



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 26 933 T2** 2006.11.23

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 069 427 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 26 933.7**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 304 003.7**

(96) Europäischer Anmeldetag: **12.05.2000**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **17.01.2001**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **29.03.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **23.11.2006**

(51) Int Cl.⁸: **G01N 21/86** (2006.01)
G01N 33/49 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

354995 **16.07.1999** **US**

(73) Patentinhaber:

Lifescan, Inc., Milpitas, Calif., US

(74) Vertreter:

BOEHMERT & BOEHMERT, 28209 Bremen

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

Shartle, Robert Justice, Livermore, CA 94550, US

(54) Bezeichnung: **Initiierung einer analytischen Messung in Blut**

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

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

Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft eine fluidische medizinische Diagnostizier Vorrichtung zur Messung der Analytkonzentration in oder einer Eigenschaft von Blutproben; insbesondere betrifft sie ein Verfahren zur Initiierung einer derartigen Messung, wenn die Blutprobe bestimmte Merkmale aufweist.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Eine Vielzahl von medizinischen Diagnostizierverfahren betreffen Tests an biologischen Flüssigkeiten wie Blut, Urin oder Speichel und basieren auf einer Veränderung der physikalischen Eigenschaften einer solchen Flüssigkeit oder eines Elementes dieser Flüssigkeit, wie zum Beispiel Blutserum. Die Eigenschaft kann eine elektrische, magnetische, flüssige oder optische Eigenschaft sein. Wenn eine optische Eigenschaft beobachtet wird, nutzen diese Verfahren eine transparente oder transluzente Vorrichtung, um die biologische Flüssigkeit und ein Reagenz zu enthalten. Eine Veränderung der Lichtabsorption der Flüssigkeit kann mit einer Analytkonzentration in oder einer Eigenschaft der Flüssigkeit verbunden sein. Typischerweise ist die Lichtquelle neben einer der Oberflächen der Vorrichtung und ein Detektor ist neben der gegenüberliegenden Oberfläche angebracht. Der Detektor mißt Licht, welches durch eine flüssige Probe geschickt wird. Alternativ können die Lichtquelle und der Detektor auf der gleichen Seite der Vorrichtung angebracht sein; in diesem Fall mißt der Detektor durch die Probe gestreutes und/oder reflektiertes Licht. Schließlich kann ein Reflektor an oder neben der gegenüberliegenden Oberfläche positioniert sein. Eine Vorrichtung von dieser letzten Art, in welcher Licht zunächst durch das Probengebiet geschickt wird und dann ein zweites Mal dort hindurch reflektiert wird, wird eine "Transfleksionsvorrichtung" genannt. Wird in dieser Patentanmeldung und den angehängten Ansprüchen Bezug auf "Licht" genommen, schließt dies den Infrarot- und Ultraviolettbereich wie auch das sichtbare Licht mit ein. Der Begriff "Absorption" soll sich auf die Verminderung der Intensität beziehen, wenn ein Lichtstrahl ein Medium passiert; daher umfaßt dieser Begriff sowohl "echte" Absorption wie auch Streuung.

[0003] Ein Beispiel für eine transparente Testvorrichtung wird von Wells et al. in WO 94/02850 beschrieben, veröffentlicht am 03.02.1994. Ihre Vorrichtung umfaßt ein versiegeltes Gehäuse, welches transparent oder transluzent, dicht und steif oder halbsteif ist. Innerhalb des Gehäuses ist ein Assaymaterial zusammen mit einem oder mehreren Assayreagenzien an vorbestimmten Stellen enthalten. Das Gehäuse wird kurz vor der Ausführung des Assays geöffnet und die Probe eingebracht. Die Kombination von Assayreagenzien und Analyt in der Probe resultiert in einer Veränderung der optischen Eigenschaf-

ten wie der Farbe, von ausgewählten Reagenzien am Ende des Assays. Die Ergebnisse können visuell oder mit einem optischen Instrument ausgelesen werden.

[0004] Das U.S.-Patent 3,620,676, erteilt am 16.11.1971 an Davis, beschreibt einen kolorimetrischen Indikator für Flüssigkeiten. Dieser Indikator umfaßt eine "halbkolbenförmige Höhlung", welche komprimierbar ist. Der Kolben wird komprimiert und entspannt, um einen Sog zu bilden, welcher Flüssigkeit aus einer Quelle durch eine halbröhrenförmige Höhlung zieht, welche auf ihrer Wandung einen Indikator aufgedruckt hat. Die einzigen Kontrollen für den Flüssigkeitsstrom in den Indikator sind, wie stark der Kolben komprimiert wird und wie lange der Indikatoreinlass in die Quelle eingetaucht wird, wenn der Kolben entspannt wird.

[0005] Das U.S.-Patent 3,640,267, erteilt am 08.02.1972 an Hurtig et al., beschreibt einen Behälter für die Probensammlung von Körperflüssigkeit, welcher eine Kammer mit elastischen, klappbaren Wänden umfaßt. Die Wände werden zusammengedrückt, bevor der Behältereinlass in der zu sammelnden Flüssigkeit platziert wird. Beim Loslassen gelangen die Wände wieder in ihren ungeklappten Zustand und ziehen dabei Flüssigkeit in und durch den Einlaß. Wie auch bei der oben diskutierten Vorrichtung von Davis ist die Kontrolle des Flüssigkeitsstroms in den Indikator sehr begrenzt.

[0006] Das U.S.-Patent 4,088,448, erteilt am 09.05.1978 an Lilja et al., beschreibt eine Küvette, welche eine optische Analyse einer mit einem Reagenz vermischten Probe ermöglicht. Das Reagenz ist an den Wänden einer Höhlung aufgebracht, welche anschließend mit der flüssigen Probe gefüllt wird. Die Probe vermischt sich mit dem Reagenz, was eine optisch detektierbare Veränderung hervorruft.

[0007] Eine Vielzahl von Patenten, die im Folgenden diskutiert werden, beschreiben Vorrichtungen zum Verdünnen und/oder Analysieren von biologischen Flüssigkeitsproben. Diese Vorrichtungen umfassen Ventil-ähnliche Entwürfe, um den Fluß der Probe zu steuern.

[0008] Das U.S.-Patent 4,426,451, erteilt am 17.01.1984 an Columbus, beschreibt eine fluidische Multizonenvorrichtung, welche ein durch Druck auslösbares Mittel zur Steuerung des Flusses einer Flüssigkeit zwischen den Zonen aufweist. Seine Vorrichtung nutzt das Druckgleichgewicht an einem Flüssigkeitsmeniskus an der Grenzschicht zwischen einer ersten Zone und einer zweiten Zone, welche einen anderen Querschnitt aufweist. Wenn sich sowohl die erste als auch die zweite Zone bei Atmosphärendruck befinden, erzeugt die Oberflächenspannung einen Rückdruck, welcher den Flüssigkeitsmeniskus

davon abhält, von der ersten in die zweite Zone vorzudringen. Die Konfiguration dieser Grenzfläche oder dieses "Stopknotenpunkts" ist dergestalt, daß die Flüssigkeit nur in die zweite Zone fließen kann, wenn ein von außen erzeugter Druck auf die Flüssigkeit in der ersten Zone ausgeübt wird, der ausreicht, um den Meniskus in die zweite Zone zu drücken.

[0009] Das U.S.-Patent 4,868,129, erteilt am 19.09.1989 an Gibbons et al., beschreibt, daß der Rückdruck an einem Stopknotenpunkt durch einen hydrostatischen Druck auf die Flüssigkeit der ersten Zone überwunden werden kann, zum Beispiel indem eine Säule aus Flüssigkeit in der ersten Zone vorliegt.

[0010] Das U.S.-Patent 5,230,866, erteilt am 27.07.1993 an Shartle et al., beschreibt fluidische Vorrichtungen mit einer Vielzahl an Stopknotenpunkten, in welchen der durch Oberflächenspannung induzierte Rückdruck am Stopknotenpunkt erhöht wird, zum Beispiel, durch Einfangen und Komprimieren von Gas in der zweiten Zone. Das komprimierte Gas kann abgelassen werden, bevor zusätzlicher hydrostatischer Druck auf die erste Zone ausgeübt wird, um die Flüssigkeit zu veranlassen, in die zweite Zone zu fließen. Durch Variation des Rückdrucks der Vielzahl von parallel angeordneten Stopknotenpunkten können "Rißknotenpunkte" gebildet werden, die einen geringeren maximalen Rückdruck aufweisen.

[0011] Das U.S.-Patent 5,472,603, erteilt am 05.12.1995 an Schembri (siehe auch U.S.-Patent 5 627 041), beschreibt die Verwendung von Zentrifugalkraft, um den Rückdruck in einem Stopknotenpunkt zu überwinden. Wenn der Fluß stoppt, ist die erste Zone bei atmosphärischem Druck zuzüglich einem zentrifugal erzeugten Druck, welcher geringer ist als der Druck, der zur Überwindung des Rückdrucks benötigt wird. Die zweite Zone befindet sich bei Atmosphärendruck. Um den Fluß wieder aufzunehmen, wird an der ersten Zone ein zentrifugaler Druck angelegt, der den Rückdruck des Meniskus überwindet. Die zweite Zone bleibt bei Atmosphärendruck.

[0012] Die europäische Patentanmeldung EP 0 803 288, von Naka et al., veröffentlicht am 29.10.1997, beschreibt eine Vorrichtung und ein Verfahren zur Analyse einer Probe, welche das Ziehen der Probe in die Vorrichtung durch einen Sog sowie die anschließende Reaktion der Probe mit einem Reagenz in einer analytischen Sektion umfaßt. Die Analyse wird mittels optischer und elektrochemischer Mittel ausgeführt. In alternativen Ausführungsformen gibt es eine Vielzahl von analytischen Sektionen und/oder Umgehungskanälen. Der Fluß unter diesen Sektionen wird ohne die Verwendung von Stopknotenpunkten ausgeglichen.

[0013] Das U.S.-Patent 5,700,695, erteilt am

23.12.1997 an Yassinzadeh et al., beschreibt eine Apparatur zum Sammeln und Handhaben einer biologischen Flüssigkeit, welche eine "thermale Druckkammer" verwendet, um eine treibende Kraft zu liefern, um die Probe durch die Apparatur zu bewegen.

[0014] Das U.S.-Patent 5,736,404, erteilt am 07.04.1998, an Yassinzadeh et al., beschreibt ein Verfahren zur Bestimmung der Gerinnungszeit einer Blutprobe, welches umfaßt, ein Ende der Probe dazu zu veranlassen, innerhalb eines Durchgangs zu oszillieren. Diese Oszillationsbewegung wird durch alternatives Erhöhen und Senken des Drucks an der Probe erzeugt.

[0015] EP 0 922 954 A2 beschreibt ein Verfahren, um die Gegenwart einer Probenflüssigkeit auf einem Teststreifen zu erkennen, indem die ersten und zweiten Ableitungen eines Parameters, wie das Reflexionsvermögen einer Mischung aus der Flüssigkeit und einem Reagenz, überwacht werden.

[0016] Das US-Patent 5,508,521 beschreibt ein Verfahren gemäß des Oberbegriffs des Anspruchs für die Detektion der Anwendung einer Flüssigkeit auf einer optisch reflektierenden Oberfläche in Gegenwart von Umgebungslicht und vorübergehender Bewegung der Kammer. Die Reaktionskammer kann so sein wie in US 4,849,340 beschrieben.

[0017] US 4,849,340 beschreibt eine Vorrichtung für flüssige Assays. Die Vorrichtung verwendet Kapillarkraft, um ein vorbestimmtes Volumen einer flüssigen Probe in eine mit dem Reagenz beladene Reaktionskammer zu ziehen, in welcher jegliche Reaktion zwischen flüssiger Probe und Reagenz überwacht wird.

[0018] EP-A-0 974 840, welches nach Artikel 54(3) EPÜ einen Stand der Technik darstellt, der nur für die Neuheit relevant ist, beschreibt eine Diagnostizier- vorrichtung für Flüssigkeiten zum Messen einer Analytkonzentration oder Eigenschaft einer biologischen Flüssigkeit. Die Vorrichtung umfaßt eine erste Schicht und eine zweite Schicht, von der mindestens eine ein elastisches Gebiet über mindestens einem Teil seiner Fläche aufweist, die durch eine Zwischenschicht getrennt sind, in welcher Ausschnitte in der Zwischenschicht, mit der ersten und zweiten Schicht, bilden:

- a) eine Probenöffnung zur Einführung einer Probe einer biologischen Flüssigkeit in die Vorrichtung;
- b) eine erste Meßfläche, in welcher ein physikalischer Parameter der Probe gemessen und mit der Analytkonzentration oder einer Eigenschaft der Flüssigkeit in Bezug gebracht wird.
- c) einem ersten Kanal mit einem ersten Ende und einem zweiten Ende, um einen fluidischen Pfad von der Probenöffnung am ersten Ende durch die erste Meßfläche bereitzustellen;

- d) eine erste Blase am zweiten Ende des ersten Kanals, umfassend mindestens einen Teil des elastischen Gebiets in mindestens der ersten oder zweiten Schicht und mit einem Volumen, das mindestens gleich groß ist, wie die vereinigten Volumina der ersten Meßfläche und des ersten Kanals; und
- e) einen ersten Stopknotenpunkt im ersten Kanal zwischen der ersten Meßfläche und der ersten Blase, welcher ein damit in einer Reihe liegendes durchgehendes Loch in mindestens der ersten oder zweiten Schicht umfaßt, wobei der Durchbruch mit einer dritten Schicht überlagert wird.

[0019] EP-A-0 974 840 beschreibt in einer weiteren Ausführungsform eine Vorrichtung, welche eine erste Schicht umfaßt, die ein elastisches Gebiet über mindestens einem Teil ihrer Fläche aufweist, und eine zweite Schicht, die durch eine Zwischenschicht getrennt werden, in welcher Vertiefungen in einer ersten Oberfläche der Zwischenschicht, mit der ersten Schicht, bilden:

- a) eine Probenöffnung zur Einführung einer Probe einer biologischen Flüssigkeit in die Vorrichtung;
- b) eine Meßfläche, in welchem die Probe eine Veränderung in einem physikalischen Parameter erfährt, welcher gemessen und mit der Analytkonzentration oder einer Eigenschaft der Flüssigkeit in Bezug gebracht wird;
- c) einen Kanal mit einem ersten Ende und einem zweiten Ende, um einen fluidischen Pfad von der Probenöffnung am ersten Ende durch die erste Meßfläche bereitzustellen;
- d) eine Blase am zweiten Ende des Kanals,

umfassend, mindestens einen Teil eines elastischen Gebiets in einer ersten Schicht und mit einem Volumen, welches mindestens etwa gleich den vereinigten Volumina der Meßfläche und des Kanals ist; und einem Stopknotenpunkt in dem Kanal zwischen der Meßfläche und der Blase, welche zwei Durchgänge umfaßt, die im Wesentlichen senkrecht zur ersten Oberfläche der Zwischenschicht sind, wobei jeder Durchgang ein erstes Ende in fließfähiger Verbindung mit dem Kanal und ein zweites Ende in fließfähiger Verbindung mit einer Vertiefung in einer zweiten Oberfläche der Zwischenschicht aufweist, wobei diese Vertiefung eine fließfähige Verbindung zwischen den zweiten Enden der Durchgänge bereitstellt.

Die Erfindung

[0020] Die Erfindung stellt ein Verfahren zur Initiierung der Messung einer Analytkonzentration oder Eigenschaft einer Blutprobe bereit, welche eine "Rouleaux"-Ausrichtung zeigt. "Rouleaux-Formation" ("Geldrollenbildung") betrifft die Stapelung von roten Blutzellen, welche eine charakteristische optische Signatur für eine solche Probe, typischerweise Vollblut, ermöglicht.

[0021] Die Erfindung stellt ein Verfahren zur Initiierung einer Messung einer Analytkonzentration oder einer physikalischen Eigenschaft einer Blutprobe bereit, umfassend

- (a) zur Verfügung stellen eines Meßgeräts, welches die Analytkonzentration oder die physikalische Eigenschaft einer Blutprobe auf einer fluidischen Diagnostizier Vorrichtung (**10**) mißt;
- (b) Einführen des Meßgerätes in die Vorrichtung (**10**), umfassend:
- (i) eine Probenöffnung (**12**) zum Einführen einer Probe des Blutes in die Vorrichtung (**10**),
- (ii) eine Meßfläche (**18**), auf welcher die Analytkonzentration oder die physikalische Eigenschaft gemessen wird;
- (iii) einen Kanal (**16**) mit einem ersten Ende und einem zweiten Ende, um einen fluidischen Pfad von der Probe am ersten Ende zur Meßfläche zur Verfügung zu stellen;
- (c) Zuführen der Blutprobe zur Probenöffnung (**12**); wobei das Verfahren weiterhin umfaßt:
- (d) Beleuchten der Probenöffnung (**12**) und Beobachten des Lichts über eine vorbestimmte Zeitspanne; und
- (e) Messen der Analytkonzentration oder der physikalischen Eigenschaft;

wobei

die Probenöffnung (**12**) transparent ist und das über eine vorbestimmte Zeitspanne durch die Probe übertragene Licht beobachtet wird und die Messung im Schritt (e) nur vorgenommen wird, wenn während der vorbestimmten Zeitspanne das Licht zuerst schlagartig abnimmt und dann zunimmt, wobei das Meßgerät die Messung nur durchführt, wenn die Blutprobe Vollblut ist.

[0022] Das erfindungsgemäße Verfahren hat eine breite Anwendung bei verschiedenen Vorrichtungen für die Messung von Analytkonzentrationen und Eigenschaften von Blut, aber es ist besonders gut angepaßt an die Messung der Prothrombin-Zeit (PT-Zeit) von Vollblut. In diesem Fall, hat die Meßfläche eine Zusammensetzung, welche die Blutgerinnungskaskade katalysiert.

Beschreibung bevorzugter Ausführungsbeispiele

[0023] Die Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen unter Bezugnahme auf Figuren einer Zeichnung näher erläutert. Hierbei zeigen:

[0024] [Fig. 1](#) eine Draufsicht einer Vorrichtung, die für die Verwendung in der vorliegenden Erfindung geeignet ist;

[0025] [Fig. 2](#) eine Explosionsdarstellung der Vorrichtung aus [Fig. 1](#);

[0026] [Fig. 3](#) eine perspektivische Ansicht der Vor-

richtung aus [Fig. 1](#);

[0027] [Fig. 4](#) eine schematische Darstellung eines Meßgeräts;

[0028] [Fig. 4A](#) ein Element des Meßgeräts von [Fig. 4](#) dar und illustriert das erfindungsgemäße Verfahren;

[0029] [Fig. 5](#) einen Graph von Kurven, die eine Flüssigkeit identifizieren, die Vollblut sein kann oder auch nicht;

[0030] [Fig. 6](#) ein Graph von Daten, welcher zur Bestimmung der PT-Zeit, unter Verwendung des Meßgeräts aus [Fig. 4](#) verwendet wird;

[0031] [Fig. 7](#) eine Draufsicht einer alternativen Ausführungsform der Vorrichtung aus [Fig. 1](#);

[0032] [Fig. 7A](#), [Fig. 7B](#) und [Fig. 7C](#) eine Zeitsequenz, während der eine Probe in die Vorrichtung aus [Fig. 7](#) eingelassen wird; und

[0033] [Fig. 8](#) eine schematische Zeichnung einer Vorrichtung, die mehrere Meßflächen und einen Umgehungskanal umfaßt.

[0034] Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Initiierung einer Messung in einer fluidischen Vorrichtung zur Analyse von Vollblut. Die Vorrichtung ist im Wesentlichen von einer Art, daß sie zusammen mit einem geeigneten Meßgerät einen physikalischen Blutparameter oder einen Bestandteil des Bluts mit einer Analytkonzentration in dem Blut oder mit einer Eigenschaft des Bluts in Bezug bringt. Optische Parameter bilden die Basis für die Messung. Das Verfahren kann an eine Vielzahl von Vorrichtungsentwürfen angepaßt werden, einschließlich Vorrichtungen, die ein kapillares Füllen einschließen; wir stellen jedoch Details für eine besonders geeignete Vorrichtung bereit, welche eine Probenaufbringungsfläche, eine Blase, die eine Saugkraft erzeugt, um die Blutprobe in die Vorrichtung zu ziehen, eine Meßfläche, in welcher die Probe eine Veränderung in einem optischen Parameter erfahren kann, wie Lichtstreuung, und einen Stopknotenpunkt, um den Fluß genau nach dem Auffüllen der Meßfläche zu stoppen, umfassen. (Die Anpassung des vorliegenden Verfahrens an andere Vorrichtungen oder für andere Messungen schließt nur Routineexperimente ein.)

[0035] Vorzugsweise ist die Vorrichtung über der Meßfläche im Wesentlichen transparent, so daß die Fläche durch eine Lichtquelle an einer Seite beleuchtet werden und das übertragene Licht an der entgegengesetzten Seite gemessen werden kann. Die Messung an der Probe kann an einem Parameter stattfinden, der sich nicht ändert, aber typischerweise erfährt die Probe in der Meßfläche eine Veränderung

und die Veränderung in übertragenem Licht ist ein Maß für den untersuchten Analyten oder die untersuchte fluide Eigenschaft. Alternativ kann Licht, das von einer flüssigen Probe gestreut wird, oder Licht, das die Probe passiert und ein zweites Mal durch sie zurückreflektiert wird (durch einen Reflektor am entgegengesetzten Ende), von einem Detektor an der gleichen Seite wie die Lichtquelle detektiert werden.

[0036] Diese Art von Vorrichtung ist für eine Vielzahl von analytischen Tests an Blut geeignet, wie der Bestimmung von biochemischen oder hämatologischen Eigenschaften oder der Messung der Konzentration von Proteinen, Hormonen, Kohlenhydraten, Lipiden, Drogen, Toxinen, Gasen, Elektrolyten usw. Die Verfahren für die Durchführung dieser Tests wurden in der Literatur beschrieben. Unter den Tests, und wo sie beschrieben werden, sind die folgenden:

- (1) Chromogener Faktor XIIa Assay (und auch andere Gerinnungsfaktoren): Rand, M. D. et al., Blood, 88, 3432 (1996).
- (2) Faktor X Assay: Bick, R. L. Disorders of Thrombosis and Hemostasis: Clinical and Laboratory Practice. Chicago, ASCP Press, 1992.
- (3) DRVVT (Dilute Russells Viper Venom Test): Exner, T. et al., Blood Coag. Fibrinol., 1, 259 (1990).
- (4) Nephelometrischer und turbidimetrischer Immunnassays für Proteine: Whicher, J. T., CRC Crit. Rev. Clin Lab Sci. 18: 213 (1983).
- (5) TPA-Assay: Mann, K. G., et al., Blood, 76, 755, (1990); und Hartshorn, J. N. et al., Blood, 78, 833 (1991).
- (6) APTT (Activated Partial Thromboplastin Time Assay): Proctor, R. R. und Rapaport, S. I. Amer. J. Clin. Path., 36, 212 (1961); Brandt, J. T. und Triplett, D. A. Amer. J. Clin. Path., 76, 530 (1981); und Kelsey, P. R. Thromb. Haemost. 52, 172 (1984).
- (7) HbA1c Assay (Glykosyliertes Hämoglobin Assay): Nicol, D. J. et al., Clin. Chem. 29, 1694 (1983).
- (8) Gesamthämoglobin: Schneck et al., Clinical Chem., 32/33, 526 (1986); und Patent U.S. 4,088,448.
- (9) Faktor Xa: Vinazzer, H., Proc. Symp. Dtsch. Ges. Klin. Chem., 203 (1977), ed. By Witt, I.
- (10) Kolorimetrisches Assay für Stickoxid: Schmidt, H. H., et al., Biochemica, 2, 22 (1995).

[0037] Das Verfahren ist besonders gut geeignet für die Verwendung in einer Vorrichtung zur Messung der Blutgerinnungszeit – "Prothrombin-Zeit" oder "PT-Zeit"- und Details bezüglich einer derartigen Vorrichtung folgen unten. Die notwendigen Modifikationen zur Anpassung des Verfahrens und der Vorrichtung für Anwendungen wie die oben aufgeführten erfordern nur routinemäßige Experimente.

[0038] [Fig. 1](#) zeigt eine Draufsicht einer Vorrichtung **10**, die für die Verwendung in der vorliegenden Erfindung geeignet ist. [Fig. 2](#) ist eine Explosionsdarstellung und [Fig. 3](#) eine perspektivische Ansicht der Vor-

richtung. Die Probe wird in die Probenöffnung **12** eingeführt, nachdem die Blase **14** komprimiert wurde. Offensichtlich muß das Gebiet der Schicht **26** und/oder der Schicht **28**, welche dem Ausschnitt für die Blase **14** benachbart ist, elastisch sein, um der Blase **14** zu ermöglichen, komprimierbar zu sein. Polyester mit einer Dicke von etwa 0,1 nm haben eine geeignete Elastizität und Sprungkraft. Vorzugsweise hat die obere Schicht **26** eine Dicke von etwa 0,125 mm, und die untere Schicht **28** von etwa 0,100 mm. Wenn die Blase freigegeben wird, zieht ein Sog die Probe durch den Kanal **16** zu der Meßfläche **18**, welche vorzugsweise ein Reagenz **20** enthält. Um sicherzustellen, daß die Meßfläche **18** mit Probe gefüllt werden kann, ist das Volumen der Blase **14** vorzugsweise mindestens gleich den vereinigten Volumina des Kanals **16** und der Meßfläche **18**. Soll die Meßfläche **18** von unten beleuchtet werden, muß die Schicht **28**, wo sie an die Meßfläche **18** angrenzt, transparent sein. Für einen PT-Test enthält Reagenz **20** Thromboplastin, welches frei von gerinnungsfördernden Reagenzien ist, die normalerweise in lyophilisierten Reagenzien gefunden werden.

[0039] Wie in den [Fig. 1](#), [Fig. 2](#) und [Fig. 3](#) gezeigt, grenzt der Stopknotenpunkt **22** an die Blase **14** und an die Meßfläche **18** an; es kann sich jedoch auf einer oder auf beiden Seiten des Stopknotenpunktes **22** eine Fortsetzung des Kanals **16** befinden, welche den Stopknotenpunkt von der Meßfläche **18** und/oder der Blase **14** trennt. Wenn die Probe den Stopknotenpunkt **22** erreicht, stoppt der Probenfluß. Für PT-Messungen ist es wichtig, den Probenfluß beim Erreichen dieses Punktes zu stoppen, um eine reproduzierbare Rouleaux-Bildung zu ermöglichen, was einen wichtigen Schritt bei der Beobachtung der Blutgerinnung unter Verwendung des hier beschriebenen Verfahrens darstellt. Es ist zu beachten, daß die Rouleaux-Bildung reversibel ist und die früher in der Probenöffnung gebildeten Rouleaux beseitigt werden, wenn das Blut durch Kanal **16** strömt. Das Prinzip der Arbeitsweise des Stopknotenpunktes wird im U.S. Patent 5 230 866 beschrieben, welches hiermit durch Nennung eingeschlossen ist.

[0040] Wie in [Fig. 2](#) gezeigt, werden alle oben genannten Elemente durch Ausschnitte in der Zwischenschicht **24** geformt, welche zwischen der oberen Schicht **26** und der unteren Schicht **28** angeordnet ist. Vorzugsweise ist Schicht **24** ein doppelseitiges Klebeband. Der Stopknotenpunkt **22** wird durch einen zusätzlichen Ausschnitt in Schicht **26** und/oder **28** gebildet, ist in einer Linie mit dem Ausschnitt von Schicht **24** angeordnet und mit einer Dichtungsschicht **30** und/oder **32** abgedichtet. Vorzugsweise umfaßt der Stopknotenpunkt, wie gezeigt, Ausschnitte in beiden Schichten **26** und **28** mit Dichtungsschichten **30** und **32**. Jeder Ausschnitt für den Stopknotenpunkt **22** ist mindestens so breit wie Kanal **16**. Ebenfalls in [Fig. 2](#) gezeigt, ist ein optionaler Filter

12A, der die Probenöffnung **12** bedeckt. Der Filter kann rote Blutkörperchen aus der Vollblutprobe abtrennen und/oder kann ein Reagenz enthalten, welches mit dem Blut wechselwirkt, um zusätzliche Informationen zu liefern. Aus Gründen, die im Folgenden deutlich werden, müssen rote Blutkörperchen von "unten" sichtbar sein, so daß die Membran transparent sein muss, wenn sie rote Blutkörperchen ausfiltert. Ein optionaler Reflektor **18A** kann sich auf einer Oberfläche der Schicht **26** befinden oder an sie angrenzen, und über der Meßfläche **18** positioniert sein. Ist der Reflektor anwesend, wird die Vorrichtung eine transflektierende Vorrichtung.

[0041] Das Verfahren unter Verwendung der Streifen aus den [Fig. 1](#), [Fig. 2](#) und [Fig. 3](#) kann in Bezug auf eine schematische Zeichnung der Elemente eines in [Fig. 4](#) gezeigten Meßgeräts verstanden werden. Der erste vom Verwender ausgeführte Schritt ist das Einschalten des Meßgeräts, wodurch der Streifendetektor **40**, der Probendetektor **42**, das Meßsystem **44** und das optionale Heizgerät **46** mit Energie versorgt werden. Der zweite Schritt ist die Einführung des Streifens. Vorzugsweise ist der Streifen über mindestens einem Teil seiner Fläche nicht transparent, so daß ein eingeführter Streifen die Beleuchtung des Detektors **40b** durch die LED **40a** blockiert. (Mehr bevorzugt wird die Zwischenschicht aus einem undurchlässigen Material geformt, so daß Hintergrundlicht nicht in das Meßsystem **44** eindringt.) Der Detektor **40b** erfaßt dadurch, daß ein Streifen eingeführt wurde und aktiviert die Blase **48**, um die Blase **14** zu komprimieren. Ein Meßgerätedisplay **50** veranlaßt den Anwender dann, die Probe in die Probenöffnung **12** einzuführen; und dies ist der dritte und letzte Schritt, den der Anwender in der Meßsequenz ausführen muß.

[0042] Es ist für ein korrektes Arbeiten der Vorrichtung wichtig, daß eine "geeignete" Probe (d.h., Vollblut) aufgebracht wurde. So darf das Meßgerät keine Messung melden, wenn etwas anderes als Vollblut eine Veränderung beim vom Detektor **42b** detektierten Licht verursacht. Solch eine Veränderung könnte daher kommen, daß der Streifen entfernt wurde, etwas (z.B. ein Finger) in die Nähe der Probenöffnung gebracht wurde, oder sogar, wenn Blutserum in die Probenöffnung eingeführt wird. Jedes dieser Ereignisse könnte ein fehlerhaftes Ergebnis verursachen. Um diese Art von Fehler zu vermeiden, kann die Probenöffnung **12** mit **42a** erleuchtet werden und diffus reflektiertes (d.h. "gestreutes") Licht wird mit dem Detektor **42b**, der senkrecht zur Ebene des Streifens **10** angebracht ist, gemessen. Wenn eine Vollblutprobe in die Probenöffnung **12** eingeführt wurde, nimmt das von **42b** detektierte Signal, aufgrund von Streuung in der Blutprobe, schlagartig zu und nimmt dann ab, da die roten Zellen sich wie Geldstücke zu stapeln beginnen (Rouleaux-Bildung). Diese Alternative wird nur als erklärender Hintergrund gegeben und ist kein

Bestandteil der Erfindung.

[0043] [Fig. 5](#) stellt diese schlagartige Zunahme an gestreuter Lichtintensität (I) gefolgt von einer Abnahme als Funktion der Zeit (t) dar, was eine Blutprobe kennzeichnet – Kurve A. Ebenfalls gezeigt – Kurve B – ist eine unterschiedliche Kurve, die eine Probe kennzeichnet, die nicht Vollblut ist.

[0044] In der Erfindung, gezeigt in [Fig. 4A](#), wird anstelle von gestreutem Licht, übertragenes Licht gemessen. Das Phänomen der Rouleaux-Bildung verursacht beim detektierten Signal eine schlagartige Abnahme und dann eine Zunahme (d.h. das Gegenstück zu Kurve A.)

[0045] Das Detektorsystem **42** ist programmiert, zunächst die Art von Signal zu benötigen, die in [Fig. 5](#) für Vollblut gezeigt ist (Kurve A oder ihr Gegenstück, je nach Fall), und dann den Aktuator **48** zu veranlassen, die Blase **14** freizugeben, um die Probe in den Kanal **16** einzulassen. Dies erfordert, selbstverständlich, eine Verzögerung (vorzugsweise von mindestens fünf Sekunden) im Vergleich zu einem einfachen Zulassen der Probe, ohne zunächst zu bestimmen, ob es sich um Vollblut handelt. Die Verzögerung bei der Freigabe der Blase **14** beeinträchtigt jedoch die unten beschriebenen Anzeigen nicht wesentlich. Die Freigabe der Blase **14** verursacht in Kanal **16** einen Sog, welcher die Probe durch die Meßfläche **18** zum Stopknotenpunkt **22** zieht. Licht von LED **44a** passiert die Meßfläche **18**, und Detektor **44b** beobachtet das Licht, das durch die Probe bei der Gerinnung übertragen wird. Gibt es mehrere Meßflächen, umfaßt das Meßsystem **44** ein LED/Detektor-Paar (wie **44a** und **44b**) für jede Meßfläche. Die Analyse des übertragenen Lichts als Funktion der Zeit (wie unten beschreiben) ermöglicht eine Berechnung der PT-Zeit, welche auf dem Meßgerätdisplay **50** angezeigt wird. Vorzugsweise wird die Proben temperatur durch ein Heizgerät **46** auf etwa 37°C gehalten.

[0046] [Fig. 6](#) stellt eine typische "Gerinnungssignatur"-Kurve da, in welcher der Strom von Detektor **44b** als Funktion der Zeit aufgetragen wird. Blut wird zuerst in der Meßfläche von **44b** zur Zeit 1 detektiert. Im Zeitintervall A, zwischen den Punkten 1 und 2, füllt das Blut die Meßfläche. Die Verminderung beim Strom während dieses Zeitintervalls beruht auf von roten Blutkörperchen gestreutem Licht und ist so ein ungefähres Maß des Hämatokritwerts. Am Punkt 2 hat die Probe die Meßfläche gefüllt und ruht, da ihre Bewegung vom Stopknotenpunkt gestoppt wurde. Die Rouleaux-Bildung ermöglicht dann eine erhöhte Lichtübertragung durch die Probe (und weniger Streuung) im Zeitintervall zwischen den Punkten 2 und 3. Am Punkt 3 beendet die Blutgerinnung die Rouleaux-Bildung und die Übertragung durch die Probe erreicht ein Maximum. Die PT-Zeit kann aus dem Intervall B zwischen den Punkten 1 und 3 oder

zwischen 2 und 3 berechnet werden. Danach geht Blut von einem flüssigen Zustand in ein halbfestes Gel über, mit einer korrespondierenden Verminderung der Lichtübertragung. Die Verminderung im Strom C zwischen dem Maximum 3 und dem Endpunkt 4 korreliert mit dem Fibrinogen in der Probe.

[0047] Die in [Fig. 2](#) dargestellte und oben beschriebene Vorrichtung wird vorzugsweise gebildet, indem thermoplastische Folien **26** und **28** an eine thermoplastische Zwischenschicht **24** laminiert werden, welche auf beiden Oberflächen einen Klebstoff aufweist. Die Ausschnitte, welche die in [Fig. 1](#) gezeigten Elemente bilden, können, zum Beispiel, durch Laserschneiden oder Ausstanzen aus den Schichten **24**, **26** und **28** geformt werden. Alternativ kann die Vorrichtung aus geformtem Kunststoff gebildet werden. Vorzugsweise ist die Oberfläche von Folie **28** hydrophil. (Film 9962, erhältlich von 3M, St. Paul, MN.) Die Oberflächen müssen jedoch nicht hydrophil sein, da die Probenflüssigkeit die Vorrichtung ohne Kapillarkräfte füllt. So können die Folien **26** und **28** unbehandelte Polyester oder andere thermoplastische Folien sein, die auf diesem Fachgebiet wohlbekannt sind. Gleichfalls kann die Vorrichtung, da Schwerkraft beim Füllen nicht beteiligt ist, in jeder Orientierung verwendet werden. Anders als Vorrichtungen mit Kapillarfüllung, welche Belüftungslöcher haben, durch die Probe austreten könnte, wird die Vorrichtung durch die Probenöffnung belüftet, bevor die Probe aufgebracht wird, was bedeutet, daß der Teil des Streifens, der zuerst in das Meßgerät eingeführt wird, ohne eine Öffnung ist, was das Risiko einer Kontamination vermindert.

[0048] [Fig. 7](#) zeigt eine Draufsicht einer anderen Ausführungsform der Vorrichtung, die für eine Verwendung mit dem Verfahren der vorliegenden Erfindung geeignet ist, in welcher die Vorrichtung einen Umgehungskanal **52** umfaßt, der Kanal **16** mit der Blase **14** verbindet. Die Funktions- und Arbeitsweise des Umgehungskanals kann mit Bezug auf die [Fig. 7A](#), [Fig. 7B](#) und [Fig. 7C](#) verstanden werden, welche eine Zeitsequenz darstellen, während der eine Probe zur Messung in die Vorrichtung **10** gezogen wird.

[0049] [Fig. 7A](#) stellt die Situation dar, nachdem der Anwender eine Probe auf den Streifen aufgebracht hat, während die Blase **14** komprimiert war. Dies kann durch Aufbringen von einem oder mehreren Tropfen Blut erreicht werden. Die Probe verbleibt dort, während das Meßgerät bestimmt, ob die Probe Vollblut enthält. Ist das der Fall, wird die Blase entspannt.

[0050] [Fig. 7B](#) stellt die Situation dar, nachdem die Blase entspannt wurde. Der resultierende verminderte Druck im Einlaßkanal **16** zieht die Probe anfangs in die Meßfläche **18**. Wenn die Probe den Stopkno-

tenpunkt **22** erreicht, trifft die Probe auf einen Rückdruck, welcher veranlaßt, daß die Probe stoppt und eine zusätzliche Probe in den Umgehungskanal gezogen wird.

[0051] **Fig. 7C** stellt die Situation dar, wenn abgelesen wird. Die Probe ist in der Meßfläche **18** zur Ruhe gekommen. Die Probe füllt auch etwas oder (wie gezeigt) den gesamten Kanal **16**.

[0052] **Fig. 8** stellt eine bevorzugte Ausführungsform einer Vorrichtung dar, die für die Verwendung mit dem Verfahren geeignet ist. Es handelt sich um eine Multikanalvorrichtung, die einen Umgehungskanal **152** einschließt. Der Umgehungskanal **152** dient in dieser Vorrichtung einem Zweck, der analog zu dem ist, dem der Umgehungskanal **52** in der Vorrichtung aus **Fig. 7** dient, die weiter oben beschrieben wurde. Meßfläche **118** enthält Thromboplastin. Vorzugsweise enthalten die Meßflächen **218** und **318** Kontrollen, mehr bevorzugt die unten beschriebenen Kontrollen. Fläche **218** enthält Thromboplastin, bovines Eluat („bovine eluate“) und rekombinanten Faktor VIIa. Die Zusammensetzung ist ausgewählt, um die Gerinnungszeit einer Blutprobe zu normalisieren, indem der Wirkung eines gerinnungshemmenden Mittels wie Warfarin entgegengewirkt wird. Meßfläche **318** enthält Thromboplastin und bovines Eluat allein, um die Wirkung eines gerinnungshemmenden Mittels teilweise zu überwinden. So werden auf einem Streifen drei Messungen durchgeführt. Die PT-Zeit der Probe, die Messung, die vom größten Interesse ist, wird in der Fläche **118** gemessen. Die Messung wird jedoch nur bestätigt, wenn Messungen in den Flächen **218** und **318** Ergebnisse innerhalb eines vorbestimmten Bereichs ergeben. Befindet sich eine oder beide Kontrollmessungen außerhalb dieses Bereichs, wird ein Wiederholungstest angezeigt. Der ausgedehnte Stopknotenpunkt **122** stoppt den Fluss in allen drei Meßflächen.

[0053] Die folgenden Beispiele zeigen Vorrichtungen, die für die Verwendung beim erfindungsgemäßen Verfahren geeignet sind, sollen aber in keinerlei Weise einschränken.

Beispiel 1

[0054] Ein für die Verwendung beim erfindungsgemäßen Verfahren geeigneter Streifen wird hergestellt, indem zunächst ein doppelseitiges Klebeband (RX 675SLT, erhältlich von Scapa Tapes, Windsor, CT) zwischen zwei Trägermaterialien in einem Laminier- und Rotationsstanz-Konvertierungssystem angeordnet wird. Das in **Fig. 7** gezeigte Muster, mit Ausnahme des Stopknotenpunkts, wird durch das obere Trägermaterial und das Klebeband, aber nicht durch das untere Trägermaterial geschnitten, welches dann als Abfall zusammen mit den Ausschnitten vom Band entfernt wird. Ein Polyesterfilm, der behan-

delt wurde, um hydrophil zu sein, (3M9962, erhältlich von 3M, St. Paul, MN) wird auf die exponierte untere Seite des Klebebands laminiert. Dann wird Reagenz (Thromboplastin, erhältlich von Ortho Clinical Diagnostics, Raritan, NJ) auf die Reagenzfläche (**18**) des Polyesterfilms mittels Dampfblasenstrahlens, unter Verwendung von Druckköpfen 51612A, von Hewlett Packard, Corvallis, OR, aufgedruckt. Eine Probenöffnung wird dann in unbehandeltem Polyesterfilm (AR1235, erhältlich von Adhesives Research, Glen Rock, PA) geschnitten und dann, zur Deckung gebracht, oben auf das doppelseitige Klebeband laminiert (nach Entfernen des Trägermaterials). Eine Stanze schneidet dann den Stopknotenpunkt durch die drei Schichten des "Sandwichs". Schließlich werden Streifen aus einseitigem Klebeband (MSX4841, erhältlich von 3M, St. Paul, MN) auf der Außenseite der Polyesterschichten angebracht, um die Stopknotenpunkte abzudichten.

Beispiel 2

[0055] Ein gleichartiges Verfahren, wie das in Beispiel 1 beschriebene, wird durchgeführt, um einen Streifen von der in **Fig. 8** gezeigten Art herzustellen. Die Reagenzien, die auf die Flächen **118P**, **218P** und **318P** dampfblasengestrahlt werden, sind jeweils Thromboplastin; Thromboplastin, bovines Eluat und rekombinanter Faktor VIIa; und Thromboplastin und bovines Eluat allein. Das bovine Eluat (bovines Plasma-Bariumcitrat-Eluat) ist erhältlich von Haematologic Technologies, Burlington, VT; und der rekombinante Faktor VIIa von American Diagnostica, Greenwich, Ct.

[0056] Messungen, die an Vollblutproben unter Verwendung des Streifens aus diesem Beispiel gemacht wurden, ergaben eine Kurve von der in **Fig. 6** gezeigten Art für jede der Meßflächen. Die Daten aus den Kurven für die Kontrollen (Meßflächen **218P** und **318P**) werden zur Qualifizierung der Daten aus der Kurve für die Meßfläche **118P** verwendet. Als Ergebnis kann die PT-Zeit verlässlicher bestimmt werden, als dies mit einem Streifen gemacht werden kann, der nur eine einzige Meßfläche hat.

Patentansprüche

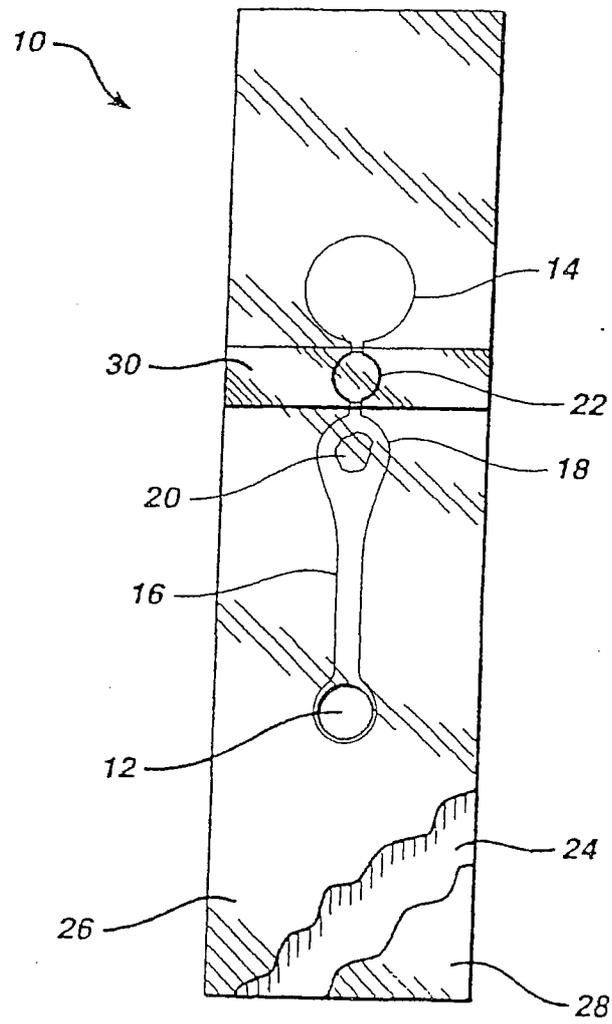
1. Verfahren zum Initiieren einer Messung einer Analytkonzentration oder einer physikalischen Eigenschaft einer Blutprobe, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfaßt:
 - (a) Zur Verfügung stellen eines Meßgerätes, welches die Analytkonzentration oder die physikalische Eigenschaft einer Blutprobe auf einer fluidischen Diagnostiziervorrichtung (**10**) mißt,
 - (b) Einführen des Meßgerätes in die Vorrichtung (**10**), wobei die Vorrichtung (**10**) die folgenden Merkmale umfaßt:
 - (i) eine Probenöffnung (**12**) zum Einführen einer Pro-

be des Blutes in die Vorrichtung (**10**),
(ii) eine Meßfläche (**18**), auf welcher die Analytkonzentration oder die physikalische Eigenschaft gemessen wird;
(iii) einen Kanal (**16**) mit einem ersten Ende und einem zweiten Ende, um einen fluidischen Pfad von der Probe am ersten Ende zur Meßfläche zur Verfügung zu stellen;
(c) Zuführen der Blutprobe zur Probenöffnung (**12**); wobei das Verfahren durch die folgenden Schritte gekennzeichnet ist:
(d) Beleuchten der Probenöffnung (**12**) und Beobachten des Lichts über eine vorbestimmte Zeitspanne; und
(e) Messen der Analytkonzentration oder der physikalischen Eigenschaft;
wobei die Probenöffnung (**12**) transparent ist und das über eine vorbestimmte Zeitspanne durch die Probe übertragene Licht beobachtet wird und die Messung im Schritt (e) nur vorgenommen wird, wenn während der vorbestimmten Zeitspanne das Licht zuerst schlagartig abnimmt und dann zunimmt, wobei das Meßgerät die Messung nur durchführt, wenn die Blutprobe Vollblut ist.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die vorbestimmte Zeit wenigstens 5 Sekunden ist.

Es folgen 8 Blatt Zeichnungen

FIG. 1



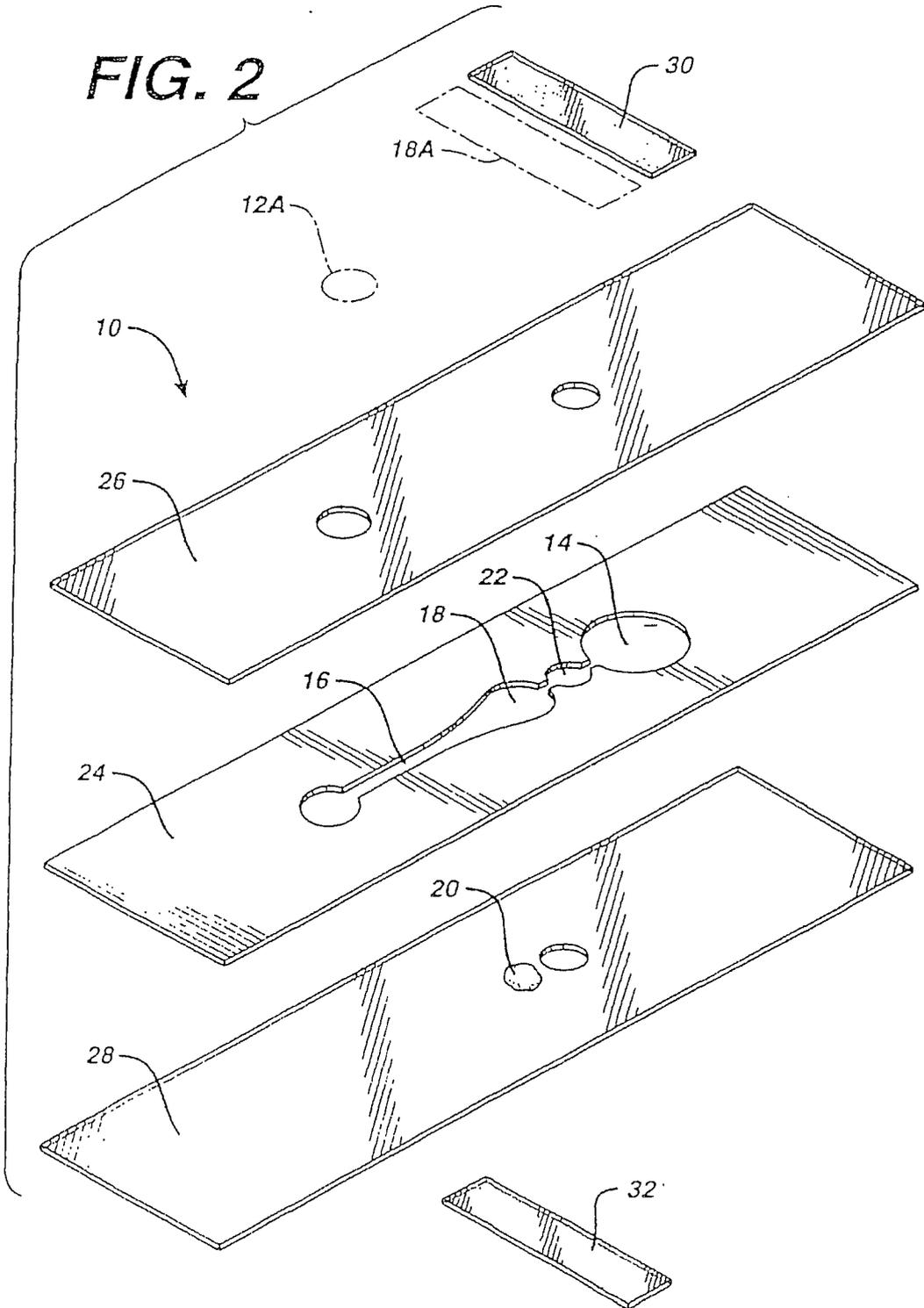


FIG. 3

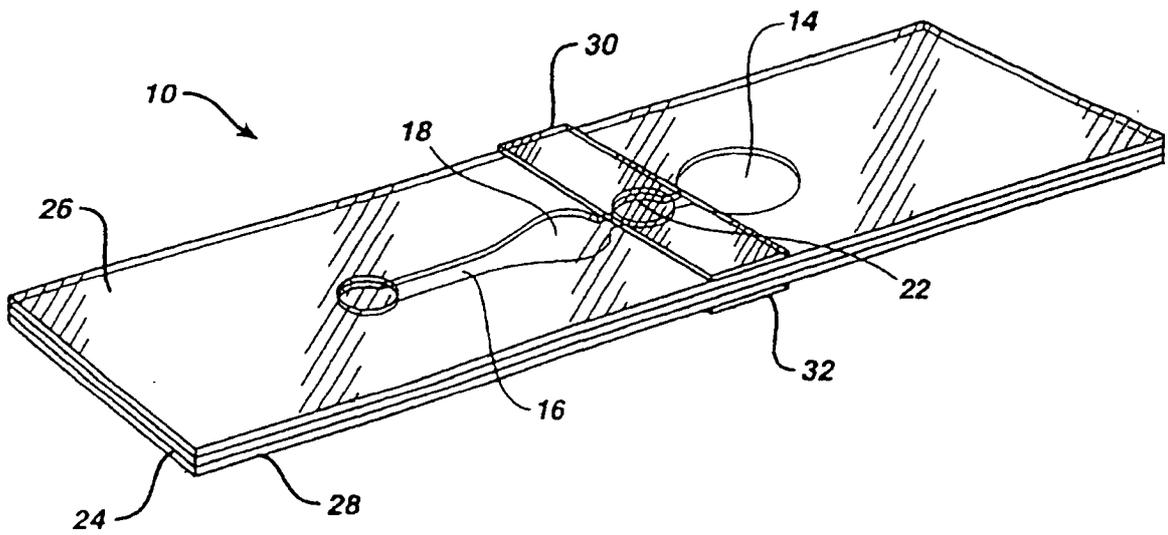


FIG. 5

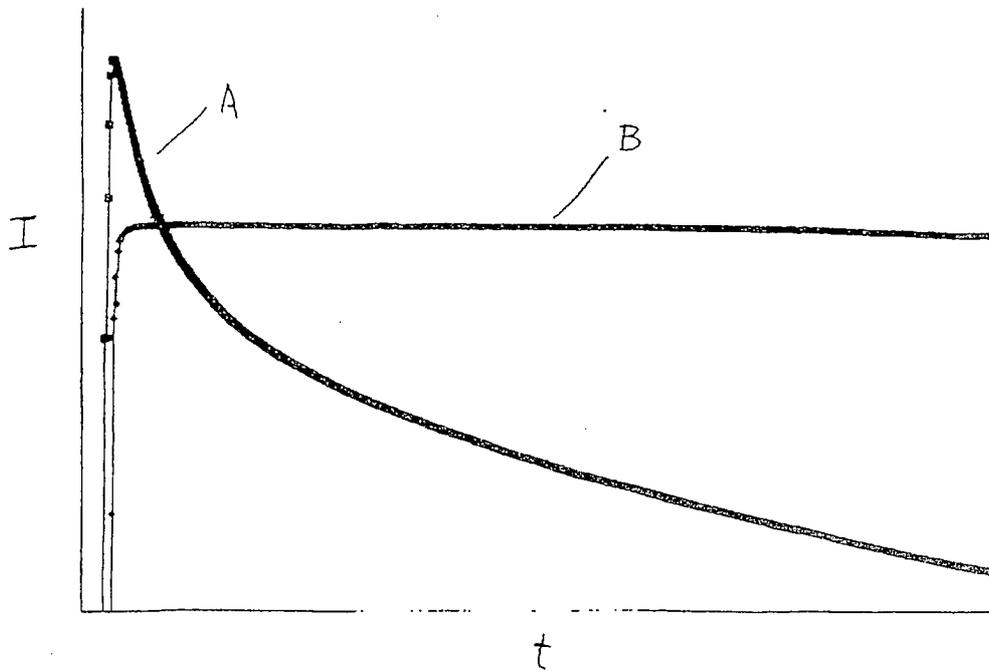


FIG. 6

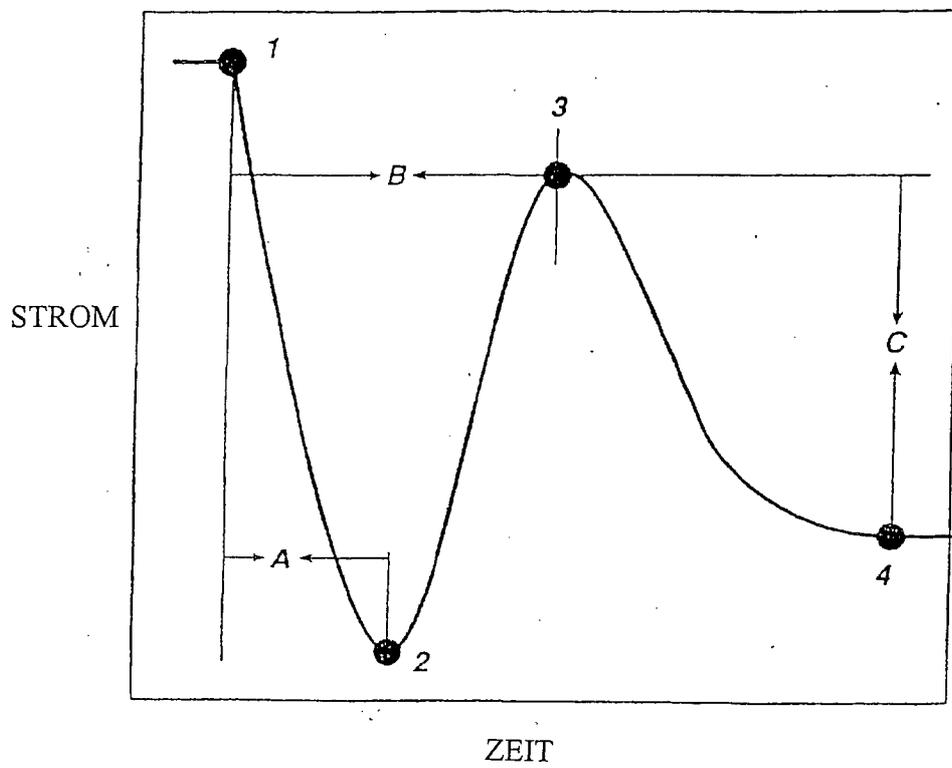


FIG. 7

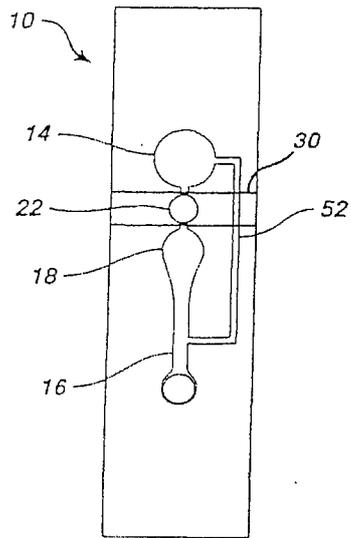


FIG. 7A

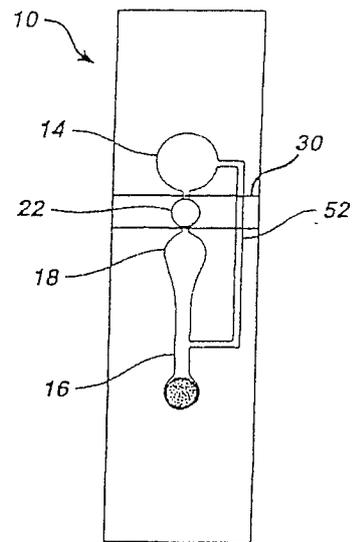


FIG. 7B

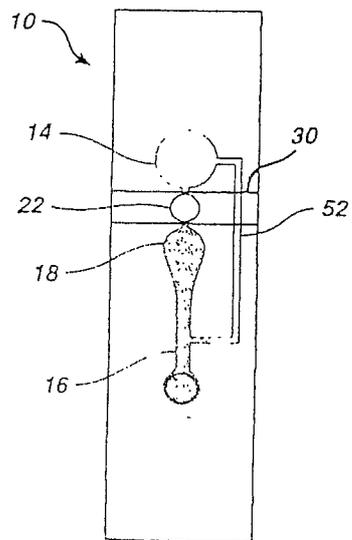


FIG. 7C

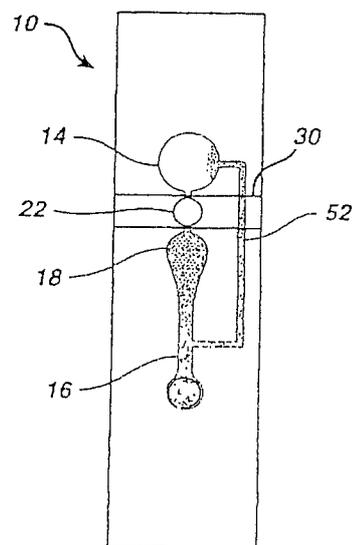


FIG. 8

