



NORGE

(12) PATENT

(19) NO

(11) 313929

(13) BI

(51) Int Cl⁷ G 01 N 21/84

Patentstyret

(21) Søknadsnr	19932316	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	
(22) Inng. dag	1993.06.23	(85) Videreføringssdag	
(24) Løpedag	1987.08.12	(30) Prioritet	1986.08.13, US, 896418
(41) Alm. tilgj.	1988.02.15		
(45) Meddelt dato	2002.12.23		
(62) Avdelt fra 19873372			

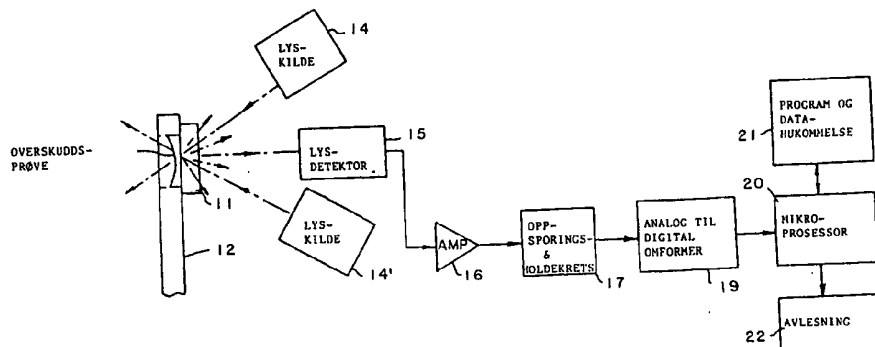
(71) Patenthaver	LifeScan Inc, 2443 Wyandotte Street, Mountain View, CA 94043, US
(72) Oppfinner	Roger Phillips, Palo Alto, CA, US Geoffrey McGarraugh, Scotts Valley, CA, US Frank Jurik, San Mateo, CA, US Ray Underwood, Red Bluff, CA, US
(74) Fullmektig	Bryn Aarflot AS, 0104 Oslo

(54) Benevnelse **Fremgangsmåte for å forårsake at en analytisk måling blir utført i et reflektans-avlesningsutstyr**

(56) Anførte publikasjoner US 4199261, WO 83/00931

(57) Sammendrag

Fremgangsmåte for å starte tidsmåling av en måling i et reflektansavlesningsutstyr, som omfatter at man tar minst en første reflektansavlesning av en første overflate av en porøs grunnmasse før påføring av en prøve på en annen overflate av nevnte grunnmasse; man tar minst en tilleggsreflektansavlesning fra nevnte første overflate; man sammenligner nevnte tilleggsreflektansavlesning med nevnte første reflektansavlesning og starter tidsmåling ved et forutbestemt fall i reflektans som er et resultat av at nevnte prøve når nevnte første overflate; og man tar minst en reflektansavlesningsmåling ved et forutbestemt tidspunkt etter at nevnte tilleggsreflektansavlesning avviker fra nevnte reflektansverdi med den forutbestemte forskjell.



Oppfinnelsens område

Den foreliggende oppfinnelse vedrører fremgangsmåte for å forårsake at en analytisk måling blir utført i et reflektansavlesningsutstyr ved slutten av en forutbestemt tidsperiode etter at en analytt reagerer med et reagens i en porøs, reflektansavlesningsgrunnmasse beliggende i utstyret.

5

Bakgrunn for oppfinnelsen

Kvantifisering av kjemiske og biokjemiske komponenter i fargede, vandige fluider, spesielt fargede biologiske fluider slik som fullstendig blod og urin og biologiske fluiderivater slik som blodserum og blodplasma er av stadig økende viktighet. Viktige anvendelser eksisterer i medisinsk diagnostikk og behandling og i kvantifisering av eksponering for terapeutiske medikamenter, toksiske stoffer, skadelige kjemikalier og lignende. I noen tilfeller er mengden av materialer som blir bestemt, enten så små - i området på 1 mikrogram eller mindre pr. desiliter - eller så vanskelig å bestemme nøyaktig at apparatet som anvendes blir komplisert og anvendbart bare for utdannet laboratoriepersonale. I dette tilfelle er resultatene hovedsakelig ikke tilgjengelige før noen timer eller dager etter prøvetaking. I andre tilfeller er det ofte en understrekning av evnen til lagoperatører og utføre testen rutinemessig, raskt og reproducerbart utenfor et laboratorieoppsett med hurtig eller øyeblikkelig avlevering av informasjon.

20

WO83/00931 beskriver en fremgangsmåte for detektering av prøvefluid på et analyseobjektglass ved å måle reflektert lys både før og etter at fluidet er blitt påført objektglasset, for å bestemme om objektglasset inneholder nok fluid for en egnet test.

25

US patent 4 199 261 beskriver en fremgangsmåte og tilhørende apparatur for detektering av lys reflektert fra en testprøve for å danne et testsignal og lys detektert direkte fra en lyskilde for å danne et kildesignal. Et mål på signal blir deretter dannet som forholdet mellom prøve og kildesignaler. Dette forholdet står for forandringer i oppnådd intensitet til lyskilden.

En vanlig medisinsk prøve er måling av blodglukosenivåer ved diabetikere. Vanlig undervisning råder diabetiske pasienter å måle blodglukosenivået fra to til syv ganger om dagen avhengig av naturen og alvorlighetsgrad av deres individuelle tilfelle. Basert på det observerte mønster i det målte glykosenivået gjør pasienten og legen sammen justeringer i diett, mosjon og insulininntak for bedre å beherske sykdommen. Denne informasjon burde klart være tilgjengelig for pasienten omgående.

Oftest anvender en metode som blir vidt brukt i U.S.A., en prøveartikkel av typen beskrevet i U.S. Patent 3.298.789, utstedt 17. januar 1967 til Mast. I denne fremgangsmåte blir en prøve av friskt fullstendig blod (typisk 20 - 40 μ l) plassert på en etylcellulosebelagt reagenspute som inneholder et enzymsystem som har glukoseoksidase og peroksydaseaktivitet. Enzymsystemet reagerer med glukose og frigjør hydrogenperoksyd. Puten inneholder også en indikator som reagerer med hydrogenperoksyd i nærvær av peroksydase til å gi en farge som er proporsjonal i intensitet med prøvens glukosenivå.

En annen populær blodglukoseprøvemetode anvender lignende kjemi, men i stedet for den etylcellulose-belagte pute anvender den en vannresistent film hvorigjennom enzymene og indikatoren blir dispergert. Denne type system er beskrevet i U.S. Patent 3.630.957, utstedt 28. desember 1971 til Rey et al.

I begge tilfeller tillates prøven å forbli i kontakt med reagensputen i en spesifisert tid (typisk ett minutt). Så, i det første tilfellet blir blodprøven vasket av med en vannstrøm, mens i det andre tilfellet blir den tørket av filmen. Reagensputen eller filmen blir så tørket med oppsugningspapir og evaluert. Evalueringen gjøres enten ved å sammenligne den dannede farge med et fargekart, eller ved å plassere puten eller filmen i et diffus-reflektans-instrument for å avlese en fargeintensitetsverdi.

Selv om de ovennevnte fremgangsmåter er blitt anvendt i glukosemåling i mange år, har de visse begrensninger. Prøvestørrelsen som kreves, er nokså stor for en fingerstikkprøve, og er vanskelig å oppnå for noen mennesker viss kapillær-blod ikke siver ut lett.

I tillegg har disse fremgangsmåter en felles begrensning med andre enkle lag-operator kolometriske bestemmelser ved at deres resultat er basert på en absolutt fargeavlesning som videre er forbundet med den absolutte reaksjonsgrad mellom prøven og testreagensene. Det faktum at prøven må vaskes eller tørkes av reagensputen etter det tidsangitte reaksjonsintervall, krever at brukeren må være klar ved slutten av tidsintervallet og tørke eller påføre en vaskestrøm ved det påkrevde tidspunkt. Det faktum at reaksjonen stoppes ved å fjerne prøven, fører til noen grad av usikkerhet i resultatet, spesielt i hendene til en hjemmebruker. Overvasking kan gi lave resultater og undervasking kan gi høye resultater.

Et annet problem som ofte eksisterer i enkle lag-operator-kolometriske bestemmelser er nødvendigheten av å starte en tidsmålingsekvens når blodet påføres på reagensputen. En bruker vil typisk ha utført et stikk i fingeren for å oppnå en blodprøve og vil så være nødt til å samtidig påføre blodet fra fingeren til en reagenspute mens han eller hun starter en tidsmålingsklokke med sin annen hånd, og derved kreves anvendelse av begge hender samtidig. Dette er spesielt vanskelig, siden det ofte er nødvendig å sikre seg om at tidsavlesningskretsen startes bare når blodet påføres på reagensputen. Alle de tidligere metoder på området krever tilleggsmålinger eller tilleggskrets for å oppnå dette resultat. Følgelig er forenkling av dette aspekt av reflektansavlesninginstrumenter ønskelige.

Tilstedeværelse av røde blodceller eller andre fargede komponenter interfererer ofte med målingene av disse absolutte verdier, og kaller derved på en utelukkelse av røde blodceller i disse to tidligere metoder siden de blir mest vidt praktisert. I utstyret i patent 3.298.789 forhindrer en etylcellulosemembran røde blodceller fra å gå inn i reagensputen. På samme måte forhindrer den vannresistente film i patent 3.630.957 røde blodceller fra å gå inn. I begge tilfeller virker skyllingen eller tørkingen også til å fjerne disse potensielt interfererende røde blodceller før måling.

Følgelig gjenstår et behov for en fremgangsmåte for påvisning av analyter i fargede væsker, slik som blod, som ikke krever fjerning av overskuddsvæske fra en reflektantstrimmel hvorfra en reflektantavlesning blir oppnådd.

Sammendrag av oppfinnelsen

Foreliggende oppfinnelse vedrører følgende fremgangsmåte for å forårsake at en analytisk måling blir utført i et Reflektansavlesningsutstyr ved slutten av en forutbestemt tidsperiode etter at en analytt reagerer med et reagens i en porøs, reflektansavlesningsgrunnmasse beliggende i utstyret, kjennetegnet ved at den omfatter at:

man tar en første reflektansavlesning av en tørr første overflate til en porøs grunnmasse før påføring av en prøve av kroppsfluid antatt å inneholde analytten på en annen overflate til nevnte porøse grunnmasse, hvorifra prøven kan bevege seg til den første overflaten ved kapillær virkning og reagere med reagenset i den porøse grunnmasse dersom analytten er tilstede i prøven;

man påfører prøven på den andre overflaten til den porøse grunnmassen;

man tar en ytterligere reflektansavlesning fra den første overflaten etter at prøven er applisert på den porøse grunnmasse;

man sammenligner nevnte ytterligere reflektansavlesning med nevnte første reflektansavlesning og starter den forutbestemte tidsperioden ved et forutbestemt fall i reflektans, tilstrekkelig til å indikere at prøven har nådd den første overflaten; og

man tar en reflektansavlesningsmåling ved slutten av den forutbestemte tidsperiode uten å ha bestemt tidspunktet hvor prøven opprinnelig ble påført på den porøse grunnmasse.

Kort beskrivelse av tegningene

Den foreliggende oppfinnelse kan mere lett forstås med referanse til den følgende detaljerte beskrivelse, når den leses i sammenheng med de vedlagte tegninger, hvor:

Fig. 1 er et perspektivbilde av en utførelsesform av en testanordning som inneholder reaksjonsputen hvortil fluidum som skal analyseres, påføres.

Fig. 2 er et blokkdiagramskjema av et apparat som kan anvendes i utførelsen av oppfinnelsen.

Fig. 3 er et blokkdiagramskjema av et alternativt apparat som kan anvendes i utførelsen av oppfinnelsen.

Detaljert beskrivelse av oppfinnelsen

Reagenselementet

Den tilgrunnliggende oppfinnelse gir en forbedret, hurtig og enkel fremgangsmåte som anvender pålitelige og lett opererbart apparat for bestemmelse av analytter slik som glukose, som spesielt involverer et enzymsubstrat som resulterer i produksjon av hydrogenperoksyd som enzymprodukt. Fremgangsmåten ligger i påføring til en porøs grunnmasse av et lite volum som er tilstrekkelig til å mette grunnmassen. Bundet til grunnmassen er en eller flere reagenser i et signalproduserende system, som resulterer i produksjon av et produkt som resulterer i en startforandring i graden av reflektans for grunnmassen. Grunnmassen er typisk tilstede i et reflektansavlesningsutstyr når fluidet påføres. Væskeprøven trenger igjennom grunnmassen, hvilket resulterer i en startforandring i reflektans ved målingsoverflaten. En avlesning blir så tatt ved ett eller flere tidspunkter etter startforandring i reflektans for å relatere den videre forandring i reflektans ved målingsoverflaten eller i grunnmassen som et resultat av dannelse av reaksjonsprodukt med mengden av analytt i prøven.

For målinger i blod, spesielt glukosemålinger, blir fullstendig blod typisk anvendt som målingsmedium. Grunnmassen inneholder et oksidasesystem, som produserer hydrogenperoksyd. Også inneholdt i grunnmassen vil det være et annet enzym, spesielt en peroksidase, og et fargesystem som produserer et lysabsorberende produkt i forbindelse med peroksidasen. Det lysabsorberende produkt forandrer reflektanssignalet. Med fullstendig blod blir avlesninger tatt ved to forskjellige bølgelengder med avlesning ved en bølgelengde anvendt til å substrahere ut bagrunnsinterferens forårsaket av hematokrit, blodoksygenering og andre variabler som kan påvirke resultatet.

Et reagenselement anvendes, som omfatter grunnmassen og ingrediensene av det signalproduserende system inneholdt i grunnmassen. Reagenselementet kan inkludere andre komponenter til spesielle anvendelser. Fremgangsmåten krever påføring av et lite fluidvolum, som typisk ikke har vært underkastet tidligere behandling, (annen enn eventuell behandling med et antikoagulerende middel), til grunnmassen. Tidsangivelse av målingen oppnås ved et apparat som automatisk

påviser en forandring i reflektans i grunnmassen når fluid trenger gjennom grunnmassen. Forandringen i reflektans over en forutbestemt tidsperiode som et resultat av dannelsen av reaksjonsprodukt, blir så relatert til mengden av analytt i en prøve.

For å assistere i avlesning av reflektans er det foretrukket at grunnmassen har minst en side som er i det vesentlige glatt og flat. Typisk vil grunnmassen bli formet til en tynn plate med minst en glatt, flat side. I anvendelse blir væskeprøven som blir analysert, påført på en side av platen, hvorved en hvilken som helst målingsforbindelse til stede passerer gjennom reagenselementet ved hjelp av kapillær-, veke-, gravitasjonsstrøm-og/eller diffusjonsvirkninger. Komponentene i det signalproduserende system tilstede i grunnmassen vil reagere til å gi et lysabsorberende reaksjonsprodukt. Innfallende lys støter mot reagenselementet ved en lokalisering som er forskjellig fra lokaliseringen hvortil prøven påføres. Lys reflekteres fra overflaten av elementet som diffust, reflektert lys. Dette diffuse lys oppsamles og måles, f.eks. av en detektor i et reflektans-spektrofotometer. Mengden av reflektert lys vil være relatert til mengden av analytt i prøven, som vanligvis er en invers funksjon av mengden av analytt i prøven.

Grunnmasse

Hver av komponentene som er nødvendige for produksjon av reagens-element, vil bli beskrevet senere. Den første komponent er selve grunnmassen.

Grunnmassen vil være en hydrofil, porøs grunnmasse, hvortil reagenser kan være kovalent eller ikke-kovalent bundet. Grunnmassen vil tillate strøm av et vandig medium gjennom grunnmassen. Den vil også tillate binding av proteinsammensetninger til grunnmassen uten på en ugunstig, signifikant måte å påvirke den biologiske aktivitet av proteinet, f.eks. en enzymatisk aktivitet av et enzym. I den utstrekning som proteiner vil bli kovalent bundet, vil grunnmassen ha aktive steder for kovalent binding eller kan aktiveres ved måter kjent på fagområdet. Sammensetningen av grunnmassen vil være reflektrende og vil være av tilstrekkelig tykkelse til å tillate dannelsen av en lysabsorberende farge i porevolumet eller på overflaten for på en vesentlig måte å påvirke reflektansen fra grunnmassen. Grunn-

massen kan være av en uniform sammensetning eller et belegg på et stoff som gir den nødvendige struktur og de nødvendige fysiske egenskaper.

Grunnmassen vil vanligvis ikke deformeres den blir våt, og bevarer således sin opprinnelige form og størrelse. Grunnmassen vil ha en definert absorberings-
5 evne, slik at volumet som absorberes, kan beregnes innen rimelige grenser, idet variasjoner vanligvis opprettholdes under omtrent 50 %, fortrinnsvis ikke større enn 10 %. Grunnmassen vil ha tilstrekkelig våtstyrke til å tillate rutine-fremstilling. Grunnmassen vil tillate at ikke-kovalent bundet reagenser blir relativt uniformt fordelt på overflaten av grunnmassen.

10 Som eksempel på grunnmasseoverflater er polyamider, spesielt med prøver som involverer fullstendig blod. Polyamidene som er best egnet, er kondensasjons-polymerer av monomerer på fra 4 til 8 karbonatomer, hvor monomerene er laktamer eller kombinasjoner av diaminer og di-karboksylysyre. Andre polymeriske sammen-
setninger som har sammenlignbare egenskaper, kan også finne anvendelse.

15 Polyamidsammensetningene kan modifiseres til å innføre andre funksjonelle grupper som gir ladete strukturer, slik at overflatene av grunnmassen kan være nøytrale, positive eller negative, så vel som nøytrale, basiske eller sure. Foretrukne overflater er positivt ladet.

Når anvendt i fullstendig blod har den porøse grunnmasse fortrinnsvis porer
20 med en gjennomsnittsdiameter i området på fra omtrent 0,1 til 2,0 μm , mer foretrukket på fra omtrent 0,6 til 1,0 μm .

En foretrukket måte å fremstille det porøse materialet på, er å støpe den hydrofile polymer på en kjerne av ikke-vevde fibre. Kjernefibre kan være et
hvilket som helst fibrøst materiale som produserer den beskrevne integritet og
25 styrke, slik som polyestere og polyamider. Reagenset som vil danne det lys-absorberende reaksjonsprodukt, som er diskutert senere i detalj, er tilstede i porene i grunnmassen, men ikke blokkerer grunnmassen, slik at væskedelen i prøvemediet, f.eks. blod som blir analysert, kan flyte gjennom porene i grunnmassen, mens partikler, slik som erytrocytter, blir holdt på overflaten.

30 Grunnmassen er i det vesentlige reflekterende, slik at den gir en diffus reflektans uten anvendelse av et reflekterende underlag. Fortrinnsvis minst 25 %,

mere foretrukket minst 50 %, av det innfallende lys tilført i grunnmassen, blir reflektert og sendt ut som diffus reflektans. En grunnmasse på mindre enn omtrent 0,5 mm tykkelse, blir vanligvis anvendt, med fra omtrent 0,01 til 0,3 mm som foretrukket. En tykkelse på fra omtrent 0,1 til 0,2 mm er mest foretrukket, spesielt for en nylon grunnmasse.

Typisk vil grunnmassen være festet til en holder for å gi den fysisk for og fasthet, selvom dette ikke behøver å være nødvendig. Figur 1 viser en utførelsesform av oppfinnelsen hvor en tynn hydrofil grunnmassepute 11 er plassert i en ende av en plastholder 12 ved hjelp av et klebemiddel 13 som direkte og fast fester reagensputen til håndtaket. Et hull 14 er tilstede i plastholder 12 i området hvortil reagenspute 11 er festet, slik at prøven kan påføres på en side av reagensputen og lys reflekteres fra den andre side.

En væskeprøve som skal testes, påføres på pute 11. Generelt, med blod som eksempel på en prøve som blir testet, vil reagensputen være av størrelsesorden på omtrent 10 mm² til 100 mm² i overflateområdet, spesielt 10 mm² til 50 mm² i området, som normalt er et volum som 5 - 10 mikroliter prøve vil mer enn mette.

Diffuse reflektansmålinger innen den tidligere fagkunnskap er typisk blitt tatt ved å anvende en reflekterende bakgrunn, festet til eller plassert bak grunnmassen. Ingen slik bakgrunn trengs eller vil normalt være tilstede under utførelsen av den foreliggende oppfinnelse, enten som en del av reagenselementet eller reflektansapparatet.

Som det kan sees fra fig. 1 holder bæreren reagenspute 11, slik at en prøve kan påføres på en side av reagensputen, mens lysreflektans måles fra siden av reagensputen som er motsatt til lokaliseringen hvor prøven påføres.

Fig.2 viser et system hvor reagensen påføres på siden med hullet i bakgrunns-håndtaket, mens lys reflekteres og måles på den andre side av reagensputen. Andre strukturer enn de beskrevne kan anvendes. Puten kan anta forskjellige former, avhengig av begrensningene som er gitt her. Puten vil være tilgjengelig på minst en overflate og vanligvis to overflater.

Det hydrofile lag (reagenselement) kan være festet til bæreren ved hjelp av en hvilken som helst egnet måte, f.eks. en holder, klemme eller klebemidler;

imidlertid i den foretrukne fremgangsmåte er den bundet til bakgrunnen. Bindingen kan gjøres med et hvilket som helst ikke-reaktivt klebemiddel, ved en termisk metode hvor bakgrunnsoverflaten smeltes nok til å fange noe av materialet som anvendes i det hydrofile lag, eller ved mikrobølge eller ultrasoniske bindingsmetoder som på samme måte smelter de hydrofile prøveputer til bakgrunnen. Det er viktig at bindingen er slik at den ikke selv interfererer vesentlig med de diffuse reflektansmålinger eller reaksjonen som skal måles, selvom det er usansynlig at dette forekommer, da ikke noe klebemiddel trenger å være tilstede på stedet hvor avlesningen tas. For eksempel kan et klebemiddel 13 påføres til bakgrunnsstrimmel 12, etterfulgt først av utstikking av hull 14 i den kombinerte strimmel og klebemiddel og så påføring av reagenspute II til klebemiddelet i området rundt hull 14, slik at den perifere del av reagensputen fester seg til bakgrunnstrimmelen.

15 De kjemiske reagenser

Ethvert signalproduserende system kan anvendes, som er i stand til å reagere med analytten i prøven for å produsere (enten direkte eller indirekte) en forbindelse som karakteristisk er absorberende ved en bølgelengde forskjellig fra bølgelengden hvorved målingsmediet i det vesentlige absorberer.

20 Polyamid-grunnmasser er spesielt anvendbare for utførelse av reaksjoner hvor et substrat (en analytt) reagerer med en et oksygen-anvendende oksidaseenzym på en slik måte at det produseres et produkt som videre reagerer med et fargeintermediat for enten direkte eller indirekte å danne en farge som absorberer i et forutbestemt bølgelengdeområde. For eksempel kan et oksidase-enzym oksydere et substrat og produsere hydrogenperoksyd som reaksjonsprodukt. Hydrogenperoksyd kan så reagere med et fargeintermediat eller -forløper i en katalysert eller ukatalysert reaksjon, for å produsere en oksydert form av intermediet eller forløperen. Dette oksyderte materiale kan produsere det fargede produkt eller reagere med en annen forløper for å danne slutfargen.

30 Eksempler på analyser og typiske reagenser inkluderer de følgende materialer vist i den følgende liste.

Analytt og prøvetypeReagenser

Glukose i blod, serum,
urin eller andre biologiske
5 fluider, vin, fruktsafter
eller andre fargede vandige
fluider. Fullstendig blod er
en spesielt foretrukket
prøvetype.

Glukose-oksidase, peroksidase
og en oksygenakseptor

Oksygenakseptorer inkluderer:

0-dianisidin (1)

0-toluidin

0-tolidin (1)

Benzidin (1)

2,2'-azinodi-(3-etylbenz-
tiazolin sulfonsyre (6)) (1)

3-metyl-2-benzotiazoli-non-
hydrazon pluss N,N-dimetyl-
anilin (1)

Sulfonert 2,4-diklorfenol
pluss 4-amino-fenazon (2)

3-metyl-2-benzotiazoli-non-
hydazon pluss 3-(dimetyl
amino)-benzosyre (3)

2-metoksy-4-allyl-fenol (4)

4-aminoantipyrin-dimetyl-
anilin (5)

- 25 (1) Som rapportert Clinical Chemistry, Richterich og Columbo, s. 367 og
referanser angitt der.
- (2) Analyst, 97 (1972) 142-5.
- (3) Anal. Biochem., 105, (1980) 389-397-
- (4) Anal. Biochem., 79, (1977) 597-601
- 30 (5) Clinica Chemica Acta, 75, (1977) 387-391 alle inkorporert her ved referanse.

Analysemetode

Analysemetoden avhenger av en forandring i absorptans, som målt ved diffus reflektans, som er avhengig av mengden av analytt tilstede i en prøve som blir testet.

Denne forandring kan bestemmes ved måling av forandringen i absorptans i
5 testprøven mellom to eller flere tidspunkter.

Det første trinn av målingen som skal betraktes, vil være påføring av prøven til grunnmassen. I praksis bør en analyse utføres som følger: Første oppnås en prøve av vandig fluid som inneholder en analytt. Blod kan oppnås ved f.eks. et stikk i finger. Et overskudd over grunnmassemetning i området hvor reflektans vil bli målt
10 (dvs. 5 - 10 mikroliter) av denne fluid, påføres til reagenselementet eller elementene av måleutstyret. Samtidig startung av en tidsangiver kreves ikke (som vanligvis kreves i den tidligere fagkunnskap) som vil bli klart nedenfor. Overskuddsfluid kan fjernes, slik som ved lett avtørking av oppsugingspapir, men slik fjerning er heller ikke påkrevd. Målingsutstyret blir typisk montert i et instrument for avlesning av
15 lysabsorptans; f.eks. fargeintensitet, ved reflektans før påføring av prøven.

Absorptans måles ved visse tidspunkter etter påføring av prøve. Absorptans refererer i denne søknad ikke bare til lys innen det visuelle bølgelengdeområdet, men også utenfor det visuelle bølgelengdeområdet, slik som infrarød og ultrafiolett stråling.

20 Fra disse målinger av absorptans kan en grad av fargeutvikling beregnes, regnet som analyttnivå.

Målingsinstrument

Et egnet instrument, slik som et diffust reflektans-spektrofotometer med
25 passende program, kan lages slik at det automatisk avleser reflektans ved visse tidspunkter, beregner grad av reflektansforandring, og ved å anvende kalibreringsfaktorer, uttaksnivået av analytt i den vandige fluid. En slik anordning er skjematisk vist i fig. 2, hvor et måleutstyr av oppfinnelsen som omfatter bakgrunn 12 borttil reagenspute 11 er festet, er vist. Lyskilde 5, f.eks. en høyintensitetslysenderdiode
30 (LED) sender en lysstråle inn i reagensputen. En vesentlig del (minst 25 %, fortrinnsvis minst 35 % og mere foretrukket minst 50 %, i fravær av reaksjons-

produkt) av dette lys blir diffust reflektert fra reagensputen og påvises av lysdetektor 6, f.eks. en fototransistor som produserer en utgående strøm proporsjonal med lyset som den mottar. Lyskilde 5 og/eller detektor 6 kan tilpasses til å danne eller svare på en spesiell bølgelengde, om ønsket. Uttaket fra detektor 6 passerer til forsterker 7, f.eks. en lineær integrert krets som omdanner fototransistorstrømmen til en spenning. Uttaket fra forsterker 7 kan føres til oppsporings- og holdekrets 8. Dette er en kombinasjon av lineær/digitalintegrert krets som sporer opp eller følger den analoge spenning fra forsterker 7 og, ved kommando fra mikroprosessor 20 låser eller holder spenningen ved dette nivå på det tidspunktet. Analog-til-digital omformer 19 tar den analoge spenning fra oppsporings- og holdekrets 8 og omformer den til f.eks. et tolv-bit binært digital tall ved kommando fra mikroprosessor 20. Mikroprosessor 20 kan være en digitalintegrert krets. Den tjener de følgende kontrollfunksjoner:

- 1) tidsangivelse for hele systemet; 2) avlesning av uttaket fra analog/digital omformer 19; 3) sammen med program og datahukommelse 21, lagring av data som tilsvarer reflektansen målt ved spesifiserte tidsintervaller; 4) beregning av analyttnivåer fra de lagrede reflektanser; og 5) uttak av analytt-konsentrasjonsdata til avleser 22.

Hukommelse 21 kan være en digitalintegrert krets som lagrer data og det mikroprosessor-opererende program. Rapportutstyr 22 kan anta forskjellige hardkopi og bløtkopiformer. Vanligvis er det en synlig fremvisning, slik som en væskekrystall eller LED fremvisning, men den kan også være en tape-printer, et hørbart signal eller lignende. Instrumentet kan også inkludere en start-stopp bryter og kan gi et hørbart eller synlig tidssignal for å angi tider for påføring av prøven, for å ta avlesninger etc., om ønsket.

25 Reflektansbytte

Selve reflektanskretsen kan anvendes til å starte tidsangivelse til å måle et fall i reflektans som forekommer når den vandige del av suspensjonsløsningen som påføres til reagensputen (f.eks. blod) vandrer til overflaten hvorved reflektans blir målt. Typisk blir målingsutstyret satt på en "klar" instilling hvor reflektans-avlesningen gjøres automatisk ved nærtliggende intervaller (typisk omtrent 0,2 sek.) fra den typisk ubleket hvite, i det vesentlige tørre, ureagerte reagensstrimmel.

Startmålingen blir typisk laget før gjennomtrengning av grunnmassen av fluid som blir analysert, men kan gjøres etter at fluiden er blitt påført på et sted på reagens-elementet forskjellig fra der hvor reflektansen måles. Reflektansverdien evalueres av mikroprosessen, typisk ved å lagre påfølgende verdier i hukommelsen og så sammenligne hver verdi med den første, ureagerte verdi. Når den vandige løsning trenger gjennom reagensgrunnmassen, signaliserer fallet i reflektans starten på målingstidsintervallet. Fall i reflektans på 5 - 50 % kan anvendes til å starte en tidsmåling, typisk et fall på omtrent 10 %. På denne enkle måte er det en nøyaktig synkronisering av målingsmedium som når overflaten hvor fra målinger blir tatt, og start av sekvensen av avlesninger, uten noe krav til aktivitet av brukeren.

Selv om de totale systemer som er beskrevet i denne søknad, er spesielt rettet mot anvendelse av polyamidgrunnmasse, og spesielt mot anvendelse av slike grunnmasser i bestemmelse av konsentrasjonen av forskjellige sukkerer, slik som glukose, og andre materialer av biologisk opprinnelse, er det ikke noe behov for å begrense reflektansbytte aspektet av oppfinnelsen til slike grunnmasser. For eksempel kan grunnmassen anvendt med reflektansbytte dannes fra et hvilket som helst vannuløselig hydrofilt materiale og en hvilken som helst annen type reflektansmåling.

20 Spesiell anvendelse til glukosemåling

Et spesielt eksempel med henblikk på påvisning av glukose i nærvær av røde blodceller vil nå bli gitt slik at større detaljer og spesielt fordeler kan pekes ut. Selv om dette representerer en foretrukket utførelsesform av den foreliggende oppfinnelse, er oppfinnelsen ikke begrenset til påvisning av glukose i blod.

25 Anvendelse av polyamid overflater for å danne reagens-elementet, gir en rekke ønskede karakteristika i den foreliggende oppfinnelse. Disse er at reagens-elementet er hydrofilt (dvs. tar lett opp reagens og prøve), ikke deformeres når det blir vått (slik at det gir en flat overflate for reflektansavlesning), er forenelig med enzymer (for å gi god lagringsstabilitet), tar opp et begrenset prøvevolum pr. enhet membranvolum
30 (nødvendig for å vise et utvidet dynamisk område for målinger) og viser tilstrekkelig våt styrke til å tillate rutinefremstilling.

I en typisk utforming blir fremgangsmåten utført ved å anvende et apparat som består av en plasholder og reagenselementet (idet grunnmassen har det signalproduserende system impregnert i seg). Den foretrukne grunnmasse for
5 anvendelse i fremstilling av reagenselementet er en nylon mikrofiltreringsmembran, spesielt membraner laget av nylon-66 støpt på en kjerne av ikke-vevede polyester-fibre. Tallrike nylon mikrofiltreringsmembraner av denne klasse blir produsert kommersielt av Pall Ultrafine Filtration Corporation som har gjennomsnittsporestørrelse på fra 0,1 til 3,0 mikron. Disse materialer viser mekanisk styrke og
10 fleksibilitet, dimensjons-stabilitet ved utsettelse for vann og hurtig væting.

Mange variasjoner i spesifikk kjemisk struktur av nylon er mulig. Disse inkluderer ufunksjonalisert nylon-66 med ladede endegrupper (solgt under handelsmerket Ultipore av Pall Ultrafine Filtration Corporation; "Pall"). Positive ladninger er fremherskende under pH 6, men negative ladninger er fremherskende ved pH over
15 6. I andre membraner blir nylon funksjonalisert før membranen blir utformet for å gi membraner med forskjellige egenskaper. Nyloner funksjonalisert med karboksy-grupper, er negativt ladet over et vidt pH-område (solgt som Carboxydyn av Pall). Nyloner kan også være funksjonalisert med en høy tetthet av positivt ladede grupper på overflaten, typisk kvarternære amin-grupper, slik at de viser liten variasjon i
20 ladning over et vidt pH-område (solgt som Posidyne av Pall). Slike materialer er spesielt vel egnet for utførelsen av foreligende oppfinnelse. Det er også mulig å anvende membraner som har reaktive funksjonelle grupper utformet til kovalent immobilisering av proteiner (solgt som Biodyne Immuno Affinity membraner av Pall). Slike materialer kan anvendes til kovalent og festeproteiner f.eks. enzymer,
25 anvendt som reagenser. Selv om alle disse materialer er anvendbare, gir nylon som har en høy tetthet av positivt ladede grupper på overflaten, den beste stabilitet av reagenser når den formes til en tørr reagenspute. Ufunksjonalisert nylon gir den nest beste stabilitet med de karboksylerte nyloner nest best.

Ønskelige resultater kan oppnås med porestørrelser som varierer fra omtrent
30 0,2 - 2,0 μm , fortrinnsvis omtrent 0,5 - 1,2 μm , og mest foretrukket omtrent 0,8 μm , når anvendt med fullstendig blod.

Formen av håndtaket hvorpå reagenselementet blir oppsamlet, er relativt lite viktig så lenge som håndtaket tillater avgang til en side av reagenselementet av prøven og til den andre side av reagenselementet av innfallende lys viss reflektans blir målt. Håndtaket hjelper også til å innføre reagenselementet inn i det absorban-
5 målende utstyr slik at det registrerer med det optiske system. Ett eksempel på et egnet håndtak er en mylar eller annen plaststrimmel hvortil et overføringsklebestoff slik som 3M 465 eller Y9460 overføringsklebemiddel er blitt påført. Et hull blir stukket inn i plasten gjennom overføringsklebemiddelet. Et reagenselement, typisk i
10 form av en tynn pute, enten som inneholder reagenser eller hvortil reagenser senere vil bli tilsatt, blir så påført til håndtaket ved hjelp av overføringsklebemidler, slik at det blir fast festet til håndtaket i området som omgir hullet som er blitt stukket gjennom håndtaket og overføringsklebemiddelet. En slik anordning er illustrert i fig. 1, som viser reagenspute 11 festet til et Mylart håndtak 12 ved hjelp av klebemiddel
15 13. Hull 14 gir tilgang av prøve eller innfallende lys til en side av reagenspute 11, mens adgang til den andre side av reagensputen er ubegrenset. Alle dimensjoner av reagensputen og håndtaket kan selekteres, slik at reagensputen passer sikkert inn i et reflektans-avlesningsinstrument i nær beliggenhet med en lyskilde og en reflektert lysdetektor.

Hvis en nylon matriks velges til å danne reagensputen, når de angitte tykkelser blir anvendt, er det foretrukket å ha reagensputen båret av holderen på en slik måte at ikke mer enn 6 mm, målt i alle retninger, er uten støtte av holderen ved lokalise-
20 ringen hvor prøven påføres og lysreflektans måles. Større områder uten støtte har tendens til å gi utilstrekkelig dimensjonsstabilitet til membranen, slik at måling av reflektans fra overflaten blir ugunstig påvirket. Et hull 14 på 5 mm i diameter i reagensstrimmelen vist i fig. 1, virker nokså tilfredstillende.

Det er ingen spesiell grense når det gjelder minimumsdiameteren av et slikt hull, selv om diametere på minst 2 mm er foretrukne for lett fremstilling, påføring av prøve, og avlesning av lysreflektans.

Selv om en rekke farger kunne anvendes som indikatorer, vil valget avhenge av prøvens natur. Det er nødvendig å velge en farge som har en absorban ved en

bølgelengde som er forskjellig fra bølgelengden hvorved røde blodceller absorberer lys, med fullstendig blod som målingsmedium, eller hvor andre forurensede stoffer i løsningen blir analysert med andre målingsmedier. MBTH-DMAB fargeparet (3-metyl-2-benzotiazolinon hydrazonhydroklorid og 3-dimetylaminobenzosyre), selv om det tidligere er blitt beskrevet som egnet for fargeutvikling for peroksidase-markører i enzym immunologiske målinger, er aldri blitt anvendt i kommersiell glukose-målingsreagens. Dette fargepar gir et større dynamisk område og viser forbedret enzymatisk stabilitet sammenlignet med tradisjonelle farger anvendt til glukosemåling, slik som benzidinderivater. Videre er MBTH-DMAB fargeparet ikke karsinogent, et karakteristika for de fleste benzidinderivater.

Et annet fargepar som kan anvendes i måling av glukose, er AAP-CTA (4-aminoantipyren og kromotropisk syre) paret. Selvom dette par ikke gir så bredt dynamiske områder som MBTH-DMAB, er det stabilt og egnet til anvendelse i utførelsen av den foreliggende oppfinnelse når man måler glukose. Igjen gir AAP-CTA fargeparet et utvidet dynamisk område og større enzymatisk aktivitetsstabilitet enn de mer vidt anvendte benzidinfarger.

Anvendelse av MBTH-DMAB paret tillater korreksjon av hematokritt og grad av oksygenering av blod med en enkel korreksjonsfaktor. De mer typiske anvendte benzidinfarger tillater ikke en slik korreksjon. Fargen danner en kromofor som absorberer ved omtrent 635 nm men ikke i noen signifikant grad ved 700 nm. Små variasjoner i måling av bølgelengder (\pm omtrent 10 nm) er tillatt. Ved 700 nm kan både hematokritt og grad av oksygenering måles ved å måle blodfarge. Videre er lyssenderdioder (LED) tilgjengelige i handelen for både 635 nm og 700 nm målinger, og forenkler derved masseproduksjon av et utstyr. Ved å anvende den foretrukne membranporestørrelse beskrevet ovenfor og den tilgrunnliggende reagensutforming kan både hematokritt og oksygenerings oppførsel korrigeres ved å måle ved bare 700 nm bølgelengde.

To tilleggsbetingelser ble funnet å gi spesiell stabilitet og lang lagringstid for en glukoseoksydase/peroksidase-utforming på en polyamidgrunnmasse. Disse anvender en pH på 3,8 til 5,0, fortrinnsvis omtrent 3,8 til 4,3, mest foretrukket omtrent 4,0, og anvendelse av et konsentrert buffersystem for påføring av reagensene

til grunnmassen. Den mest effektive buffer ble funnet å være 10 vekt% citratbuffer, med konsentrasjoner på fra 5 - 15 % som effektive. Dette er vekt/volum prosent av løsningen hvori reagensene påføres til grunnmassen. Andre buffere kan anvendes på det samme molare grunnlag. Størst stabilitet ble oppnådd ved å anvende en lav pH, fortrinnsvis omtrent pH 4, et MBTH-DMAB fargesystem, og en høy enzym- konsentrasjon på omtrent 500-1000 U/ml av påføringsløsning.

I fremstilling av MBTH-DMAB reagenser og enzymsystemet som danner resten av det signalproduserende system, er det ikke nødvendig å opprettholde nøyaktige volumer og forholder, selvom de foreslåtte verdier nedenfor gir gode resultater. Reagenser blir lett absorbert av grunnmasseputen når glukoseoksydase er tilstede i en løsning ved omtrent 27 - 54 vol%, peroksydase er tilstede ved en konsentrasjon på omtrent 2,7 - 5,4 mg/ml MBTH er tilstede ved en konsentrasjon på omtrent 4 - 8 mg/ml, og DMAB er tilstede ved en konsentrasjon på omtrent 8 - 16 mg/ml. DMAB-MBTH vektforholdet blir fortrinnsvis opprettholdt i området på (1-4):1, fortrinnsvis omtrent (1,5-2,5):1, mest foretrukket omtrent 2:1.

De grunnleggende fremstillingsteknikker for reagentelementet er, så snart de er opprettet, enkle. Selve membranen er sterk og stabil, spesielt når en nylon-membran av den foretrukne utførelsesform velges. Bare to løsninger er nødvendige for å påføre reagens, og disse løsninger blir både lette utformet og er stabile. Den første inneholder hovedsakelig fargekomponentene og den andre inneholder hovedsakelig enzymene. Når man anvender f.eks. MBTH-DMAB fargeparet, blir de individuelle farger løst i et vandig organisk løsningsmiddel, typisk en 1:1 blanding av acetonitril og vann. Grunnmassen dyppes inn i løsningen, overskuddsvæske fjernes ved avtørking og grunnmassen blir så tørket, typisk ved 50 - 60 °C i 10 - 20 minutter. Grunnmassen som inneholder fargene, blir så dyppet i en vandig løsning som inneholder enzymene. En typisk utforming ville inneholde peroksydase og glukoseoksydase-enzymene så vel som hvilken som helst ønsket buffer, konserveringsmiddel, stabilisator, eller lignende. Grunnmassen blir så avtørket for å fjerne overskuddsvæske og tørket som foran. En typisk utforming for glukose-reagentet er som følger:

Fargedyp

Bland: 40 mg MBTH,
80 mg DMAB,
5 ml acetonitril, og
5 ml vann.

Rør til alle faste stoffer er oppløst og hell på en glassplate eller annen flat overflate. Dyp et stykke Posidyne membran (Pall Co.), tørk av overskuddsvæske og tørk ved 56 °C i 15 min.

Enzymdyp

Bland: 6 ml vann,
10 mg EDTA, dinatriumsalt,
200 mg Poly Pep, lav viskositet, <Sigma'
0,668 g natriumcitrat
0,523 g sitronsyre
2,0 ml 6 vekt% Gantrez AN-139 løst i vann <GAF'
30 mg pepperrotperoksydase, 100 enheter/mg, og
2,0 ml glukoseoksydase, 2000 enheter/ml.

Rør inntil alle faste stoffer er løst og hell på en glassplate eller annen flat overflate. Dyp et stykke membran tidligere impregnert med farge, tørk av overskuddsvæske og tørk ved 56 °C i 15 minutter.

Det elektroniske apparat som blir anvendt til å gjøre reflektansavlesninger, inneholder minimalt en lyskilde, en reflektert lysdetektor, en forsterker, en analog til digital omformer, en mikroprosessor med hukommelse og program og en avlesningsanordning.

Lyskilden består typisk av en lysutsendingsdiode (LED). Selv om det er mulig å anvende en polykrom lyskilde og en lysdetektor som er i stand til å måle ved to forskjellige bølgelengder, ville et foretrukket apparat inneholde to LED kilder eller en enkelt diode i stand til å sende to forskjellige lysbølgelengder. Kommersielt tilgjengelige LEDer som produserer lysbølgelengdene som er beskrevet som foretrukne i den foreliggende spesifisering, inkluderer Hewlett Packard HLMP-1340 med

et emisjonsmaksimum ved 635 nm og en Hewlett Packard QEMT-1045 med smal-
båndemisjonsmaksimum ved 700 nm. Egnede kommersielt tilgjengelige lys-
detektorer inkluderer en Hamamatsu 5874-18K og en Litronix BPX-65.

Selv om andre fremgangsmåter for å ta målinger, er mulige, har den følgende
5 fremgangsmåte gitt de ønskede resultater. Avlesninger blir tatt av fotodetektoren
ved spesifiserte intervaller etter at tidsmåling er startet. 635 nm LED blir skrudd på
bare i løpet av et kort målingstidsområde som begynner omtrent 20 sek. etter
starttidspunktet som angitt ved reflektansbyttet. Hvis denne avlesning indikerer at et
høyt glukosenivå er tilstede i prøven, blir en 30 - sekunders avlesning foretatt og
10 anvendt i sluttberegningen for å forbedre nøyaktighet. Typisk er høye nivåer
betraktet å begynne ved omtrent 250 mg/dl. Bakgrunnen korrigeres med en 700 nm
avlesning tatt omtrent 15 sek. etter starten av målingsperioden. Avlesningen fra
fotodetektoren integreres over intervallet, mens den passende LED blir aktivert, som
typisk er mindre enn ett sekund. Rå-reflektans-avlesningene blir så anvendt til
15 beregninger som utføres av mikroprosessen etter at signalet er blitt forsterket og
omdannet til et digitalsignal. Tallrike mikroprosessorer kan anvendes til å utføre
beregningen. En AIM65 enkelttavle mikrokomputer produsert av Rockwell
International har vist seg å være tilfredstillende.

De foreliggende fremgangsmåter og apparater tillater en veldig enkel
20 prosedyre med minimums operasjonstrinn for anvenderen. I anvendelse blir
reagensstrimmelen plassert i detektoren slik at hullet i strimmelen samsvarer med
optikken av påvisningssystemet. En fjernbar hette eller annet dekke blir plassert
over optikken og strimmelen for å beskytte det hele fra omgivende lys. Måling-
sekvensen blir så startet ved å trykke ned en knapp på måleapparatet som aktiverer
25 mikrocomputeren til å ta en måling av reflektert lys den ureagerte reagenspute, kalt
en R_{loft} avlesning. Hetten blir så fjernet og en bloddråpe blir påført på reagensputen,
typisk mens reagensputen registreres med optikken og avlesningsanordningen. Det
er foretrukket at reagensstrimmelen blir etterlatt på plass med optikken for å
minimalisere håndtering. Instrumentet er i stand til å føle påføring av blod eller
30 annen prøve ved en nedgang i reflektans når prøven passerer gjennom grunnmassen
og reflektert lys blir målt på den motsatte side. Nedgang i reflektans starter en tids-

målingsekvens som er beskrevet i detalj på andre steder i denne spesifikasjon.

Dekket bør erstattes innen 15 minutter av prøvepåføring, selv om dette tidsrom kan variere avhengig av typen av prøve som blir målt. Resultater blir typisk vist ved omtrent 30 sek. etter påføring av blod, når en blodglukoseprøve blir målt, selv om en 5 20 sek. reaksjon er tillatelig for glukoseprøver som har en glukosekonsentrasjon på mindre enn 250 mm/dl. Hvis andre prøver blir målt, kan egnede tider for fremvisning av resultatet være forskjellig, og kan lett bestemmes fra karakteristika av det/den valgte reagens/prøve.

En spesielt nøyaktig evaluering av glukosenivå (eller annen analytt som blir 10 målt), kan gjøres ved å anvende bakgrunnsstrøm, dvs. strømmen fra fotodektoren med strøm på men uten lys reflektert fra reagensputen, for å gjøre en bakgrunnskorrigering. Det er blitt demonstrert av over en 2 - 3 måneders periode forandrer denne verdi seg ikke for et spesielt instrument som er fremstilt i henhold til de foretrukne utførelsesformer av denne spesifikasjon, og det er mulig å programmere denne 15 bakgrunnsavlesning inn i computerhukommelsen som en konstant. Med en svak modifisering av prosedyren kan imidlertid denne verdi måles ved hver analyse for mer nøyaktige resultater. I den modifiserte prosedyre bør måleren skrus på med lukket åpning før reagensstrimmelen er på plass, og bakgrunnsstrømmen ville bli målt. Teststrimmelen ville så bli innført inn i måleren med lokket lukket, og en 20 $R_{\text{tørr}}$ måling blir tatt, og prosedyren fortsatt som beskrevet ovenfor. Med denne modifiserte prosedyre trenger ikke bakgrunnstrømmen å være stabil i løpet av målerens brukstid, og gir derved mer nøyaktige resultater. Rådata nødvendig for beregning av et resultat i en glukosemåling er en bakgrunnstrøm rapportert som bakgrunnsreflektans, R_b , som beskrevet ovenfor; en avlesning av den ureagerte 25 teststrimmel, $R_{\text{tørr}}$, også beskrevet ovenfor; og en sluttpunktmåling. Når man anvender de foretrukne utførelsesformer beskrevet her, er slutt punktet ikke spesielt stabilt og må nøyaktig tidsbestemmes fra den initielle påføring av blod. Imidlertid utfører måleren som beskrevet her denne tidsmåling automatisk. For glukosekonsentrasjoner under 250 mg/dl blir et egnet stabilt slutt punkt nådd på 20 sek., og 30 en slutt reflektans, R_{20} , blir tatt. For glukosekonsentrasjoner opp til 400 mg/dl er en 30-sekunders reflektansavlesning, R_{30} , adekvat. Selv om systemet beskrevet her,

viser god difrensiering opp til 800 mg/dl glukose, er målingen i noen grad forstyrret og unøyaktig over 450 mg/dl, selv om den ikke er så stor at den forårsaker et signifikant problem. Lengre reaksjonstider bør gi mer egnede avlesninger for de høyere nivåer av glukosekonsentrasjon.

5 700 nm reflektansavlesningen for den dobbelte bølgelengdemåling blir typisk tatt ved 15 sek. (R_{15}). Ved dette tidspunkt vil blod fullstendig ha mettet reagensputen. Etter 15 sek. fortsetter fargereaksjonen å finne sted, og føles i liten grad av en 700 nm avlesning. Følgelig, siden fargeabsorpsjon ved 700 nm signalet er en ulempe, blir avlesninger etter 15 sek. ignorert i beregningene. Rådata beskrevet ovenfor
10 anvendes til å beregne parametere som er proporsjonale med glukosekonsentrasjon, som lettere kan visualiseres enn reflektansmålinger. En logaritmisk transformasjon av reflektans analog med forholdet mellom absorberingsevne og analytt-konsentrasjon observert i transmisjonsspektroskopi (Beer's Law) kan anvendes om ønsket. En forenkling av Kubelka-Monk ligningene, utledet spesifikt for reflektansspektroskopi, har vist seg spesielt anvendbar. I denne utledning er K/S relatert til
15 analyttkonsentrasjon med K/S definert ved ligning 1.

$$K/S-t = (1 - R^*t)^2 / (2 \times R^*t) \quad (1)$$

R^*t er reflektiviteten tatt ved et spesielt slutt-tidspunkt, t , og er den absorberte fraksjon av den innfallende lysstråle beskrevet ved ligning 2, hvor R_t er sluttpunkt-reflektans, R_{20} eller R_{30} .

$$R^*t = (R_t - R_b) / (R_{t\text{ørr}} - R_b) \quad (2)$$

R^*t varierer fra 0 for ikke noe reflektert lys (R_b) til 1 for totalt reflektert lys ($R_{t\text{ørr}}$). Anvendelse av reflektivitet i beregningene forenkler i stor grad målings-
25 disse komponenter måles med hver $R_{t\text{ørr}}$ og R_b måling.

For en enkelt bølgelengdeavlesning kan K/S beregnes ved 20 sekunder (K/S-20) eller 30 sekunder (K/S-30). Kalibreringskurvene som relaterer disse parametere til YSI (Yellow Springs Instruments) glukosemålinger, kan beskrives nøyaktig ved den tredje ordens polynome ligning gjengitt i ligning 3.

$$30 \quad YSI = a_0 + a_1(K/S) + a_2(K/S)^2 + a_3(K/S)^3 \quad (3)$$

Koeffisientene for disse polynomer er satt opp i tabell 1.

TABELL 1
Koeffisienter for tredje-ordens polynom tilpasning
av enkeltbølgelengde kalibreringskurver.

	K/S-20	K/S-30
5		
a_0	-55,75	-55,25
a_1	0,1632	0,1334
a_2	$-5,765 \times 10^{-5}$	$-2,241 \times 10^{-5}$
a_3	$2,58 \times 10^{-8}$	$1,20 \times 10^{-8}$

10

De enkle kjemiske stoffer som blir målt i de foretrukne utførelsesformer, er MBTH-DMAB indaminfarge, og den komplekse grunnmasse som blir analysert, er fullstendig blod fordelt på en $0,8 \mu$ Posidyne membran. Et tilbakeblikk med tittel "Application of Near Infra Red Spectrophotometry to the Nondestructive Analysis of Foods: A Review of Experimental Results", CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 18(3) 203-30 (1983), beskriver anvendelse av instrumenter på måling av en forskjell i optisk tetthet $OD (a - b)$ hvor OD_a er den optiske tetthet ved en bølgelengde som tilsvarer absorpsjonsmaksimum av en komponent som skal bestemmes, og OD_b er den optiske tetthet ved en bølgelengde hvor den samme komponent ikke absorberer signifikant.

20

Algoritmen for dobbelt bølgelengdemåling er nødvendigvis mer kompleks enn for enkelt bølgelengdemåling men er mye sterkere. Den første ordens-korreksjon, anvendt ved 700 nm avlesningen, er en enkelt subtraksjon av bakgrunnsfargen p.g.a. blod. For å gjøre denne korreksjon kan det bestemmes og ble bestemt en relasjon mellom absorbans ved 635 nm og 700 nm p.g.a. blodfarge ved å måle blodprøver med 0 mg/dl glukose over et vidt blodfargeområde. Fargeområdet ble konstruert ved å variere hematokritt, og nokså lineære forhold ble observert. Fra disse linjer ble K/S-15 ved 700 nm normalisert til å gi ekvivalens til K/S-30 ved 635 nm. Dette forhold er gjengitt i ligning 4, hvor K/S-15n er den normaliserte K/S-15 ved 700 nm.

30

$$K/S-15n = (K/S-15 \times 1,54) - 0,133 \quad (4)$$

Legg merke til at ekvivalensen av det normaliserte 700 nm signal og 635 nm signalet bare er sann ved null glukose. Uttrykkene hvorfra kalibreringskurvene ble utledet, er definert ved ligninger 5 og 6.

$$K/S-20/15 = (K/S-20) - (K/S-15n) \quad (5)$$

$$K/S-30/15 = (K/S-30) - (K/S-15n) \quad (6)$$

Disse kurver tilpasses best ved fjerde-ordens polynome ligninger lik ligning 3 hvortil et fjerde-ordens ledd i K/S blir lagt til. De computertilpassede koeffisienter for disse ligninger er satt opp i tabell 2.

TABELL 2

Koeffisienter for fjerde-ordens polynom
tilpasning av dobbelt bølgelengde kalibreringskurver.

	K/S-20/15	K/S-30/15
a ₀	-0,1388	1,099
a ₁	0,1064	0,05235
a ₂	6,259 x 10 ⁻⁵	1,229 x 10 ⁻⁴
a ₃	-6,12 x 10 ⁻⁸	-5,83 x 10 ⁻⁸
a ₄	3,21 x 10 ⁻¹¹	1,30 x 10 ⁻¹¹

En annen ordenskorleksjon for å eliminere feil p.g.a. kromtaograferingsvirkninger er også blitt utviklet. Lav-hematokrittprøver har karakteristisk lave 700 nm avlesninger sammenlignet med høyere hematokrittprøver med den samme 635 nm avlesning. Når forholdet (K/S-30)/(K/S-15) blir plottet i forhold til K/S-30 over et vidt området av hematokritter og glukosekonsentrasjoner, indikerer den resulterende linje på den grafiske fremstilling grensen mellom prøvene som viser kromatograferingsvirkninger (over kurven) og de som ikke gjøre det (under kurven). K/S-30 for prøvene over kurven blir korrigert ved å forhøye avlesningen til å tilsvare et punkt på kurven med den samme (K/S-30)/(K/S-15).

Korreksjonsfaktorene gjengitt ovenfor, ble utformet til å passe til et enkelt instrument og et begrenset antall reagenspreparater. Algoritmen kan optimaliseres for et enkelt instrument og reagens på samme måte som beskrevet ovenfor.

I sammendrag minimaliserer systemet av den foreliggende oppfinnelse operatorvirkninger og gir tallrike fordeler i forhold til de tidligere reflektans-avlesningsmetodene på fagområdet. Når sammenlignet med tidligere fremgangsmåter for f.eks. bestemmelse av glukose i blod, er det flere synlige fordeler. For det første er mengden av prøve som kreves for å mette den tynne reagenspute, liten (typisk 5 - 10 mikroliter). For det andre er operatortiden som kreves, bare den som er nødvendig for å påføre prøven på det tynne hydrofile lag og stenge lokket (typisk 4 - 7 sekunder). For det tredje kreves ingen samtidig tidsavlesningsstart. For det fjerde kan fullstendig blod anvendes. Denne fremgangsmåte krever ingen separasjon eller anvendelse av røde cellefrie prøver og kan likeledes anvendes med andre dypt fargede prøver.

Flere ikke åpenbare fordeler fremkommer som et resultat av utførelsen av den foreliggende oppfinnelse med fullstendig blod. Normalt vil vandige løsninger (som blod) trenge gjennom en hydrofil membran for å gi et væskelag på den motsatte side av membranen, en overflate som så ikke er egnet til reflektansmåling.

Det er imidlertid blitt oppdaget at blod, tilsynelatende p.g.a. vekselvirkninger mellom røde blodceller og proteiner i blodet med grunnmassen, vil væte polyamid-grunnmassen uten at en overskuddsvæske trenger gjennom den porøse grunnmasse for å interferere med reflektansavlesningen på den motsatte side av grunnmassen.

Videre ville de tynne membraner anvendt i den foreliggende oppfinnelse når de er våte, forventes å transmittere lys og returnere bare et svakt signal til det reflektansmålede utstyr. Tidligere undervisning har hovedsakelig angitt at et reflekterende lag er nødvendig bak grunnmassen for å reflektere tilstrekkelig lys. I andre tilfeller er en hvit pute blitt plassert bak reagensputen før fargemåling. I det foreliggende tilfelle kreves verken et reflekterende lag eller en hvit pute. Faktisk blir oppfinnelsen typisk utført med en lysabsorberende overflate bak reagenselementet når innfallende lys blir rettet mot matriksen. Ved å anvende en lysabsorberende overflate bak reagenselementet, koblet til målingsreflektans ved to forskjellige bølgelengder, tillates akseptable reflektans-målinger å oppnås uten fjerning av overskuddsvæske fra grunnmassen, for derved å eliminere ett trinn som typisk krevdes ved tidligere underviste metoder.

Oppfinnelsen som nå blir generelt beskrevet, vil forstås bedre ved referanse til de følgende spesifikke eksempler.

Eksempel 1

5 Reproduserbarhet:

En mannlig blodprøve (JG, hematokritt = 45) ble anvendt til å samle reproduserbarhetsdata fremsatt i tabell 3 - 5.

10

TABELL 3
Reproduserbarhet av et enkelt bølgelengde MPX system

	Gj.snitt (mg/dl)		S.D. (mg/dl)		%C.V.		
	YSI (mg/dl)	20 sek.	30 sek.	20 sek.	30 sek.	20 sek.	30 sek.
15	25	23,1	23,0	2,1	2,04	9,1	9,0
	55	53,3	53,2	3,19	3,32	6,0	6,3
	101	101	101	3,0	3,3	3,0	3,3
	326	326,6	327	13,3	9,8	4,1	3,0
	501		503		17,1		3,4
20	690		675		28		4,15
	810		813		37		4,5

25

TABELL 4
Reproduserbarhet av et dobbelt bølgelengde MPX system

	Gj.snitt (mg/dl)		S.D. (mg/dl)		%C.V.		
	YSI (mg/dl)	20 sek.	30 sek.	20 sek.	30 sek.	20 sek.	30 sek.
	25	25	27	1,34	1,55	5,4	5,7
30	55	55	57,4	2,58	2,62	4,7	4,6
	101	101	101,5	2,55	2,18	2,5	2,1
	326	332	330	15,0	7,1	4,5	2,1
	501		505		21,3		4,2
	690		687		22,8		3,3
35	810		817		30,4		3,7

TABELL 5

Reproduserbarhet av en åpning på 3,0 mm i diameter

YSI (mg/dl)	% C.V.	
	4,7 mm	3,0 mm
55 - 100	4,8	4,9
300	3,0	5,0
600	3,8	5,5
gj.sn.	3,9	5,1

10 Blodet ble delt i alikvote mengder og tilsatt glukose over et område på 25 - 800 mg/dl. Tjue bestemmelser ble gjort ved hvert glukoseprøvenivå fra strimler tatt tilfeldig fra en 500 strimmelprøve (porsjon FJ4-49B). Resultatene fra dette studium førte til de følgende konklusjoner:

15 1. Enkel vs. dobbeltbølgelengde: Gjennomsnitt C.V. for det 30-sekunders dobbelte resultat var 3,7 % vs. 4,8 % for det 30-sekunders enkeltbølgelengde-resultat, en forbedring på 23 % over et glukoseområde på 25 - 810 mg/dl.

20 Det var en 33 % forbedring i C.V. i det 25 - 326 mg/dl glukoseområdet. Her minket C.V. fra 5,4 % til 3,6 %, en signifikant forbedring i det mest anvendte området. Den 20-sekunders dobbelt bølgelengdemåling ga lignende forbedringer i C.V., sammenlignet med enkelt bølgelengdemålingen i 25 - 326 mg/dl området (tabell 3 og 4).

25 2. Dobbelt bølgelengde, 20 vs. 30-sekunders resultat: Gjennomsnitt C.V. for et 20-sekunders resultat i 25-100 mg/dl området er nesten identisk med 30-sekunders avlesningen, 4,2 % vs. 4,1 %. Imidlertid har ved 326 mg/dl 30-sekunders avlesningen en C.V. på 2,1 % og 20-sekunders avlesningen en C.V. på 4,5 %. Som det ble sett i K/S-20 responskurven begynner hellingen å avta skarpt over 250 mg/dl. Dette fører til dårlig reproduserbarhet ved glukosenivåer større enn 300 for 20-sekunders resultatet. Fra disse reproduserbarhetsdata er avskjæringen for 20-sekunders
30 resultatet et sted mellom 100 og 326 mg/dl. En avskjæring på 250 mg/dl ble senere bestemt fra resultatene fra utbyttstudiet fremsatt i eksempel II.

3. Størrelse av åpning: En mindre størrelse av optikkåpning, 3,0 mm vs. 5 - 0 min., ble undersøkt. Starteksperimentering ved å anvende et 10- replika, hånddyppet plateprøve viste forbedrete C.V. verdier med 3,0 mm åpningen, tilsynelatene p.g.a. lettere registrering med systemoptikken. Imidlertid, når maskinlaget rullemembran ble anvendt, var gjennomsnitt C.V. (tabell 5) av den større åpning, 4,7 mm, 3,9 % vs. en gjennomsnitt C.V. for 3,0 mm åpningen på 5,1 %. Denne 30 % økning i C.V. var sannsynligvis forårsaket av den ujevne overflate av rullemembranporsjonen som diskutert nedenfor.

10

Eksempel II

Utbytte:

For sammenligning av den foreliggende fremgangsmåte (MPX) mot en typisk fremgangsmåte innen den tidligere fagkunnskap som anvender en Yellow Springs Instrument Model 23A glukose analysator fabrikkert av Yellow Springs Instrument Co., Yellow Springs, Ohio (YSI), ble blod fra 36 donorer testet. Donorene ble delt likt mellom menn og kvinner og rangerte i hematokritt fra 35 til 55 %. Blodprøvene ble anvendt innen 30 timers oppsamling, med litium heparin som antikoagulat. Hver blodprøve ble delt i aliquote mengder og tilsatt glukose for å gi 152 prøver i området på fra 0 - 700 mg/dl glukose. Hver prøve ble testet i duplikat for en total mengde på 304 datapunkter.

20

Responskurve ble konstruert fra disse data, og glukoseverdier så beregnet fra den passende ligning (tabell 1 og 2). Disse MPX glukoseverdier ble så plottet vs. YSI verdiene for å gi spredningsdiagrammer.

25

Sammenligning av MPX-systemer: For både 20-sekunders og 30-sekunders målingstidene er mer spredning synlig i enkeltbølgelengde spredningsdiagrammene enn i dobbeltbølgelengde spredningsdiagrammene. 20-sekunders avlesningen blir veldig spredt over 250 mg/dl, men 30-sekunders målingen har ikke vist spredning før glukosenivået er ≥ 500 mg/dl.

30

Disse spredningsdiagrammer ble kvantisert ved å bestemme avvikene fra YSI ved forskjellige glukoseområder. De følgende resultater ble oppnådd.

TABELL 6

Nøyaktighet av MPX fra utbytte data

MPX bølgelengde	Målings- tid (sek.)	S.A. (mg/dl)		C.V. for område*	
		0-50	50-250	250-450	450-70
5 Enkel	20	±5,6	7,2	14,5	-
Enkel	30	±6,9	7,1	8,8	10,2
Dobbel	20	±2,3	5,3	12,8	-
Dobbel	30	±2,19	5,5	5,8	8,4

10 **Bemerk:** Disse er intermetode C.V.-verdier.

- a) Dobbelte bølgelengde systemet ga C.V.-verdier som rangerte 30 % lavere enn enkelt bølgelengde systemet.
- b) Enkelt bølgelengde systemet, fra 0-50 mg/dl, viste et S.A. på ± 6-7 mg/dl, mens et S.A. for en dobbelt bølgelengde måling var bare ±2,2 mg/dl.
- 15 c) Avskjæringen for en 30-sekunders MPX måling er 250 mg/dl. For 50 - 250 mg/dl området ga både 20- og 30-sekunders målingene lignende intermetode C.V.-verdier (omtrent 7 % for enkelt bølgelengde, 5,5 % for dobbelt bølgelengde). Imidlertid, i 250 - 450 mg/dl området mere enn fordobler intermetode C.V.-verdiene seg for 20-sekunders avlesningen til 14,5 % for den enkle og 12,8 % for den dobbelte bølgelengde.
- 20 d) 30-sekunders avlesningen var ubrukelig over 450 mg/dl for både den enkle og dobbelte bølgelengdemåling (C.V.-verdier på 10,2 og 8,4 %).

Som konklusjon ga to MPX systemer optimumskvantisering i 0 - 450 mg/dl området.

- 25 1. **MPX 30 dobbel:** Dette dobbelt bølgelengdesystem ga en 30-sekunders målingstid med en 95 % konfidensgrense (definert som sannsynligheten for at en måling er innen 2 S.A. av YSI) på 11,3 % (C.V.) for området fra 50 - 450 mg/dl (tabell 7) og ±4,4 mg/dl (S.A.) for 0,50 mg/dl.
2. **MPX 30/20 dobbel:** Dette dobbelt bølgelengdesystem ga en 20-sekunders målingstid i 0-250 mg/dl området og en 30-sekunders tid for 250-450 området. 95 % konfidensgrensene er nesten identiske med MPX 30 dobbeltsystemet
- 30 (tabell 7), 11,1 % (C.V.) for 50-450 mg/dl og ±4,6 mg/dl (S.A. for 0-50 mg/dl).

TABELL 7

Sammenligning av 95 % konfidensgrenser for MPX,
GlucoScan Plus og Accu-Chek bG* reagens strimler

5	Målings område mg/dl	MPX enkelt bølgelengde		MPX dobbelt bølgelengde	
		20 sek.	30 sek.	20 sek.	30 sek.
	0-50	11,2 mg/dl	13,8 mg/dl	4,6 mg/dl	4,4 mg/dl
	50-250	14,4 %	14,2 %	10,6 %	11,0 %
10	250-450	-	17,6 %	-	11,6 %
	77-405	GlucoScan Plus (Drexler klinisk)		15,9 %	
	77-405	Accu-Chek bG (Drexler klinisk)		10,7 %	
	50-450	MPX 20/30 dobbelt hybrid		11,1 %	
15	50-450	MPX 30 dobbelt		11,3	

* Konfidensgrenser for MPX var fra YSI. Konfidensgrensene for GlucoScan Plus og Accu-Chek bG var fra regresjonsligningen vs. YSI som eliminerer skjevheter p.g.a. små forskjeller i kalibrering.

20

Eksempel III

Stabilitet:

Det meste av benkeskalaarbeidet som ble utført for å optimalisere stabilitet, ble fullført ved å anvende hånddyppede 0,8 μ Posidyne membran plater. Den spesifikke farge/enzymutforming ble fremsatt tidligere.

25

1. Romtemperatur stabilitet:

Dette studium forsøkte å kartlegge enhver forandring i respons i 0,8 μ Posidyne membranreagenset lagret ved 18 - 20°C over tørkemiddel av silisiumdioksyd-gel. Etter 2,5 mnd. var det ingen merkbar forandring som målt ved responsen for en romtemperaturprøve vs. responsen for en prøve lagret ved 5°C. Hvert spredningsdiagram representerte et glukoseområde på 0 - 450 mg/dl.

30

2. Stabilitet ved 37°C:

Et 37°C stabilitetsstudium ved å anvende det samme reagens som ved RT studiet ble utført. Forskjellene i glukose-verdier for reagens under betingelsen 37°C vs. RT reagens, for strimler under betingelser med og uten klebemiddel, ble plottet over tid. Selvom data var uklare, p.g.a. den dårlige reproduserbarhet av håndlagde strimler, var stabiliteten utmerket for strimler enten de var under betingelsen med eller uten klebemiddel.

3. Stabilitet ved 56°C:

Åtte 5- til 6-dagers stabilitet ble utført ved å anvende forskjellige preparater med lik utforming på platemembran (tabell 8). For lav-glukose-testnivået (80 - 100 mg/dl) falt gjennomsnitts glukoseverdien under betingelsen ved 3,4 %, med det høyeste fall på 9,55 %. Ved det høye testnivå (280 - 320 mg/dl) sank glukose-avlesningen med et gjennomsnitt på 3,4 %, idet den største nedgang var 10,0 %.

TABELL 8

Stabilitet av pH = 4,0, 0,8 Posidyne plate reagens
Utforming understreket for 5 til 6 dager ved 56°C

% forskjell (56°C vs RT prøve)

<u>Prøve nr.</u>	<u>YSI (80-100 mg/dl)</u>	<u>YSI (280-320 mg/dl)</u>
FJ22B	-6,25	+5,4
FJ27A	-4,0	-5,14
FJ28B	-2,4	-5,3
FJ30H	-9,55	-10,0
FJ31C	+4,43	-1,24
FJ36	-3,2	-8,5
FJ48B*	-3,0	0,0
GM48A*	<u>-3,0</u>	<u>-2,5</u>
Gjennomsnitt på	-3,4	-3,4

* Disse to prøver inneholdt to ganger den normale konsentrasjon av enzym og farge.

Et studium av denne membran under 56°C betingelse over en 19-dagers periode viste ingen hoved forskjell for strimler under betingelser med eller uten klebemiddel. I begge tilfeller var 19-dagers nedgangen i glukoseverdi <15 % ved lave testnivåer (80 - 100) og 300 mg/dl.

- 5 Et annet 56°C studium hvor man anvendte hånddyppet 0,8 μ Posidyne membran med to ganger det normale konsentrasjon av enzym og farge, ble fullført. To separate preparater med den samme utforming ble laget, og stabiliteten målt over en 14-dagers periode. Gjennomsnittresultatene fra de to studier ble plottet. Forandringer var inne \pm 10 % over 14-dagers perioden ved både det høye og lave glukose testnivå.
- 10 Disse data viser at denne utforming er spesielt stabil.

Eksempel IV

Prøvestørrelse:

Krav til prøvestørrelse for MPX er vist i tabell 9.

15

TABELL 9

Virkning av prøvestørrelse på MPX målinger

20	Prøve størrelse (μ l)	<u>Dobbelt bølgelengde</u>					<u>enkelt bølgelengde</u>				
		Gj.sn.					Gj.sn.				
Lav glukose YSI = 56											
25	3	41	50	39	31	40	31	42	30	19	30
	4	44	49	49	49	48	41	45	44	45	44
	5	54	48	49	51	50	50	49	48	49	49
	10	48	48	50	47	48	54	53	56	55	54
30	20	49	49	49	50	49	55	57	58	60	58
Høy glukose YSI = 360											
	3	301	260	276	286	280	274	232	244	260	252
	4	383	378	367	341	367	361	356	342	318	344
35	5	398	402	382	370	388	378	387	366	351	370
	10	364	362	378	368	368	356	358	379	369	366
	20	375	370	380	378	376	380	382	389	385	384

Volumene gjengitt i tabellen ble overført til reagensputen vist i fig. 1 ved å anvende en mikropipette. Når blod fra et stikk i finger blir påført en strimmel, kan den totale prøven ikke overføres, derfor representerer volumene som er gjengitt her, ikke den totale prøvestørrelse som trengs å klemmes ut fra fingeren for analysen. En 3- μ l prøve er minimum som er nødvendig for fullstendig å dekke reagenspute-
sirkelen. Dette gir ikke nok prøve til fullstendig å mette reagensputen og MPX gir
lave resultater. En 4- μ l prøve metter knapt reagensputen, mens en 5- μ l prøve er klart
tilstrekkelig. En 10- μ l prøve er en stor, skinnende dråpe og en 20- μ l prøve er veldig
stor dråpe og det er bare sannsynlig at denne kan brukes når blod fra en pipette
anvendes til prøvetaking.

Ved lav glukosekonsentrasjon er enkelt bølgelengde resultatet i noen grad avhengig av prøvestørrelsen, som blir fullstendig eliminert når man anvender dobbelt bølgelengde målingen. Selvom denne avhengighet med enkelt bølgelengden kunne betraktes som akseptabel, er den klart uønsket.

Eksempel V

Reproduserbarhet:

Eksperimentelle målinger beskrevet ovenfor, ble alltid kjørt i replikat, vanligvis 2, 3 eller 4 bestemmelser pr. datapunkt. Disse sett har alltid vist nært samsvar selv for prøver med ekstreme hematokritter eller ekstreme oksygenivåer. C.V.-verdier var godt under 5 %. Det viser seg derfor at reproduserbarhet er veldig god til utmerket.

Den tilgrunnliggende oppfinnelse gir mange fordeler i forhold til systemer som for øyeblikket kommersielt eller blitt beskrevet i litteraturen. Fremgangsmåtene er enkle og krever liten teknisk fagkunnskap og er relativt frie for operatorfeil. Målingene kan utføres hurtig og anvende billige og relativt uskadelige reagenser, viktige betraktninger for materialer anvendt i hjemmet. Brukeren oppnår resultater som kan forstås og anvendes sammen med opprettholdelsesterapi. I tillegg har reagensene lange stabilitetstider, slik at resultatene som oppnås vil være pålitelige i lange tidsperioder. Utstyret er enkelt og pålitelig og i det vesentlige automatisk.

P a t e n t k r a v

1. Fremgangsmåte for å forårsake at en analytisk måling blir utført i et reflektansavlesningsutstyr ved slutten av en forutbestemt tidsperiode etter at en
5 analytt reagerer med et reagens i en porøs, reflektansavlesningsgrunnmasse beliggende i utstyret, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter at:

man tar en første reflektansavlesning av en tørr første overflate til en porøs grunnmasse før påføring av en prøve av kroppsfluid antatt å inneholde analytten på en annen overflate til nevnte porøse grunnmasse, hvorifra prøven kan bevege seg til
10 den første overflaten ved kapillær virkning og reagere med reagenset i den porøse grunnmasse dersom analytten er tilstede i prøven;

man påfører prøven på den andre overflaten til den porøse grunnmassen;

man tar en ytterligere reflektansavlesning fra den første overflaten etter at prøven er applisert på den porøse grunnmasse;

15 man sammenligner nevnte ytterligere reflektansavlesning med nevnte første reflektansavlesning og starter den forutbestemte tidsperioden ved et forutbestemt fall i reflektans, tilstrekkelig til å indikere at prøven har nådd den første overflaten; og

man tar en reflektansavlesningsmåling ved slutten av den forutbestemte tidsperiode uten å ha bestemt tidspunktet hvor prøven opprinnelig ble påført på den
20 porøse grunnmasse.

2. Fremgangsmåte i henhold til krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte overflate i utgangspunktet er tørr og nevnte ytterligere reflektansavlesning er forskjellig fra nevnte første reflektansverdi når et væskemålingsmedium trenger
25 gjennom den nevnte første overflate til nevnte grunnmasse.

3. Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte reagens omfatter en fargeforløper bundet til grunnmassen.

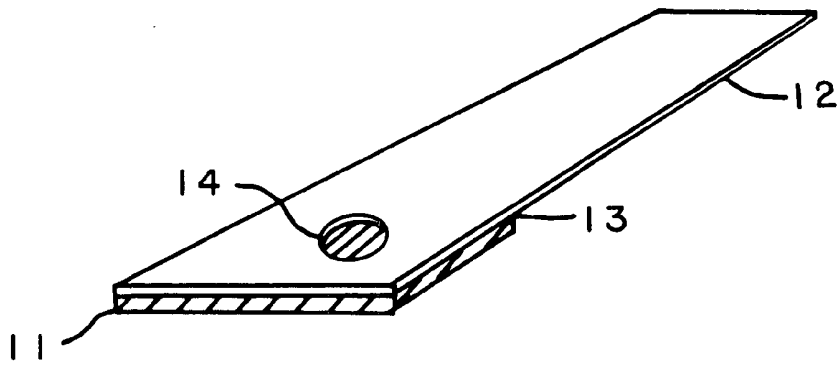


FIG. 1

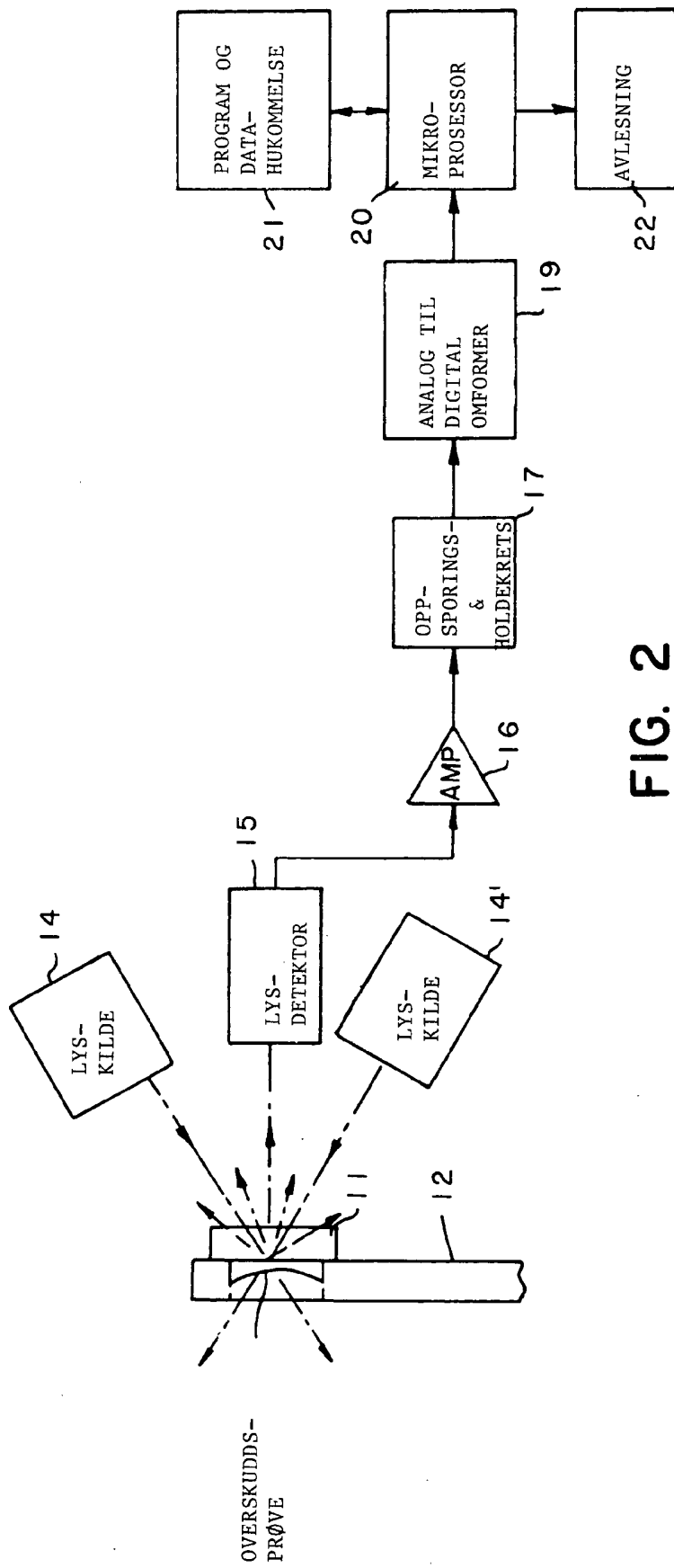


FIG. 2

313929

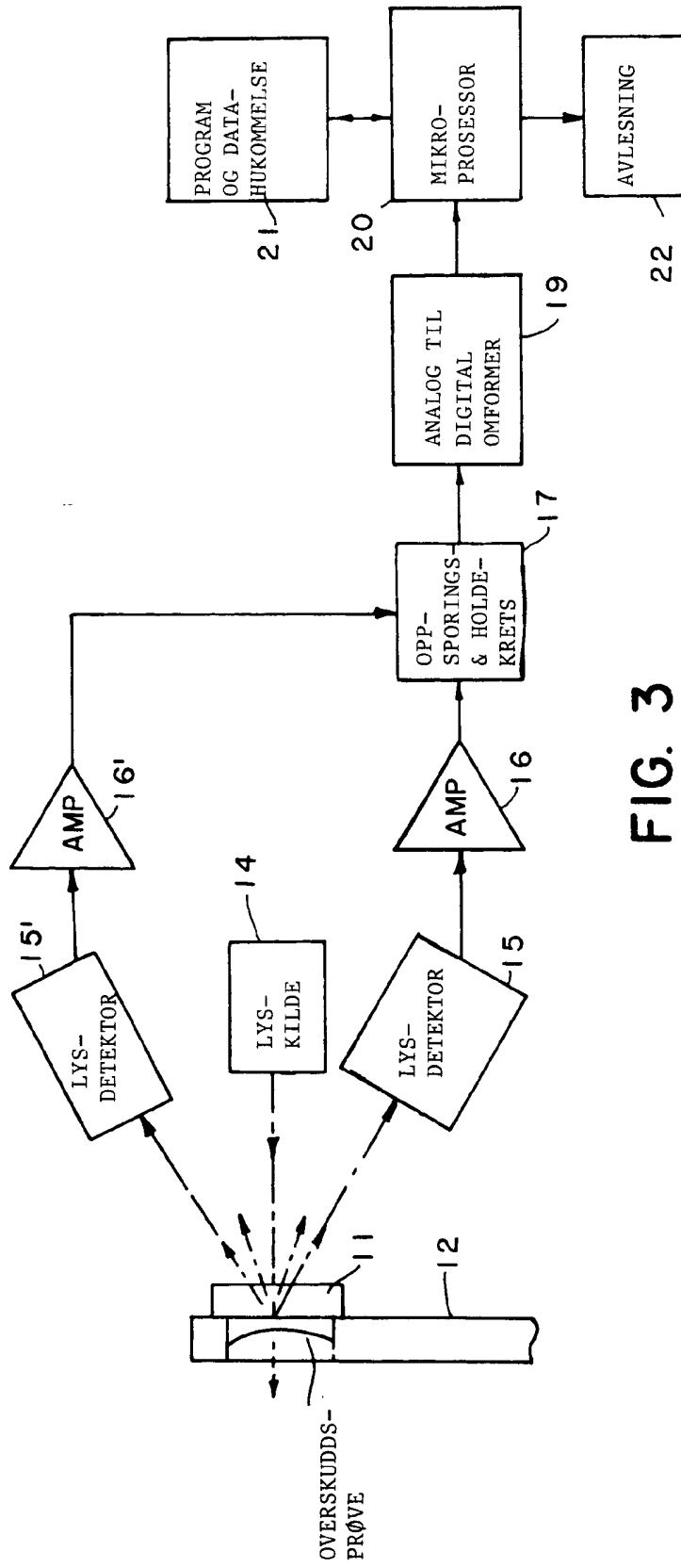


FIG. 3