(19) DANMARK

(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT (11) 165765 B

Patentdirektoratet
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 4589/86

(22) Indleveringsdag: 25 sep 1986

(41) Alm. tilgængelig: 27 mar 1987

(44) Fremlagt: 11 jan 1993

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 26 sep 1985 CH 4172/85

(51) Int.Cl.5 G 01 N 33/72
G 01 N 33/52
G 01 N 33/96

(71) Ansøger: *F. HOFFMANN-LA ROCHE AG; Grenzacherstrasse 124 - 184; 4002 Basel, CH

(72) Opfinder: Michel Le *Dain; FR

(74) Fuldmægtig: Plougmann & Vingtoft A/S

(54) Fremgangsmåde til bestemmelse af bilirubinindhold, prøvesæt til brug ved denne fremgangsmåde, samt anvendelse af et reagens til brug ved fremsilling af prøvesættet

(56) Fremdragne publikationer

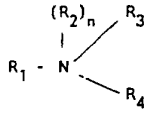
EP off.g.skrift nr. 87150

(57) Sammendrag:

4589-86

Fremgangsmåde til bestemmelse af totalbilirubin i en biologisk prøve ved hjælp af diazometoden samt hertil egnede reagenser.

Fremgangsmåden består i, at der ved bilirubinbestemmelsen anvendes ét eller flere detergenter med den almene formel I



I

hvor R_1 er ligekædet eller forgrenet alkyl med 10-16 carbonatomer, R_2 er oxygen eller ligekædet eller forgrenet alkyl med 1-4 carbonatomer; R_3, når n = 0, er hydrogen eller ligekædet eller forgrenet alkyl med 1-4 carbonatomer eller $-(CH_2-CH_2-O)_xH$, hvor x er et helt tal fra 1 til 5, R_3, når n = 1, og R_2 er oxygen, er ligekædet eller forgrenet alkyl med 1-4 carbonatomer eller $-(CH_2-CH_2-O)_xH$, hvor x er et helt tal fra 1-5, R_3, når n = 1, og R_2 er ligekædet eller forgrenet alkyl med 1-4 carbonatomer, er ligekædet eller forgrenet alkyl med 1-4 carbonatomer; R_4, når n = 0, er hydrogen eller ligekædet eller forgrenet alkyl med 1-4 carbonatomer eller $-(CH_2-CH_2-O)_xH$, hvor x er et helt tal fra 1-5, R_4, når n = 1, og R_2 er oxygen, er ligekædet eller forgrenet alkyl med 1-4 carbonatomer eller $-(CH_2-CH_2-O)_xH$, hvor x er et helt tal fra 1-5, R_4, når n = 1, og R_2 er ligekædet eller forgrenet alkyl med 1-4 carbonatomer, er ligekædet eller forgrenet alkyl med 1-10 carbonatomer; eller R_2, R_3 og R_4 tilsammen med nitrogenatomet danner en pyridiniumgruppe, idet der i dette tilfælde, samt i tilfælde, hvor n = 1, og R_2 er ligekædet eller forgrenet alkyl med 1-4 carbonatomer, forekommer en tilsvarende anion.

Fremgangsmåden til bestemmelse af bilirubin giver højere linearitet, gunstigere reaktionskinetik, der tillader anvendelse af auto-blanking-systemet, lang brugsopløsningsstabilitet og god reproducerbarhed.

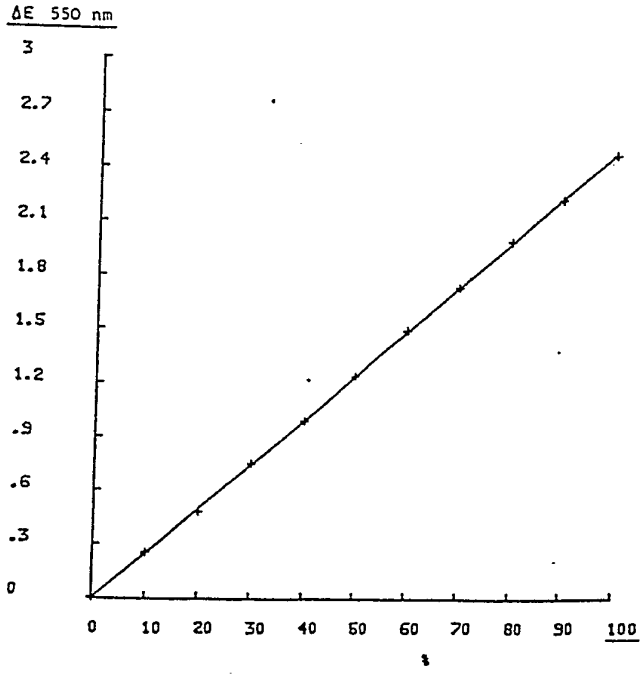
Detergentet med den almene formel I er især dodecylethyldimethyl-ammoniumbromid.

Reagenserne til anvendelse ved bestemmelse af bilirubin kan foreligge i vandig opløsning eller fortrinsvis i stabiliseret eller lyofiliseret form.

fortsættes

Afbildning 1

4589-86



= 42,8 mg/dl
(732 µmol/l)

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til bestemmelse af totalbilirubininindhold i en biologisk prøve ved diazometoden samt hertil egnede reagenser.

Bestemmelse af totalbilirubininindhold ved diazometoden er en for fagmanden velkendt teknik. Dog udviser denne metode samt de hertil anvendte prøvesæt visse ulemper, idet det især hidtil ikke har været muligt at gennemføre denne metode i analyseautomater ved den såkaldte auto-blanking-metode.

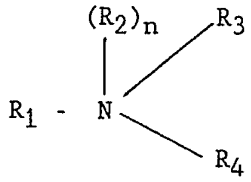
Fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse og de hertil tilvejebragte prøvesæt giver en test, der udmærker sig ved følgende overraskende fordele:

- højere linearitet
- en for reaktionen gunstig kinetik, der tillader anvendelse af auto-blanking-systemet
- enklere reagenstilberedning
- lang brugsopløsningsstabilitet og
- god nøjagtighed og god reproducerbarhed.

Som bekendt består diazometoden til bestemmelse af bilirubin i, at det i den biologiske prøve indeholdte bilirubin omsættes med en diazoniumforbindelse til et farvestof, hvis intensitet svarer til bilirubinmængden i prøven.

I EP-A-0 087 150 foreslåes det, at bestemmelse af totalbilirubin gennemføres ved diazometoden i nærværelse af acceleratoren tetramethylensulfon. Tilstedeværelse af tetralmethylensulfon muliggør desuden anvendelse af ikke-ioniske overfladeaktive midler. Den beskrevne metode giver linære resultater op til et indhold på 20 mg/dl bilirubin.

Inden for rammerne af den foreliggende opfindelse har det nu overraskende vist sig, at de ovennævnte fordele kan opnås ved, at der ved bilirubinbestemmelsen ifølge diazometoden anvendes ét eller flere detergenter med den almene formel I



I

hvor R_1 er ligekædet eller forgrenet alkyl med 10-16 carbonatomer, R_2 er oxygen eller ligekædet eller forgrenet alkyl med 1-4 carbonatomer; R_3, når n = 0, er hydrogen eller ligekædet eller forgrenet alkyl med 1-4 carbonatomer eller- $(CH_2\text{-}CH_2\text{-}O)_xH$, hvor x er et helt tal fra 1 til 5, R_3, når n = 1, og R_2 er oxygen, er ligekædet eller forgrenet alkyl med 1-4 carbonatomer eller $-(CH_2\text{-}CH_2\text{-}O)_xH$, hvor x er et helt tal fra 1-5, R_3, når n = 1, og R_2 er ligekædet eller forgrenet alkyl med 1-4 carbonatomer, er ligekædet eller forgrenet alkyl med 1-4 carbonatomer; R_4, når n = 0, er hydrogen eller ligekædet eller forgrenet alkyl med 1-4 carbonatomer eller- $(CH_2\text{-}CH_2\text{-}O)_xH$, hvor x er et helt tal fra 1-5, R_4, når n = 1, og R_2 er oxygen, er ligekædet eller forgrenet alkyl med 1-4 carbonatomer eller $-(CH_2\text{-}CH_2\text{-}O)_xH$, hvor x er et helt tal fra 1-5, R_4, når n = 1, og R_2 er ligekædet eller forgrenet alkyl med 1-4 carbonatomer, er ligekædet eller forgrenet alkyl med 1-10 carbonatomer; eller R_2, R_3 og R_4 tilsammen med nitrogenatomet danner en pyridiniumgruppe, idet der i dette tilfælde, samt i tilfælde, hvor n = 1, og R_2 er ligekædet eller forgrenet alkyl med 1-4 carbonatomer, forekommer en tilsvarende anion.

Foretrukne detergenter (i det følgende også betegnet acceleratorreagenser) med formlen I, er N,N-dimethyl-decylamin, N,N-dimethyl-dodecylamin, N,N-dimethyl-tetradecylamin, N,N-dimethyl-hexadecylamin, didecyldimethylammoniumchlorid, dodecyltrimethylammoniumchlorid, dodecyltrimethylammoniumbromid, dodecylethyldimethylammoniumbromid, dodecylpyridiniumchlorid, tetradecyltrimethylammoniumbromid samt N,N-dimethyldodecylaminoxid. Et særligt foretrukket detergent med den almene formel I er dodecylethyldimethylammoniumbromid.

I første aspekt angår den foreliggende opfindelse prøvesæt til bestemmelse af totalbilirubinindhold i en biologisk prøve, hvilket prøvesæt omfatter en beholder, som indeholder en vandig opløsning af

a1) en eller flere detergenter

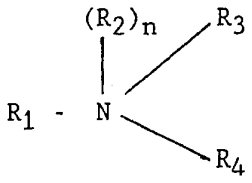
2) en aromatisk aminoforbindelse, der ved hjælp af nitrit lader sig omdanne til en ved bestemmelse af bilirubininhold sædvanlig diazoniumforbindelse,

3) en stærk syre,

og en beholder, som indeholder

b) en vandig nitritopløsning,

hvilket prøvesæt er ejendommelig ved, at detergenterne har den almene formel I



I

hvor R_1 er ligekædet eller forgrenet alkyl med 10-16 carbonatomer, R_2 er oxygen eller ligekædet eller forgrenet alkyl med 1-4 carbonatomer; R_3, når n = 0, er hydrogen eller ligekædet eller forgrenet alkyl med 1-4 carbonatomer eller - $(CH_2-CH_2-O)_xH$, hvor x er et helt tal fra 1 til 5, R_3, når n = 1, og R_2 er oxygen, er ligekædet eller forgrenet alkyl med 1-4 carbonatomer eller- $(CH_2-CH_2-O)_xH$, hvor x er et helt tal fra 1-5, R_3, når n = 1, og R_2 er ligekædet eller forgrenet alkyl med 1-4 carbonatomer, er ligekædet eller forgrenet alkyl med 1-4 carbonatomer; R_4, når n = 0, er hydrogen eller ligekædet eller forgrenet alkyl med 1-4 carbonatomer eller -$(CH_2-CH_2-O)_xH$, hvor x er et helt tal fra 1-5, R_4, når n = 1, og R_2 er oxygen, er ligekædet eller forgrenet alkyl med 1-4 carbon atomer eller -$(CH_2-CH_2-O)_xH$, hvor x er et helt tal fra 1-5, R_4, når n = 1, og R_2 er ligekædet eller forgrenet alkyl med 1-4 carbonatomer, er ligekædet eller forgrenet alkyl med 1-10 carbonatomer; eller R_2, R_3 og R_4 tilsammen med nitrogenatomet danner en pyridiniumgruppe, idet der i dette tilfælde, samt i

tilfælde, hvor n = 1, og R_2 er ligekædet eller forgrenet alkyl med 1-4 carbonatomer, forekommer en tilsvarende anion,

I et andet aspekt angår den foreliggende opfindelse et prøvesæt til bestemmelse af totalbilirubin i en biologisk prøve, hvilket prøvesæt indeholder

a) ét eller flere detergenter med den almene formel I,
b) en ved bilirubinbestemmelse sædvanlig diazoniumforbindelse og
c) en stærk syre.

I de ovennævnte prøvesæt er detergentet med den almene formel I fortrinsvis til stede i en koncentration på 0,25-10%, især i en koncentration på 1-3%.

Den aromatiske aminoforbindelse er fortrinsvis til stede i en koncentration på 0,5-40 mM, især en koncentration på 1-30 mM.

Som foretrukne stærke syrer kommer amidosvovlsyre, saltsyre samt svovlsyre i betragtning.

Koncentrationen af amidosvovlsyre ligger fortrinsvis i området 0,025-1 M, især i området 0,10-0,25 M, og blandingen af indholdet i de to beholdere har fortrinsvis en pH-værdi på 1-3.

Ved anvendelse af saltsyre er koncentrationen fortrinsvis i området 0,01-0,5 M, især i området 0,05-0,2 M, og blandingen af indholdet af de to beholdere har fortrinsvis en pH-værdi på 1-3.

Ved anvendelse af svovlsyre ligger koncentrationen fortrinsvis i området 0,01-0,5 M, især i området 0,05-0,25 M, og blandingen af indholdet af de to beholdere har fortrinsvis en pH-værdi på 1-3.

Den aromatiske aminoforbindelse, der ved hjælp af nitritopløsningen lader sig omsætte til den tilsvarende diazoniumforbindelse, er fortrinsvis 4-aminobenzensulfonsyre, 2,4- eller 2,5-dichloranilin, 4-nitroanilin, 2-methoxy-4-nitroanilin eller 2-methoxy-5-nitroanilin.

Den ovennævnte nitritopløsning har fortrinsvis en koncentration på 4-100 mM.

For så vidt prøvesættet allerede indeholder den færdige diazoniumforbindelse, drejer det sig her fortrinsvis om diazoteret aminobenzensulfonsyre eller diazoteret 2,3- eller 2,5-dichloranilin eller diazoteret 4-nitroanilin eller 2-methoxy-4-nitroanilin eller 2-methoxy-5-nitroanilin.

Koncentrationen af diazoniumforbindelse i den vandige opløsning ligger fortrinsvis i området 0,10-5,0 g/l, især i en koncentration på 0,15-3,0 g/l.

De foretrukne detergenter med den almene formel I er allerede omtalt indledningsvis, idet dog hertil kan bemærkes, at substituenterne R_3 og R_4 i den almene formel I fortrinsvis har samme betydning.

I et tredje aspekt angår den foreliggende opfindelse et stabiliseret eller lyofiliseret reagens til brug ved fremstilling af prøvesættet, hvilket prøvesæt indeholder diazoteret aminobenzensulfonsyre, diazoteret 4-nitroanilin, 2-methoxy-4-nitroanilin, 2-methoxy-5-nitroanilin, 2,4-dichloranilin eller 2,5-dichloranilin, samt ét eller flere detergenter med den almene formel I.

I et fjerde aspekt angår den foreliggende opfindelse en fremgangsmåde til bestemmelse af totalbilirubinindhold i en biologisk prøve ved diazometoden ved stærk sur pH, hvilken fremgangsmåde er ejendommelig ved, at der anvendes ét eller flere detergenter med den almene formel I.

I et femte aspekt angår den foreliggende opfindelse anvendelse af et detergent med den almene formel I ved en fremgangsmåde til bestemmelse af totalbilirubinindhold ved diazometoden ved stærk sur pH i en biologisk prøve.

I et sjette aspekt angår den foreliggende opfindelse en fremgangsmåde til bestemmelse af totalbilirubinindhold i en biologisk prøve ved diazometoden ved stærk sur pH og ved autoblanking-metoden, hvilken

fremgangsmåde er ejendommelig ved, at der anvendes ét eller flere detergenter med den almene formel I.

Afbildning 1 viser linearitetsundersøgelser med et højkoncentreret bilirubinkontrolserum (se eksempel 1 for nærmere detaljer).

Afbildning 2 viser kinetik for reaktionen med en fortyndingsrække af kontrolserumblanding (se eksempel 3 for nærmere detaljer).

Afbildning 3 viser overensstemmelse med kontrolsera (se eksempel 4 for nærmere detaljer).

Afbildning 4 viser kinetik for reaktionen med en fortyndingsrække af kontrolserumblanding (se eksempel 5 for nærmere detaljer).

Afbildning 5 viser recovery-undersøgelser med kontrolserumblandinger (se eksempel 7 for nærmere detaljer).

Afbilning 6 viser linearitetsundersøgelser med højkoncentreret bilirubinserum (se eksempel 8 for nærmere detaljer).

Opfindelsen illustreres ved nedenstående eksempler.

EKSEMPEL 1

- Reagensopløsninger:

Reagensopløsning 1 indeholder 20 g dodecylethyldimethylammoniumbromid og 5,195 g sulfanilsyre opløst i 1 liter 0,05N saltsyre. Reagens 2 er en 6,25 mM vandig natriumnitritopløsning. Reagens 1 blandes med reagens 2 i forholdet 5:1. Efter 1 minut ved stuetemperatur er reaktionsblandingen klar til brug.

- Testgennemførelse på Cobas-Bio®

Brugsreagenset blandes med serum eller bilirubinstandard ved en forudbestemt temperatur (25°C, 30°C eller 37°C) i forholdet 17,5:1.

Ekstinktionen måles ved 550 nm efter nøjagtig 4,5 sekunder og igen efter 304,5 sekunder.

- Beregning:

- ved *sammenligning* af ekstinktionsdifferencen med en bilirubinstandard eller et kontrolserum:

$$\frac{(E_2P-E_1P)-RL}{(E_2S-E_1S)-RL} \times \text{bilirubinkoncentration (S)}$$

P = prøve
S = standard eller kontrolserum.

Reagensblindværdi (RL) måles systematisk på instrumentet og trækkes fra.

- ved *faktor:* mg/dl = 18,09 x ΔE
μmol/l = 309 x ΔE

Afbildning 1 viser linearitetsundersøgelsen med et højkoncentreret bilirubinkontrolserum (42,8 mg/dl).

EKSEMPEL 2

- Reagensopløsning
Jfr. eksempel 1

- Testgennemførelse: manuel fremgangsmåde

I kuvetter (lysvej 1 cm) blev reagensopløsningerne pipetteret på følgende måde:

	Analyse (A)	Analyseblindværdi (AL)
- Reagensopløsning 1	-	1,0 ml
- Reagensblanding	1,0 ml	-
- Prøve	0,10 ml	0,10 ml

Der blandes grundigt, hvorefter blandingen henstilles i 10 minutter ved stuetemperatur. I de derefter følgende 60 minutter måles prøvens ekstinktion mod analyseblindværdien ved 546 nm eller 550 nm.

Med frisk reagensblanding (1 dag ved stuetemperatur eller 5 dage ved 4°C) kan reagensblindværdien udelades.

- Bedømmelse

Ved sammenligning af ekstinktionsforskellen med bilirubinstandard eller kontrolserum:

$$\frac{E(A)-E(AL)}{E(S)-E(SL)} \times \text{bilirubinkoncentration (S)}$$

- ved faktor = 12,4 x ΔE (mg/dl)
212 x ΔE (μmol/l)

EKSEMPEL 3

- Reagenser

- Lyofiliseret diazoreagens

I en 25 mM vandig amidosvovlsyreopløsning opløses følgende i den angivne rækkefølge:

4 g D-mannit
1 g dextran 32 og
2,4 g diazoteret sulfanilsyre-tetrafluorboratsalt.

Opløsningen fyldes op til 1 liter og fordeles i 3 ml-portioner til lyofilisering. Når temperaturen i lyofilisatoren når -40°C, indstilles vakuumet (0,01 mm Hg). Derefter varmes pladerne til 10°C under vakuum i ca. 16 timer. Til sidst tørres lyofilisatet i 2 timer ved 20°C under vakuum.

- Acceleratorreagens

Til en 0,25M vandig amidosvovlsyreopløsning sættes der følgende i den angivne rækkefølge:

75 ml dodecyldimethylaminoxid (30% vandig opløsning)
1 g methylparaben og
25 g D-mannit.

Opløsningen fyldes op til 1 liter.

Opløsningen kan anvendes som flydende reagens eller, som ovenfor, lyofiliseres efter fordeling i 6 ml-portioner.

- Brugsreagenser

Det lyofiliserede diazoreagens opløses i 3 ml deioniseret vand. For så vidt acceleratorreagenset er lyofiliseret, opløses det i 6 ml deioniseret vand.

- Testudførelse på Cobas Bio®

Acceleratorreagensopløsningen blandes med en serumprøve (P) eller en bilirubinstandard (S) ved en forudbestemt temperatur (25°C, 30°C eller 37°C) i forholdet 12,5:1. Efter en inkubationstid på 10 sekunder måles ekstinktionen ved 550 nm (= analyseblindværdi). Derefter sættes der 40 µl diazoreagensopløsning til kuvetten, og ekstinktionen aflæses efter 1 sekund og igen efter 301 sekunder.

- Bedømmelse

Ved sammenligning af ekstinktionsdifferencen med en bilirubinstandard eller med et kontrolserum:

$$\frac{(E_2P-E_1P)-AL-RL}{(E_2S-E_1S)-SL-RL} \times \text{bilirubinkoncentration (S)}$$

P = prøve

S = standard

AL = analyseblindværdi, SL = standardblindværdi

RL = reagensblindværdi målt systematisk på instrument og trukket fra.

- ved *faktor*: 16,10 x ΔE for mg/dl
  275 x ΔE for μmol/l

- Afbildning 2: Kinetik for reaktionen med en fortyndingsrække af kontrolserumblanding (40,4 mg bilirubin/dl).

EKSEMPEL 4

- Reagenser

- Lyofiliseret diazoreagens og
- acceleratorreagens jfr. eksempel 3

- Brugsreagenser jfr. eksempel 3

- Testudførelse: manuel fremgangsmåde

I kuvetter (lysvej 1 cm) pipetteres reagensopløsningerne ved stuetemperatur på følgende måde:

- prøve eller standard: 0,10 ml
- acceleratorreagensopløsning: 1,00 ml

Der blandes grundigt, og ekstinktion (E_1) ved 546 nm eller 550 nm aflæses mod vand.

- diazoreagensopløsning: 0,20 ml

Der blandes grundigt, og efter 6 minutter aflæses ekstinktionen (E_2) mod vand.

- Bedømmelse

- Ved sammenligning af ekstinktionsforskellen med en bilirubinstandard eller med et kontrolserum:

$$\frac{E_2P-E_1P}{E_2S-E_1S} \times \text{bilirubinkoncentration (S)}$$

- ved faktor: 16,3 x ΔE (mg/dl)
279 x ΔE (μmol/l)

- Afbildning 3: Rigtighed over for kontrolsera (koncentration i mg/dl).

EKSEMPEL 5

- Reagenser

- Lyofiliseret diazoreagens og
- acceleratorreagens jfr. eksempel 3

- Brugsreagenser

- For så vidt acceleratorreagenset er lyofiliseret, opløses det i 6 ml deioniseret vand.

- Diazoreagenset opløses i 18 ml acceleratorreagensopløsning.

- Testudførelse på Cobas Bio®

Brugsreagenset blandes med serum eller bilirubinstandard ved en forudbestemt temperatur (25°C, 30°C eller 37°C) i forholdet 17,5:1. Ekstinktionen måles efter nøjagtigt 4,5 sekunder ved 550 nm og igen efter 304,5 sekunder.

- Bedømmelse:

- Sammenligning med ekstinktionsforskel, jfr. eksempel 3
- Med faktor = 16,80 x ΔE (mg/dl)
  = 287 x ΔE (μmol/l).

- Afbildning 4:

Reaktionens kinetik med fortyndingsrækken af en kontrolserumblanding (40,4 mg/dl).

EKSEMPEL 6

- Reagenser, jfr. eksempel 5.

- Testudførelse: (manuel fremgangsmåde)

I kuvetter (lysvej 1 cm) pipetteres de nedenfor angivne opløsninger ved stuetemperatur på følgende måde:

	Analyse (A)	Analyseblindværdi (AL)
- Acceleratorreagensopløsning	-	1,0 ml
- Brugsreagensopløsning	1,0 ml	-
- Serum eller standard	0,10 ml	0,10 ml

Der blandes grundigt, hvorefter efter 6 minutter ekstinktionen mod ekstinktion (AL) aflæses ved 546 nm eller 550 nm.

For hver serie måles der en reagensblindværdi (brugsreagensopløsning).

- Bedømmelse

- Ved ekstinktionsforskel med en standard

$$\frac{E(A)-E(AL)-RL}{E(S)-E(SL)-RL} \times \text{bilirubinkoncentration (S)}$$

med faktor: 13,20 x ΔE (mg/dl)
226 x ΔE (μmol/l).

EKSEMPEL 7

- Lyofiliseret monoreagens

I en 0,333M vandig amidosvovlsyreopløsning tilsættes og blandes der følgende i den angivne rækkefølge:

60 g dodecylethyldimethylammoniumbromid
3 g dextran 32 og
1 g diazoteret sulfanilsyre-tetrafluorboratsalt.

Opløsningen fyldes op til 1 liter og fordeles i 2 ml-portioner til lyofilisering. Lyofiliseringen udføres som beskrevet i eksempel 3.

- Brugsreagens:

Lyofilisatet opløses i 6 ml deioniseret vand. Dette reagens er særlig anvendeligt til analyseautomater.

- Testudførelse på Cobas Bio®

som beskrevet i eksempel 1.

- Bedømmelse:

  - ved sammenligning med standard eller kontrolserum, jfr. eksempel 1
  - ved faktor: 16,95 x ΔE (mg/dl)
    290 x ΔE (μmol/l).

- Afbildning 5: Recovery-undersøgelser med kontrolserumblandinger (23-366 μmol/l).

EKSEMPEL 8

Lyofiliseret monoreagens med diazoteret 2,4-dichloranilin

- Lyofiliseret monoreagens

I en 0,333M vandig amidosvovlsyreopløsning tilsættes der og blandes der følgende i den nævnte rækkefølge:

30 g dodecylethyldimethylammoniumbromid
6 g dextran 32 og
1,4 g diazoteret 2,4-dichloranilin stabiliseret med naphthalendisulfonsyrenatriumsalt.

Opløsningen fyldes op til 1 liter og fordeles i 2 ml-portioner til lyofilisering (jfr. eksempel 3).

- Brugsreagens

Lyofilisatet opløses i 6 ml deioniseret vand.

- Testudførelse på Cobas Bio®

som beskrevet i eksempel 1.

- Bedømmelse:

  - ved sammenligning med standard eller kontrolserum som beskrevet i eksempel 1
  - med faktor: 19,80 x ΔE (mg/dl).

- Afbildning 6:

Linearitetsundersøgelse med et højkoncentreret bilirubinkontrolserum (37,7 mg/dl).

EKSEMPEL 9

Lyofiliseret monoreagens med diazoteret 2,5-dichloranilin

- Lyofiliseret monoreagens

I en 0,333M vandig amidosvovlsyreopløsning tilsættes og blandes der følgende i nævnte rækkefølge:

30 g dodecylethyldimethylammoniumbromid
6 g dextran 32 og
1,4 g diazoteret 2,5-dichloranilin stabiliseret med naphthalendisulfonsyrenatriumsalt.

Opløsningen fyldes op til 1 liter og fordeles i 2 ml-portioner til lyofilisering (jfr. eksempel 3).

- Brugsreagens

Lyofilisatet opløses i 6 ml deioniseret vand.

- Testudførelse på Cobas-Bio®

Brugsreagenset blandes med serum eller bilirubinstandard ved 25°C i forholdet 17,5:1. Ekstinktionen måles ved 550 nm efter nøjagtig 4,5 sekunder og igen efter 304,5 sekunder.

- Bedømmelse

  - ved sammenligning af ekstinktionsforskellen med en bilirubinstandard eller et kontrolserum
  - ved faktor: mg/dl = 21,11 x ΔE
    μmol/l = 361 x ΔE.

EKSEMPEL 10

Lyofiliseret monoreagens med 4-nitrobenzendiazonium-tetrafluorboratsalt.

- Lyofiliseret monoreagens

I en 0,333M vandig amidosvovlsyreopløsning tilsættes og blandes der følgende i nævnte rækkefølge:

54 ml dodecyldimethylamin
6 g dextran 32 og
0,6 g 4-nitrobenzendiazonium-tetrafluorboratsalt.

Opløsningen fyldes op til 1 liter og fordeles i 2 ml-portioner til lyofilisering (jfr. eksempel 3).

- Brugsreagens

Lyofilisatet opløses i 6 ml deioniseret vand.

- Testudførelse på Cobas-Bio®

Testudførelsen udføres som i eksempel 9.

- Bedømmelse

  - ved sammenligning af ekstinktionsforskellen med en bilirubinstandard eller et kontrolserum
  - ved faktor: mg/dl = 18,44 x ΔE
    μmol/l = 315,1 x ΔE.

PATENTKRAV

1. Prøvesæt til bestemmelse af totalbilirubinindhold i en biologisk prøve, hvilket prøvesæt omfatter en beholder, som indeholder en vandig opløsning af

a1) en eller flere detergenter

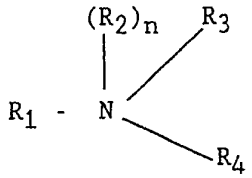
2) en aromatisk aminoforbindelse, der ved hjælp af nitrit lader sig omdanne til en ved bestemmelse af bilirubinindhold sædvanlig diazoniumforbindelse,

3) en stærk syre,

og en beholder, som indeholder

b) en vandig nitritopløsning,

k e n d e t e g n e t ved, at detergenterne har den almene formel I



I

hvor R_1 er ligekædet eller forgrenet alkyl med 10-16 carbonatomer, R_2 er oxygen eller ligekædet eller forgrenet alkyl med 1-4 carbonatomer; R_3, når n = 0, er hydrogen eller ligekædet eller forgrenet alkyl med 1-4 carbonatomer eller- $(CH_2\text{-}CH_2\text{-}O)_xH$, hvor x er et helt tal fra 1 til 5, R_3, når n = 1, og R_2 er oxygen, er ligekædet eller forgrenet alkyl med 1-4 carbonatomer eller $-(CH_2\text{-}CH_2\text{-}O)_xH$, hvor x er et helt tal fra 1-5, R_3, når n = 1, og R_2 er ligekædet eller forgrenet alkyl med 1-4 carbonatomer, er ligekædet eller forgrenet alkyl med 1-4 carbonatomer; R_4, når n = 0, er hydrogen eller ligekædet eller forgrenet alkyl med 1-4 carbonatomer eller- $(CH_2\text{-}CH_2\text{-}O)_xH$, hvor x er et helt tal fra 1-5, R_4, når n = 1, og R_2 er oxygen, er ligekædet eller forgrenet alkyl med 1-4 carbonatomer eller $-(CH_2\text{-}CH_2\text{-}O)_xH$, hvor x er et helt tal fra 1-5, R_4, når n = 1, og R_2 er ligekædet eller forgrenet alkyl med 1-4 carbonatomer, er ligekædet eller forgrenet alkyl med 1-10 carbonatomer; eller R_2, R_3 og R_4 tilsammen med nitrogenatomet danner en pyridiniumgruppe, idet der i dette til-

fælde, samt i tilfælde, hvor n = 1, og R_2 er ligekædet eller forgrenet alkyl med 1-4 carbonatomer, forekommer en tilsvarende anion.

2. Prøvesæt til bestemmelse af totalbilirubinindhold i en biologisk prøve,
k e n d e t e g n e t ved, at det indeholder
a) ét eller flere detergenter med den almene formel I,
b) en ved bilirubinbestemmelse sædvanlig diazoniumforbindelse og
c) en stærk syre.

3. Prøvesæt ifølge krav 1 eller 2,
k e n d e t e g n e t ved, at detergentet med den almene formel I er i en koncentration på 0,25-10%.

4. Prøvesæt ifølge krav 3,
k e n d e t e g n e t ved, at detergentet med den almene formel I er i en koncentration på 1-3%.

5. Prøvesæt ifølge krav 1,
k e n d e t e g n e t ved, at den aromatiske aminoforbindelse er i en koncentration på 0,5-40 mM.

6. Prøvesæt ifølge krav 5,
k e n d e t e g n e t ved, at den aromatiske aminoforbindelse er i en koncentration på 1-30 mM.

7. Prøvesæt ifølge krav 1 eller 2,
k e n d e t e g n e t ved, at den stærke syre er amidosvovlsyre.

8. Prøvesæt ifølge krav 7,
k e n d e t e g n e t ved, at amidosvovlsyren er i en koncentration på 0,025-1M, og at blandingen af indholdet af de to beholdere har en pH-værdi på 1-3.

9. Prøvesæt ifølge krav 8,
k e n d e t e g n e t ved, at amidosvovlsyren er i en koncentration

på 0,10-0,25M, og at blandingen af indholdet af de to beholdere har en pH-værdi på 1-3.

10. Prøvesæt ifølge krav 1 eller 2,
k e n d e t e g n e t ved, at den stærke syre er saltsyre.

11. Prøvesæt ifølge krav 10,
k e n d e t e g n e t ved, at saltsyren er i en koncentration på 0,01-0,5M, og at blandingen af indholdet af de to beholdere har en pH-værdi på 1-3.

12. Prøvesæt ifølge krav 11,
k e n d e t e g n e t ved, at saltsyren er i en koncentration på 0,05-0,2M, og at blandingen af indholdet af de to beholdere har en pH-værdi på 1-3.

13. Prøvesæt ifølge krav 1 eller 2,
k e n d e t e g n e t ved, at den stærke syre er svovlsyre.

14. Prøvesæt ifølge krav 13,
k e n d e t e g n e t ved, at svovlsyren er i en koncentration på 0,01-0,5M, og at blandingen af indholdet af de to beholdere har en pH-værdi på 1-3.

15. Prøvesæt ifølge krav 14,
k e n d e t e g n e t ved, at svovlsyren er i en koncentration på 0,05-0,25M, og at blandingen af indholdet af de to beholdere har en pH-værdi på 1-3.

16. Prøvesæt ifølge krav 2,
k e n d e t e g n e t ved, at diazoniumforbindelsen er i en koncentration på 0,10-5,0 g/l.

17. Prøvesæt ifølge krav 16,
k e n d e t e g n e t ved, at diazoniumforbindelsen er i en koncentration på 0,15-3,0 g/l.

18. Prøvesæt ifølge krav 1,
k e n d e t e g n e t ved, at nitritopløsningen er i en koncentration på 4-100 mM/l.

19. Prøvesæt ifølge krav 1 eller 2,
k e n d e t e g n e t ved, at substituenterne R_3 og R_4 i den almene formel I har samme betydning.

20. Prøvesæt ifølge krav 1,
k e n d e t e g n e t ved, at den aromatiske aminoforbindelse er 4-aminobenzensulfonsyre, 2,4- eller 2,5-dichloranilin, 4-nitroanilin, 2-methoxy-4-nitroanilin eller 2-methoxy-5-nitroanilin.

21. Prøvesæt ifølge krav 2,
k e n d e t e g n e t ved, at diazoniumforbindelsen er diazoteret aminobenzensulfonsyre eller diazoteret 2,4- eller 2,5-dichloranilin eller diazoteret 4-nitroanilin eller 2-methoxy-4-nitroanilin eller 2-methoxy-5-nitroanilin.

22. Prøvesæt ifølge et hvilket som helst af kravene 1-21,
k e n d e t e g n e t ved, at detergentet med den almene formel I er

N,N-dimethyl-decylamin,
N,N-dimethyl-dodecylamin,
N,N-dimethyl-tetradecylamin,
N,N-dimethyl-hexadecylamin,
didecyldimethylammoniumchlorid,
dodecyltrimethylammoniumchlorid,
dodecyltrimethylammoniumbromid,
dodecylethyldimethylammoniumbromid,
dodecylpyridiniumchlorid,
tetradecyltrimethylammoniumbromid eller
N,N-dimethyldodecylaminoxid.

23. Anvendelse af et stabiliseret og lyofiliseret reagens til brug ved fremstilling af prøvesættet ifølge krav 2,
k e n d e t e g n e t ved, at det indeholder diazoteret aminobenzensulfonsyre, diazoteret 4-nitroanilin, 2-methoxy-4-nitroanilin,

2-methoxy-5-nitroanilin, 2,4-dichloranilin eller 2,5-dichloranilin samt ét eller flere detergenter med den almene formel I ifølge krav 1.

24. Anvendelse ifølge krav 23,
k e n d e t e g n e t ved, at detergentet med den almene formel I er

N,N-dimethyldodecylaminoxid,
N,N-dimethyldodecylamin,
dodecylethyldimethylammoniumbromid,
dodecyltrimethylammoniumbromid,
tetradecyltrimethylammoniumbromid eller
dodecylpyridiniumchlorid.

25. Fremgangsmåde til bestemmelse af totalbilirubinindhold i en biologisk prøve efter diazometoden ved stærkt sur pH,
k e n d e t e g n e t ved, at der anvendes et prøvesæt ifølge krav 1.

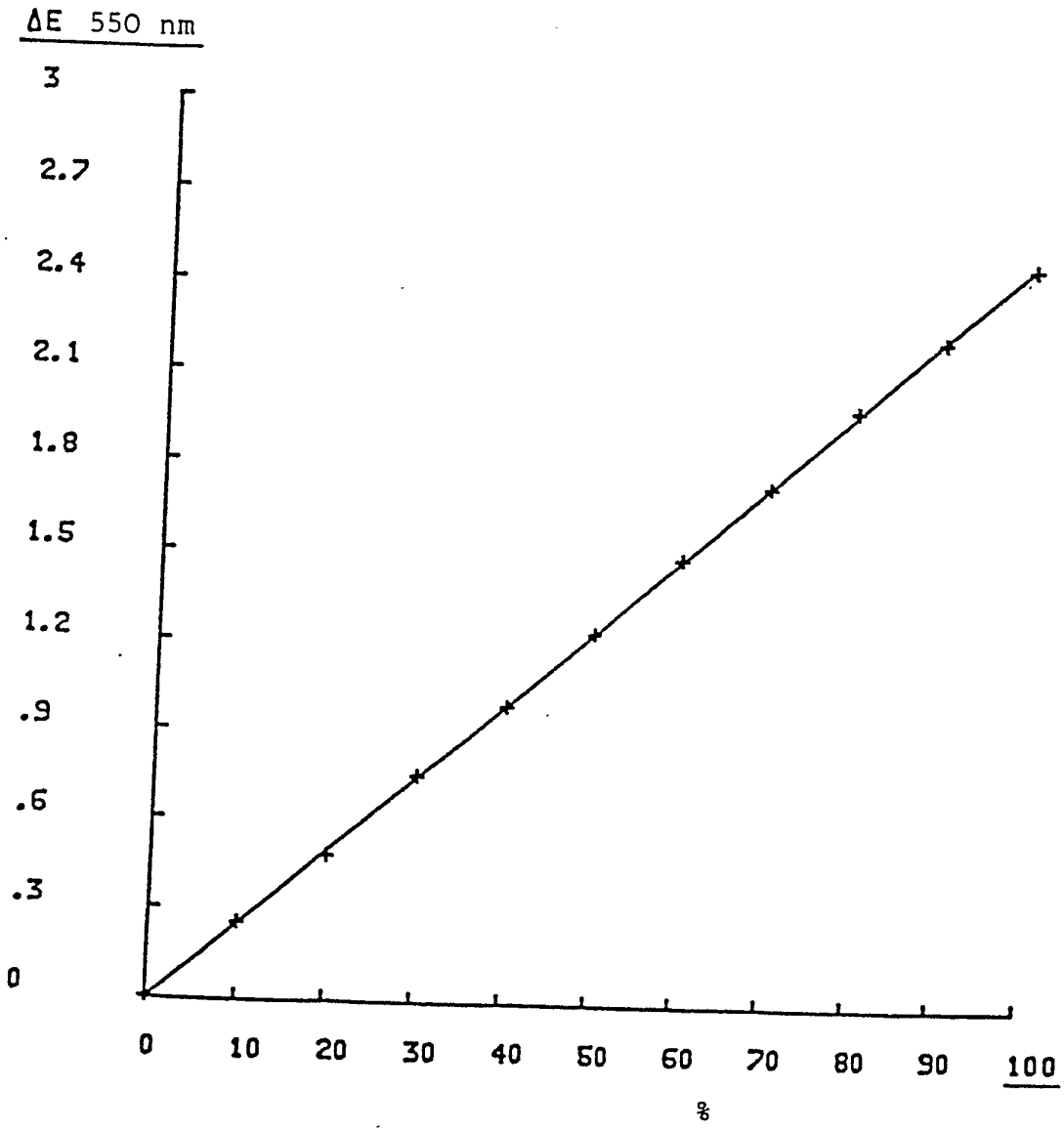
26. Fremgangsmåde til bestemmelse af totalbilirubin i en biologisk prøve efter diazometoden ved stærkt sur pH,
k e n d e t e g n e t ved, at der anvendes et prøvesæt ifølge krav 22.

27. Fremgangsmåde til bestemmelse af totalbilirubin i en biologisk prøve efter diazometoden ved stærkt sur pH og efter auto-blankingmetoden,
k e n d e t e g n e t ved, at der anvendes et prøvesæt ifølge krav 1, fortrinsvis ét eller flere detergenter ifølge krav 22.

28. Anvendelse af et prøvesæt ifølge krav 1 ved en fremgangsmåde til bestemmelse af totalbilirubin efter diazometoden ved stærkt sur pH i en biologisk prøve.

29. Anvendelse af et prøvesæt ifølge krav 22 ved en fremgangsmåde til bestemmelse af totalbilirubin efter diazometoden ved stærkt sur pH i en biologisk prøve.

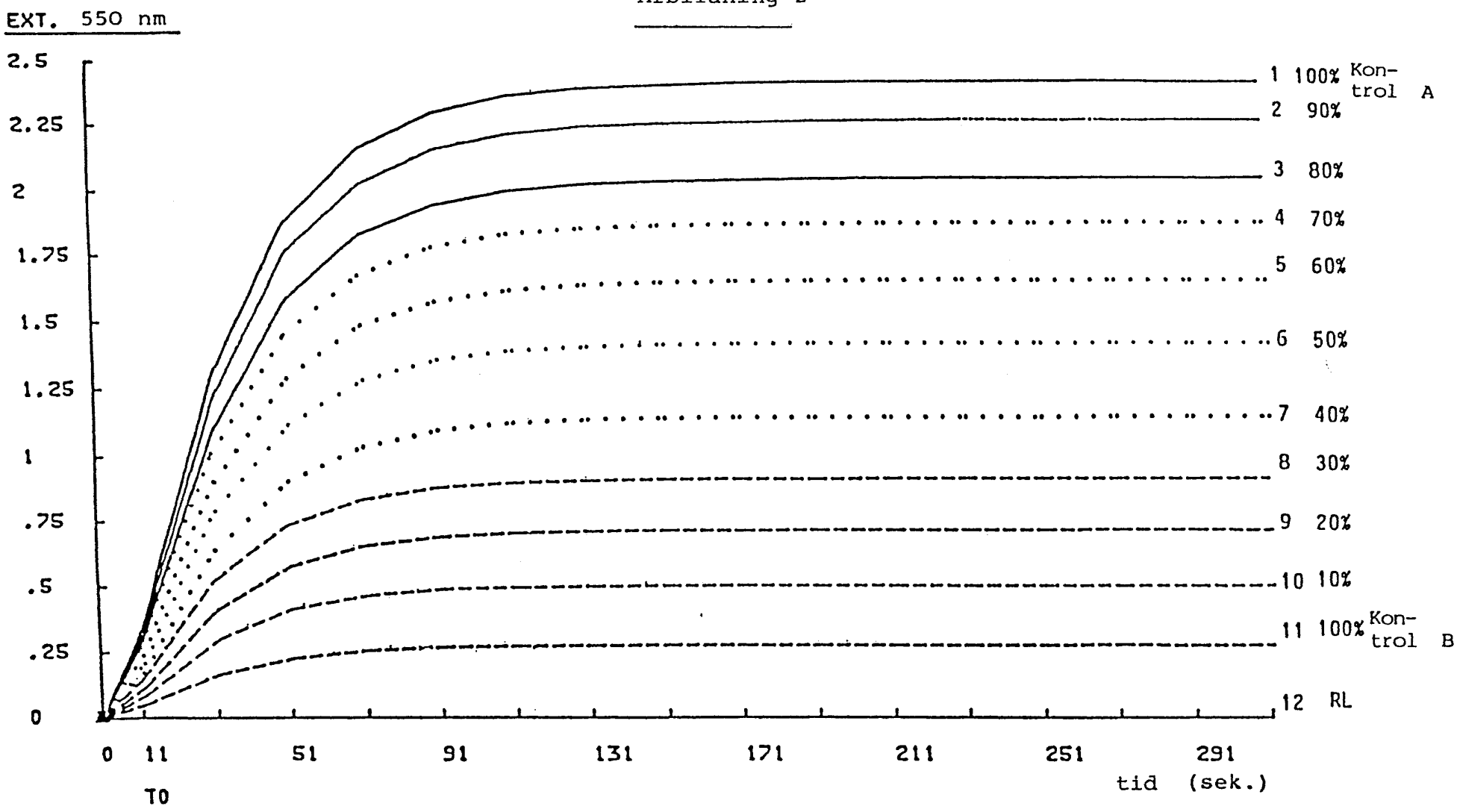
Afbildning 1



= 42,8 mg/dl
(732 µmol/l)

Kinetik ved analysetype 6

Afbildning 2



DK 165765 B

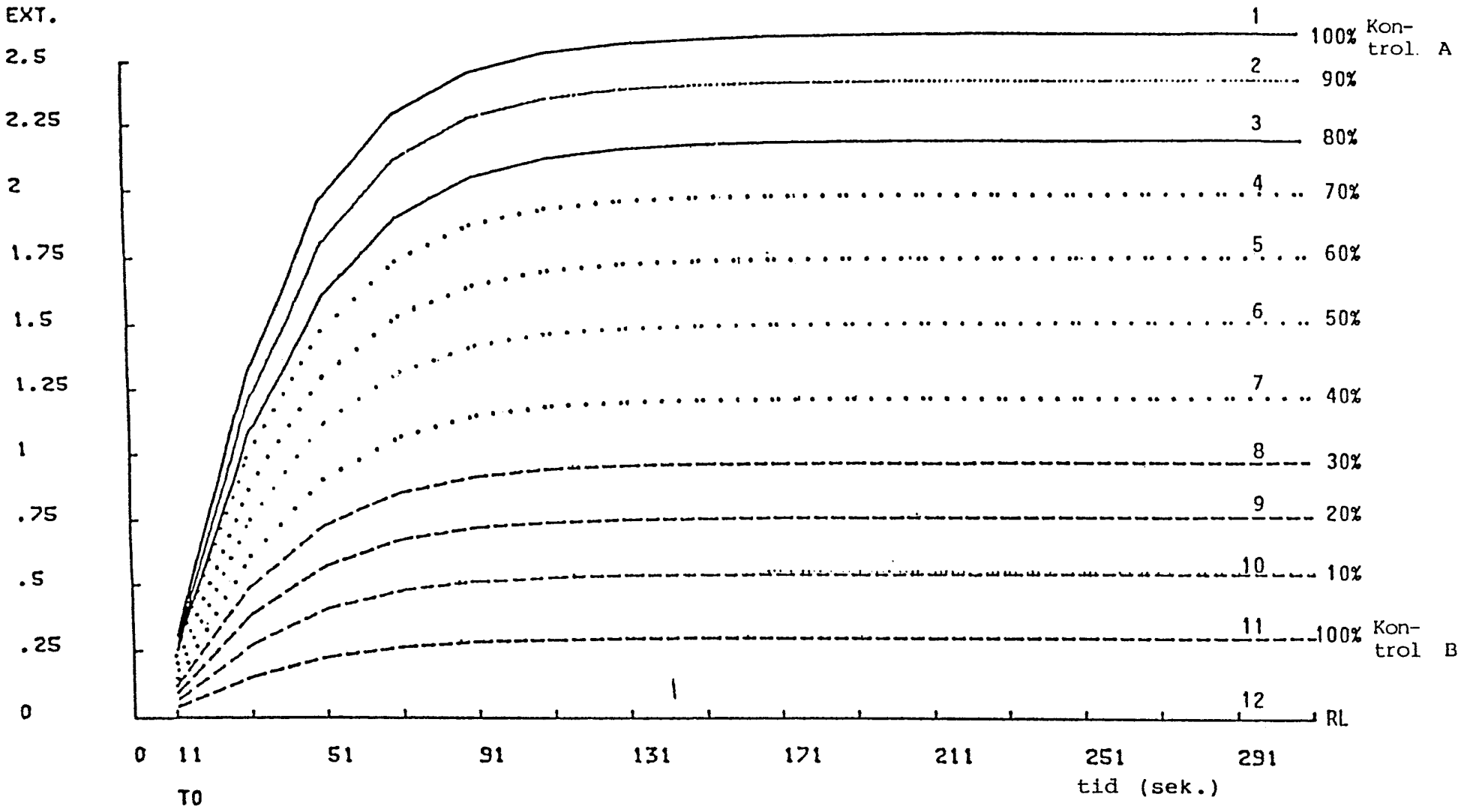
Afbildning 3

Manuel metode: Overensstemmelse med kontrolsera

Kontrolsera	Angivet værdi	Resultat
N <Roche> P 1833	1.2 - 1.4 - 1.6	1.50
P <Roche> E 0641	3.0 - 3.2 - 3.4	3.20
Moni-Trol I-E LTD 205	1.35- 1.46- 1.57	1.46
Moni-Trol II-E PTD 103	3.6 - 3.94- 4.3	4.10
Validate N 4993073	0.96- 1.20- 1.44	1.16
Validate A 4662033	3.40- 4.20- 5.00	4.54
BIC 969 R	18.6 -20.4 -22.2	20.20
Kontrollogen 613412	17.2 -20.2 -23.2	19.40

Kinetik ved analysetype 5

Afbildning 4



DK 165765 B

Afbildning 5

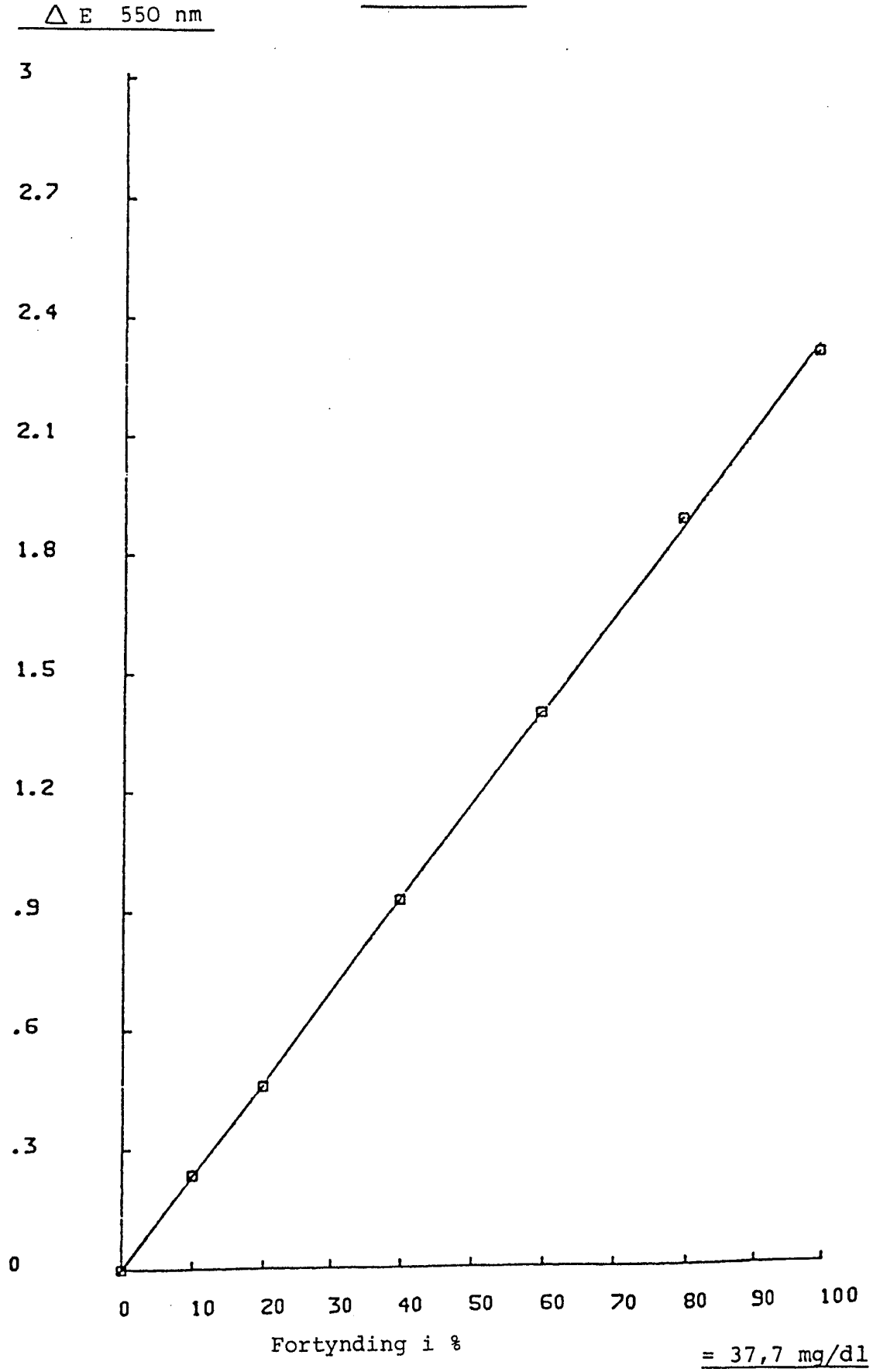
Recovery-Studie

		angivet værdi µmol/l	målt værdi µmol/l	Recovery %
1. Kontrollogen Bilirubin Lot A613413A + Sigma Standardset 34F6094				
100 %	0 %	365.9	362.9	99.2
80 %	20 %	326.9	323.5	99.0
60 %	40 %	287.9	286.6	99.5
40 %	60 %	248.9	248.3	99.8
20 %	80 %	209.9	211.1	100.5
0 %	100 %	171.0	176.0	102.9
				Middel: 100.1%
2. <Roche> N, Lot P1039	+ Sigma Standardset 34F6094			
0 %	100 %	171.0	174.4	101.9
20 %	80 %	141.9	144.0	101.4
40 %	60 %	111.8	112.8	100.9
60 %	40 %	82.3	82.6	100.3
80 %	20 %	52.7	53.0	100.5
100 %	0 %	23.1	23.9	101.7
				Middel: 101.1%

DK 165765 B

(Diazoteret 2,4-dichloranilin)

Afbildning 6



= 37,7 mg/dl