DESIGN AND DEVELOPMENT OF NON-INVASIVE MULTI-ANALYZER FOR CLINICAL APPLICATION

AMIT KUMAR SINGH

CENTRE FOR BIOMEDICAL ENGINEERING

INDIAN INSTITUTE OF TECHNOLOGY DELHI

MARCH 2020

DESIGN AND DEVELOPMENT OF NON-INVASIVE MULTI-ANALYZER FOR CLINICAL APPLICATION

by

AMIT KUMAR SINGH

CENTRE FOR BIOMEDICAL ENGINEERING

Submitted
in fulfillment of the requirements of the degree of Doctor of Philosophy
to the

INDIAN INSTITUTE OF TECHNOLOGY DELHI

March 2020

Dedicated to

My Father (Late) Dr. S. K. Singh and family

“Dream is not that which you see while sleeping, it is something that does not let you sleep”

- Dr. A.P.J. Abdul Kalam

CERTIFICATE

This is to certify that the thesis entitled **'Design and development of non-invasive multi-analyzer for clinical application'** being submitted by **Mr. Amit Kumar Singh** to the Indian Institute of Technology Delhi for the award of **Doctor of Philosophy** is a record of bonafide research work carried out by him. **Mr. Amit Kumar Singh** has worked under my guidance and supervision and has fulfilled the requirements for the submission of this thesis, which, to my knowledge has reached the requisite standard.

The results obtained in this thesis are original and have not been submitted, in part or full, to any other University or Institute for the award of any other degree or diploma.

Dr. Sandeep Kumar Jha
Associate Professor
Centre for Biomedical Engineering
Indian Institute of Technology Delhi
Hauz Khas, New Delhi – 110016
India

ACKNOWLEDGMENTS

Successful completion of a well-cherished task in scientific research has its own reward. At the same time, remembering the kind guidance of caring teachers and everlasting encouragement from all the dear ones is an experience of its own kind. Without their continuous guidance and support, the study would not have seen the light of the day. I am incredibly grateful to all those persons and organizations that have kindly extended help in different ways during the course of my study. Acknowledging them for their noble deed is a matter of great pleasure for me.

I want to express my sincere thanks to my doctoral supervisor ***Dr. Sandeep Kumar Jha*** *for his valuable guidance, encouragement, and support at all stages of research as well as writing work. Working under his supervision has indeed been an enriching experience, and I had learned and mastered many techniques in his laboratory under guidance. It was my privilege and matter of pride to be an IIT Delhi student and having Dr. Sandeep Jha as my Ph.D. supervisor.*

I would also like to thank my SRC members, ***Prof. Veena Koul, Prof. Sneh Anand and Dr. Shalini Gupta*** *for their insightful suggestions and comments. I extend my sincere thanks to all faculty members and staff members of the Centre for Biomedical Engineering for their guidance and generous support.*

I am incredibly thankful to the Indian Institute of Technology Delhi for providing all the facilities and assistantship to carry out my research work. I am also thankful to the Department of Biotechnology (DBT) for providing me research assistantship to carry out my research work.

I am also thankful to the pathology lab staff of the Indian Institute of Technology Delhi Hospital, who helped me carry out clinical studies. I would also like to express my sincere gratitude to all the volunteers who participated in this study.

It is my immense pleasure to thank all my colleagues at CBME and all my lab members Appan Roychoudhury, Ms. Anuradha Soni, Tanu Bhardwaj, Rishi Raj, Marieshwaran, & Avinash Kaur for their help, moral support and friendly atmosphere throughout the research work.

I would also like to owe my deep sense of gratitude towards my late father and for my family for their tremendous moral support, constant encouragement, blessings, love and excellent guidance which always lighten up my task and my life.

Above all, I thank the master of ceremonies, the powerful Almighty God who gave me the confidence, power, blessings, skill, energy, and courage to accomplish this work.

Amit Kumar Singh

ABSTRACT

Advances in point of care technology have led to the development of handheld, low cost, and reusable biosensors for easy, fast, and daily monitoring of multiple analytes in different diseases like diabetes and chronic kidney disease. The reusable biosensor also helps in reducing per-unit cost of the analyte detection in the lab-based instruments. Most of them are blood-based, which cause pain and discomfort to subjects. In recent years, non-invasive biosensors using other body fluids such as saliva, tears, sweat, urine, etc. have emerged as better alternatives to invasive ones. Still, they suffer from various drawbacks such as weak correlation among body fluids, interferences from surrounding molecules, high cost, inaccuracy, etc. because of which they fail to create an impact in the biosensor market. Multi analyzer measurement of the multiple analytes are costlier and bulky therefore cannot be used in point of care technology. Hence, development of a pain-free, affordable, easy to operate, and reliable non-invasive multi-analyzer holds excellent commercial potential as well as can gain massive popularity among ordinary people, especially in developing countries.

In this regard, the present doctoral work consisting of six chapters aims to develop a handheld, non-invasive multi-analyzer using a simple strategy involving the critical techniques of immobilization and miniaturization. Most of the work presented in this thesis deals with reusable glucose biosensor, noninvasive glucose biosensor development using saliva sample and a handheld multi-analyzer instrument development on a strip based format and finally, the developed system has been tested for detection of other analytes such as urea and pH in saliva.

The first chapter of the thesis is devoted to the extensive literature survey technologies for the multi-analyzer instrument in existing, and upcoming technologies for invasive and non-invasive samples is also discussed. The reusability of the glucose biosensor is also discussed in this chapter, and the last chapter discusses the work summary along with the future outcomes of the research work.

The second chapter shows the development of reusable glucose biosensor using low-cost eggshell membrane in biological samples using the dissolved oxygen probe and LabVIEW. The proposed sensor was also demonstrated for the estimation of glucose in human blood samples.

The third chapter demonstrated the design and development of hand-held optical transmission based instrument and low-cost strip design and fabrication method for the development of the

glucose biosensor strips. The standard operating procedure for the measurement procedure for real samples was also simplified as per point of care technology. Interference study and clinical validation are also shown for this biosensor, and good correlation was found for diabetic and non-diabetic patients saliva glucose level to blood glucose level.

The fourth chapter deals with the improvement of instrument design to accommodate the multi-analyzer feature along with providing ambient temperature compensation for the enzymatic reactions. The strip design and manufacturing technology were also improved for decreasing the manufacturing time of the strips. Shelf life improvement in the biosensor strip and the ambient temperature compensation is also provided in the developed biosensor. The clinical results are also verified for diabetic and non-diabetic patients for fasting and non-fasting conditions and found good correlations for diabetic patients among the results.

The fifth chapter explores the feasibility of the developed system for testing other analytes such as urea and pH of saliva using the same strategy but with a low-cost strip having different enzyme (urease) dye combination and pH dye for pH detection. The successful implementation of the proposed system for urea and pH shows that our methodology for detecting multiple analytes via developed hand-held instrument is feasible and can be used as multi-analyzer detection in a non-invasive manner in future, thus replacing many lab-based traditional methods for multiple analyte detection.

सार

पिऔसीटी में अग्रिमों ने मधुमेह और सीकेडी जैसे विभिन्न रोगों में कई विश्लेषणों के लिए आसान, तेज, और दैनिक निगरानी के लिए हाथ में, कम लागत और पुन: प्रयोज्य बायोसेंसर के विकास का नेतृत्व किया है। पुन: प्रयोज्य बायोसेंसर प्रयोगशाला आधारित उपकरणों में विश्लेषण का पता लगाने की प्रति इकाई लागत को कम करने में भी मदद करता है। उनमें से ज्यादातर रक्त आधारित हैं, जो विषयों के लिए दर्द और परेशानी का कारण बनते हैं। हाल के वर्षों में, शरीर के अन्य तरल पदार्थ जैसे लार, आँसू, पसीना, मूत्र, आदि का उपयोग करने वाले गैर-इनवेसिव बायोसेंसर लोगों के लिए बेहतर विकल्प बनकर उभरे हैं। फिर भी, वे विभिन्न कमियों से ग्रस्त हैं जैसे कि शरीर के तरल पदार्थ के बीच कमजोर संबंध, आसपास के अणुओं से हस्तक्षेप, उच्च लागत, अशुद्धि, आदि जिसके कारण वे बायोसेंसर बाजार में प्रभाव पैदा करने में विफल रहते हैं। मल्टीपल एनालाइजर का कई एनालिटिक्स का माप महंगा और भारी होता है, इसलिए पिऔसीटी में इस्तेमाल नहीं किया जा सकता। इसलिए, एक दर्द मुक्त, सस्ती, संचालित करने में आसान और विश्वसनीय मल्टी-एनालाइज़र का विकास उत्कृष्ट व्यावसायिक क्षमता के साथ-साथ आम लोगों के बीच, विशेष रूप से विकासशील देशों में व्यापक लोकप्रियता हासिल कर सकता है।

इस संबंध में, छह अध्यायों से युक्त वर्तमान डॉक्टोरल कार्य का लक्ष्य है कि एक सरल रणनीति का उपयोग करते हुए स्थिरीकरण और लघुकरण की महत्वपूर्ण तकनीकों का उपयोग करके एक हैंडहेल्ड, गैर-इनवेसिव मल्टी-एनालाइज़र विकसित करना। इस थीसिस में प्रस्तुत अधिकांश कार्य पुन: प्रयोज्य ग्लूकोज बायोसेंसर, लार के नमूने का उपयोग करते हुए बिनाइनवेसिव ग्लूकोज बायोसेंसर विकास और एक स्ट्रिप आधारित प्रारूप पर हैंडहेल्ड मल्टी-एनालाइजर इंस्ट्रूमेंट डेवलपमेंट से संबंधित है और अंत में, विकसित प्रणाली का परीक्षण अन्य विश्लेषणों जैसे कि लार में यूरिया और पीएच का पता लगाने के लिए किया गया है।

थीसिस का पहला अध्याय मौजूदा मल्टी-एनालाइज़र इंस्ट्रूमेंट के लिए व्यापक साहित्य सर्वेक्षण प्रौद्योगिकियों के लिए समर्पित है, और इनवेसिव और गैर-इनवेसिव नमूनों के लिए आगामी तकनीकों पर भी चर्चा की गई है। इस अध्याय में ग्लूकोज बायोसेंसर की पुन: प्रयोज्यता पर भी चर्चा की गई है, और अंतिम अध्याय शोध कार्य के भविष्य के परिणामों के साथ-साथ कार्य सारांश पर भी चर्चा करता है।

दूसरा अध्याय डीओ प्रोब लैबव्यू का उपयोग करके जैविक नमूनों में कम लागत वाले अंडकोष झिल्ली का उपयोग करके पुन: प्रयोज्य ग्लूकोज बायोसेंसर के विकास को दर्शाता है। मानव रक्त नमूनों में ग्लूकोज के अनुमान के लिए प्रस्तावित सेंसर का भी प्रदर्शन किया गया था।

तीसरे अध्याय ने ग्लूकोज बायोसेंसर स्ट्रिप्स के विकास के लिए हाथ से संचालित ऑप्टिकल ट्रांसमिशन आधारित इंस्ट्रूमेंट और लो-कॉस्ट स्ट्रिप डिज़ाइन और फैब्रिकेशन विधि के विकास और डिजाइन का प्रदर्शन किया गया है। पिऔसीटी के अनुसार वास्तविक नमूनों की माप प्रक्रिया के लिए ऐसऔपि को भी सरल बनाया गया था। इस बायोसेंसर के लिए हस्तक्षेप अध्ययन और नैदानिक सत्यापन भी दिखाया गया है, और मधुमेह और गैर-मधुमेह के रोगियों एसजीएल से बीजीएल के लिए अच्छा सहसंबंध पाया गया।

चौथा अध्याय एंजाइमी प्रतिक्रियाओं के लिए परिवेश तापमान मुआवजा प्रदान करने के साथ-साथ मल्टी-एनालाइज़र सुविधा को समायोजित करने के लिए डिजाइन के सुधार से संबंधित है। स्ट्रिप्स के विनिर्माण समय को कम करने के लिए स्ट्रिप डिज़ाइन और विनिर्माण प्रौद्योगिकी में भी सुधार किया गया है। बायोसेंसर स्ट्रिप में शेल्फ जीवन सुधार और विकसित बायोसेंसर में परिवेश तापमान कंपनसेशन भी प्रदान किया गया है। उपवास और

गैर-उपवास की स्थिति के लिए मधुमेह और गैर-मधुमेह के रोगियों के लिए नैदानिक परिणाम भी सत्यापित किए गए हैं और परिणामों के बीच मधुमेह के रोगियों के लिए अच्छे संबंध पाए गए हैं।

पांचवें अध्याय में समान रणनीति का उपयोग करते हुए यूरिया और लार के पीएच जैसे अन्य विश्लेषणों के परीक्षण के लिए कम लागत वाली पट्टी के साथ विकसित प्रणाली की व्यवहार्यता की खोज की गई है, लेकिन यूरिया का पता लगाने के लिए अलग एंजाइम (यूरेस) तथा डाई संयोजन और पीएच डाई प्रयोग की गई है। यूरिया और पीएच के लिए प्रस्तावित प्रणाली के सफल कार्यान्वयन से पता चलता है कि विकसित हाथ से आयोजित साधन के माध्यम से कई विश्लेषणों का पता लगाने के लिए हमारी कार्यप्रणाली संभव है और भविष्य में गैर- इनवेसिव तरीके से मल्टी-एनालाइजर डिटेक्शन के रूप में इसका उपयोग किया जा सकता है, इस प्रकार कई प्रयोगशालाओं में पारंपरिक तरीके से प्रयुक्त कई विश्लेषणों का पता लगाने के तरीके को बदला जा सकता है।

CONTENTS

List of Figures and Illustrations

List of Tables

List of Abbreviations

2-ME	2-Mercaptoethanol
μ-PAD	Paper-based analytical device
ADC	Analogue-to-digital converter
ASSURED	Affordable, Sensitive, Specific, User-friendly, Rapid and robust, Equipment-free and Deliverable
BGL	Blood glucose level
BiCMOS	Bipolar Complementary Metal-Oxide Semiconductor
BP	Bromocresol Purple
BUN	Blood Urea Nitrogen
BUL	Blood Urea Level
CKD	Chronic Kidney Disease
COMP	Cartilage Oligomeric Matrix Protein
CVD	Cardiovascular disease
DAQ	Data acquisition card
DO	Dissolved oxygen
DNA	Deoxyribonucleic acid
DNS	Dinitrosalicylic acid
DTT	Dithiothreitol
DW	Distilled water
ELISA	Enzyme-linked immune sorbent assay
ESRD	End-Stage Renal Disease
FDA	Food and Drug Administration

FISA	Fully integrated sensor array
GDP	Gross Domestic Product
GFR	Glomerular filtration rate
GO_x	Glucose oxidase
GSM	Grams per Square Meter
H_2O_2	Hydrogen peroxide
HRP	Horseradish peroxidase
HIV	Human immunodeficiency virus
I2C	Inter-integrated Circuit
IC	Integrated Chip
IDF	International Diabetes Federation
ISFET	Ion sensitive field-effect transistor
IR	Infrared
IL	Interleukin
KCl	Potassium Chloride
LA	Lactic Acid
LabVIEW	Laboratory virtual instrument engineering workbench
LCD	Liquid Crystal Display
LDR	Light Dependent Resistor
LED	Light Emitting Diode
LII	Light Intensity Integration
LOC	Lab on a chip
LOD	Limit of detection

MATLAB	Matrix Laboratory
MMC	Multi-media card
NaCl	Sodium Chloride
NaOH	Sodium Hydroxide
NCD	Non-communicable diseases
NCKD	Non-Chronic Kidney Disease
NH_4Cl	Ammonium Chloride
NIR	Near-infrared spectroscopy
NY	Nitrazine Yellow
PB	Phosphate buffer
PCB	Printed Circuit Board
PHT	Phenol Hypochlorite Test
PIC	Programmable interrupt controller
POC	Point of Care
POCD	Point of Care Devices
POCT	Point of Care Technology
PR	Phenol red
PTH	Plated through-hole
PVA	Polyvinyl alcohol
QCM	Quartz crystal microbalance
RBC	Red blood cells
RGB	Red Green Blue
RNA	Ribonucleic acid

RSD	Standard deviation in sensor measurement
SAW	Surface acoustic wave
SD	Standard deviation
SD_x	Salivary diagnostics
SERS	Surface-enhanced Raman scattering
SGL	Salivary glucose level
SMT	Surface mount technology
S/N	Signal to noise ratio
SOP	Standard Operating Protocol
SPR	Surface Plasmon Resonance
SUL	Saliva urea level
UN	United Nations
USA	United States of America
US	United States
USB	Universal Synchronous Bus
VOCs	Volatile Organic Compounds
WBC	White blood cells
WHO	World Health Organization