskillelig fra responsen i hele innretningen, innenfor den normale avlesningstiden for den forsøkspreparat-inkorporerte matriksen. En andre inkorporert analytt-konsentrasjon ville tilveiebringe en respons som er detekterbar ved fukting med vann, men som er uadskillelig fra responsen i hele innretningen i den normale avlesningstiden, når en andre innretning er konstruert for å bringes i kontakt med en prøve som inneholder mer enn 100 mg/dl glukose. Dersom følgelig begge kontrollområdene er synlige inneholder prøven mindre enn 30 mg/dl glukose; dersom ett kontrollområde er synlig inneholder prøven en glukosekonsentrasjon innenfor det angitte området; og dersom ingen av kontrollområdene er synlige inneholder prøven en konsentrasjon av glukose som

ligger over det angitte området. I det sistnevnte tilfellet kan behandling og/eller ytterligere undersøkelse være påkrevet.

5 Tørrking av matriksen etter inkorporeringen av den ureagerte analytten eller en analog derav, kan utføres ved hjelp av en hvilken som helst innretning som ikke i negativ retning påvirker den inkorporerte, ureagerte analytten eller forsøkspreparatet, vanligvis ved hjelp av en luftfylt ovn.
10 Det tørkede papiret kan deretter skjæres og monteres på den ene enden av en bærerdell, f.eks. et stivt eller halvstivt polystyren-filmbånd. Montering av papiret på båndet kan utføres ved hjelp av et dobbeltklebende limbånd, f.eks. båndet tilgjengelig fra 3M Company, under betegnelsen "Double
15 Stick". Bærerelementet tilveiebringer et hensiktsmessig håndtak som letter anvendelsen av innretningen.

De følgende eksemplene beskriver forsøk som ble utført ved utviklingen av foreliggende oppfinnelse. Fagmannen vil være
20 istand til å foreta variasjoner, substitusjoner og endringer i sammensetningen, bestanddelene og reaksjonsparametrene der hvor dette kan synes ønskelig.

Følgende forkortelser er anvendt i eksemplene:

25	mg	-	milligram
	dl	-	desiliter
	μl	-	mikroliter
	mg	-	milligram
30	M	-	molar
	d	-	tetthet
	g/cm ³	-	gram pr. kubikkcentimeter
	°C	-	grader Celsius
	mg/dl	-	milligram pr. desiliter
35			

165365

Eksempel 1: Innretning med indre kontroll for glukosepåvisning.

Glukose kan inkorporeres med en bærermatrix som på forhånd er inkorporert med en glukose-forsøkssammensetning, enten i
5 form av en oppløsning eller en suspensjon av glukose.

a. Suspensjon

Glukose ble pulverisert til et fint pulver i en morter. En
blanding av heksan (tetthet = $0,66 \text{ g/cm}^3$) og dibrommetan
10 (tetthet = $2,50 \text{ g/cm}^3$) ble fremstilt som hadde tilnærmet
samme tetthet som glukosekrystallene. Krystallene kunne så
suspenderes lett for hånd ved virvelblanding, slik at det ble
dannet en suspensjon som sedimenterte meget langsomt, om
overhodet. En 30 mikroliter (μl) prøve av suspensjonen ble
15 plassert som et lite punkt med en pipette på en glukosefor-
søksinnretning utformet for bestemmelse av glukose i serum
eller helt blod. Glukoseforsøksinnretningen var et kommer-
sielt tilgjengelig glukosepåvisningsbånd av typen "Seralyzer"
som innbefatter en forsøkssammensetning som er reaktiv med
20 glukose: glukose-oksydase, peroksydase og 3,3',5,5'-
tetrametylbenzidin. Ingen synlig endring fant sted når den
ureagerte analytten ble inkorporert. De analytt-inkorporerte
innretningene ble deretter tørket ved 45°C i 6 minutter i en
luftfylt ovn. Etter tørking viste de indre kontrollområdene
25 en synlig kolorimetrisk reaksjon når innretningen ble fuktet
med 30 μl vanlig vann.

b. Oppløsning

En papirbærermatrix ble inkorporert med en glukoseforsøks-
30 sammensetning innbefattende glukose-oksydase, peroksydase og
3,3',5,5'-tetrametylbenzidin, i konsentrasjoner utformet for
bestemmelse av uringlukose og tørket. En fargeløs oppløsning
inneholdende ca. 100 mg/dl glukose i metoksy-2-propanol ble
påført på den tørkede bæreren som et lite punkt i sentrum av
35 matriksen med en sprøyte under lufttrykk, og bæreren ble
igjen tørket. Glukoseoppløsningen som ble benyttet ga en
detekterbar optisk respons når den ble fuktet med vann,

svarende til responsen i hele matriksen når en annen innretning ble brakt i kontakt med en prøve inneholdende 100 mg/dl glukose. Denne konsentrasjonen tilveiebrakte utviklingen av farge i løpet av 1 minutt etter at innretningen var dyppet i vann, den normale avlesningstiden for glukoseforsøksinnretningen. Når innretningen ble dyppet i en vandig prøve inneholdende ca. 30 mg/dl glukose viste innretningen en total farge, svarende til konsentrasjonen av 30 mg/dl på det aktuelle fargekartet, med et lite punkt av en mørkere farge i det indre kontrollområdet. Dette resultatet ville indikere for brukeren at den lave avlesningen virkelig er korrekt, ikke en misvisning som skyldes lav reaktivitet av en forsøksinnretning hvori forsøkssammensetningen er blitt nedbrutt på grunn av lagringsbetingelsene eller andre belastninger.

Tilsvarende resultater ble oppnådd når en oppløsning av glukose i pyridin ble påført på en tørket glukose-forsøksinnretning i form av en inkorporert papirmatriks med en pipette.

Eksempel II: Innretninger for urea-påvisning med indre kontroll.

Reagensrenhet av guanidin-hydroklorid, en analog av urea, nedmales til et fint pulver med en morter og pistill. Ifølge Merck-indeksen er tettheten av fast guanidin-hydroklorid 1,32 g/cm³. Ved å anvende formelen:

$$d_{\text{heksan}} X_{\text{heks}} + d_{\text{DEM}} (1 - X_{\text{heks}}) = d_{\text{faststoff}}$$

hvor:

$$d_{\text{heksan}} = \text{tetthet av heksan} = 0,669/\text{cm}^3$$

$$d_{\text{DEM}} = \text{tetthet av dibrommetan} = 2,509/\text{cm}^3$$

$$X_{\text{heks}} = \text{molfraksjon av heksan i flytende blanding}$$

kan andelen av heksan i heksan/dibrommetan-blandingen beregnes, slik at den er lik tettheten av guanidin-hydro-

165365

klorid. En blanding av denne sammensetningen fremstilles og guanidinet suspenderes i den. En 30 µl prøve av suspensjon plasseres som et lite punkt på hvert av et antall av "Seralyzer" blod-urea-nitrogen (BUN) reagensbånd med en pipette. "Seralyzer" BUN innretningen er en papirmatriks inkorporert med en forsøkssammensetning innbefattende o-ftalaldehyd og en ioneveksler-harpiks som gir en lav pH når en prøve som inneholder natriumklorid påføres. Innretningene tørkes deretter i en ovn ved 45°C i ca. 6 minutter. Det indre kontrollpunktet av guanidin-hydroklorid vil bli mørkt blågrønt når innretningen fuktes med vann.

Eksempel III: Innretning for urinsyrepåvisning med indre kontroll.

Urinsyre fra Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, ble omsatt med ca. 0,1 M litiumhydroksyd. Litiumsaltet av urinsyre ble krystallisert fra vann ved inndampning og tørket i en eksikator i 2 dager over silikagel. Det tørkede silisiumuratet ble finmalt og deretter suspendert i en heksan-dibrommetanblanding ved følgende fremgangsmåte. Siden tettheten av analytten var ukjent ble noe faststoff tilsatt til dibrommetanen. Heksan ble deretter tilsatt dråpevis inntil man fikk en oppløsningsmiddelblanding hvori det faste stoffet viste tendens til å suspenderes uten å flyte eller synke. Den resulterende suspensjonen (30 µl) ble plassert på "Seralyzer" urinsyre-reagensbånd (tilgjengelig fra Miles Laboratories, Inc., Elkhart, Indiana 46515) som et lite punkt med en pipette og tørket i en ovn ved 45°C i 6 minutter. "Seralyzer" urinsyre-påvisningen er en papirmatriks inkorporert med en forsøkssammensetning som er reaktiv med urinsyre innbefattende urikase, 4-aminoantipyren, 3-metyl-2-benzotiazolinon og buffere. Det resulterende indre kontrollområdet ble mørkt rødt når det ble fuktet med vanlig vann. Urinsyre-analogen, litiumuratet, ble benyttet fremfor den frie syren fordi dets høyere oppløselighet lettet vekselvirkningen mellom kontrollsammensetningen og prøvesammensetningen når innretningen ble fuktet.

Eksempel IV: Forsøksinnretning for keton med indre kontroll. Metanol ble fortørket i 2 dager over molekylarsikter ("13X" tilgjengelige fra Alfa, Danvers, MS) og deretter filtrert. Metanolen ble deretter benyttet til å fremstille en oppløsning av 120 mg/dl natrium-metylacetoacetat. En 0,5 µl prøve av metanoloppløsningen ble pipettert på et "Ketostix" reagensbånd, kommersielt tilgjengelig fra Miles Laboratories, Inc., Elkhart, IN. "Ketostix" er en papirmatriks inkorporert med en forsøkssammensetning innbefattende magnesiumsulfat og natrium-blåsyresalt. Det innførte kontrollområdet forelå i form av et lite punkt. Innretninger inkorporert ved denne fremgangsmåten ble tørket over molekylarsikter. Når de ble brakt i kontakt med vanlig vann ble det indre kontrollområdet av innretningen mørke brunt.

Eksempel V: Innretning for påvisning av bilirubin med indre kontroll.

Krystallisert bilirubin ble oppløst i fortørket kloroform (konsentrasjon 1,60 mg/dl). En 1 µl porsjon av oppløsningen ble påført i et lite punkt med en pipette på bilirubin-reagensputene på "N-Multistix SG" reagensbånd (tilgjengelig fra Miles Laboratories, Inc.). Bilirubin-reagensputen består av en papirmatriks inkorporert med en forsøkssammensetning innbefattende bufret 2,4-dikloranilindiazoniumsalt. Innretningene ble tørket. Ingen fargeutvikling ble observert under og etter påføringen. Når innretningen for bilirubinbestemmelse med indre kontroll ble fuktet med vanlig vann utviklet det seg en purpurfarge i det indre kontrollområdet.

Eksempel VI: Kontroll- eller kalibreringsinnretning.

En lyofilisert, pulverisert form av glutaminsyre, oksaleddiksyre-transaminase (AST) kan oppnås fra Sigma Chemicals Co., St. Louis, MO. Prøver av pulveret inneholdende 2000 enheter enzym suspenderes i en heksan-dibrommetanblanding hvis spesifikke tetthet stemmer overens med tettheten for enzymet ved fremgangsmåten angitt i eksempel III. En suspensjon inneholdende 0,37 enheter enzym pr. mikroliter suspensjon

fremstilles. En 30 µl prøve av suspensjonen plasseres på et "Seralyzer AST" reagensbånd, slik at den i det vesentlige dekker hele matriksen og tørkes deretter. ("Seralyzer AST" forsøksinnretningen består av en papirmatriks inkorporert med en forsøkssammensetning innbefattende α -ketoglutarat, L-aspartat, kaliumfosfat, magnesiumklorid, tiaminpyrofosfat, 3,5-diklor-2-hydroksybenzensulfonat, 4-aminoantipyrin, oksalodekarboksylase, pyruvat-oksydase, peroksydase og buffere). Mengden enzym som benyttes svarer til innholdet i en serumprøve inneholdende 100 enheter enzym som er fortynnet ifølge forsøksprosedyren for "Seralyzer AST". Båndet tørkes deretter ved 60°C i ca. 6 minutter. Når båndet bringes i kontakt med 30 µl destillert vann, følges fargeutviklingen ved å anvende "Seralyzer" reflektansfotometeret tilgjengelig fra Miles Laboratories, Inc. Instrumentet viser verdien av 100 enheter ved avslutningen av den normale 4 minutters avlesningstiden for et AST-bånd. Båndet fremstilt på denne måten tjener som et kontroll-bånd for den diagnostiske forsøksinnretningen for AST og unngår problemet med å rekonstituere sera som en kontroll.

Eksempel VII: Selv-indikerende innretning for glukosepåvisning.

"Visidex II" reagensbåndene, kommersielt tilgjengelig fra Miles Laboratories, Inc., benyttes til å fremstille en selvindikerende innretning for påvisning av glukose i blod som indikerer for brukeren når en glukose-konsentrasjon i prøven ligger innenfor det normale området. Yttergrensene for normale glukose-nivå hos voksne strekker seg fra 60 mg/dl til 110 mg/dl i blod. (Jacobs D.S., Kasten, B.L., DeMott W.R., Wolfson, W.L. i "Laboratory Test Handbook with DRG Index", Mosby/Lexi-Comp. St. Louis 1984). "Visidex II" reagensbåndet består av en papirindeks inkorporert med en forsøkssammensetning innbefattende glukose-oksydase, peroksydase, buffere og 3,3',5,5'-tetrametylbenzidin med et belegg av etylglukose og gelatin.

En glukose-oppløsning fremstilles i tørket pyridin ved en konsentrasjon som, når den inkorporeres i "Visidex II" båndet, tørkes og fuktes med vann, vil gi en farge som visuelt ikke kan adskilles fra fargen som dannes når et vanlig "Visidex II" bånd bringes i kontakt med en blodprøve inneholdende 60 mg/dl glukose og avtørkes for avlesning. En andre glukose-oppløsning fremstilles i tørket pyridin ved en konsentrasjon som, når den inkorporeres i et "Visidex II" bånd tørkes og fuktes med vann, vil gi en detekterbar respons, farge, som visuelt ikke kan adskilles fra fargen som dannes når et vanlig "Visidex II" bånd bringes i kontakt med en blodprøve inneholdende 110 mg/dl glukose og avtørkes for avlesning. Disse konsentrasjonene finnes ved eksperimenter. En fin linje av hver oppløsning trykkes på "Visidex II" båndet, fortrinnsvis på motstående side nær kanten av matriksen.

Når en dråpe blod plasseres på dette båndet og avtørkes, ved å følge "Visidex II" anvisningene, kan ett av tre tilfeller oppstå. I tilfellet I kan en svak farge utvikles over hele båndet med to linjer som er synlige der hvor glukosen ble påført. Dette viser at prøven inneholder glukose i en betydelig mindre mengde enn 60 mg/dl. Dette er et klinisk farlig nivå av hypoglykemi. I tilfellet II utvikles en uniform farge som er betydelig mørkere enn linjen dannet ved 60 mg/dl-linjen, men lysere enn 110 mg/dl-linjen. Følgelig kan bare én linje lett registreres visuelt. Dette er det normale tilfellet som viser nærværet av normale glukosenivåer i blodet. I tilfellet III er fargen som utvikles av prøven så mørk at ingen av linjene er synlige. Dette tilsvarer klinisk forhøyede glukosenivåer. Denne fremgangsmåten kan lett generaliseres til et hvilket som helst antall linjer, eller mønstre, bare begrenset av evnen til å trykke reagenslinjer og produsere visuelt adskilbare mønstre.

165365

22

P a t e n t k r a v

1.

Forsøksinnretning med holdbarhetskontroll for bestemmelse av
5 en analytt innbefattende:

(a) en bæreratriks;

(b) en reagenssammensetning for bestemmelse av en
analytt, inkorporert i det vesentlige uniformt med
10 bæreratriksen, hvor reagenssammensetningen er i
stand til å tilveiebringe en detekterbar, optisk
respons ved fukting av den forsøkspreparat-inkor-
porerte bæreratriksen med en vandig oppløsning av
analytten som skal bestemmes;

15 k a r a k t e r i s e r t v e d at den videre innbefatter

(c) ureagert analytt, eller en analog derav, inkorporert
i minst en del av den forsøkspreparat-inkorporerte
bæreratriksen, ved en konsentrasjon som er tilstrek-
kelig for å tilveiebringe en detekterbar, optisk
20 respons i den dobbelt inkorporerte bæreratriksen ved
fukting av matriksen med vann.

2.

Forsøksinnretning ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t
25 v e d at den ureagerte analytten, eller en analog derav, er
inkorporert i det vesentlige uniformt med hele den forsøks-
preparat-inkorporerte bæreratriksen.

3.

30 Forsøksinnretning ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t
v e d at den ureagerte analytten, eller en analog derav, er
inkorporert i en begrenset definert del av den forsøkspreparat-
inkorporerte bæreratriksen.

4.

35 Forsøksinnretning ifølge krav 3, k a r a k t e r i s e r t
v e d at den detekterbare optiske responsen i den definerte

delen av bæreratriksen i det vesentlige ikke lar seg skille fra den detekterbare, optiske responsen som utvikles av forsøkssammensetningen, innenfor en normal avlesningstid for forsøksinnretningen, i i det vesentlige hele bæreratriksen ved fukting av matriksen med en vandig væskeprøve inneholdende analytten i en konsentrasjon som er minst like stor som den inkorporerte analytt-konsentrasjonen.

5.

Forsøksinnretning ifølge et hvilket som helst av kravene 3 og 4, nyttig som en selv-indikerende innretning, k a r a k t e r i s e r t v e d at den ureagerte analytten, eller en analog derav, er inkorporert med et stort antall begrensede definerte områder av den forsøkspreparat-inkorporerte bæreratriksen, hver analytt-inkorporering ved en forskjellig konsentrasjon, og hvor hver inkorporert analytt-konsentrasjon er tilstrekkelig til å tilveiebringe en detekterbar, optisk respons i hver av de nevnte definerte delene av bæreratriksen ved fukting av matriksen med vann, hvor den detekterbare, optiske responsen i hver av de definerte delene av den dobbelt inkorporert bæreratriksen ikke lar seg skille fra den optiske responsen som utvikles av forsøkssammensetningen, innenfor en normal avlesningstid for forsøksinnretningen, i i det vesentlige hele bæreratriksen ved fukting av matriksen med en vandig, flytende prøve inneholdende analytten i en konsentrasjon som i det minste er like stor som den inkorporerte konsentrasjonen av analytt i den begrensede definerte delen.

6.

Forsøksinnretning ifølge et hvilket som helst av kravene 3 til 5, k a r a k t e r i s e r t v e d at analytten er glukose, forsøkssammensetningen innbefatter glukose-oksydase og et indikatorsystem og konsentrasjonen av glukosen, eller glukose-analogen, inkorporert med bæreratriksen gir en detekterbar, optisk respons som er ekvivalent med den som gis

165365

24

ved ca. 100 mg pr. desiliter glukose i en vandig prøve på
mindre enn ca. 2 minutter.

5

10

15

20

25

30

35

165365

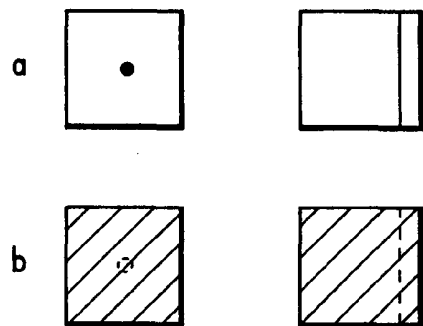


FIG. 1

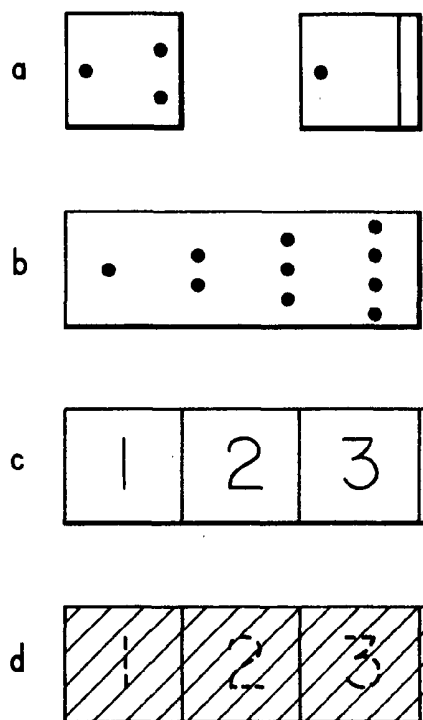


FIG. 2