



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 602 07 196 T2 2006.07.20

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 357 383 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 602 07 196.8

(96) Europäisches Aktenzeichen: 02 013 433.4

(96) Europäischer Anmeldetag: 13.06.2002

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 29.10.2003

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: 09.11.2005

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 20.07.2006

(51) Int Cl.⁸: G01N 33/92 (2006.01)

B01D 39/00 (2006.01)

B01D 39/20 (2006.01)

C12Q 1/60 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
371093 P 09.04.2002 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR

(73) Patentinhaber:
Cholestech Corp., Hayward, Calif., US

(72) Erfinder:
Jones, Ronald M., Mountain View, US; Worthy,
Thomas E., Walnut Creek, US; Shindelman, Jeff,
Castro Valley, US; Bellet, Neal, Walnut Creek, US;
Nugent, Anthony, Dublin, US

(74) Vertreter:
Patent- und Rechtsanwälte Bardehle, Pagenberg,
Dost, Altenburg, Geissler, 81679 München

(54) Bezeichnung: Verfahren und Vorrichtung zur Quantifizierung von Lipoprotein-Cholesterol hoher Dichte

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelebt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

1. Gebiet der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung der Konzentration von mit Lipoproteinen hoher Dichte (HDL) verbundenem Cholesterin in einer Blutflüssigkeitsprobe und eine diagnostische Probenvorrichtung zur Durchführung des Verfahrens.

2. Hintergrund der Erfindung

[0002] Man weiß, dass die Menge an im Blut vorliegendem Cholesterin mit dem Risiko von Kranzgefäßkrankheiten zusammenhängt. Cholesterin zirkuliert im Blut vorwiegend in proteingebundener Form. Die Proteine, welche Cholesterin transportieren sind die Lipoproteine, welche in 3 Klassen, basierend auf ihrer Dichte unterteilt werden. Die Lipoproteine mit sehr niedriger Dichte (VLDL) sind triglyceritreiche Lipoproteine, welche in der Leber synthetisiert werden und letztendlich zu Lipoproteinen niedriger Dichte (LDL) umgewandelt werden, welche den Großteil des Plasmacholesterins im Menschen transportieren. Die Lipoproteine mit hoher Dichte (HDL) sind Lipoproteine, welche in dem Katabolismus von triglycerinreichen Lipoproteinen und in der Entfernung von Cholesterin von äußerem Gewebe und dem Transport zur Leber involviert sind. Ein umgekehrter Zusammenhang zwischen Serum HDL-Level und dem Risiko von Herzkrankgefäßen wurde festgestellt. Insbesondere wenn der Anteil von Serumcholesterin, welcher mit HDL verbunden ist, niedrig ist, ist das Risiko von Herzkrankgefäßerkrankungen erhöht.

[0003] Im Hinblick auf die Wichtigkeit von relativen Serumcholesterinleveln in der Risikoeinschätzung und dem Management von atherogenischen Krankheiten, wurde ein erheblicher Aufwand getrieben, um große Populationen von sowohl normalen als auch Hochrisikoindividuen für Serumlevel von HDL, LDL, als auch Gesamtcholesterin und Triglyceriden zu untersuchen. Die Effektivität von Behandlungen von Hochrisikoindividuen wurde durch reguläres Testen von Serumlevels von Cholesterin in den verschiedenen Lipoproteinabteilungen beobachtet.

[0004] Ein Verfahren zum spezifischen HDL-Cholesterintesten basiert auf der selektiven Abscheidung von Nicht-HDL-Lipoproteinen in Serum durch ein polyanionisches Gemisch, wie z. B. Dextransulfat, Heparin oder Phosphotungstat, üblicherweise in der Anwesenheit eines Gruppe-II-Kations, wie z. B. Mg^{2+} , Mn^{2+} oder Ca^{2+} . Die Spezifität und der Grad an Abscheidung hängen von einer Vielzahl von Faktoren ab, inklusive dem Typ und der Konzentration des Abscheidungsreagens. Im Allgemeinen ist die Rangfolge der Abscheidung von Serumcholesterinpartikeln, mit zunehmender Konzentration von Polyanion,

VLDL, LDL und HDL. HDL verbleibt üblicherweise löslich bei Konzentrationen von Heparin oder Dextransulfat, welche vollständig Partikel niedrigerer Dichte ausfällen, obwohl geringere APOE-Arten von HDL mit Partikeln niedrigerer Dichte mit abgeschieden werden können. Durch das selektive Abscheiden von Partikeln niedriger Dichte können HDL-Serumcholesterinlevel bestimmt werden.

[0005] In einem typischen Lipidprobenverfahren wird ein kleines Blutvolumen gezogen und zentrifugiert, um ein klares Plasma oder Serumprobenflüssigkeit zu erzeugen. Das Probenfluid wird dann in mehrere Probenrörchen aufgeteilt, um (a) das Gesamtserumcholesterin, (b) Triglycerine, und (c) HDL-Cholesterin zu bestimmen. Die HDL-Probe wird abgeschieden, wie oben, und die Partikel niedrigerer Dichte werden durch Filtration oder Zentrifugieren entfernt, bevor das Cholesterin bestimmt wird. Die Proben werden dann mit einem Enzymmix reagiert, welcher Cholesterinesterase, Cholesterinoxidase, Peroxidase und einen Farbstoff enthält, welcher in der Anwesenheit von H_2O_2 zu einem Produkt mit bestimmter Farbgebung oxidiert werden kann. Die Rörchen können spektrophotometrisch gelesen werden, und die gesuchten Gesamtwerte von HDL- und LDL-Cholesterin können bestimmt werden.

[0006] Trotz der Genauigkeit und Zuverlässigkeit, welche mit den gerade beschriebenen Flüssigkeitsphasen Cholesterintestvorrichtungen erreicht werden können, hat die Untersuchung für eine weiträumige Verwendung eine Vielzahl von Einschränkungen. Erstens verwendet das Verfahren eine venöse Blutprobe, wodurch ein erfahrener Techniker benötigt wird, um die Blutprobe zu sammeln und zu fraktionieren, und das behandelte Blut in einzelne Probenrörchen aufzuteilen. Wenigstens eins der Probenrörchen (zur HDL-Bestimmung) muss mit einem Abscheidungswirkstoff behandelt werden und weiter verarbeitet werden, um abgeschiedenes Material zu entfernen. Obwohl einige dieser Prozeduren automatisiert werden können, sind für diesen Zweck eingerichtete Analysenmaschinen teuer und außerhalb von großen Hospitälern nicht breit verfügbar.

[0007] Die US-Patente Nr. 5,213,964, 5,213,965, 5,316,196 und 5,451,370 desselben Anmelders offenbaren Verfahren und Probenvorrichtungen, welche viele der oben erwähnten Probleme im Wesentlichen überwinden, welche mit Flüssigkeituntersuchenden Verfahren zur Messung von Serumcholesterinlevels verbunden sind. In einer Ausführungsform ist die Vorrichtung eingerichtet, um die Konzentration von mit HDL verbundenem Cholesterin in einer Blutprobe zu messen, welche auch LDL- und VLDL-Partikel enthält. Die Vorrichtung enthält eine Siebmatrix, welche in der Lage ist, lösliche und abgeschiedene Lipoproteine zu trennen, während sich eine Fluidprobe durch die Matrix bewegt. Ein mit der Matrix ver-

bundenes Reservoir ist eingerichtet, um einen löslichen Abscheidungsagenten freizusetzen, um selektiv LDL und VLDL abzuscheiden, während Fluid in und durch die Matrix gezogen wird. Dies erlaubt eine Trennung von HDL von den abgeschiedenen Lipoproteinen, basierend auf der schnelleren HDL-Migration durch die Siebmatrix. Die Fluidprobe, so um nicht-HDL-Lipoproteine vermindert, migriert dann zu einer Testoberfläche, wo sie auf Cholesterin untersucht wird.

[0008] Die oben erwähnten Vorrichtungen, obwohl sie einen Fortschritt über Flüssigkeitsphasenuntersuchungen darstellen, bergen die Möglichkeit einer Kontamination des Flusstransportweges mit den Abscheidungsreagenzien. Derartige Reagenzien könnten die HDL-Quantifikation störend beeinflussen oder andere chemische Untersuchungsvorgänge, welche auf anderen Bereichen einer Mehrfachuntersuchungsvorrichtung stattfinden. Die vorliegende Erfindung betrifft und überwindet diese Probleme.

[0009] Weitere Verfahren und Vorrichtungen zur Messung von HDL-Cholesterin in Blutproben sind in EP 0 408 223 und EP 0 415 298 (Rittersdorf et. al.) offenbart, welche ein kontinuierliches Untersuchungsverfahren beschreiben, welches auf einem Teststreifen durchgeführt wird, und die folgenden Schritte und dementsprechende Elemente umfasst. Die Blutprobe wird auf eine Separationsschicht aufgetragen, um zellulare Blutbestandteile zu trennen. Durch Kapillarkräfte oder die Schwerkraft getrieben fließt die Probe durch einen weiteren Träger, welcher lösliche Abscheidungsagenten enthält, welche, nachdem sie in der Serumprobe gelöst sind, in der Probe enthaltene Nicht-HDL-Lipoproteine abscheiden. In einem weiteren Träger werden die abgeschiedenen Bestandteile von der Serumprobe gefiltert, um ihre Beeinflussung von späteren HDL-Quantifikationen zu verhindern. In demselben Träger wird die Probe zu einer Position transportiert, welche zu dem HDL-quantifizierenden Träger benachbart ist, und gespeichert, bis der HDL-Quantifizierungsschritt gestartet wird. Letztendlich wird die Probe zu einer HDL-Quantifizierungsschicht übertragen, wo das HDL-Cholesterin in der Serumprobe durch eine enzymatische Reaktion quantifiziert wird.

[0010] Ein Nachteil dieses Probendesigns ist, dass der als ein Reservoir dienende Träger eine Migration der abgeschiedenen Bestandteile oder löslichen Reagenzien in die Probe erlaubt, was die HDL-Quantifikation störend beeinflussen kann. Außerdem kann, während der Lagerung der Serumprobe, HDL durch Anhaftung an den Trägerfasern gefangen werden, Abscheidungsreagenzien können weitere unerwünschte Reaktionen verursachen und der Träger kann durch die trocknende Serumprobe verstopfen.

[0011] US-Patent Nr. 5,135,716 (Takore) offenbart

zusätzliche Vorrichtungen und Verfahren zur HDL-Quantifizierung in einer Blutflüssigkeitsprobe. In diesen Vorrichtungen fließt die Flüssigkeitsprobe kontinuierlich durch einen ununterbrochenen Pfad, von einer Einlassöffnung zu einem Träger zur HDL-Quantifizierung. Dementsprechend ist die Möglichkeit, das Probenvolumen, welches in den HDL-Testträger eintritt, zu steuern und die Umgebungsbedingungen für die HDL-Untersuchung zu steuern, begrenzt. Außerdem bieten die Vorrichtungen keine Möglichkeit für eine gleichzeitige Untersuchung von unterschiedlichen Analysen einer einzigen Fluidprobe.

[0012] Es ist daher das Ziel der vorliegenden Erfindung, eine HDL-Probenvorrichtung und ein Verfahren zu schaffen, welche die oben erwähnten Nachteile des Standes der Technik überwinden.

3. Übersicht über die Erfindung

[0013] In einem Aspekt bietet die Erfindung eine Probenvorrichtung zur Messung von Serumcholesterin, welches mit Lipoproteinen von hoher Dichte (HDL) verbunden ist in einer Blutflüssigkeitsprobe, welche außerdem Lipoproteine niedriger Dichte (LDL) und/oder Lipoproteine sehr niedriger Dichte (VLDL) enthält. Die Vorrichtung umfasst:

(i) eine Vielzahl von porösen Elementen, durch welche solch eine Blutflüssigkeitsprobe nacheinander durch Kapillarkräfte und/oder Schwerkraft fließen kann,

wobei diese Vielzahl von Elementen weiter eine Probenverteilungsmatrix umfasst, welche in einem HDL-Testfeld endet, in welchem HDL-Konzentrationen untersucht werden können, und weiter stromaufwärts des HDL-Testfelds ein Element umfasst, welches ein immobilisiertes Reagenz enthält, welches wirkt, um selektiv Nicht-HDL-Lipoproteine von der Flüssigkeitsprobe zu binden und zu entfernen.

[0014] Die Vorrichtung umfasst weiter: (ii) Montagemittel, welche wirken, um die Vorrichtung zwischen einer (a) Probenverteilungsposition, wobei das HDL-Testfeld nicht in Fluidkommunikation mit der Probenverteilungsmatrix ist, und (b) einer Testposition einzustellen, wobei das HDL-Testfeld und die Verteilungsmatrix in Fluidkommunikation miteinander sind.

[0015] Das immobilisierte Reagenz umfasst vorzugsweise einen polyanionischen Reagenz, besonders bevorzugt ein sulfonatisches Polysaccharid. In einer Ausführungsform ist das immobilisierte Reagenz an einer ersten Probensammelstelle immobilisiert, innerhalb der Probenverteilungsmatrix, welche in Fluidkommunikation mit dem HDL-Testfeld platziert ist, wenn die Vorrichtung in der Testposition ist. In einer anderen Ausführungsform ist das immobilisierte Reagenz an einer zweiten Probensammelstelle immobilisiert, innerhalb der Probenverteilungsmatrix, welche in Fluidkommunikation mit dem HDL-Testfeld platziert ist, wenn die Vorrichtung in der Verteilungsposition ist.

sierte Reagenz an einem porösen Reagenzfeld festgelegt, welches stromabwärts von der Verteilungsmatrix angeordnet ist und stromaufwärts von dem HDL-Testfeld, welches Reagenzfeld in Fluidkommunikation mit dem HDL-Testfeld gesetzt wird, wenn die Vorrichtung in der Testposition ist. Das Reagenzfeld kann an dem HDL-Testfeld befestigt sein.

[0016] Vorzugsweise umfasst die Vorrichtung weiter: ein Siebfeld, stromaufwärts von und die Probenverteilungsmatrix berührend, welches zellulare Bestandteile von der Blutflüssigkeitsprobe entfernen kann, und einen Kassettenkörper, welcher das Siebfeld enthält und weiter einen Schacht zur Aufnahme der Blutflüssigkeitsprobe, welcher Schacht in Fluidkommunikation mit dem Siebfeld und der Probenverteilungsmatrix ist.

[0017] Die Vorrichtung beinhaltet vorzugsweise auch eine Reaktionsschiene, an welcher das HDL-Testfeld befestigt ist, und das oben erwähnte Montagemittel wirkt, um die Reaktionsschiene an dem Kassettenkörper zu befestigen und die relativen Positionen der Reaktionsschiene und des Kassettenkörpers zwischen der Probenverteilposition und der Testposition einzustellen. Das Montagemittel ist vorzugsweise weiter wirksam, um den Transfer der Vorrichtung von der Testposition zu einer Position zu bewirken, in welcher das HDL-Testfeld nicht in Fluidkommunikation mit der Probenverteilungsmatrix ist.

[0018] In einer Ausführungsform enthält die Probenverteilungsmatrix zusätzlich Probensammelbereiche, und die Reaktionsschiene umfasst zusätzlich Testfelder, derart, dass die zusätzlichen Felder in Fluidkommunikation mit den zusätzlichen Probensammelbereichen gebracht werden, wenn die Vorrichtung zu der Testposition bewegt wird.

[0019] Das HDL-Testfeld enthält typischerweise Reagenzen, welche in der Anwesenheit von HDL-Cholesterin eine merkbare Änderung in dem Testfeld erzeugen, welche in einer Ausführungsform eine optisch bemerkbare Änderung ist. Das HDL-Untersuchungsfeld kann einen Biosensor umfassen, welcher vorzugsweise dazu dient, elektro-chemisch die Erzeugung von Sauerstoff oder Wasserstoffperoxid zu messen, welche abhängig ist von mit HDL verbundenen Cholesterinkonzentrationen innerhalb des Untersuchungsfelds.

[0020] In einer Ausführungsform umfasst das Reagenzfeld eine poröse polymerische Membran. In einer bevorzugten Ausführungsform, wo das immobilisierte Reagenz ein anionisches Reagenz ist, wie z. B. ein sulfonatisiertes Polysaccharid, enthält die polymerische Membran kationische Oberflächengruppen. In einer weiteren Ausführungsform ist das HDL-Testfeld und das Reagenzfeld jeweils eine poröse polymerische Membran, und die Membranen sind zusammen

laminiert. In einem weiteren Aspekt bietet die Erfindung eine Probenvorrichtung zur Messung von Serumcholesterin, welches mit Lipoproteinen von hoher Dichte (HDL) in einer Blutflüssigkeit verbunden ist, welche ebenfalls Lipoproteine von niedriger Dichte (LDL) und/oder Lipoproteine von sehr niedriger Dichte (VLDL) enthält, welche Vorrichtung umfasst: eine Probenverteilungsmatrix zur Verteilung der Blutflüssigkeitsprobe; ein Reagenzfeld, welches ein immobilisiertes Reagenz enthält, welches dazu dient, selektiv Nicht-HDL-Lipoproteine von der Flüssigkeitsprobe zu entfernen; und ein HDL-Testfeld, in welchem HDL-Konzentrationen untersucht werden können, welches in Fluidkommunikation mit dem Reagenzfeld ist; wobei das Reagenzfeld in Fluidkontakt mit der Probenmatrix gebracht werden kann.

[0021] Das immobilisierte Reagenz umfasst vorzugsweise ein sulfonatisches Polysaccharid, und das Reagenzfeld umfasst vorzugsweise eine poröse polymerische Membran, welche kationische Oberflächengruppen hat.

[0022] In einem zugehörigen Aspekt bietet die Erfindung ein Verfahren zur Messung von Serumcholesterin, welches mit Lipoproteinen von hoher Dichte (HDL) in einer Blutflüssigkeitsprobe verbunden ist, welche ebenfalls Lipoproteine von niedriger Dichte (LDL) und/oder Lipoproteine von sehr niedriger Dichte (VLDL) enthält. Das Verfahren umfasst:

(a) Kontaktieren einer solchen Probe mit einer absorptiven Probenverteilungsmatrix, wobei die Probenverteilungsmatrix eines von einer Vielzahl von porösen Elementen ist, welche innerhalb einer Probenvorrichtung enthalten sind, durch welche die Probe nacheinander durch Kapillarkräfte und/oder Schwerkraft fließen kann,

wobei die Vielzahl von Elementen in einem HDL-Testfeld endet, in welchem HDL-Konzentrationen untersucht werden können, und stromaufwärts von dem HDL-Testfeld ein Element umfasst, welches ein immobilisiertes Reagenz enthält, welches wirksam ist, um selektiv Nicht-HDL-Lipoproteine von der Fluidprobe zu binden und zu entfernen,

(b) Kontaktieren der Probe mit dem Element, welches das immobilisierte Reagenz enthält;

(c) Platzieren der Matrix in Fluidkommunikation mit dem HDL-Testfeld, wobei die Probe von dem Element zu dem HDL-Testfeld bewegt wird; und

(d) Bestimmen des Gehalts an HDL-Lipoproteinen in der Blutflüssigkeitsprobe.

[0023] Gemäß dem Verfahren ist die Matrix vor Schritt (c) nicht in Fluidkommunikation mit dem HDL-Testfeld.

[0024] Das immobilisierte Reagenz enthaltende

Element ist vorzugsweise ein poröses Reagenzfeld, welches stromabwärts von der Verteilungsmatrix und stromaufwärts von dem HDL-Testfeld angeordnet ist, welches Reagenzfeld in Fluidkommunikation mit dem HDL-Testfeld in Schritt (c) ist. In einer Ausführungsform des Verfahrens ist die Matrix vor Schritt (c) nicht in Fluidkommunikation mit dem Reagenzfeld. Beim Kontakt der Matrix mit dem Reagenzfeld in Schritt (b) ist das Reagenzfeld vorzugsweise in gleichzeitiger Fluidkommunikation mit dem HDL-Testfeld. Das Reagenzfeld kann an dem HDL-Testfeld befestigt sein.

[0025] In einer weiteren Ausführungsform ist das Element, welches das immobilisierte Reagenz enthält die Matrix, derart, dass die Kontakte der Schritte (a) und (b) gleichzeitig auftreten.

[0026] In einer weiteren Ausführungsform ist das immobilisierte Reagenz innerhalb einer Siebmatrix enthalten, stromaufwärts von und die Probenverteilungsmatrix berührend, so dass die Kontaktierung der Schritte (a) und (b) in umgekehrter Reihenfolge erfolgt.

[0027] Das Verfahren umfasst vorzugsweise weiter den Schritt des Unterbrechens der Fluidkommunikation zwischen der Matrix und dem Testfeld, wenn eine gewünschte Menge an Probe übertragen wurde.

[0028] In bevorzugten Ausführungsformen des Verfahrens umfasst das immobilisierte Reagenz ein sulfonatisches Polysaccharid, und das Reagenzfeld umfasst eine poröse polymerische Membran, welche kationische Oberflächengruppen hat.

[0029] Die Anzeige von HDL-Cholesterin an dem Testfeld kann optisch bemerkbar sein. Das HDL-Testfeld kann auch einen Biosensor umfassen. Der Biosensor ist vorzugsweise wirksam, um elektro-chemisch die Produktion von Sauerstoff oder Wasserstoffperoxid zu messen, welche von der HDL-verbundenen Cholesterinkonzentration innerhalb des Testfelds abhängt.

[0030] Diese und andere Aufgaben und Merkmale der Erfindung werden nun besser sichtbar, wenn die folgende ausführliche Beschreibung der Erfindung in Verbindung mit den beigefügten Zeichnungen gelesen wird.

4. Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0031] [Fig. 1](#) bis [Fig. 3](#) sind Seitenansichten von multi-analytischen Probenvorrichtungen, welche in Übereinstimmung mit verschiedenen Ausführungsformen der Erfindung konstruiert sind, wobei [Fig. 2](#) und [Fig. 3](#) Teilansichten zeigen; und [Fig. 4](#) eine perspektivische Ansicht einer multi-analytischen Probenvorrichtung in explodierter Form ist, welche in Übereinstimmung mit einer Ausführungsform der Er-

findung konstruiert ist.

5. Ausführliche Beschreibung der Erfindung

I. Definitionen

[0032] Die nachfolgenden Begriffe haben die folgenden Bedeutungen, wenn nicht anders angegeben.

[0033] Ein Element ist in „Fluidkommunikation“ mit einem anderen Element, wenn ein Fluid in der Lage ist, von einem Element zu dem anderen mittels Kapillarwirkung und/oder Schwerkraft zu wandern. Die Elemente müssen nicht in direktem Kontakt sein; d. h. andere Elemente, durch welche diese Flüssigkeit fließen kann, können dazwischen sein.

[0034] Ein „Feld“, wie z. B. ein Reagenzfeld oder Probenfeld, wie hier verwendet, kann jegliches Material umfassen, wie z. B. eine poröse Membran oder einen Faserstreifen, welcher imprägnierte oder immobilisierte Reagenzen enthalten kann und durch welchen Fluid über Kapillarwirkung und/oder Schwerkraft fließen kann.

II. Probenvorrichtung

[0035] Die [Fig. 1](#) bis [Fig. 4](#) zeigen verschiedene Ausführungsformen einer multianalytischen Probenvorrichtung **14**, welche in Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung konstruiert sind, wobei [Fig. 4](#) in Explosionsansicht gezeigt ist. Die Vorrichtung ist insbesondere dafür konstruiert, Serumcholesterin zu bestimmen, welches mit HDL verbunden ist (auch als HDL-verbundenes Cholesterin oder einfach HDL-Cholesterin bezeichnet), in dem ein kleines Volumen einer Blutprobe, typischerweise zwischen 10 bis 50 µl von Blut verwendet wird. Andere Untersuchungen, wie z. B. der Gesamtcholesterin- oder Triglycerinlevel, können gleichzeitig von derselben Probe bestimmt werden. Die Bestimmung von HDL-verbundenem Cholesterin kann auch einfach als Bestimmung von HDL oder eine HDL-Untersuchung bezeichnet werden.

[0036] Die Vorrichtung enthält einen Hauptkörper oder -träger **15**, welcher einen Schacht **16** definiert, welcher so dimensioniert und abgemessen ist, um eine Menge einer Blutprobe aufzunehmen, typischerweise zwischen etwa 25 bis 50 µl. Der Schacht ist in Fluidkontakt mit einem Siebfeld **22**, welches in einem ausgesparten Bereich **20** getragen sein kann, welcher in dem oberen Rand des Trägers ausgebildet ist. Der Fluidkontakt kann direkt, oder wie in der in [Fig. 1](#) gezeigten Vorrichtung durch eine Kapillarleitung **18** geschaffen werden, welche in der Platte an dem Grund des Schachts ausgebildet ist. Der Träger ist vorzugsweise eine Kunststoffplatte, wobei der Schacht, der ausgesparte Bereich und/oder die Ka-

pillarleitung mittels Standardpressform oder maschinellen Bearbeitungsverfahren geformt werden.

[0037] Das im Bereich **20** getragene Siebfeld **22** dient dazu, teilweise größere Feststoffe (inklusive Blutzellen) zu entfernen, während die Probe durch die Feldmatrix in einer von unten nach oben gerichteten Richtung migriert, wie in der Figur abgebildet. Das Feld **22** ist vorzugsweise aus einem Glasfaser-matrixmaterial hergestellt, um wässriges Fluid durch Oberflächenbenetzung anzu ziehen, und um die Bewegung von Blutzellen zu behindern, wenn die Blutprobe durch die Matrix gezogen wird. Ein beispielhaftes Feld ist ein Glasfiberfilter, wie z. B. ein GF/D oder PD008-Filter von Whatman, welcher eine Packdichte von etwa $0,16 \text{ g/cm}^3$ und eine Dicke von etwa 1 mm hat. Das Feld ist dimensioniert, um ein bestimmtes Volumen einer Probenflüssigkeit zu absorbieren, vorzugsweise etwa zwischen 15 und 25 μl . Das Siebfeld **22** kann zusätzlich Reagenzien zum Einfangen von roten Blutzellen enthalten, wie z. B. Phytaglutinin, Antikörper speziell für die Membranoberfläche von roten Blutkörperzellproteinen, Thrombin, oder Ionenaustausch-Wirkstoffe. In einer Ausführungsform kann das Feld immobilisierte Reagenzien zur Entfernung von Nicht-HDL-Lipoproteinen enthalten, wie im Folgenden beschrieben wird.

[0038] Das Siebfeld **22** kontaktiert wiederum einen länglichen Streifen oder eine Probenverteilungsmatrix **26**, welche sich entlang des oberen Randes von Platte **15** erstreckt. Dieser Streifen kann auch durch Schaumkissen **27** oder andere Träger gestützt werden, wie in [Fig. 4](#) abgebildet. Matrix **26** dient dazu, Probenflüssigkeit von einem zentralen Probenauftragsbereich **28** zu verteilen, welcher in Flüssigkeitskontakt mit Feld **22** ist, zu Probensammelbereichen wie z. B. **30, 32**, innerhalb der Matrix.

[0039] Die Matrix ist vorzugsweise aus Glasfibern gebildet. Die Packdichte und -dicke der Matrix ist so ausgebildet, um Volumina von Probenflüssigkeit, z. B. 10 bis 25 μl , zu absorbieren und zu verteilen, welche dem Probenauftragsbereich des Streifens von dem Probensammelbereich des Streifens zugeführt werden. Die Matrix hat eine bevorzugte Packdichte zwischen etwa $0,16 \text{ g/cm}^3$ und $4,0 \text{ g/cm}^3$. Ein beispielhaftes Streifenmaterial ist ein F-165-25A Glasfiberfilter von Whatman, welcher eine Packdichte von etwa $0,2 \text{ g/cm}^3$ und eine Dicke von ungefähr 0,12 mm hat.

[0040] Die Vorrichtung **14** enthält auch eine Reaktionsschiene **60**, welche aus einem länglichen Träger **62** und mehreren benetzbareren, saugfähigen Reaktionstestfeldern **64, 66, 68** und **70** zusammengesetzt ist, die auf der unteren Oberfläche des Trägers wie abgebildet getragen sind. Der Träger **62** ist transparent oder hat Fenster, z. B. Fenster **76** ([Fig. 4](#)), wodurch es möglich ist, die Felder durch den Träger zu

beobachten. Diese Fenster können transparentes Material sein, oder einfache Öffnungen in dem Träger. Die Reaktionstestfelder in der Reaktionsschiene sind an dem Träger durch ein transparentes oder durchsichtiges haftendes Material befestigt, oder durch Schallschweißung oder andere geeignete Befestigungsverfahren. Jedes in einer bestimmten Untersuchung verwendete Testfeld enthält analyseabhängige Reagenzien, welche dazu dienen, eine analyseabhängige Änderung in dem Feld zu erzeugen, welche auf eine bekannte Weise entdeckt werden kann, wie weiter unten beschrieben. Alle oder beliebige integrierte Untermengen der Testfelder können in einer bestimmten Untersuchung angewandt werden.

[0041] Die Reaktionstestfelder sind vorzugsweise poröse Polymermembranen und haben vorzugsweise eine Dicke von etwa 100 bis 150 μm und Seitenabmessungen von etwa 3 mm. Das Absorptionsvolumen eines jeden Felds ist vorzugsweise zwischen etwa 0,5 bis 1,0 μl . In einer Ausführungsform sind alle oder einige der Reaktionsfelder asymmetrische Membranen; d. h. Membranen, die einen Porositätsgradienten über die Dicke der Membran aufweisen.

[0042] Die Reaktionsschiene ist auf Träger **15** durch Montagemittel befestigt, welche dazu dienen, um (a) die Vorrichtung in einer Probenverteilungsposition zu halten, wobei das Testfeld und, in einer Ausführungsform, das Reagenzfeld (weiter unten beschrieben), von der Probenverteilungsmatrix beabstandet sind, und um (b) die Vorrichtung zu einer Testposition zu bewegen, wo das Testfeld, Reagenzfeld, falls vorhanden, und die Probenverteilungsmatrix alle in Fluidkommunikation sind. Die Montagemittel können auch dazu verwendet werden, eine derartige Fluidkommunikation zu unterbrechen, nachdem eine gewünschte Menge von Probe die Testfelder betreten hat, und/oder nach einer bestimmten Kontaktzeit, indem die Vorrichtung von der Testposition zu einer Position bewegt wird, in welcher die Testfelder nicht in Fluidkommunikation mit der Probenverteilungsmatrix sind (welches dieselbe sein kann wie die „Probenverteilungs“-position). Eine solche Bewegung kann durch Beobachten der Reflektion an der oberen Oberfläche des Testfelds gesteuert werden, welche abhängig vom Ausmaß der Benetzung reflektiert, wie im US-Patent Nr. 5,114,350 der Anmelderin beschrieben. Alternativ, wenn die Absorptionskapazität und Probenaufnahmerate des Feldmaterials bekannt sind, kann die Probengröße mit ausreichender Genauigkeit einfach dadurch gesteuert werden, indem eine vorbestimmte Kontaktzeit verwendet wird.

[0043] Die Montagemittel können z. B. ein Paar von nachgiebigen Bauteilen enthalten, wie z. B. elastomere Blöcke **71, 72**, welche dazu dienen, das Testfeld und, in einer Ausführungsform, das Reagenzfeld zu einer Nicht-Übertrag- oder Probenverteilungsposi-

tion zu zwingen, in welcher die Felder von der Probenverteilungsmatrix beabstandet sind. Durch Zusammendrücken oder Freigabe der nachgiebigen Bauteile kann eine Fluidkommunikation zwischen der Probenverteilungsmatrix **26** und dem HDL-Testfeld **64** und/oder dem Reagenzfeld **74** (weiter unten beschrieben) selektiv herbeigeführt und getrennt werden. Die Fluidkommunikation kann über Direktkontakt oder durch ein Zwischenelement stattfinden. Die tragenden Blöcke könnten mittels Federn oder einer kolbenähnlichen Wirkung zusammengepresst werden. Alternativ könnten externe mechanische Vorrichtungen den Hauptkörper **15** und/oder den Träger **62** angreifen und zueinander bewegen. Derartige Vorrichtungen können konventionelle Komponenten enthalten, wie z. B. Klemmen, Kolben, Schrittmotoren, Schneckengetriebe oder ähnliches. Ein beispielhaftes System ist der Cholestech LDX® Analyser, ein eigenständiger, automatisierter Analysator, welcher vorteilhaft bei der Verwendung mit Probenvorrichtungen wie der hier beschriebenen ist.

[0044] In dem Flussweg der HDL-Probe ist, stromaufwärts von dem HDL-Testfeld, ein Element vorgesehen, welches daran immobilisiert ein polyanionisches Reagenz hat, welches wirksam ist, um von der Fluidprobe Nicht-HDL-Lipoproteine zu binden und zu entfernen. Dieses Element kann das Siebfeld sein oder die Probenverteilungsmatrix. Vorzugsweise ist ein separates Reagenzfeld **74**, welches ein derartiges immobilisiertes Reagenz hat, zwischen der Probenverteilungsmatrix und dem HDL-Testfeld vorgesehen. Dieses Reagenzfeld kann an der Probenverteilungsmatrix, wie in [Fig. 3](#), befestigt sein, oder noch bevorzugter an dem Testfeld, welches zur Untersuchung von HDL genutzt wird, wie in [Fig. 1](#) und [Fig. 4](#) abgebildet. Immobilisierte Bindereagenzien können in jedem oder allen der Elemente **22**, **26** und **74** vorliegen; sie sind vorzugsweise jedoch auf Reagenzfeld **74** begrenzt.

[0045] Ein solches Reagenzfeld **74** kann auch in einer im Wesentlichen co-planaren Position zwischen dem HDL-Testfeld und einem Probensammelbereich von Matrix **26**, wie in [Fig. 2](#) abgebildet, gehalten sein. Zum Beispiel könnte ein kompressierbares Tragelement **73** das Reagenzfeld **74** über der Matrix halten, so dass eine Bewegung der Reaktionsschiene zu dem Hauptkörper (oder umgekehrt) diese Bereiche in Fluidkommunikation bringen würde, und zwar vorzugsweise das erste Testfeld **64** in Fluidkommunikation mit der oberen Oberfläche von Reagenzfeld **74** bringen würde und dann die untere Oberfläche des Reagenzfelds in Fluidkommunikation mit der Probenverteilungsmatrix. Wie oben festgestellt, kann die Fluidkommunikation durch Direktkontakt, wie in den Figuren dargestellt, oder durch ein Zwischenelement bestehen.

[0046] Das Reagenzfeld hat vorzugsweise eine Di-

cke von etwa 100 bis 150 µm, Seitenabmessungen von 3 × 6 mm und ein Absorptionsvolumen von etwa 0,5 bis 1,0 µl. Es enthält ein immobilisiertes Reagenz, welches wirksam ist, um selektiv LDL- und VLDL-Partikel von der Fluidprobe zu entfernen. Das Reagenz kann z. B. ein Antikörper sein, oder vorzugsweise ein polyanionisches Reagenz, welches LDL- und VLDL-bindend ist. Derartige Reagenzien, welche aus dem Stand der Technik bekannt sind, enthalten sulfonierte Polysaccharide, Heparin, und Phosphotungstate in der Anwesenheit oder Abwesenheit eines Gruppe II Kations, wie z. B. Mg²⁺, Mn²⁺ oder Ca²⁺. Ein bevorzugtes Reagenz ist ein sulfonierte Polysaccharid, wie z. B. Dextransulfat, welches ein typisches Molekulargewicht von 50.000 bis 500.000 Daltons hat, wahlweise in Kombination mit Magnesiumacetat oder Chloriden, welche gepuffert sind, um pH-neutral zu bleiben.

[0047] Das Reagenzfeld ist wirksam, um gebundene Nicht-HDL-Lipoproteine innerhalb des Reagenzfelds zu fangen und sie vom Eintritt in das HDL-Testfeld **64** zu hindern. Da die bindenden Reagenzien an dem Träger immobilisiert sind, und in der Fluidprobe nicht lösbar sind, wird die Migration von abgeschiedenen Probenbestandteilen und abgeschiedenen Reagenzien in das HDL-Testfeld vermieden.

[0048] In einer bevorzugten Ausführungsform besteht Reagenzfeld **74** aus einer porösen polymerischen Membran, welche Porengrößen von etwa 1 µm oder weniger hat. In einer Ausführungsform ist das polyanionische Reagenz, z. B. Dextransulfat, durch elektrostatische Kräfte und/oder Kovalenzbindungen an einer Membran immobilisiert, welche positiv geladene Oberflächengruppen hat. Ein Beispieldmaterial für diesen Zweck ist eine Nylonmembran, welche quaternäre Ammoniumoberflächengruppen hat, wie z. B. eine AM080-Membran von der Cuno Corporation (Meridian, CT). Andere kommerzielle Polymermembranen haben eine kationische Oberfläche, welche Immobilon-Ny+™ enthält (Millipore Corp., Bedford, MA), Zetabind® (ebenfalls von Cuno Corp.), GeneScreen® (NEN/DuPont, Boston, MA), Hybond N+ (Amersham, Piscataway, NJ) und Posidyne® (Pall Corp. Glen Cove, NY).

[0049] Das US-Patent Nr. 5,543,054 (Charkoudian et al.) beschreibt ein Verfahren, um negativ geladene Kohlenhydrate kovalent an einer Membran zu binden, welche reaktive Teile in Nähe zu positiv geladenen Teilen an ihrer Oberfläche hat. Die Membran ist z. B. ein poröses Polymer, z. B. Polytetrafluoroethylen, Polyvinylfluorid, Polyester, Polyamid, Polykarbonat, Polypropylen, Polymethylmethacrylat, Polymethacrylat, Polysulfonat, oder Polystyren, welches mit Hercules R-4308™ beschichtet ist, ein Polyamid-Polyamin Epichlorhydrinharz.

[0050] In dem Fall einer positiv geladenen Memb-

ran, wie oben beschrieben, kann die Membran mit einer Lösung von Polyanionen über einen automatischen Ausgabeprozess imprägniert und getrocknet werden. Die Membran kann auch mit divalenten Kationen imprägniert werden. Alternativ kann das Reagenz auf kleinen Partikeln immobilisiert werden, welche dann auf eine geeignete Membran aufgetragen werden.

[0051] Zur Immobilisierung von Reagenzien auf Glasfibern, in Ausführungsformen, in denen Bindereagenzien auf der Siebmatrix und/oder Probenverteilungsmatrix immobilisiert sind, können die Fasern zuerst mit einem kationischen Polymer wie oben beschrieben beschichtet werden. Alternativ können die Glasfibern mit einem Reagenz funktionalisiert werden, welches eine Siloxangruppe und eine kationische Gruppe enthält (z. B. 3-(Triethoxysilyl)Propyltrimethylammoniumchlorid oder ähnlichen Reagenzien), wie es aus dem Stand der Technik zur Funktionalisierung von silikatbasierten Oberflächen bekannt ist.

[0052] Ein polyanionisches Bindereagenz kann auch an einer Membran oder einem anderen Substrat, wie z. B. einem Fasersubstrat, durch kovalente Befestigung immobilisiert werden. Verschiedene chemische Verfahren zum kovalenten Befestigen von Polysacchariden an verschiedenen Substraten sind aus dem Stand der Technik bekannt. (siehe z. B. US-Patent Nr. 4,744,899 (Tani et al.), 6,281,202 und 6,008,203 (Magnani et al.), 6,204,254 (Nelson et al.), 6,060,525 (Slingsby et al.), 5,919,523 (Sundberg et al.) und 5,811,532 (House)). Zum Beispiel kann eine Hydroxyl enthaltene Oberfläche mit Epichlorohydrin modifiziert werden, um eine epoxierte Oberfläche zu erzeugen, welche mit Hydroxylgruppen in dem Polysaccharid reagiert. Alternativ kann das Polysaccharid modifiziert werden, um elektrophile Gruppen zu enthalten, wie z. B. Epoxide, Ester oder Aldehyde, welche dann mit einer Amino- oder Tiol enthaltenen Oberfläche reagieren können. Zur Befestigung auf Glasoberflächen oder Glasfasern, als auch auf anderen Hydroxyl enthaltenen Oberflächen, sind funktionalisierte Silanreagenzien, wie z. B. Aminoalkyl oder Hydroxylalkyl-Trialkoxysilane besonders nützlich.

[0053] In einer Ausführungsform besteht das Reagenzfeld **74** aus einer einzelnen Membran. Die Erfindung betrifft auch die Verwendung von mehreren übereinander gestapelten Membranen, d. h. bis zu etwa 6 Membranen, wo wenigstens eine und vorzugsweise jede Membran Reagenzien enthält, um Nicht-HDL-Lipoproteine zu binden, für Reagenzfeld **74**.

[0054] In einer Ausführungsform ist das Testfeld **64** ebenfalls eine Polymermembran, welche Reagenzien zur Untersuchung von HDL-Levels enthält. Falls gewünscht können HDL-Untersuchungsreagenzien,

wie z. B. Peroxidase, an der Testfeldmembran immobilisiert werden, gemäß den allgemein bekannten Verfahren zur Enzymimmobilisation. (siehe US-Patent Nr. 4,999,287; US-Patent Nr. 5,419,902; Blum, L. J. et al., Anal. Lett. 20 (2): 317–26 (1987); Kiang, S. W. et al., Clin. Chem. 22 (8): 1378–82 (1976); Guibault, G. G., Ed., Modern Monographs in Analytical Chemistry, Vol. 2: Analytical Uses of Immobilized Enzymes (1984); Torchilin, V. P., Progress in Clinical Biochemistry and Medicine, Vol. 11: Immobilized Enzymes in Medicine (1991).) In einer anderen Ausführungsform kann ein Reagenz, wie z. B. Katalase, welches geeignet ist, um jedes erzeugte Wasserstoffperoxid zu zerlegen, das nach unten von Testfeld **64** diffundieren könnte, in dem Reagenzfeld **74** enthalten sein.

[0055] In einer bevorzugten Ausführungsform, wo zwei befestigte Polymermembranen für das Testfeld **64** bzw. das Reagenzfeld **74** verwendet werden, sind die geeigneten Reagenzien imprägniert oder visiert, und die Membranen werden als eine 2-Membran-Schicht zum Einbau in die Probenvorrichtung während der Herstellung verarbeitet. In einer weiteren Ausführungsform umfasst das HDL-Untersuchungsfeld einen Biosensor, wie z. B. in PCT WO 9958966 (Dobson et al.) beschrieben. Dieses Dokument offenbart eine Biosensorvorrichtung, umfassend eine leitende Oberfläche, eine Schicht aus dielektrischem Material über der leitenden Oberfläche, und eine Vielzahl von Poren, welche sich durch die dielektrische Schicht erstrecken. Jede der Poren enthält ein Biopolymer in Kontakt mit der leitenden Oberfläche, und kann als eine Mikroelektrode dienen, welche eine chemische Antwort in ein elektrisches Signal konvertiert. Bei Verwendung wird ein Fluid, welches ein zu untersuchendes Analyt enthält, auf den Poren aufgetragen, so dass es in Kontakt mit dem Biopolymer ist. In der vorliegenden HDL-Probenvorrichtung wird dies erreicht, wenn Reagenzfeld **74**, welches eine Probenflüssigkeit enthält, in Fluidkommunikation mit dem HDL-Probenfeld platziert oder darin gehalten wird; d. h. der Poren enthaltenden Oberfläche des Biosensors.

[0056] Das Biopolymer in den Mikroelektrodenporen ist üblicherweise ein Enzym, wie z. B., für die Messung von mit HDL verbundenem Cholesterin, Cholesterinoxidase. Cholesterin wird durch Cholesterinoxidase an das entsprechende Keton oxidiert, wodurch Wasserstoffperoxid freigegeben wird, welches dann durch die Enzymperoxidase in Wasser und Sauerstoff umgewandelt werden kann. Sowohl Sauerstoff als auch Wasserstoffperoxid kann dann elektrochemisch gemessen werden. Elektrochemische Verfahren, die verwendet werden können, beinhalten amperometrische Verfahren, wie in der Clark-Sauerstoffelektrode, welche den Strom misst, der durch Reduktion von Sauerstoff oder Oxidation von Wasserstoffperoxid erzeugt wird, oder voltamet-

rische Verfahren. Die Verwendung von zyklischer Voltammetrie an Microelektroden wurde zur Messung von verschiedenen Analyten beschrieben (siehe z. B. R. J. Forster, Chem. Soc. Rev. 289–297 (1994)), z. B. Dopamin (Pihel et al., Anal. Chem. 68 (13) 2084–9 (1996) und Fullarene (Soucaze-Guilloux et al., Anal. Chem. 65 (6): 669–72 (1993)) wie auch Hydrogen-Peroxide (Horrocks et al., Anal. Chem. 65 (24): 3605–14 (1993); Nowall et al., Electroanalysis 9 (2): 102–9 (1997); Dequaire et al., J. Am. Chem. Soc. 124 (2): 240–53 (2002)).

III. Untersuchungsverfahren

[0057] Im Betrieb wird eine Blutprobe in Schacht **16** eingesetzt und durch Siebfeld **22** aufgesaugt, wo große Partikel, inklusive rote Blutzellen, entfernt werden und dann in die Probenverteilungsmatrix **26** gelangen. Diese Schritte finden statt, während die Vorrichtung in einer „Probenverteilungs“phase ist. Wobei die Probenverteilungsmatrix nicht in Fluidkommunikation mit den Testfeldern ist, noch, in bestimmten Ausführungsformen (z. B. [Fig. 1](#) bis [Fig. 2](#)), mit dem Reagenzfeld **74**.

[0058] An einem Punkt vor dem Kontaktieren der Testfelder kontaktiert das Probenserum immobilisierte Bindereagenzien, welche in der Siebmatrix enthalten sein können, der Probenverteilungsmatrix, oder bevorzugt, in einem separaten Reagenzfeld, so dass Nicht-HDL-Lipoproteine an dem entsprechenden Träger gebunden werden. Die Vorrichtung ist somit effektiv, um Nicht-HDL-Lipoproteine von dem Serum zu entfernen, während ein Durchlass von Serum, welches Flüssigkeitsphasen-HDL enthält zum HDL-Testfeld **64** erlaubt wird. In einer Ausführungsform findet diese Entfernung statt, während die Vorrichtung in der Probenverteilungsposition ist; d. h. wo das Reagenz an dem Siebfeld immobilisiert ist, an der Probenverteilungsmatrix, oder vorzugsweise an einem separaten Reagenzfeld, welches in Fluidkommunikation mit diesen Elementen ist (z. B. [Fig. 3](#)).

[0059] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist das Reagenz an einem Reagenzfeld **74** immobilisiert, welches während der Probenverteilungsphase, z. B. in [Fig. 1](#) bis [Fig. 2](#) und [Fig. 4](#) abgebildet, nicht in Fluidkommunikation mit der Siebmatrix oder Probenverteilungsmatrix ist. Ein Vorteil der Ausführungsformen von [Fig. 1](#) bis [Fig. 4](#), welche ein separates Reagenzfeld verwenden, ist, dass die Probenverteilungsmatrix und Elemente stromaufwärts keine Nicht-HDL-Bindungsreagenzien enthalten; derartige Reagenzien liegen nur in Reagenzfeld **74** vor. Daher ist die Beeinträchtigungsmöglichkeit von diesen Reagenzien in Untersuchungen von Nicht-HDL-Analyten eliminiert.

[0060] Wenn die Serumprobe die Probensammelbereiche erreicht, wie z. B. Bereiche **30** und **32** be-

nachbart zu den Enden von Matrix **26**, wird die Vorrichtung in eine Testposition eingestellt, vorzugsweise indem Reaktionsschiene **60** bewegt wird, um die Testfelder **64**, **66**, **68** und/oder **70** und, in den Ausführungsformen von [Fig. 1](#) bis [Fig. 2](#) und [Fig. 4](#), Reagenzfeld **74**, in Fluidkommunikation mit der Matrix zu setzen. In dieser Position wird durch Kapillarkräfte Probenflüssigkeit in der Matrix in die Testfelder gezogen. Die Reaktionsschiene wird in dieser Position gehalten bis ein gewünschter Benetzungssgrad der Testfelder erreicht ist. Falls gewünscht wird die Schiene dann entfernt, um die Fluidkommunikation zwischen der Probenverteilungsmatrix und dem Testfeld zu unterbrechen, wenn eine gewünschte Menge an Probenflüssigkeit in die Testfelder eingetreten ist, und/oder nach geeigneter Kontaktzeit.

[0061] In Ausführungsformen der Vorrichtung, in denen Reagenzfeld **74** zwischen Testfeld **64** und Probenverteilungsmatrix **26** positioniert ist, aber an keinem befestigt ist (z. B. [Fig. 2](#)), platziert eine jeweilige Bewegung der Reaktionsschiene und des Hauptkörpers zueinander, üblicherweise in dem die Reaktionsschiene nach unten bewegt wird, diese drei Bereiche in Fluidkommunikation, vorzugsweise indem zuerst Testfeld **64** in Fluidkommunikation mit Reagenzfeld **74** platziert wird, zu ungefähr der Anordnung der Elemente, die in [Fig. 1](#) und [Fig. 4](#) gezeigt ist, und dann, durch weitere Bewegung, das Reagenzfeld in Fluidkommunikation mit der Probenverteilungsmatrix platziert wird. Der Kontakt wird beibehalten bis ein gewünschter Grad an Benetzung erreicht ist, wie oben beschrieben.

[0062] Während des Betriebs, in den Ausführungsformen, wie z. B. in [Fig. 1](#) bis [Fig. 2](#) und [Fig. 4](#) dargestellt (weiter dadurch gekennzeichnet, dass Bindereagenzien auf Element **74** beschränkt sind), während die Probenflüssigkeit durch den HDL-Untersuchungsweg fließt, welcher Felder **74** und **64** umfasst, fließen deren fühlende Ränder in einer Aufwärtsrichtung durch Feld **74**, wo Nicht-HDL-Lipoproteine reagieren und gefangen werden, und direkt zum benachbarten Untersuchungsfeld, wo HDL mit den Untersuchungsreagenzien darin reagiert, zur Messung von mit HDL verbundenem Cholesterin. Weitere Probenbestandteile verbleiben während dieser Zeit in Kontakt mit Feld **74**, und schreiten von Feld **74** zu Feld **64** in einer ähnlichen Weise fort, bis die Absorptionskapazität von Feld **64** erreicht ist. Dementsprechend findet eine Quantifizierung von mit HDL verbundenem Cholesterin in Testfeld **64** gleichzeitig mit der Bindereaktion statt, welche im Reagenzfeld **74** stattfindet. Das von der Probenverteilungsmatrix zu dem HDL-Untersuchungsweg (umfassend Felder **74** und **64**) transferierte Volumen an Probenflüssigkeit ist vorzugsweise gleich oder größer als die Absorptionskapazität von Testfeld **64**, und kleiner oder gleich der kombinierten Absorptionskapazität von Testfeld **64** und Reagenzfeld **74**.

[0063] In diesen Ausführungsformen, wenn die Probenflüssigkeit in Kontakt mit Reagenzfeld **74** kommt, welches die immobilisierten Bindereagenzien enthält, ist das letztere in direktem Kontakt mit HDL-Testfeld **64**, wodurch der temporäre Kontakt der Blutprobe mit den Bindereagenzien vor der HDL-Untersuchungsreaktion begrenzt wird. Probenvorbereitung und HDL-Auswertung werden somit in separaten Schritten durchgeführt, wobei die Probenvorbereitung, z. B. Filterung von zellulären Blutkomponenten beinhaltet und, wahlweise, zeitweises Lagern der Blutprobe und Anpassung der Blutprobe an Testanforderungen oder -bedingungen wie z. B. Temperatur, Druck und Umgebungsatmosphäre. Da der temporäre Kontakt der Blutprobe mit den unterschiedlichen Reagenzien reduziert ist, wird jegliche chemische Störung der HDL-Auswertung verhindert. Da die Reagenzien immobilisiert sind ist es unwahrscheinlich, dass sie von dem Reagenzfeld in benachbarte Elemente migrieren. Falls gewünscht, kann die Untersuchung für eine gewünschte Zeit unterbrochen werden, nach der Probenauftragung und Entfernung von zellulären Komponenten, aber vor dem Kontakt mit Bindereagenzien, z. B. um die umgebende Atmosphäre einzustellen oder die Umgebungstemperatur anzupassen, um so den Test zu unterstützen. Dies wird dadurch erreicht, dass die Vorrichtung in der Probenverteilungsposition gehalten wird. Um dieses Ziel zu erreichen, ist die Probenverteilungsmatrix eingerichtet, um falls benötigt zusätzlich als ein Reservoir zu dienen.

[0064] Das HDL-Testfeld enthält Reagenzien zur Quantifizierung von mit HDL verbundenem Cholesterin. Vorzugsweise enthalten diese Cholesterinesterase, um freies Cholesterin vom HDL zu lösen, Cholesterinoxidase, um durch Reaktion mit freiem Cholesterin Wasserstoffperoxid zu erzeugen, Peroxidase, und ein daran gekoppeltes Farbstoffsysteem, welches in der Anwesenheit von Peroxidase und Wasserstoffperoxid zu einem bestimmten gefärbten Signalreaktionsprodukt konvertiert wird. Das Testfeld kann auch einen Biosensor umfassen, welcher wirksam ist, um elektrochemisch Wasserstoffperoxid und/oder Sauerstoff, wie oben beschrieben, zu quantifizieren.

[0065] Die verbleibenden Testfelder enthalten ebenfalls Untersuchungsreagenzien, welche eine Änderung in dem Feld erzeugen, welche optisch entdeckt werden kann, entweder visuell oder in bekannter Weise durch einen Detektor. In bevorzugten Ausführungsformen der vorliegenden Vorrichtung und Verfahren sind die Nicht-HDL-bindenden Reagenzien im Reagenzfeld **74** angeordnet, und nicht in der Probenverteilungsmatrix oder Siebmatrix. Daher ist die Möglichkeit einer Beeinträchtigung durch diese Reagenzien in Untersuchungen von Nicht-HDL-Analyten eliminiert.

[0066] Vorzugsweise enthält jedes dieser Untersuchungsfelder Komponenten von Reagenzien zur Er-

zeugung von Wasserstoffperoxid über eine Reaktion des Analyts mit einem Enzym, wobei das Wasserstoffperoxid anschließend ein Substratreagenz zu einem gefärbten Signalreaktionsprodukt konvertiert oder elektrochemisch, wie oben beschrieben, gemessen wird. Enzymatische Farbreaktionen, welche eine Vielzahl von substratspezifischen Oxidasen verwenden, zur enzymatischen Erzeugung von Wasserstoffperoxid und darauf folgende Oxidation eines Farbstoffs, um ein gefärbtes Reaktionsprodukt zu bilden, sind bekannt.

[0067] Eine Vorrichtung mit vier oder mehr Reaktionsfeldern kann verwendet werden, um gleichzeitig HDL-Cholesterin (HDL), Glukose, Gesamtcholesterin (TCh), und Triglyceridlipid (TG) zu messen. Jedes Feld enthält die oben beschriebenen üblichen Signalkomponenten (Peroxidase und ein gekoppeltes Farbstoffsysteem), so dass erzeugtes Wasserstoffperoxid ein bestimmt gefärbtes Signalreaktionsprodukt erzeugt. Das Testfeld für Gesamtcholesterin, welches einem Serum ausgesetzt wird, ohne einem abscheidenden oder bindenden Reagenz ausgesetzt zu werden, und die HDL-Testfelder enthalten jeweils, zusätzlich zu den gemeinsamen Signalkomponenten, Cholesterinesterase, um esterifiziertes Cholesterin in der Form von freiem Cholesterin von Serumlipoproteinen freizusetzen, inklusive HDL-, LDL- und VLDL-Partikeln und Cholesterinoxidase, um Wasserstoffperoxid durch Reaktion mit freiem Cholesterin in der Probenflüssigkeit, wie oben beschrieben, zu erzeugen. Das Glukose-Untersuchungsfeld enthält Glukoseoxidase, zusätzlich zu den gemeinsamen Signalkomponenten. Das Triglyceridfeld enthält, zusätzlich zu den gemeinsamen Signalkomponenten, Lipase, L-Glycerokinase, und L-Glycerol-3-Phosphatoxidase, um über das Zwischenglied L-Glycerol-3-Phosphat Wasserstoffperoxid vom Triglycerid zu erzeugen.

[0068] Die in das TG-Feld gezogene Serumprobe wird keinen abscheidenden oder bindenden Reagenzien ausgesetzt, und enthält daher die gesamten Serum-Lipoproteine, wodurch das TG-Signal die gesamten Serumtriglyceride repräsentiert.

[0069] Vergleichsstandardfelder können ebenfalls verwendet werden; siehe z. B. das im US-Patent 5,114,350 beschriebene System der Anmelderin.

[0070] Wie oben festgestellt ist es ein Vorteil der vorliegenden Vorrichtung und Verfahren, dass die Probenverteilungsmatrix keine Nicht-HDL-abscheidenden oder – bindenden Reagenzien enthält; derartige Reagenzien liegen nur im Reagenzfeld **74** vor. Daher ist die Möglichkeit von Beeinträchtigungen durch diese Reagenzien in Untersuchungen von Analyten, wie z. B. Gesamtserumcholesterin und Gesamttriglycerid eliminiert.

BEISPIELE

[0071] Die folgenden Beispiele beschreiben, aber beschränken in keiner Weise die Erfindung.

Beispiel 1: Präparation einer Reagenzmembran mit immobilisierten Bindereagenzien

[0072] Eine wässrige Lösung, enthaltend 5 bis 20 mg/ml Dextransulfat (500.000 MW) und (wahlweise) 12,5 mM Mg(OAc)₂ wird auf eine kationische Membran, wie oben beschrieben, verteilt, z. B. einer Nylonmembran mit quaternären Ammoniumoberflächengruppen, welche eine Dicke von etwa 125 µm hat. Die Reagenzlösung wird in einer Rate von etwa 16 µl/inch ausgegeben, und die Membran wird dann für 20 Minuten bei 50°C in einem kontinuierlichen Durchlaufprozess getrocknet. Auf diese Weise können z. B. Längen von 100 Fuß vorbereitet und zurechtgeschnitten werden, um zu den Untersuchungsvorrichtungen zu passen.

Beispiel 2: Vorbereitung von HDL-Testmembranen

[0073] Um eine HDL-Reaktionsmembran vorzubereiten, wird eine polysulfonatische Membran mit der folgenden wässrigen Formel imprägniert: Cholesterinoxidase 36,5 Einheiten/ml, Cholesterinesterase 215 Einheiten/ml, Peroxidase 200 Einheiten/ml, 4-Aminoantipyrin 1,88 mg/ml, und TOOS (3-[Ethyl(3-Methylphenyl)Amino]-2-Hydroxy propan-sulfonische Säure) 12,05 mg/ml. Das Reagenz wird mit einer Rate von 16,6 µl/inch ausgegeben, und die Membran wird für 20 Minuten bei 50°C in einem kontinuierlichen Durchlaufprozess getrocknet. Auf diese Weise können z. B. Längen von 100 Fuß vorbereitet und zurechtgeschnitten werden, um zu den Untersuchungsvorrichtungen zu passen.

[0074] Um ein laminiertes Reagenz/Untersuchungsfeld wie das in [Fig. 1](#) gezeigte vorzubereiten, werden die zwei Membranen, welche wie oben mit Reagenzien imprägniert sind, separat (der Reihe nach) durch Ultraschall-Schweißung an der Reaktionsschiene befestigt, oder sie können gleichzeitig mit einem einzelnen Ultraschweißungsschritt befestigt werden. Die Membranen können auch vor Auftragung von Reagenzien zusammen laminiert werden, und die entsprechenden Reagenzien werden dann, zuerst an einer Seite des Laminats und dann an der anderen aufgetragen.

Beispiel 3: Ein typisches Untersuchungsverfahren

[0075] Eine typische Untersuchung wird in einem LDX®-Analysator durchgeführt, unter Verwendung von Reagenzfeldern und HDL-Testfeldern, welche im Wesentlichen wie in Beispielen 1 bis 2 beschrieben präpariert sind. Für eine wie in [Fig. 1](#) gezeigte Probenvorrichtungskonfiguration, wird eine Probe (35 µl

von Serum oder Blut) auf den Proben schacht aufgetragen und es ihr ermöglicht, sich für zwei Minuten durch die Probenverteilungsmatrix zu verteilen. Die Reaktionsschiene wird dann mit der Matrix für 3 Sekunden in Kontakt gebracht, eine Zeit, welche ausreichend ist, um genügend Serum zu übertragen, um das Reagenzfeld und Testfeld (kombinierte Kapazität etwa 1,5 µl) zu füllen, wonach die Schiene in ihre Ausgangsposition zurückgeführt wird. Von der oberen Oberfläche des HDL-Testfelds werden alle 3 Sekunden 150 Sekunden lang Reflektionsmessungen genommen, um den Fortschritt der HDL-Untersuchungsreaktion zu beobachten. Der minimal erhaltene Reflexwert wird dann in mg/dL von HDL-Cholesterin konvertiert, entsprechend einer vorher festgelegten Kalibrationskurve.

Patentansprüche

1. Eine Proben vorrichtung (14) zur Messung von mit Lipoproteinen von hoher Dichte (HDL) verbundem Serumcholesterin in einer Blutprobe, welche auch Lipoproteine niedriger Dichte (LDL) oder Lipoproteine sehr niedriger Dichte (VLDL) enthält, wobei die Vorrichtung aufweist:

- eine Probenverteilungsmatrix (26) zur Verteilung der Flüssigkeitsprobe;
- ein Element (74), welches ein immobilisiertes Reagenz enthält, welches wirkt, um selektiv Nicht-HDL-Lipoproteine von der Flüssigkeitsprobe zu binden und/oder zu entfernen; und
- ein HDL-Testfeld (64), in welchem HDL-Konzentrationen untersucht werden können, welches in Fluidkommunikation mit dem Reagenzfeld (74) ist; wobei das Reagenzfeld (74) in Fluidkommunikation mit der Probenverteilungsmatrix (26) gebracht werden kann.

2. Die Vorrichtung (14) nach Anspruch 1, weiter aufweisend:

- eine Vielzahl von porösen Elementen (22, 64, 66, 68, 70), durch welche die Blutflüssigkeitsprobe nacheinander durch Kapillarwirkung und/oder Schwerkraft fließen kann, und
- Montagemittel (71, 72), welche wirken, um die Vorrichtung (14)(a) zwischen einer Probenverteilung position, in der das HDL-Testfeld (64) nicht in Fluidkommunikation mit der Probenverteilungsmatrix (26) ist und (b) einer Testposition einzustellen, in der das HDL-Testfeld (64) und die Probenverteilungsmatrix (26) in Fluidkommunikation miteinander sind.

3. Die Vorrichtung (14) nach Anspruch 1, wobei das immobilisierte Reagenz an einem ersten Proben sammelbereich (30) in der Probenverteilungsmatrix (26) immobilisiert ist, welche in Fluidkommunikation mit dem HDL-Testfeld (64) platziert ist, wem die Vorrichtung (26) in der Testposition ist.

4. Die Vorrichtung (14) nach Anspruch 1, wobei das Element (74) ein poröses Reagenzfeld (74) ist,

welches stromabwärts von der Verteilungsmatrix (26) und stromaufwärts des HDL-Testfelds (64) angeordnet ist, welches in Fluidkommunikation mit dem HDL-Testfeld (64) platziert ist, wenn die Vorrichtung (14) in der Testposition ist.

5. Die Vorrichtung (14) nach Anspruch 3, wobei das Reagenzfeld (74) an dem HDL-Testfeld (64) befestigt ist.

6. Die Vorrichtung (14) nach Anspruch 1, weiter umfassend ein Siebfeld (22), welches wirkt, um zelluläre Bestandteile von der Blutflüssigkeitsprobe zu entfernen, stromaufwärts von und in Kontakt mit der Probenverteilungsmatrix (26).

7. Die Vorrichtung (14) nach Anspruch 5, weiter umfassend einen Kassettenkörper (15), enthaltend das Siebfeld (22) und weiter umfassend einen Schacht (16), um die Blutflüssigkeitsprobe aufzunehmen, in Fluidkommunikation mit dem Siebfeld (22) und der Probenverteilungsmatrix (26).

8. Die Vorrichtung (14) nach Anspruch 6, weiter umfassend eine Reaktionsschiene (60) an welcher das HDL-Testfeld (64) befestigt ist.

9. Die Vorrichtung (14) nach Anspruch 7, wobei das Montagemittel (71, 72) wirkt, um die Reaktionsschiene (60) an dem Kassettenkörper (15) zu befestigen und um die relativen Positionen der Reaktionsschiene (60) und des Kassettenkörpers (15) zwischen der Probenverteilungsposition und der Testposition einzustellen.

10. Die Vorrichtung (14) nach Anspruch 8, wobei die Probenverteilungsmatrix (26) zusätzlich Probensammelbereiche (30, 32) enthält, und die Reaktionsschiene (60) weiter zusätzliche Testfelder (66, 68, 70) umfasst, so dass diese zusätzlichen Testfelder (66, 68, 70) in Fluidkommunikation mit den zusätzlichen Probenverteilungsbereichen (30, 32) gebracht werden, wenn die Vorrichtung (14) zu der Testposition bewegt ist.

11. Die Vorrichtung (14) nach Anspruch 1, wobei das Montagemittel (70, 72) weiter wirkt, um (c) die Vorrichtung (14) von der Testposition zu einer Position zu bewegen, in welcher das HDL-Testfeld (64) nicht in Fluidkommunikation mit der Probenverteilungsmatrix (26) ist.

12. Die Vorrichtung (14) nach Anspruch 1, wobei das immobilisierte Reagenz ein polyanionisches Reagenz umfasst.

13. Die Vorrichtung (14) nach Anspruch 11, wobei das immobilisierte polyanionische Reagenz ein sulfonatisches Polysaccharid enthält.

14. Die Vorrichtung (14) nach Anspruch 1, wobei das HDL-Testfeld (64) Reagenzien enthält, welche, in der Anwesenheit von HDL-Cholesterin, eine bemerkbare Änderung in dem HDL-Testfeld (64) erzeugen.

15. Die Vorrichtung (14) nach Anspruch 13, wobei diese Änderung optisch entdeckt werden kann.

16. Die Vorrichtung (14) nach Anspruch 1, wobei das HDL-Testfeld (64) einen Biosensor umfasst.

17. Die Vorrichtung (14) nach Anspruch 15, wobei der Biosensor wirkt, um elektrochemisch die Produktion von Sauerstoff oder Wasserstoffperoxid zu messen, welche von der Konzentration von HDL-verbundenem Cholesterin in dem Testfeld (64) abhängt.

18. Die Vorrichtung (14) nach Anspruch 1, wobei das Reagenzfeld (74) eine poröse Polymermembran umfasst.

19. Die Vorrichtung (14) nach Anspruch 17, wobei die Polymermembran kationische Oberflächengruppen enthält.

20. Die Vorrichtung (14) nach Anspruch 1, wobei das Reagenzfeld (74) mehrfach gestapelte Membranen umfasst, von denen wenigstens eine ein immobilisiertes Reagenz enthält, welches wirkt, um nicht HDL-Lipoproteine zu binden.

21. Die Vorrichtung (14) nach Anspruch 1, wobei jedes der HDL-Testfelder (64) und der Reagenzfelder (74) eine poröse Polymermembran ist.

22. Die Vorrichtung (14) nach Anspruch 21, wobei das Reagenzfeld (74) kationische Oberflächengruppen umfasst.

23. Die Vorrichtung (14) nach Anspruch 5, wobei das HDL-Testfeld (64) und Reagenzfeld (74) zusammen laminiert sind.

24. Verfahren zur Messung von Serumcholesterin verbunden mit Lipoproteinen hoher Dichte (HDL) in einer Blutflüssigkeitsprobe, welche außerdem Lipoproteine niedriger Dichte (LDL) oder Lipoproteine sehr niedriger Dichte (VLDL) enthält, umfassend die Schritte

- In-Kontakt-Bringen der Probe mit einem Element (74), welches ein immobilisiertes Reagenz enthält, welches wirkt, um selektiv Nicht-HDL-Lipoproteine von der Probe zu binden und/oder zu entfernen;
- Transferieren dieser Probe von dem Element (74) zu einem HDL-Testfeld (64), in welchem HDL-Konzentrationen untersucht werden können; und
- Bestimmung des Anteils an HDL-Lipoproteinen in dieser Probe in diesem HDL-Testfeld (64).

25. Das Verfahren nach Anspruch 24, weiter um-

fassend die Schritte

d. In-Kontakt-Bringen der Probe mit einer absorptionsfähigen Probenverteilungsmatrix (26), wobei die Probenverteilungsmatrix (26) eines einer Vielzahl von porösen Elementen (22, 26, 64, 66, 68, 70) ist, welche in einer Probenvorrichtung (14) enthalten sind, durch welche die Probe nacheinander durch Kapillarwirkung und/oder Schwerkraft fließen kann, welche Vielzahl von Elementen (22, 26, 64, 66, 68, 70) in dem HDL-Testfeld (64) endet, und stromaufwärts von dem HDL-Testfeld (64) das Element (74) umfasst,

e. Platzieren der Probenverteilungsmatrix (26) in Fluidkommunikation mit dem HDL-Testfeld (64), wobei die Probe von dem Element (74) zu dem HDL-Testfeld (64) transferiert wird; wobei vor diesem Platzierungsschritt die Probenverteilungsmatrix (26) nicht in Fluidkommunikation mit dem HDL-Testfeld (64) ist.

26. Das Verfahren nach Anspruch 24, wobei das Element (74) ein poröses Reagenzfeld ist, welches stromabwärts der Probenverteilungsmatrix (26) und stromaufwärts des HDL-Testfelds (64) angeordnet ist, welches in Fluidkommunikation mit dem HDL-Testfeld (64) in Schritt (b) platziert wird.

27. Das Verfahren nach Anspruch 25, wobei, vor Schritt (a) die Probenverteilungsmatrix (26) nicht in Fluidkommunikation mit dem Reagenzfeld (74) ist.

28. Das Verfahren nach Anspruch 26, wobei bei dem Kontakt der Probenverteilungsmatrix (26) mit dem Reagenzfeld (74) das Reagenzfeld (74) in gleichzeitiger Fluidkommunikation mit dem HDL-Testfeld (64) ist.

29. Das Verfahren nach Anspruch 28, wobei das Reagenzfeld (74) an dem HDL-Testfeld (64) befestigt wird.

30. Das Verfahren nach Anspruch 29, wobei das HDL-Testfeld (64) und Reagenzfeld (74) zusammen laminiert werden.

31. Das Verfahren nach Anspruch 25, wobei die Probenverteilungsmatrix (26) das immobilisierte Reagenz enthält, so dass die Schritte (a) und (b) gleichzeitig stattfinden.

32. Das Verfahren nach Anspruch 25, wobei das immobilisierte Reagenz in einer Siebmatrix (22) enthalten ist, stromaufwärts von und in Kontakt mit der Probenverteilungsmatrix (26), so dass Schritt (a) vor Schritt (d) stattfindet.

33. Das Verfahren nach Anspruch 25, weiter umfassend den Schritt von Unterbrechen der Fluidkommunikation zwischen der Probenverteilungsmatrix (26) und dem HDL-Testfeld (64), wenn eine gewünschte Probenmenge transferiert wurde.

34. Das Verfahren nach Anspruch 25, wobei das immobilisierte Reagenz ein sulfoniertes Polysaccharid umfasst.

35. Das Verfahren nach Anspruch 26, wobei das Reagenzfeld (74) eine poröse Polymermembran umfasst, welche kationische Oberflächengruppen hat.

36. Das Verfahren nach Anspruch 26, wobei das Reagenzfeld (74) mehrfach gestapelte Membranen umfasst, von denen wenigstens eine ein immobilisiertes Reagenz enthält, welches wirkt, um Nicht-HDL-Lipoproteine zu binden.

37. Das Verfahren nach Anspruch 25, wobei die entdeckbare Anzeige von HDL-Cholesterin optisch entdeckt werden kann.

38. Das Verfahren nach Anspruch 24, wobei das HDL-Testfeld (64) einen Biosensor umfasst.

39. Das Verfahren nach Anspruch 38, wobei der Biosensor wirksam ist, um elektrochemisch die Produktion von Sauerstoff oder Wasserstoffperoxid zu messen, welche von der Konzentration von HDL-verbundenem Cholesterin in dem HDL-Testfeld (64) abhängt.

Es folgen 3 Blatt Zeichnungen

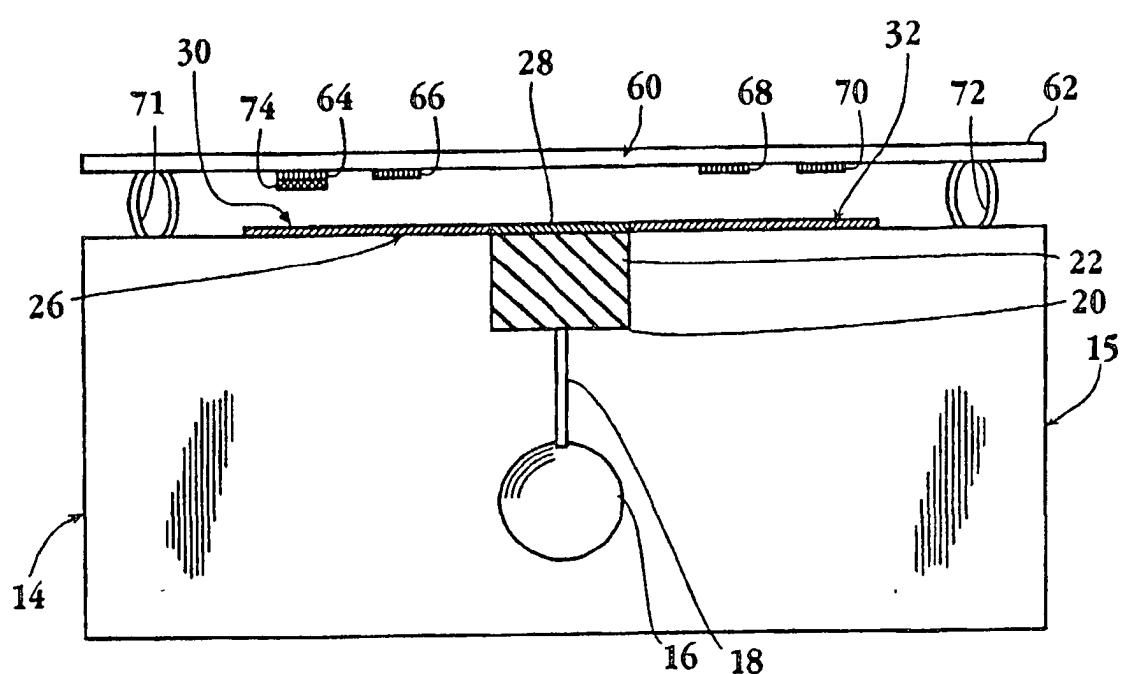


Fig. 1

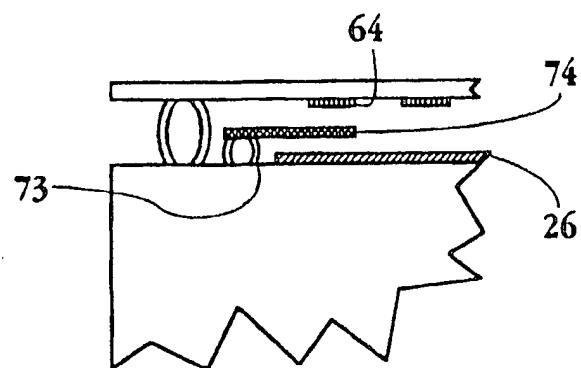


Fig. 2

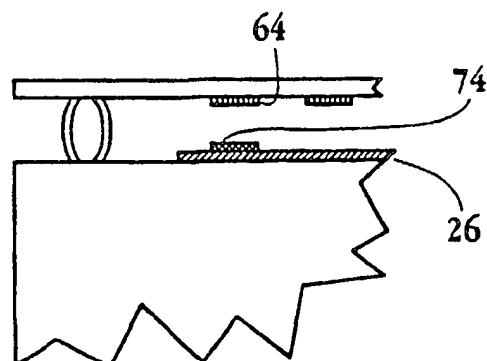


Fig. 3

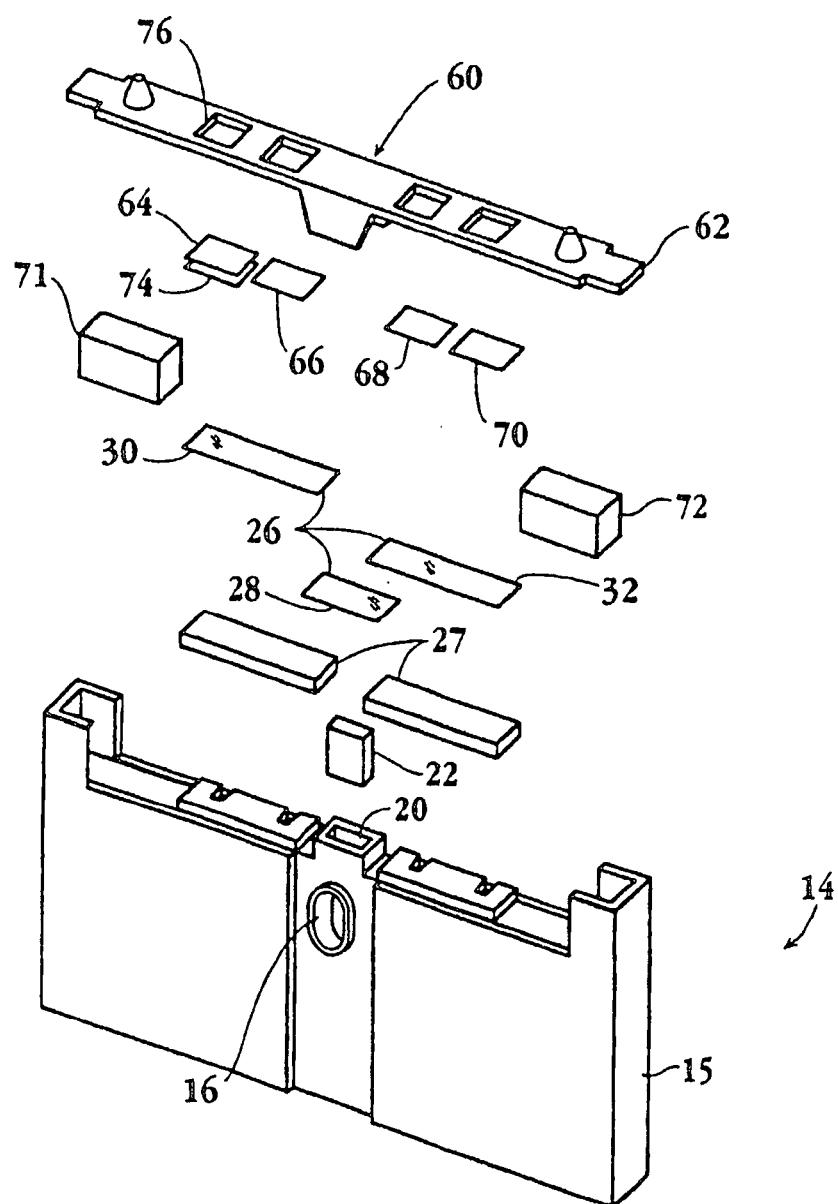


Fig. 4