



Patentdirektoratet
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 1524/87

(51) Int.Cl.5

G 01 N 33/52

(22) Indleveringsdag: 25 mar 1987

(41) Alm. tilgængelig: 28 sep 1987

(44) Fremlagt: 04 jan 1993

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 27 mar 1986 DE 3610429

(71) Ansøger: *Boehringer Mannheim GmbH; Sandhoferstrasse 116; D-W-6800 Mannheim 31, DE

(72) Opfinder: Juergen *Doeding; DE, Hans *Wielinger; DE, Rolf *Lerch; DE

(74) Fuldmægtig: Firmaet Chas. Hude

(54) Fremgangsmåde til bestemmelse af blods koaguleringsparametre og en reagensbærer til anvendelse ved fremgangsmåden

(56) Fremdragne publikationer

GB pat. nr. 1364755

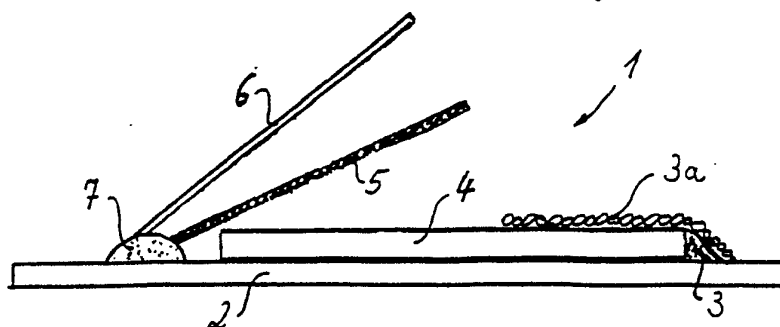
(57) Sammendrag:

1524-87

Opfindelsen angår en prøvebærer til bestemmelse af koagulationsparametre. Et prøvelag (4) indeholder glasfibre, der er overtrukket med polyvinylalkohol eller polyvinylalkohol/vinylacetat. Opfindelsen angår også en tilsvarende bestemmelsesmetode og en fremgangsmåde til fremstilling af egnede glasfibre.

1524-87

Fig 1



Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til bestemmelse af de såkaldte koaguleringsparametre, dvs. til analyse af blod med henblik på de bestanddele, der har indflydelse på koagulationsprocessen, samt en reagensbærer til anvendelse ved fremgangsmåden.

Til kvalitative eller kvantitative analytiske bestemmelser af bestanddele i legemsvæsker, navnlig blod, er der i den senere tid i tiltagende omfang anvendt såkaldte bærerbundne prøver. Ved sådanne er reagenser indlejret i tilsvarende lag i en fast reagensbærer, der bringes i kontakt med analyseprøven. Reaktionen mellem analyseprøven og reagenser fører til et påviseligt signal, navnlig et farveomslag, som kan bedømmes visuelt eller ved hjælp af et apparat, for det meste reflektionsfotometrisk.

Reagensbærere er hyppigt udformet som reagensstrimler, der i det væsentlige består af et aflangt bærerlag af plastmateriale og derpå anbragte reagensfelter. Der kendes imidlertid også reagensbærere, der er udformet som kvadratiske eller rektangulære småplader.

I EP-A nr. 00 45 476 beskrives et middel og en fremgangsmåde til adskillelse af plasma eller serum fra helblod, navnlig til reagensbærere til diagnostisk bestemmelse af legemsvæskers bestanddele (såkaldte parametre), som gør det muligt at bestemme indholdsstoffer fra helblod på enkel måde. Ifølge dette litteratursted kan plasma adskilles fra erythrocytter, idet man lader helblodet løbe gennem et lag af glasfibre med fiberdiametre på under $2,5 \mu$, som tilbageholder erythrocytterne. Fortrinsvis påføres derved blodet på enden af et rektangulært glasfibervlies, hvorfra plasmaet kapillært transporteres til det øvrige område. På denne med plasma fyldte vliesdel trykkes efter plasmaudvindingsprocessen en matriks (papir, sugende film etc.), der indeholder de for reaktionen nødvendige reagenser, hvori påvisningsreaktionen for de parametre, der skal eftervises, gennemføres ved remissionsmålinger.

Dette simple plasmaudvindings- og plasmatransportsystem kan anvendes for alle klinisk-kemisk vigtige parametre med undtagelse af parametre, der skal bestemmes indenfor rammerne af undersøgelser af hæmostasiologiske spørgsmål. Det er kendt, at

5 koaguleringsanalyser principielt må gennemføres i plastbeholdere eller glasbeholdere, der er inaktiveret med en belægning af siliconeharpiks, da ubehandlet glas påvirker blods eller plasmas koaguleringssevne. Således forkorter glas ved aktivering enfase-koagulationstiden ifølge Quick for plasmaer, hvis

10 koagulationsfaktorer ligger i normalområdet. Enfase-koagulationstiden ifølge Quick forlænges ved lavprocentuelle plasmaer ved inaktivering af koagulationsfaktorer. Glas inaktiverer herved fremfor alt faktorerne V og IIa. Ved denne inaktivering og de dermed fejlagtigt forlængede koagulationstider forsvinder den diagnostiske nytte, da forholdene mellem de enkelte

15 koagulationsfaktorer forskydes. Den i procent angivne Quick-værdi omfatter ud over fibrinogenkoncentrationen aktiviteten af faktorerne II, V, VII og X. Et sammenføjjet plasma fra sunde donorer defineres som 100% plasma, og ved fortynding med fysiologisk kogsaltopløsning fremstilles tilsvarende lavprocentuelle plasmaer. Ved hjælp af denne fortyndingsrække tilvejebringes en referencekurve, på basis af hvilken Quick-værdien for patientplasma kan bestemmes.

20

25 Også bestemmelsen af den partielle thromboplastintid (PTT) påvirkes imidlertid negativt ved inaktivering af faktorerne XII og XI. Påvisningen af antithrombin III og heparin forstyrres betydeligt ved en inaktivering af thrombin ved hjælp af glas.

30 Det er således formålet med den foreliggende opfindelse at tilvejebringe en fremgangsmåde til bestemmelse af blods koaguleringsparametre såvel som til anvendelse ved fremgangsmåden navnlig som adskillelses- og transport-system i en reagensbærer egnede glasfiberlag, der er koagulationsneutrale, og derved også er anvendelige til hæmostasiologiske undersøgelser.

35 Herved skal de fortrinsvis bibeholde deres adskillelses- og transportegenskaber.

Dette opnås med en fremgangsmåde til bestemmelse af koagulationsparametre, der er ejendommelig ved det i krav 1's kendetegnende del angivne, og ved hjælp af den i krav 3 angivne reagensbærer.

5

Det har vist sig, at man kan modificere glasoverflader kemisk ved tilsætning af polyvinylalkoholer på en sådan måde, at de bibeholder de hydrofile egenskaber, der f.eks. er nødvendige for sugesevnen hos glasfibervlies, men taber indflydelsen på koagulationsfaktorerne, dvs. bliver koagulationsneutrale. Dette er særligt overraskende, da det er kendt, at man kan belægge glas på overfladen ved siliconisering med siliconeharpiksemulsioner, og derved udelukke en påvirkning af koagulationsfaktorerne, men at denne siliconisering i specielle tilfælde bevirker en så kraftig hydrofobering af glasfibre-
overflade, at der ikke mere kan finde nogen befugtning sted, således at fibrene fuldstændigt taber deres plasmatransportegenskaber og deres egenskaber til at fraskille erythrocytter.

Polyvinylalkohol fremstilles ud fra polyvinylacetat ved forsæbning, idet der i afhængighed af de ønskede produkt egenskaber kan gennemføres en fuldstændig eller delvis forsæbning. Til anvendelse ved den foreliggende opfindelse er både et fuldstændigt forsæbet og et partielt forsæbet produkt anvendeligt. Polyvinylalkoholer, der i stor mængde tilbydes i handlen, adskiller sig navnlig ved deres gennemsnitlige molekylvægt, der normalt ligger mellem ca. 10.000 og 100.000 og i enkelte særtilfælde også kan nå væsentligt højere værdier, samt ved restindholdet af acetylgrupper. De lavmolekylære forbindelser, der indeholder ca. 5-15%, navnlig ca. 10% acetylgrupper, er lettest opløselige i vand, produkter der er højmolekylære og/eller har et større indhold af acetylgrupper, er derimod mindre opløselige i vand. Af indflydelse på opløseligheden er endvidere den indbyrdes vekselvirkning mellem polyvinylalkoholkæderne. Ved en parallel lejring af polymerkæderne i bestemte områder opstår der "krystallinske områder", idet orienteringstendensen er, jo større, jo mere regelmæssigt kæderne

er opbygget, og jo lavere antal der er af acetylgrupper, der på kraftigste måde modvirker orienteringen. Ved en forsæbningsgrad på 97-100 mol%, dvs. ved en acetyleringsgrad på 3-0 mol% forøges "krystalliniteten" derfor særlig kraftigt, hvorved omvendt opløseligheden i koldt vand aftager kraftigt.

Vandopløseligheden kan endvidere forringes ved efterbehandling med aldehyder (acetalisering) eller ved andre kemiske omdannelser af alkoholgrupperne. Anvendelige i forbindelse med den foreliggende opfindelse er navnlig polyvinylalkoholer med en ringe opløselighed i koldt vand, men med en god opløselighed i varmt vand. Produkterne skal ved 20°C kun langsomt eller slet ikke opløses i vand, men ved temperaturer på 50-100°C, navnlig ved temperaturer over 60°C, skal de være let opløselige i vand.

Fremstillingen af glasfibervlies ifølge opfindelsen kan ske ved at et tilsvarende glasfibervlies efterfølgende behandles med en opløsning af polyvinylalkohol i vand eller et egnet organisk opløsningsmiddel, og derefter tørres, fortrinsvis ved temperaturer på over 60°C, navnlig ved 90-140°C eller ved at man ved fremstilling af glasfibervlies tilsætter polyvinylalkohol. Som bekendt fremstilles glasfibervlies på den måde, at man suspenderer og derved spreder de tørre og sammenfiltrede glasfibre, der har en middeldiameter på 0,1-20 μm og en længde på 0,1-5 mm, i et meget stort overskud af vand og former denne "bøtte" i tynde lag og tørrer på en måde, der er analog med den ved papirfremstilling konventionelle metode, og ved hjælp af de ved papirfremstilling konventionelle maskiner. Polyvinylalkoholpulver eller -fibre, der er sat til bøtten, fordeler sig ved opslæmningen af glasfibrene på regelmæssig måde i massen, og bliver ved den efterfølgende fremstilling af vlieset opløst eller opsmeltet i et sådant omfang, at de efterfølgende under tørringen af vlieset danner et regelmæssigt overtræk på glasfibrene. Dette overtræk bevirker, at glasfibrene bliver koaguleringsneutrale, men ellers stadig bevarer hydrofile egenskaber i et sådant omfang, at sug evnen og transpor-

ten af vand eller vandige opløsninger gennem et sådant vlies ikke forringes.

5 Særligt foretrukket anvendes der i bøtten silaniserede glasfibre. Egnede sådanne fibre er beskrevet i DE patentansøgning nr. 35 23 969, til hvis hele indhold der her henvises. Disse kan derefter ifølge den foreliggende opfindelse overtrækkes med polyvinylalkohol eller polyvinylalkohol/vinylacetat. Derved opnås glasfiberlag, der i særligt høj grad er koagulationsneutrale og udmærker sig ved en særlig god styrke.

10 Da polyvinylalkoholen overtrækker glasfibrene forholdsvis regelmæssigt, når den påføres ifølge opfindelsen, er allerede forholdsvis små mængder, navnlig ca. 0,5-20%, fortrinsvis 1-5%, tilstrækkelige til at gøre fibrene koagulationsneutrale. Andele på over 20% ville ganske vist ikke være skadelige for den ønskede virkning, men de ville dog af økonomiske grunde ikke være formålstjenlige.

20 Dersom glasfibervlieset ikke blot skal anvendes til transport af serum og plasma, men også skal anvendes til fraskillelse af erythrocytter fra plasma ifølge EP-A 00 45 476, skal glasfibrene have en middeldiameter på 0,2-5 μm , fortrinsvis 0,5-2,5 μm , og vlieset skal have en vægtfylde på 0,1-0,5 g/cm^3 . Dersom 25 det kun kommer an på koagulationsneutraliteten og transportegenskaberne, kan der også anvendes glasfibre med større tykkelse og vlies med andre vægtfylder. Også vliesets polyvinylalkoholindhold kan for sådanne vliestyper forøges ud over det ellers fordelagtige indhold på 20%.

30 Glasfibrene ifølge opfindelsen udlægges ifølge konventionelle metoder til vlies, der, som det bl.a. er beskrevet i eksemplerne, kan anvendes i midler til bestemmelse af koagulationsparametre. De kan dog også anvendes i form af en kort søjle 35 til plasmaudvinding ifølge EP-A 00 45 476, hvorpå plasmaet derefter på konventionel måde kan anvendes ved koagulationsprøver.

Yderligere udformningsmuligheder for prøvebæreren ifølge opfindelsen til bestemmelse af koagulationsparametre kan fremstilles i analogi med de midler, der er beskrevet i EP-A 00 45 476, hvortil der her henvises. Naturligvis må i sådanne midler
5 ikke blot galsfiberlagene ifølge opfindelsen, men også alle de øvrige dele, der kommer i kontakt med plasmaet, bestå af koagulationsneutrale materialer, idet der navnlig kan anvendes tilsvarende for fagmanden kendte plastmaterialer.

10 Opfindelsen belyses nærmere i det følgende i forbindelse med tegningen og nogle eksempler.

På tegningen viser:

15 fig. 1 et skematisk sidebillede af en reagensbærer ifølge opfindelsen, og

fig. 2 en remissionskurve, der er fremstillet under anvendelse af en reagensbærer ifølge fig. 1.

20

Den på fig. 1 viste reagensbærer 1 har den principielle form af en konventionel reagensstrimmel. På et bærelag 2 af plastfolie (f.eks. polystyren) er der ved hjælp af en smelteklæbestrimmel 3 fastgjort et glasfiberlag 4 og et afdækningsnet 3a,
25 der delvis overlapper glasfiberlaget 4.

På den anden side overlappes glasfiberlaget 4 af et oxidationsmiddellag 5 og et reaktionslag 6, som klapagtigt er fastgjort til bærelaget 2 ved hjælp af en yderligere smelteklæbestrimmel 7.
30

Til gennemførelse af en analyse bliver en bloddråbe anbragt på afdækningsnettet 3a og transporteret gennem glasfiberlaget 4 til oxidationsmiddellagets 5 og reaktionslagets 6 område. Der
35 ved sker der en adskillelse af plasma, sådan som det er beskrevet i den europæiske patentansøgning nr. 45476. For at indlede reaktion med de i lagene 5 og 6 indeholdte reagenser,

trykkes disse nedad, således at prøvevæsken trænger ind i disse lag, og de tilsvarende reaktioner forløber.

5 Nærmere enkeltheder vedrørende de ved en koagulationsprøve af den omhandlede art forløbende kemiske reaktioner fremgår af den europæiske patentansøgning med offentliggørelsesnummer 182373 og af de følgende eksempler.

10 Eksempel 1:

Fremstilling af et glasfibervlies ifølge opfindelsen

15 1 kg glasfibre opslås i en hollænder med 420 l vand, der er indstillet let surt (pH 3,0), til spredning af fibrene. I en papirmaskines (skråsigtemaskine Void, Heidenheim) forrådsbeholder fortyndes til en stoftæthed på 0,3%, og til denne fortynding sættes 50 g polyvinylalkoholfibre (Kuralon VPB 105-2 fra firmaet Kuraray), og der blandes. I papirmaskinens stofudløb fortyndes suspensionen med ledningsvand til 0,05%, og den 20 bringes i denne tilstand på sigten. Her sker bladdannelsen. Bladet tørres på en tørrecylinder ved 110-120°C. I afhængighed af maskinens indstilling opnås der vlies med fladevægt på 20-100 g/m² og tykkelser på 0,2-1 mm.

25 Eksempel 2

Afprøvning af glasfibervlies for koagulationsneutralitet

30 Prøver på hver 40 mg af det ifølge eksempel 1 fremstillede glasfibervlies bringes hver sammen med 300 µl sammenføjet plasma fra sunde donorer såvel som fra patienter, der er behandlet med antikoagulatmidler, og der inkuberes i 1 min ved 37°C. Derefter fraskilles plasmaet ved centrifugering. Plasmaet undersøges før og efter behandlingen med glasfibervlies til 35 bestemmelse af enfasekoagulationstiden ifølge Quick. Herved kan størkningsprøven anvendes: start af koagulationskaskade calciumchlorid og thromboplastin og ophængning (tysk: häkeln)

af prøven, idet tiden til dannelse af fibrintråde måles. Der kan ligeledes anvendes en fotometrisk prøve til bestemmelse af Quick-tiden (U. Becker et al: Neue Aspekte der Gerinnungsdiagnostik, F.K. Schattauer-Verlag, Stuttgart - New York, 1984, side 17 til 30).

Eksempel 3

Bestemmelse af enfasekoagulationstid ifølge Quick

a) Fremstilling af reagensbærer.

Der fremstilles en reagensbærer ifølge fig. 1. Glasfiberlaget 4 er et vlies med en fladevægt på 50-60 g/m² og en tykkelse på 0,5 mm. Det er i reagensbærerens længderetning ca. 15 mm langt. Afdækningsnettet 3a har en trådtykkelse på 140 µm og en maskevidde på 250 µm.

Reaktionslaget 6 består af en polycarbonatfolie med en tykkelse på 200 µm, på hvilken der med en rakel påføres en reagensfilm med en vådfilmtykkelse på 110 µm, og tørres ved 45°C. Den filmdannende masse fremstilles på følgende måde:

I 1 l vand opløses: 10 g lineær tværbundet polyacrylamid ("Rohagit 700" fra firmaet Röhm, Darmstadt), 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansulfonsyre 100 mmol, Tos-Gly-Pro-Arg-p-phenylendiamin 1 mmol, N-(4-fluorphenyl)-N-methylaminomethan-phosphonsyre 15 mmol, kaninhjernethromboplastin 4,9 g.

Denne opløsning indstilles på pH 7,5 med natronlud.

Oxydationsmiddellaget 5 består af et tilsvarende imprægneret nylonnet (trådtykkelse ca. 40 µm, maskevidde ca. 60 µm, type NY 20 HC super fra firmaet Züricher Beuteltuchfabrik, Schweiz). Nettet imprægneres med en vandig opløsning af 50 mmol K₃[Fe(CN)₆]/l og 50 mmol calciumchlorid/l.

b) Sammenligning mellem reagensbærere ifølge opfindelsen og sådanne, hvori der er anvendt normal glasfibervlies.

På nylonnettet 3a, hvortil glasfibervlieset 4 er fastgjort, pipetteres ved hver prøve 35 μ l citratplasma fra en fortyndingsserie på 100%, 50%, 33%, 25% og 12,5% i fysiologisk kog-saltopløsning. Reagensbærerne tempereres derefter til 37°C og farvedannelsen med tiden følges med et remissionsfotometer. Det iagttages herved, at der med glasfibervlieset ifølge opfindelsen opnås væsentligt højere signaler i sammenligning med dem, der opnås med ubehandlet glasfibervlies (se fig. 2). Som Quick-tiden tages den tid, indenfor hvilken der forløber en remissionsnedsættelse på 10% remission. Forskellene vises med tal i den efterfølgende tabel:

	Prøve med glasfibervlies ifølge opfindelsen		Prøve med ikke-belagt glas-fibervlies
	Tider i sek for en re-missionsformindskelse på 10%		Tider i sek for en remis-sionsformindskelse på 10%
	Plasma	på 10%	
	100%	44,7	46,2
	50%	51,5	78,8
	33%	58,8	121,7
	25%	66,0	160,2
	12,5%	99,0	ikke mere målelig

P a t e n t k r a v .

30

1. Fremgangsmåde til bestemmelse af blods koagulationsparametre, k e n d e t e g n e t ved, at blodet før kontakten med reagenserne ledes gennem et glasfiberlag, hvori glasfibrene er overtrukket med polyvinylalkohol eller polyvinylalkohol/vi-nylacetat.

35

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at blodet ledes langs med laget.

3. Reagensbærer til anvendelse ved fremgangsmåden ifølge krav 1 eller 2, k e n d e t e g n e t ved, at den omfatter et lag (4), der indeholder glasfibre, der er overtrukket med polyvinylalkohol eller polyvinylalkohol/vinylacetat.

5

4. Reagensbærer ifølge krav 3, k e n d e t e g n e t ved, at laget (4) indeholder 0,5-20%, fortrinsvis 1-5% polyvinylalkohol.

10

5. Reagensbærer ifølge krav 3, k e n d e t e g n e t ved, at glasfibrene har en gennemsnitlig diameter på 0,2-5 μm , fortrinsvis 0,5-2,5 μm , og at laget har en vægtfylde (rumvægt) på 0,1-0,5 g/cm³.

15

6. Reagensbærer ifølge krav 3, k e n d e t e g n e t ved, at glasfibrene er silaniseret.

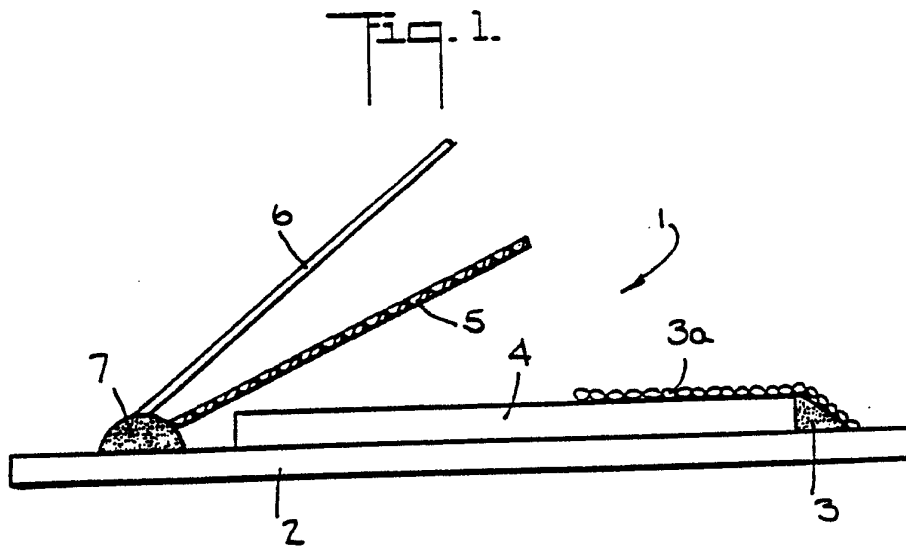
7. Reagensbærer ifølge krav 3, k e n d e t e g n e t ved, at laget er udformet som vlies.

20

25

30

35



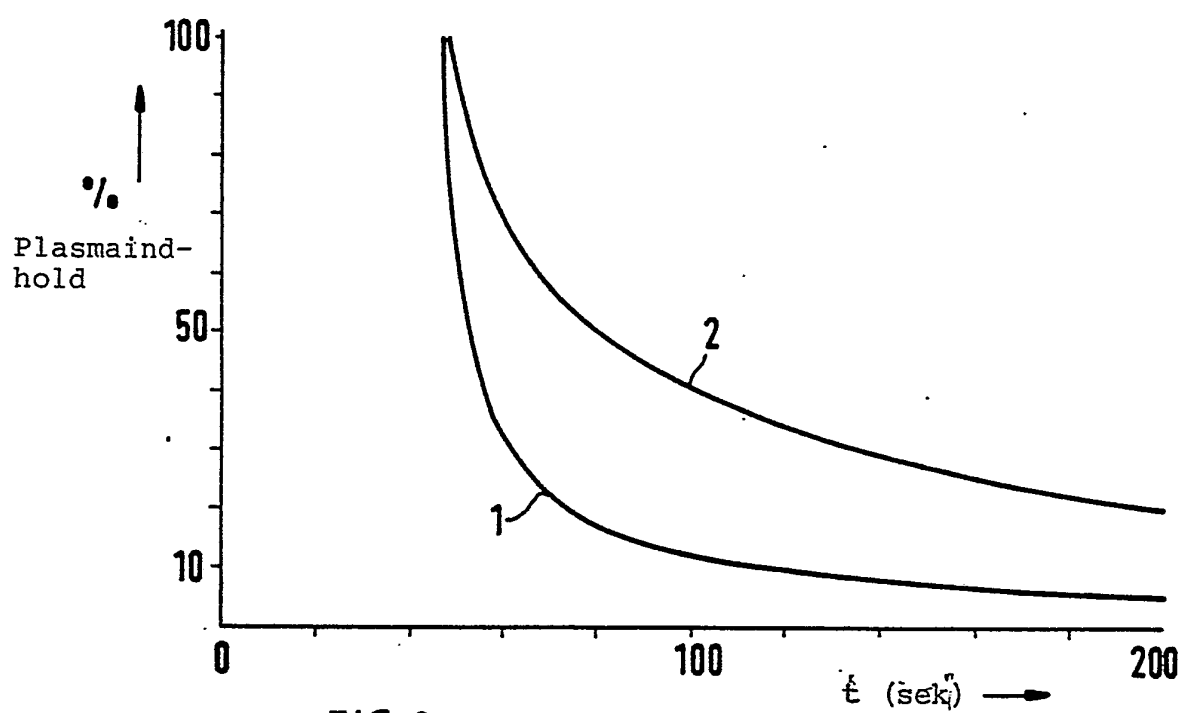


FIG.2