NORGE

(12) **PATENT**

(19) NO (11) **315957** (13) B1

(51) Int Cl[7] G 01 N 33/68, 33/70, 33/53, 33/52

Patentstyret

(21) Søknadsnr	19942987	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	
(22) Inng. dag	1994.08.12		
(24) Løpedag	1994.08.12	(85) Videreføringsdag	
(41) Alm. tilgj.	1995.06.06	(30) Prioritet	1993.12.02, US, 160239
(45) Meddelt dato	2003.11.17		

(71) Patenthaver Miles Inc, P.O. Box 40, Elkhart, IN 46515, US
(72) Oppfinner Kin-Fai Yip, Elkhart, IN 46516, US
Amy H Chu, Elkhart, IN 46514, US
Brenda Tudor, Elkhart, IN 46514, US
(74) Fullmektig Zacco Norway AS, 0106 Oslo

(54) Benevnelse **Fremgangsmåte for å bestemme protein og kreatinin i en vandig løsning i en enkelt reaksjonsbeholder**

(56) Anførte publikasjoner I.S.Ross et al., "An immunoturbidimetric assay for microalbuminuria in normal and diabetic urine.", Transplantation Proceedings, 1986, Vol. 18(6), s. 1654-1655
EP 057110

(57) Sammendrag

En fremgangsmåte for å bestemme protein og kreatinin i urinen i en enkelt reaksjonsbeholder ved anvendelse av en kontinuerlig prosess er beskrevet. Fremgangsmåten innbefatter justering av pH til et nivå som er egnet for å utføre en immunoanalyse for proteinet og å utføre en slik bestemmelse ifølge en immunoagglutineringsteknikk. Økning av pH til et nivå egnet for å bestemme kreatinin hurtig oppløser skyetheten forårsaket ved agglutinasjonsreaksjonen slik at bestemmelse av kreatinin kan bli utført uten forsinkelser.

Foreliggende oppfinnelse angår en fremgangsmåte for å bestemme protein og kreatinin i en vandig løsning i en enkelt reaksjonsbeholder.

Human serum albumin (HSA), et av proteinene som er målbare i urinen, har klinisk betydning for detektering av tidlige stadier av nefropati, dvs. en unormal tilstand i nyrene. En høy prosentandel av individer som lider av insulinavhengig diabetes mellitus (IDDM) og ikke-insulinavhengig diabetes mellitus (NIDDM) kan utskille HSA i nivåer som er høyere enn den øvre enden av normalpopulasjonen. Dette stadiet med "mikroalbuminuri" blir progressivt verre og fører til nefropati. På grunn av at nyreskaden ved mikroalbuminuri kan bli kontrollert eller reversert ved administrering av hensiktsmessig terapi, er det velkjent at måling av mikroalbuminuri er en del av den omfattende behandlingen av IDDM og NIDDM.

Andre urinbårede proteiner, for eksempel IgG, alfa-1-mikroglobulin, Bence-Jones protein og N-acetyl-b-D-glukoseaminidase, er nyttige som markører for å detektere og differensiere prerenale, glomerulære og postrenale former av proteinuri. Proteinuri, som antydes dersom proteinkonsentrasjonen i urinen er høyere enn 30 mg/dl, er et vanlig symptom ved mange forskjellige nyresykdommer. For nefrologer, diabetologer og kardiologer er det derfor et behov å oppnå testmetoder som er sensitive, spesifikke og kvantitative for bestemmelse av disse proteinene i urinen.

For å øke sensitiviteten og spesifisiteten til urinproteinanalyser og minimalisere problemet med høy urinstrømningsrate som resulterer i urinfortynning, blir protein/-kreatininforhold anvendt i urinprotienanalyseresultater for å normalisere urinkonsentrasjonen. Typiske urinproteinanalyser innbefatter immunanalyser så som radioimmunanalyse, enzymimmunanalyse, lateksassistert immunanalyse og immunturbidimetrisk analyse. Vanlige kreatininanalyser, så som alkaliske Jaffe og Benedict-Behre metoder, blir utført ved en høy pH, vanligvis i området på fra 11,5 til 12,5. Vanlig praksis i dagens kliniske laboratorier er å kjøre protein- og kreatininanalyser separat, og deretter kombinere verdiene som blir oppnådd fra disse analysene for å oppnå proteinkreatinin-forholdet. Siden pasienter med høye urinstrømningsrater vil ha kunstig lave proteinverdier på grunn av urinfortynningen og siden kreatinin er en god markør for fortynning av urinen, elimineres ved anvendelse av protein/kreatininforholdet problemer med urinfortynning og det gir en mer nøyaktig refleksjon av den sanne proteinutskillellsesraten.

I Clin. Chem. 32/8, 1544-1548 (1986); beskriver Watts et al fire immunkjemiske metoder (radioimmunanalyse, radial immundiffusjon, immunturbidimetri og enzymbun-

det immunsorbent analyse) for måling av albumin i urinen ved lave konsentrasjoner. De har påpekt at diabetisk nefropati er en hovedårsak til død når det gjelder insulinavhengige diabetikere og at klinisk kjemiske laboratorier trenger en teknikk som er sensitiv, spesifikt for albumin og praktisk. Watts et al fortsetter å fremheve i Practical Diabetes Vol. 9, No. 3, s. 84-86 at mikroalbuminuri er en tilstand med overnormale mengder av albumin i urinen som unngår å bli detektert i indikator fargebindingstester, og er en kraftfull markør for både tidlig nefropati og kardiovaskulære sykdommer hos pasienter med diabetes mellitus.

Foreliggende oppfinnelse angår en fremgangsmåte for å bestemme protein og kreatinin i en vandig løsning i en enkelt reaksjonsbeholder (10) som er kjennetegnet ved at den omfatter trinnene:

a) frembringelse av en reaksjonsbeholder med hovedsakelig horisontal rotasjonsakse (10) og en analytisk reagenskanal (23) inneholdende første (24) og andre (34) reaksjonssoner der første reaksjonssone (23) er inkorporert med et tørt immunreagens spesifikt for proteinet (28) og den andre reaksjonssonen (34) er inkorporert med et tørt basisk reagens (32b) som er i stand til å øke pH i et reaksjonsfluid før inn i reaksjonskanalen (23) til et nivå som er egnet for kreatininbestemmelse;

b) innføring av en vandig prøve antatt å inneholde protein og kreatinin og et reaksjonsfluid (21) bufret til en pH egnet for bestemmelse av proteinkonsentrasjonen ved immunturbidometrisk metode inn i reaksjonsbeholderen (10) og bringing av denne i kontakt med det tørre immunreagens (28) for derved å oppløse immunreagenset og medføre en økning i turbiditet av reaksjonsfluidet ved interaksjon mellom immunreagenset og proteinet;

c) bestemmelse av konsentrasjonen av protein basert på endringen i turbiditet som en funksjon av tiden;

d) bringing av reaksjonsfluidet (21) og et reagens for bestemmelse av kreatinin (32a) i kontakt med et tørt basisk reagens (32b) i den andre reaksjonssonen (34) for derved å oppløse dette basiske reagenset og øke pH i reaksjonsfluidet til nivået nødvendig for kolorimetrisk bestemmelse av kreatinin; og

e) bestemmelse av konsentrasjonen av kreatinin i fluidprøven ved spektrofotometrisk metode.

Etter at de individuelle protein- og kreatininkonsentrasjonene er bestemt blir deres forhold beregnet.

Ved utførelse av foreliggende oppfinnelse er det mulig å anvende enten mulighet A, der kreatinin bestemmes før protein, eller mulighet B, der proteinkonsentrasjonen blir bestemt først, etterfulgt av bestemmelse av kreatininkonsentrasjonen i urinprøven som blir testet. Uansett i vilken rekkefølge bestemmelsene utføres, er det nødvendig å justere pH i urinprøven for å oppfylle kravene til proteinimmunanalysen som blir utført ved en pH på omtrent 7 til 9 som er det optimale pH området for denne analysen. Kreatininanalysen blir utført ved en pH på fra omtrent 11.5 til 12.5 for å deprotonere kreatinin slik at analysesystemet kan virke på riktig måte. Den første praktiske testen for å bestemme kreatinin i urinen, kjent som Jaffe-metoden, involverer dannelsen av rød-gulbrun farget kreatininpikrat ved binding av pikrinsyre og kreatinin i den alkaliske oppløsningen. En tidligere metode for bestemmelse av kreatinin, kjent som Benedict-Behre-metoden, involverer omsetning av et annet kreatinin reaktivt reagens, 3,5-dinitrobenzosyre, med kreatinin i det alkaliske mediet. Et hvilket som helst reagens som vil tilveiebringe en farget respons når det bringes i kontaktet med kreatinin ved den høye pH som er nødvendig for å deprotonere, det er egnet for anvendelse i dette trinnet.

Den analytiske metoden ifølge foreliggende oppfinnelse kan utføres i en hvilken som helst rekkefølge når det gjelder protein- og kreatininbestemmelsen. Ifølge mulighet A blir en urinprøve blandet med et egnet reagens for kreatininbestemmelse og en sterk base for å danne farge for kreatininkonsentrasjonsmålingen som vanligvis utføres ved spektrofotometriske metoder. pH til reaksjonsblandingen blir deretter redusert ved anvendelse av et hensiktsmessig surgjøringsmiddel og blandet med antistoffreagenset for å danne turbiditet for måling av proteinkonsentrasjonen.

I mulighet B blir urinprøven blandet med antistoffreagenset for å danne turbiditet for måling av proteinkonsentrasjonen. Et alkalisk reagens og en hensiktsmessig kreatininindikator blir deretter tilsatt for å øke pH og for å utvikle farge for måling av kreatininkonsentrasjonen.

Mens volumene til urinprøven og reagensoppløsningene kan være hva som helst som er hensiktsmessig for det bestemte analytiske miljøet, er små volumer, for eksempel 1 til

50 µl urin og 20 til 1,000 µl bufferoppløsning inneholdende kreatininreagenset og immunreagenset for proteinet, tilstrekkelig.

Når bestemmelsen blir utført ved anvendelse av mulighet A oppstår en forsinkelse mellom kreatinin- og proteinanalysen på grunn av at det fargede kreatininreaksjonsproduktet vil interferere med den turbidimetriske analysen for bestemmelse av protein i det neste trinnet. Mulighet B er derfor den foretrukne fremgangsmåten på grunn av at det er blitt oppdaget at agglutinasjonsproduktene til antistoff/proteinreaksjonen oppløses nesten øyeblikkelig ved tilsetning av det basiske reagens og kreatininreagenset, slik at denne delen av analysen kan bli utført i løpet av omtrent 1 sekund av proteinbestemmelsen. I dette henseendet er en proteinanalyseteknikk som involverer lysspredning, som i nefelometriske eller turbidometriske analyser, som involverer immunagglutinasjon spesielt egnet for anvendelse i denne oppfinnelsen. Dette kan være en agglutinasjonsanalyse mellom antistoffer og proteinet, eller av lateksbundet antistoff agglutinasjonstype hvor et antistoff, eller fragment derav som er spesifikt for bestemte epitoper av proteinet, er bundet til en vannsuspenderbar partikkel (for eksempel polystyren eller annen lateks) og protein. Ved å kombinere et stort antall epitopiske bindingsseter for antistoffer eller antistofflateks og de mange epitopene på proteinet, kan et stort aggregat dannes mellom antistoffene eller antistofflateks og proteinet. Dette aggregatet danner turbiditeten som kan bli målt spektrofotometrisk og graden av turbiditet kan bli korrelert med konsentrasjonen av proteinet i testprøven. Følgende eksempel illustrerer en analyse for HSA og kreatinin ved anvendelse av fremgangsmåten ifølge foreliggende oppfinnelse.

Eksempel I

Måling av HSA og kreatinin ifølge mulighet A

Til 1,08 ml av en 5% polyetylenglykoloppløsning ble det tilsatt 60 µl av en prøve bestående av HSA, kreatinin eller en blanding av HSA og kreatinin. Dette ble etterfulgt av 30 µl alkalisk reagens (kaliumfosfat, pH 13,5) og 30 µl DNBA for å initiere kreatininanalysen, mens absorpsjonen ved 531 nm ble målt i 200 sekunder. Økningen av absorpsjonsraten er proporsjonal med konsentrasjonen av kreatinin i prøven og er illustrert i figur 1. Det kan fra figur 1 sees at konsentrasjonen av kreatinin i en prøve kan bli målt nøyaktig i et område mellom 20 og 500 mg/dl. Rett etter målingen ble 50 µl Tris-HCl (Tris buffer er tris (hydroksymetylaminometan) tilsatt. Etter at det fargede kreatininreaksjonsproduktet ble ødelagt av bufferen (noen få minutter) ble 60 µl antiserum (geiteantistoff mot HSA) tilsatt. Absorpsjonen ved 531 nm ble på ny målt i 150 sekunder. Økningsraten av absorpsjonen er proporsjonal med konsentrasjonen av HSA i prøven som illustrert i

figur 2. Ut fra figur 2 kan det bli bestemt at konsentrasjonen av HSA kan bli målt nøyaktig innenfor området 5 til 500 mg/l.

Måling av HSA og kreatinin ifølge mulighet B

Til 1,08 ml prøve av analysebuffer (pH 8,5) bestående av 4% polyetylenglykol, 10 mM Tris, 10 mM EDTA og 0,02% natriumazid ble det tilsatt 60 µl prøve (HSA, kreatinin eller en blanding av HSA og kreatinin). Dette ble etterfulgt av 60 µl antiserumreagens for å initiere HSA analysen. Absorpsjonen ved 531 nm ble målt i 200 sekunder. Økningsraten i absorpsjonen er proporsjonal med konsentrasjonen av HSA i prøven. Etter turbidometrisk HSA-måling ble 30 µl av det alkaliske reagenset tilsatt etterfulgt av 30 µl 3,5 dinitrobenzosyre (DNBA) reagens. Turbiditeten forsvant øyeblikkelig etter tilsetning av alkali slik at det ikke oppsto noen forsinkning når det gjelder å fortsette med kreatininanalysen. Absorpsjonen ved 531 nm ble på ny målt i 3 minutter. Økningsraten i absorpsjonen er proporsjonal med konsentrasjonen av kreatinin i prøven. Den kombinerte HSA og kreatininanalysen er illustrert i figur 3. Ut fra figur 3 kan det bli bestemt at konsentrasjonen av HSA i en prøve kan bli målt nøyaktig mellom et område på 5 til 1,000 mg/l og deretter kan kreatinin (150 mg/dl) i prøvene måles nøyaktig.

På grunn av at den kombinerte analysen av protein og kreatinin i urinen virker bra i ovennevnte våt-analyseformat er det funnet at den er spesielt egnet for tilpasning til en reaksjonsbeholder for å utføre sekvensielle analytiske analyser som de som er beskrevet i US-patent nr. 4,990,075. Dette patentet beskriver en reaksjonsbeholder som har en vesentlig horisontal rotasjonsakse og en analytisk reagens-reaksjonskanal inneholdende første og andre reaksjonssoner inkorporert med første og andre analytiske reagenser som reagerer med en analytt i en flytende testprøve for åprodusere en detekterbar respons som en funksjon av analytten. Den andre reaksjonssonen er beliggende i en forutbestemt avstand bort fra og i fluidkommunikasjon med den første reaksjonssonen, hvorved en flytende testprøve avsatt i reaksjonskanalen kan bli transportert med tyngdekraften langs reaksjonskanalen mellom reaksjonssonene ved rotering av reaksjonsbeholderen rundt rotasjonsaksen. Reaksjonsbeholderen har innretning for væsketestprøvelevering for å tilveiebringe en enrettet strømning av den flytende testprøven inn i reaksjonsbeholderen og innførselsanordninger i væskekommunikasjonen med leveringsinnretningen for innføring av den flytende testprøven inn i leveringsinnretningen.

Protein/kreatinin-analysen kan bli utført i denne reaksjonsbeholderen ved anvendelse av enten konfigurasjon A eller B beskrevet nedenfor. Med referanse til figur 4 ved anvendelse av konfigurasjon A blir en blanding av antistoffet og et additiv så som et mono-

sakkarid, disakkarid eller oligosakkarid tørket på det første reagenssetet 28 i den første reaksjonsbeholderen 24 av reaksjonsbeholderen 10. Additivitet er ønskelig på grunn av at det stabiliserer antistoffet under tørkingen og under den lange lagringen etter å ha blitt tørket. Additivene kan også tilveiebringe fysisk stabilitet for å forhindre flassing og oppsprekking av det tørkede reagenset. Innretningen har indre vegger 14 som danner et leveringsrom 23 som muliggjør innføring av en væsketestprøve, så som en liten mengde urin som skal bli analysert, inn i innretningen, og på grunn av at leveringsrommet er i fluidkommunikasjon med reaksjonskanalen 21, kan den flytende testprøven innføres i reaksjonskanalen gjennom leveringsrommet og kan bli tvunget til å strømme langs reaksjonskanalen ved rotasjon i klokkeretningen av innretningen langs dets horisontale rotasjonsakse. Testprøven blir hensiktsmessig levert gjennom kapillærdispenseren 12 som vist i figur 4. På grunn av at bare en liten mengde av urin vil bli ført inn gjennom leveringskanalen kan ytterligere reaksjonsfluid inneholdende egnede buffere bli ført inn enten gjennom leveringskanalen eller fra en annen kilde så som væskeleveringsreservoaret 26 tilpasset å inneholde et buffer- og/eller væskereagens for å utføre de analytiske analyseprosedyrene ifølge foreliggende oppfinnelse. Det flytende leveringsreservoaret omfatter et reservoarlegeme 27 som har en nedsenkning deri 26 som virker som fluidreservoaret for oppbevaring av fluidet helt til det skal benyttes, og som er dekket av en membran (ikke vist) som kan fjernes for å muliggjøre at fluidet i reservoar 26 strømmer inn i reaksjonskanalen 21. Enkel manipulasjon av innretningen vil forårsake at væsketestprøven båret av fluidet fra væskereservoaret 26 strømmer inn i posisjonen for innsyn gjennom innsynsrom 42.

Reaksjonsbeholderen har en første reaksjonssone 24 som vanligvis er anbrakt i reaksjonskanalen 21. Den første reaksjonssonen inneholder tørket antistoffreagens ved første reagenssete 28 som vanligvis er koblet til en av sideveggene angitt som 18 a og b i figur 8 eller til den indre veggen av reaksjonsbeholderen 16. Egnet rotasjon av innretningen vil bringe reaksjonsfluidet i kontakt med det ønskede antistoffreagenset ved sete 28 for å lette oppløsningen derav. Når antistoffreagenset er tilstrekkelig oppløst i reaksjonsfluidet som bærer urintestprøven, blir innretningen 10 rotert 45° til høyre, hvilket forårsaker at fluidet dekker innsynsporten 42 hvor spektrofotometriske avlesninger blir utført og forandringen i turbiditeten som en funksjon av tiden blir bestemt. Ved å sammenligne disse avlesningene med grafer dannet ved anvendelse av en urinprøve inneholdende kjente mengder av protein blir proteinkonsentrasjonen i testprøven bestemt.

Systemet er nå klart for det andre trinnet av den analytiske prosedyren som er bestemmelse av kreatininkonsentrasjonen. En blanding av et egnet kreatininreagens så som

DNBA og et tilsvarende additiv og en vannoppløselig polymer så som et ikke-reaktivt protein, polyetylengykol, polyeter eller polyvinylalkohol som har samme funksjon som sukkeradditivet, blir tørket på det andre reagenssetet 32a beliggende i den andre reaksjonssonen 34. En blanding av alkalisk reagens og additiv sammen med en vannoppløselig polymer blir tørket på det tredje reagenssetet 32b som er på den motsatte veggen av beholderen i forhold til reaksjonssetet 32a slik at de fysisk er separert fra hverandre. Et flytende bufferreagens som typisk omfatter polyetylenglykol for å forsterke agglutinasjonen, tris, EDTA og natriumazid som konserveringsmidler, kaliumklorid som et stabiliserende middel for antistoffet og for å forhindre dannelsen av uønskede reaksjonsprodukter og et ikke-reaktivt protein så som gelatin, hydrolysert gelatin, ovalbumin og kasein for å forhindre uspesifikk absorpsjon av proteiner til reaksjonsbeholderen ved en pH mellom 7 og 9 innføres i beholderen sammen med urinprøven som inneholder proteinet som skal analyseresog kreatinin.

Etter at proteinanalysen er fullført roteres beholderen ytterligere 135° til høyre for å invertere den fra dets opprinnelige posisjon og bringe bufferoppløsningen i kontakt med det tørkede kreatinindeteksjonsreagenset ved reaksjonssetet 32a og det alkaliske reagenset til et sete 32b for derved å forårsake oppløsning derav som angitt i fig. 7. Dette resulterer i en økning i bufferoppløsningens pH til nivået 11.5 til 12.5 som er nødvendig for at kreatininbestemmelsesreaksjonen foregår. Det er uventet at kreatininkonsentrasjonen kan bli bestemt spektrofotometrisk kort etter dette oppløsningstrinnet, dvs. i løpet av 1 sekund eller mer, vanligvis i løpet av den tiden som er nødvendig for å blande prøven og begynne målingen (omtrent 5 sekunder) på grunn av at det ble funnet at sløretheten av bufferoppløsningen forårsaket av protein/antistoff agglutinasjon raskt blir borte når oppløsningen bringes i kontakt med det kreatinin bestemmende middelet og sterk base. Dette akselererer analysesystemet betraktelig på grunn av at den slørete bufferoppløsningen normalt ville trenge mange dager på å bli tilstrekkelig klar for at den kolorimetriske kreatininanalysen ville bli utført med hell. Det er vanlig at en operatør i et travelt klinisk laboratorium ikke vil vente mer enn omtrent 30 minutter og fortrinnsvis ikke mer enn 5 eller til og med 1 minutt etter fullføring av proteinanalysen før påbegynning av kreatininanalysen. Om ønskelig kan kreatininanalysen bli utført rett etter at den spektrofotometriske målingen av proteiner er utført. Etter oppløsning av kreatinindeteksjonsreagenset og det alkaliske reagenset blir innretningen rotert tilbake til posisjonen angitt i fig. 6 hvor de spektrofotometriske avlesningene blir utført gjennom innsynsport 42 over en tidsperiode for å oppnå fargeutvikling som en funksjon av tiden som kan bli sammenlignet med kreatininbestemmelsene utført på prøver med kjente konsentrasjoner av kreatinin for å bestemme de ukjente kreatininkonsentrasjonene.

I konfigurasjon B blir en blanding av antistoff og additiv tørket på det første reagenssetet 28 og blandingen av alkalisk reagens og additiv blir tørket på det andre reagenssetet, enten 32a eller b. Det flytende buffermiddelet som omfatter kreatininreagens, polyetylenglykol, tris, EDTA, natriumazid, kaliumklorid og et ikke-reaktivt protein ved en pH på 7 til 9 blir ført inn i reaksjonsbeholderen sammen med en urinprøve inneholdende proteinet og kreatinin. Bufferoppløsningen oppløser antistoffreagenset som før og proteinkonsentrasjonen blir bestemt spektrofotometrisk gjennom innsynsport 42. Etter bestemmelse av proteinkonsentrasjonen blir bufferoppløsningen brakt i kontakt med det tørkede alkaliske reagenset ved det andre reagenssetet for derved å oppløse det alkaliserte reagenset og øke pH til det nivået som er nødvendig for at kreatiinnanalysen blir utført. En hvilken som helst konfigurasjon kan bli anvendt i sammenheng med den tidligere beskrevne reaksjonsbeholderen for å oppnå ekvivalente resultater.

I en bestemt utførelsesform ble geite antiserum mot HSA anvendt som antistoffreagens ved å tørke dette på det første reagenssetet. Dette materialet er kommersielt tilgjengelig og kan bli anvendt uten ytterligere behandling. Antiserumet blir fortrinnvis konsentrert 2-ganger og kombinert med en sukkrose/trehalose-blanding i et nivå på fra 2-5% som stabilisator. En 15 µl prøve av reagenset blir tørket på reaksjonssetet ved anvendelse av en tørketrakt drevet ved 60°C og en tørketid på 15 minutter.

Det alkaliske reagenset for kreatinin omfatter enten en basisk hydroksidoppløsning (for eksempel 2,5 M KOH) eller en blanding av alkaliske buffermaterialer så som fosfat, borat eller guanidinderivater for å opprettholde riktig pH og det basiske hydroksid. 15 µl av en blanding av 1 M fosfat og 4 M kaliumhydroksid kombinert med sukkrose/trehalose-blandingen blir tørket på det andre reagenssetet ved anvendelse av en tørketrakt drevet ved 60°C med en tørketid på 15 minutter.

Det foretrukne kreatininreagenset, DNBA, blir vanligvis applisert på det andre reagenssetet fra dets 1,4 M vandige oppløsning inneholdende 10% av enten sukker eller polymeradditiv ved påføring av 15 µl prøve av oppløsningen og tørking som før.

I drift ved anvendelse av konfigurasjon A ble en 0,57 ml prøve av bufferoppløsningen (4% polyetylenglykol, 25 mM Tris, 5 mM EDTA, 0,1% natriumazid og 0,1% gelatin som ikke-reaktivt protein; pH = 8,5) og 30 µl av prøven (HSA og kreatinin i urin) ført inn i beholderen for å initiere reaksjonen. Etter måling av blankprøven ble antistoffreagenset løst opp og absorpsjonen ved 531 nm ble målt i 120 sekunder. Økningsraten i ab-

sorpsjonen ble anvendt for å bestemme HSA-konsentrasjonen. Det alkaliske reagenset og DNBA-reagenset ble deretter løst opp og kreatinin konsentrasjonen ble bestemt ifølge økningsraten i absorpsjon. Det var mulig å utføre dette trinnet i løpet av så kort tid som 1, vanligvis 1-5 sekunder av HSA-bestemmelsen på grunn av at oppløsningen klarnet så hurtig etter oppløsning av kreatininreagensene.

En analyse som anvender konfigurasjon B ble utført hvor 0,57 ml av en oppløsning av DNBA i buffer (4% polyetylenglykol, 25 mM Tris, 5 mM EDTA, 0,1% natriumazid, 100 mM KCl og 10 mg/ml DNBA); pH 8.5 og 30 µl HSA og kreatinin i urin ble ført inn i beholderen for å initiere reaksjonen. Etter måling av blankprøven ble antistoffreagenset løst opp og absorpsjonen ved 531 nm ble målt i 1 til 2 minutter. HSA-konsentrasjonen ble bestemt som en funksjon av grad av økning i absorpsjonen. Alkalireagenset ble deretter løst opp og absorpsjonen ved 531 nm ble på ny målt i 3 minutter, idet kreatininkonsentrasjonen ble bestemt ut fra grad av økning i absorpsjonen.

Fig. 9 illustrerer reaksjonsresponsprofilen til prøver inneholdende forskjellige konsentrasjoner av HSA og 148 mg/dl kreatinin målt ifølge denne prosedyren. Ut fra fig. 9 kan det bestemmes at konsentrasjonen av HSA i en urinprøve kan måles nøyaktig i området mellom 5 til 500 mg/l og deretter kan kreatinin (148 mg/dl) i prøven måles nøyaktig.

P a t e n t k r a v

1.

Fremgangsmåte for å bestemme protein og kreatinin i en vandig løsning i en enkelt reaksjonsbeholder (10), k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter trinnene:

a) frembringelse av en reaksjonsbeholder med hovedsakelig horisontal rotasjonsakse (10) og en analytisk reagenskanal (23) inneholdende første (24) og andre (34) reaksjonssoner der første reaksjonssone (23) er inkorporert med et tørt immunreagens spesifikt for proteinet (28) og den andre reaksjonssonen (34) er inkorporert med et tørt basisk reagens (32b) som er i stand til å øke pH i et reaksjonsfluid før inn i reaksjonskanalen (23) til et nivå som er egnet for kreatininbestemmelse;

b) innføring av en vandig prøve antatt å inneholde protein og kreatinin og et reaksjonsfluid (21) bufret til en pH egnet for bestemmelse av proteinkonsentrasjonen ved immunturbidometrisk metode inn i reaksjonsbeholderen (10) og bringing av denne i kontakt med det tørre immunreagens (28) for derved å oppløse immunreagenset og medføre en økning i turbiditet av reaksjonsfluidet ved interaksjon mellom immunreagenset og proteinet;

c) bestemmelse av konsentrasjonen av protein basert på endringen i turbiditet som en funksjon av tiden;

d) bringing av reaksjonsfluidet (21) og et reagens for bestemmelse av kreatinin (32a) i kontakt med et tørt basisk reagens (32b) i den andre reaksjonssonen (34) for derved å oppløse dette basiske reagenset og øke pH i reaksjonsfluidet til nivået nødvendig for kolorimetrisk bestemmelse av kreatinin; og

e) bestemmelse av konsentrasjonen av kreatinin i fluidprøven ved spektrofotometrisk metode.

2.

Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at pH blir justert til et nivå på fra omtrent 7 til 9 før immunanalysen blir utført.

3.

Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at pH blir justert til et nivå på fra omtrent 11,5 til 12,5 før kreatininanalysen blir utført.

4.

Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at reagenset for den kolometriske bestemmelsen av kreatinin er picrinsyre eller 3,5-dinitro-benzosyre.

5.

Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at det vandige oppløsningsmiddelet er urin.

6.

Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at immunanalysen er av agglutinasjonstype.

7.

Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at proteinkonsentrasjonen bestemmes ved en egnet pH og deretter økes pH til et nivå som er egnet for bestemmelse av kreatinin.

8.

Fremgangsmåte ifølge krav 7, k a r a k t e r i s e r t v e d at bestemmelse av kreatinin initieres i løpet av omtrent 30 minutter fra tidspunktet hvor pH blir øket.

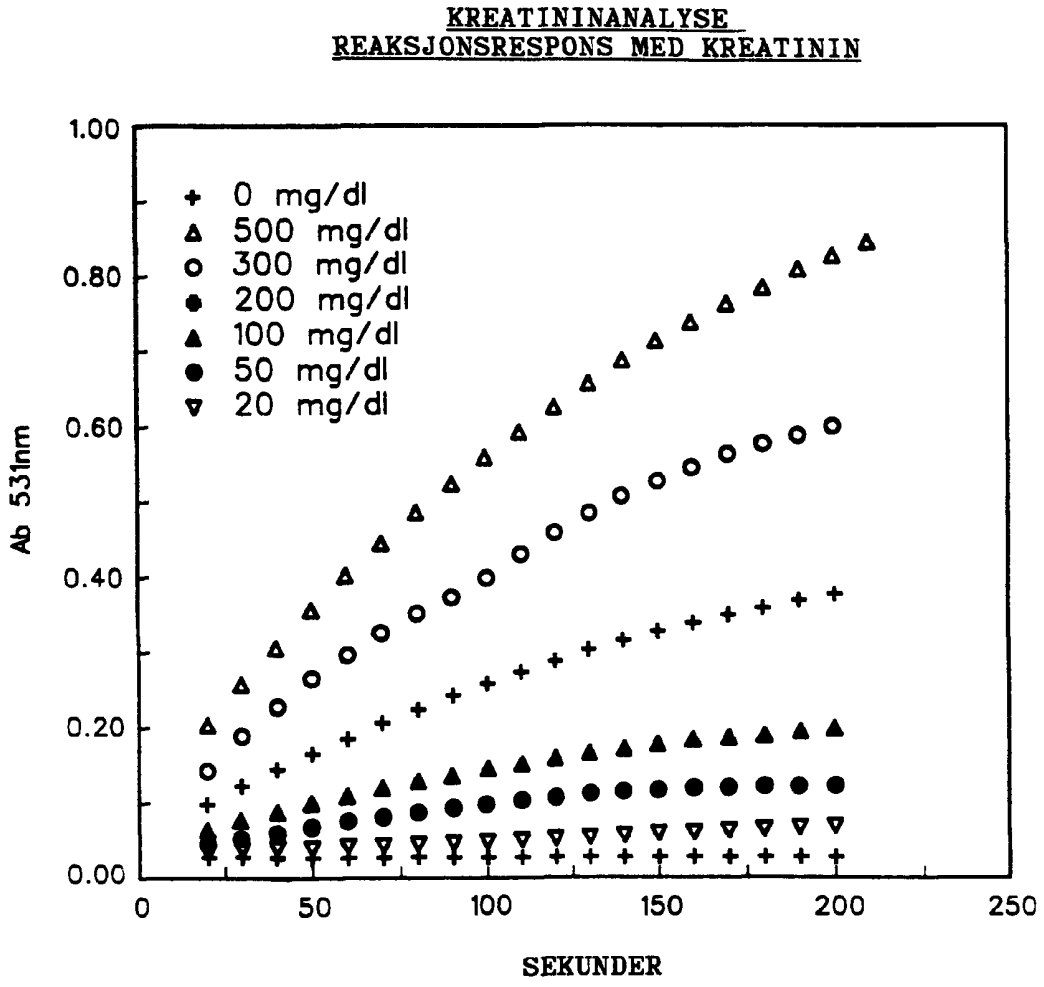

KREATININANALYSE
REAKSJONSRESPONS MED KREATININ
1.00
0.80
0.60
0.40
0.20
0.00
Ab 531nm
0 mg/dl
500 mg/dl
300 mg/dl
200 mg/dl
100 mg/dl
50 mg/dl
20 mg/dl
0
50
100
150
200
250
SEKUNDER

FIG. 1

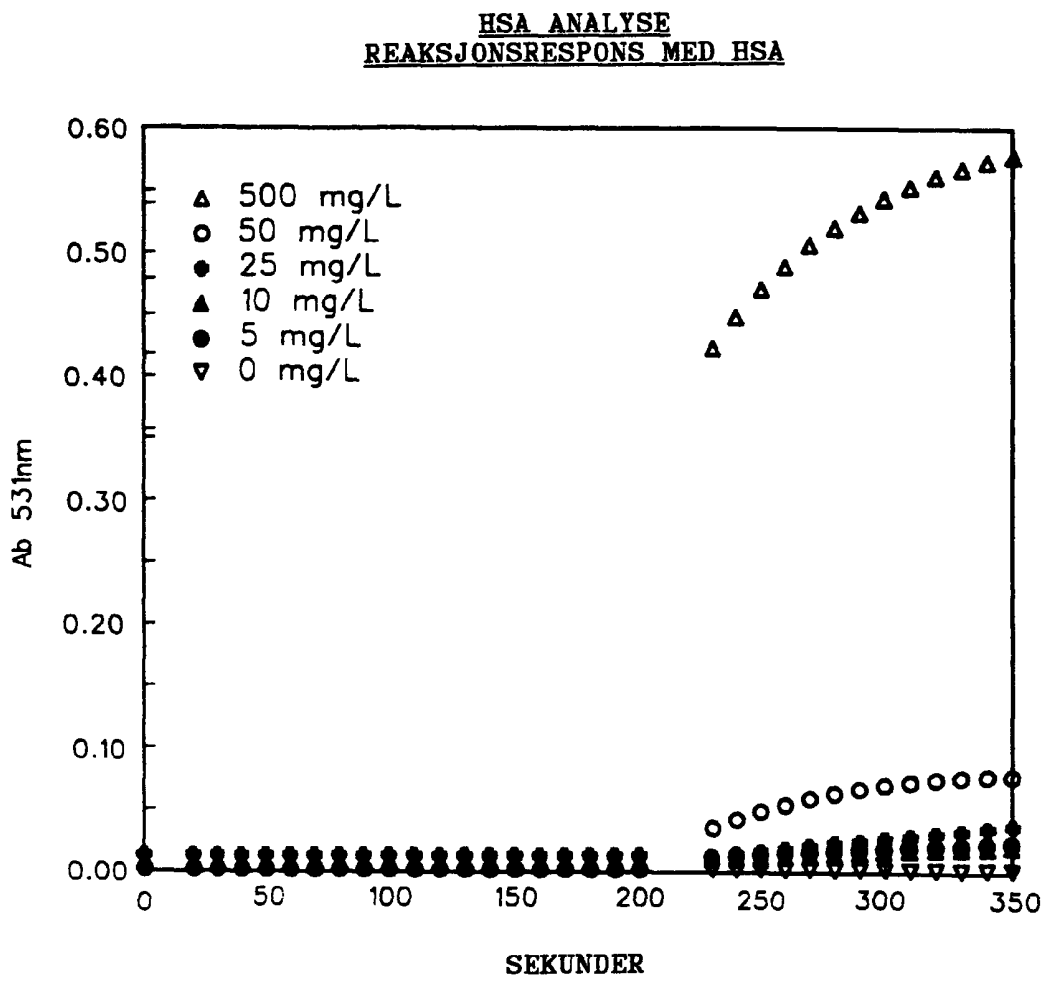

HSA ANALYSE
REAKSJONSRESPONS MED HSA
0.60
0.50
0.40
0.30
0.20
0.10
0.00
Ab 531nm
500 mg/L
50 mg/L
25 mg/L
10 mg/L
5 mg/L
0 mg/L
0
50
100
150
200
250
300
350
SEKUNDER

FIG. 2

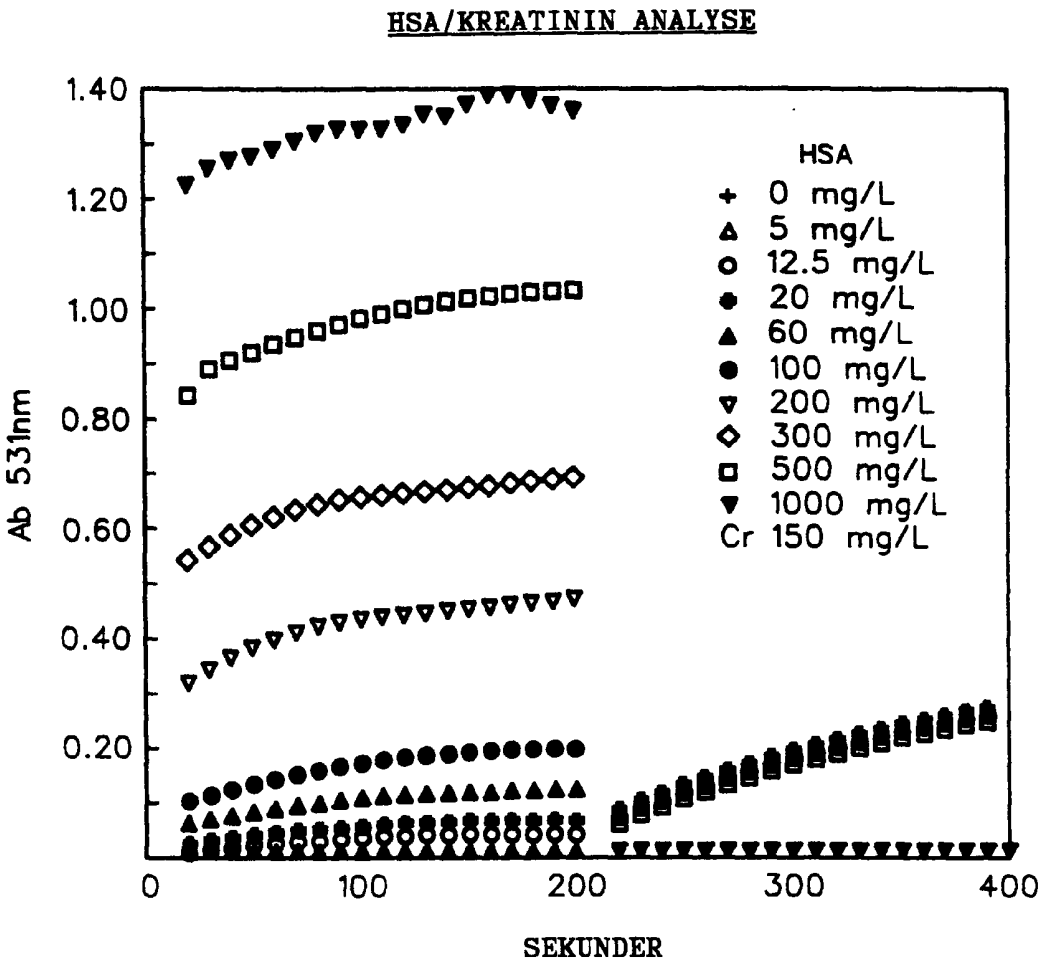

HSA/KREATININ ANALYSE
1.40
1.20
1.00
0.80
0.60
0.40
0.20
Ab 531nm
0
100
200
300
400
SEKUNDER
HSA
0 mg/L
5 mg/L
12.5 mg/L
20 mg/L
60 mg/L
100 mg/L
200 mg/L
300 mg/L
500 mg/L
1000 mg/L
Cr 150 mg/L

FIG. 3

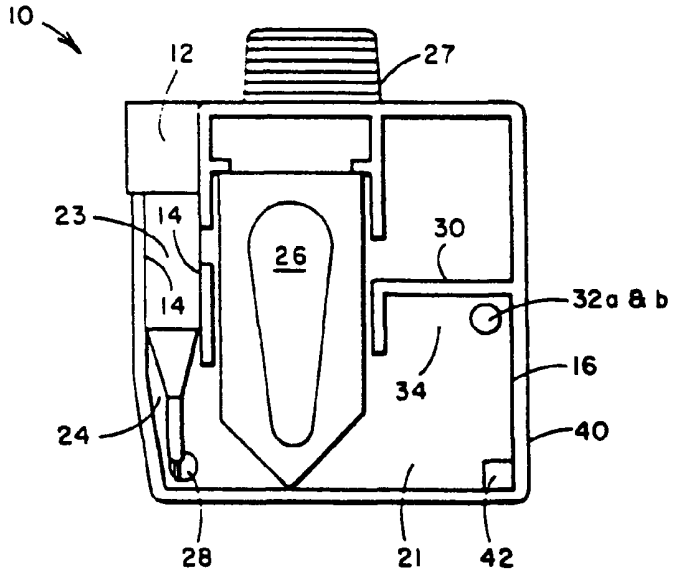

10
12
27
23
14
14
26
30
32a & b
16
34
24
40
28
21
42

FIG. 4

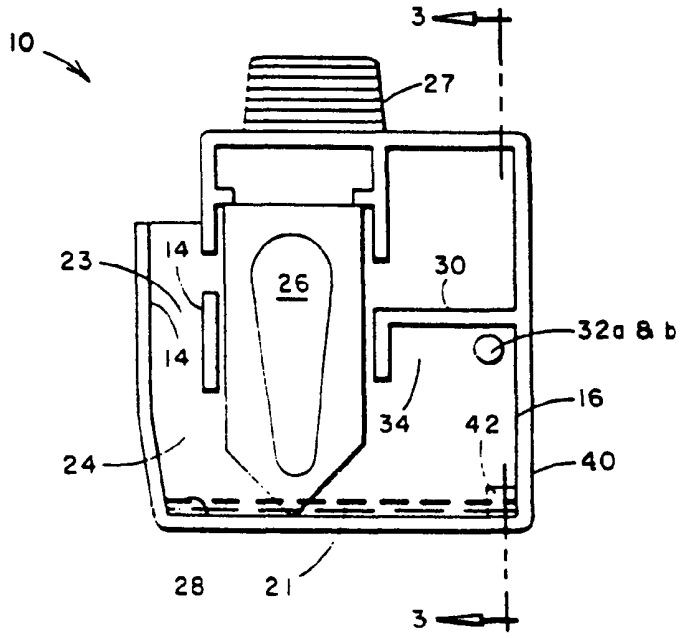

3
10
27
23
14
14
26
30
32a & b
16
34
42
24
40
28
21
3

FIG. 5

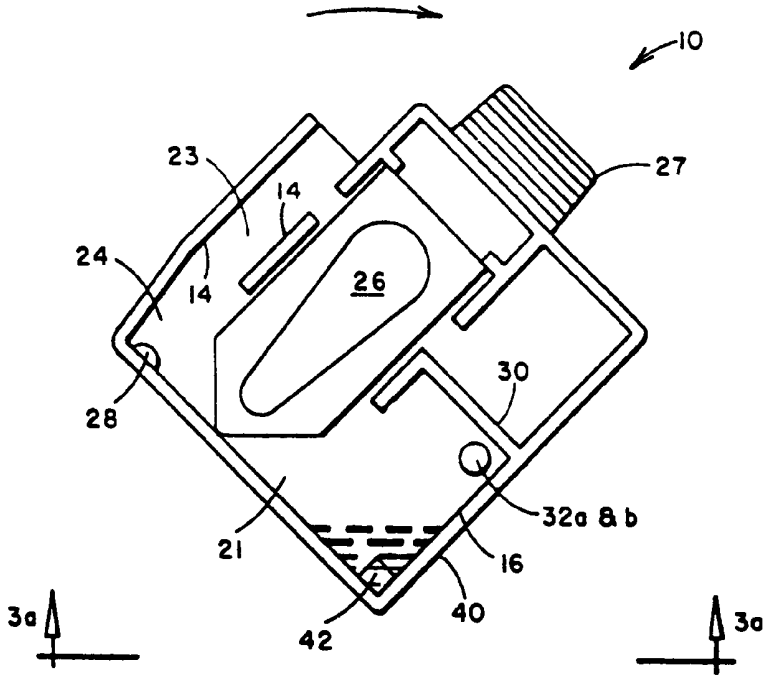

10
23
14
27
24
14
26
30
28
32a & b
21
16
40
42
3a
3a

FIG. 6

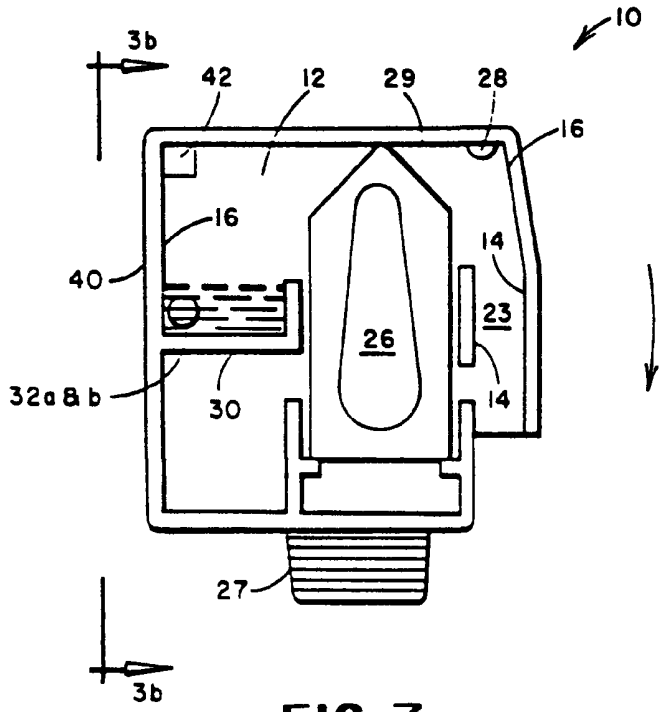

10
3b
42
12
29
28
16
16
14
40
23
26
32a & b
30
14
27
3b

FIG. 7

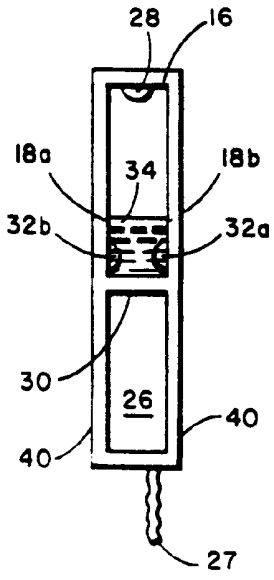


FIG. 8

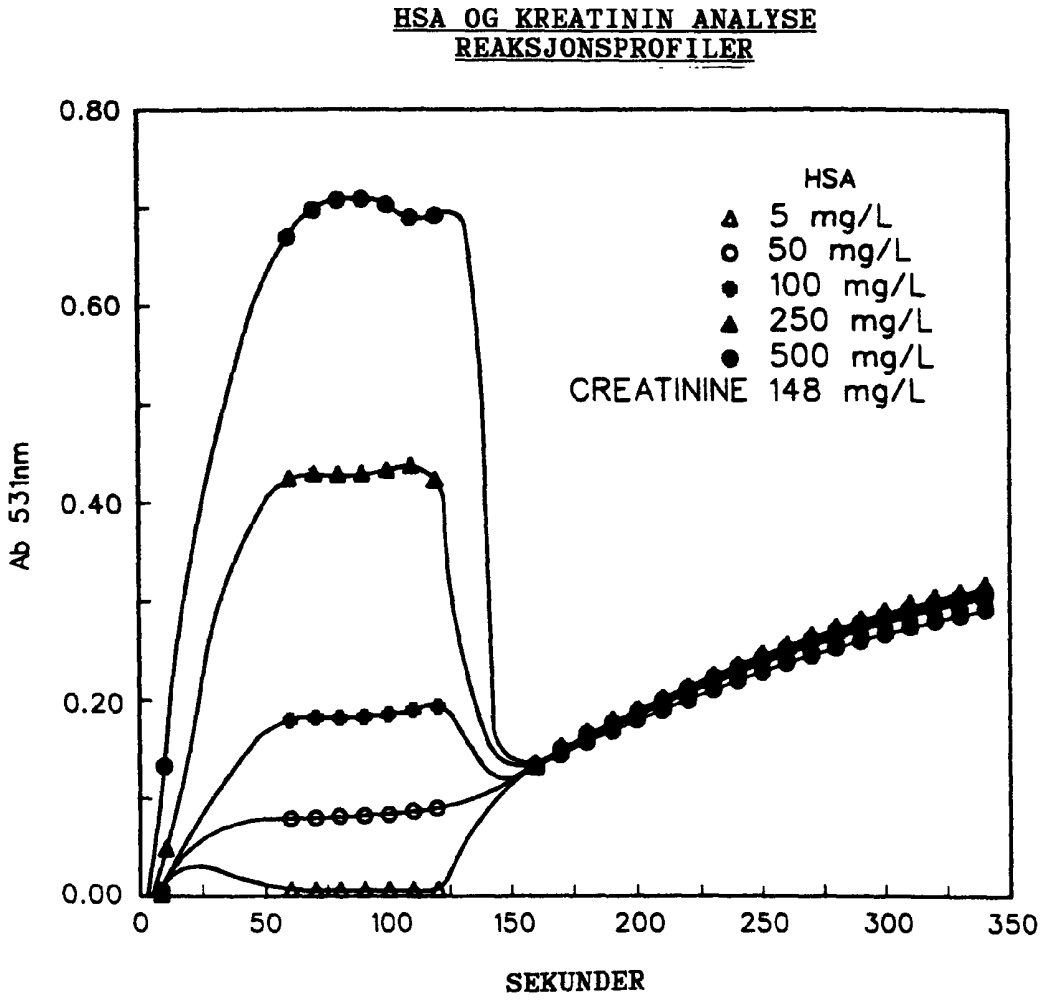

HSA OG KREATININ ANALYSE
REAKSJONSPROFILER
0.80
0.60
0.40
0.20
0.00
Ab 531nm
HSA
5 mg/L
50 mg/L
100 mg/L
250 mg/L
500 mg/L
CREATININE 148 mg/L
0
50
100
150
200
250
300
350
SEKUNDER

FIG. 9