

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102639708 A

(43) 申请公布日 2012. 08. 15

(21) 申请号 201080054087. 0

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2010. 09. 30

C12Q 1/32 (2006. 01)

(30) 优先权数据

A61B 10/00 (2006. 01)

0950717-9 2009. 09. 30 SE

A61B 5/15 (2006. 01)

61/247, 214 2009. 09. 30 US

G01N 33/543 (2006. 01)

61/304, 612 2010. 02. 15 US

G01N 33/573 (2006. 01)

G01N 33/72 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 05. 30

(86) PCT申请的申请数据

PCT/SE2010/051048 2010. 09. 30

(87) PCT申请的公布数据

W02011/040874 EN 2011. 04. 07

(71) 申请人 卡尔马克瑞典股份公司

地址 瑞典卡尔斯塔德

(72) 发明人 M. 卡尔森 S. 西奥特阿芙奥纳斯

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 张文辉

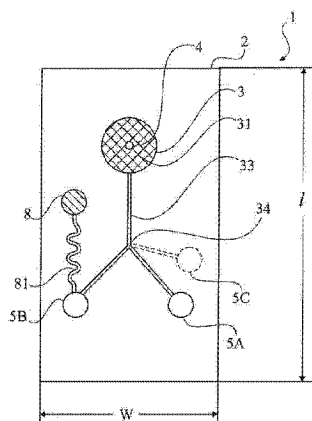
权利要求书 4 页 说明书 14 页 附图 4 页

(54) 发明名称

用于测定缺氧诱导的细胞损伤的测试系统

(57) 摘要

本发明涉及一种用于评估哺乳动物（包括人）中的缺氧诱导的细胞损伤的测试系统，其包含具有由分离装置分开的样品入口和收集室的一次性装置，其中所述收集室与至少两个，即第一和第二可见检测区室连接，其中的至少一个排布有用于直接视觉检测的化学手段，所述第一检测区室排布为测定自所述哺乳动物采集的体液样品中的血红蛋白（Hb）水平是否超出预定的阈值，并且所述第二检测区室排布为评估所述样品中的乳酸脱氢酶（LDH）的总量水平。



1. 用于评估哺乳动物,包括人中的缺氧诱导的细胞损伤的测试系统,其包含具有用分离装置(3)排布的样品入口(4)和收集室(32)的一次性装置(2),其特征在于:收集室(32)与至少两个,即第一(5A)和第二(5B)可见检测区室连接,其中的至少一个排布有用于直接检测的化学手段,所述第一检测区室(5A)排布为测定来自所述哺乳动物的体液(9)样品中的血红蛋白(Hb)量是否超过预定的水平,并且所述第二检测区室(5B)排布为依靠所述化学手段评估所述样品中的乳酸脱氢酶(LDH)的总量水平。

2. 依照权利要求1的测试系统,其中所述至少两个检测区室(5A,5B)分别排布有用于直接检测所述Hb和LDH量的化学手段。

3. 依照权利要求2的测试系统,其中所述至少两个可见检测区室(5A,5B)排布有依靠比色法直接视觉检测的化学手段。

4. 依照权利要求1或2的测试系统,其中所述至少两个可见检测区室(5A,5B)排布有通过分光光度手段直接检测的化学手段。

5. 依照权利要求1-4中任一项的测试系统,其中所述分离装置(3)包含具有 3mm^2 至 500mm^2 ,优选地小于 150mm^2 面积的分离滤膜(31)。

6. 依照权利要求1-5中任一项的测试系统,其中所述样品是全血样品(9),且所述分离装置(3)包含用于分开血浆(9')与所述全血样品(9)内的血细胞的滤膜(31)。

7. 依照权利要求1-5中任一项的测试系统,其中所述样品是血浆、血清、尿液、脑脊液(CSF)、腹膜内流体或唾液之任一。

8. 依照前述权利要求中任一项的测试系统,其中所述体液(9)样品的体积是 $1\mu\text{L}$ - $100\mu\text{L}$,更优选地 $10\mu\text{L}$ - $75\mu\text{L}$ 。

9. 依照前述权利要求中任一项的测试系统,其中经由所述样品入口(4)应用所述体液(9)样品至可能通过视觉检测评估缺氧诱导的细胞损伤的时间是小于5分钟,优选地小于2分钟,甚至更优选地小于1分钟。

10. 依照前述权利要求中任一项的测试系统,其中通过与颜色强度升高的标准参照量表比较来评估所述体液(9)样品中的预后标志物的总量,而颜色缺乏或不太强烈的颜色对应于低密度的标志物,而较强烈的颜色对应于高浓度的标志物。

11. 依照前述权利要求中任一项的测试系统,其中所述一次性装置(2)包含卡片上排布的超过两个可见检测区室(5A-C),优选地,所述区室之每一个排布有试剂组合物形式的化学手段。

12. 依照前述权利要求中任一项的测试系统,其中所述至少两个可见检测区室(5A-C)之每个排布有直接视觉检测由下列预后标志物组成的组的一个成员的试剂组合物:Hb、LDH、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、乳酸盐、肌酸激酶(CK)、K、Mg和Ca。

13. 依照前述权利要求中任一项的测试系统,其中所述一次性装置(2)具有连接的接受室(6)和样品入口(4),所述接受室(6)形成样品收集器(7)的区室和界面。

14. 依照权利要求1-13中任一项的测试系统,其中所述样品入口(4)包含用于自哺乳动物收集体液样品的整合毛细管样品收集器(7)。

15. 依照前述权利要求中任一项的测试系统,其中所述化学手段是干化学手段或湿化学手段形式的试剂组合物。

16. 依照权利要求 15 的测试系统,其中所述试剂组合物排布为测定 LDH,包括四唑化合物,优选地选自下组:硝基蓝四唑(NBT)、1-(对-碘苯基(jodofenyl))-5-(对-硝基苯(nitrofenyl))-3-苯基甲腈(fenylformazan)(INT)和 3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-5-(3-羧基甲氧基苯基)-2-(4-磺苯基)-2H-四唑盐(MTS)。

17. 依照权利要求 15 或 16 的测试系统,其中所述试剂组合物包含吩嗪硫酸甲酯(phenazine methosulphate, PMS) 或 1-甲氧基-5-甲基吩嗪硫酸甲酯(mPMS)形式的介质。

18. 依照权利要求 15-17 中任一项的测试系统,其中所述试剂组合物进一步包含乳酸盐和 NAD^+ 。

19. 依照前述权利要求中任一项的测试系统,其中检测区室(5A-C)内部的 pH 是 8-11,优选地 8.5-10,更优选地 8.8-9.8。

20. 依照权利要求 15-18 中任一项的测试系统,其中所述试剂组合物排布为测定包含 N-甲基-D-葡萄糖胺的缓冲液中的 LDH。

21. 依照权利要求 15 或 20 中任一项的测试系统,其中检测区室(5A-C)内部的 pH 是 9-11,优选地 9.5-10.5,更优选地 9.8-10.2。

22. 依照权利要求 15 的测试系统,其中所述试剂组合物排布为测定 Hb,包括联苯胺化合物,优选地选自下组:四甲基联苯胺(TMB)和 3,3'-二氨基联苯胺(DAB)。

23. 依照权利要求 22 的测试系统,其中所述试剂组合物包含过氧化物底物,优选地选自下组:过氧化氢、和叔-丁基过氧化氢(T-hydro)。

24. 依照权利要求 22 或 23 中任一项的测试系统,其中用于测定 Hb 的所述检测区室(5A)内部的 pH 是 3-7,优选地 4.5-5.5。

25. 依照前述权利要求中任一项的测试系统,其中所述一次性装置(2)包含具有反应停止物的区室(8),所述反应停止物用于在预定的时间跨度后中断预后标志物与所述试剂组合物间的反应。

26. 依照前述权利要求中任一项的测试系统,其包含用于在所述收集室(32)内部产生负压的手段(14),用于促使来自体液样品的血浆通过所述分离装置(3)并进入所述至少两个检测区室(5A-B)。

27. 依照前述权利要求中任一项的测试系统,其中所述一次性装置(2)是便携的,并且具有 3-15cm,优选地 5-10cm 的长度(1),0.5-5cm,优选地 2-4cm 的宽度(W)和 0.1-3cm,优选地 0.3-0.7cm 的厚度(d)。

28. 依照前述权利要求中任一项的测试系统,其中所述一次性装置(2)具有 5-50g 的重量。

29. 评估哺乳动物中的缺氧诱导的细胞损伤的方法,包括下列步骤:

- a. 提供包含诸如血细胞等颗粒的来自哺乳动物的体液(9)样品,
- b. 依靠分离装置(3)分开所述颗粒与所述体液(9)样品,
- c. 使所述分开的体液(9')与用于直接检测的化学手段接触,
- d. 测定所述体液(9')中的 Hb 量是否高于或低于预定的阈值,及 Hb 的量是否低于所述阈值:
- e. 评估所述体液(9')中的乳酸脱氢酶(LDH)的总量水平,并
- f. 通过评估所述体液(9')中的 LDH 水平来评估缺氧诱导的细胞损伤的风险和/或存

在。

30. 依照权利要求 29 的方法,其中在步骤 (d)-(e) 中,通过依靠比色法的直接视觉检测来实施分别测定和评估标志物 Hb 和 LDH 水平。

31. 依照权利要求 29 的方法,其中在步骤 (d)-(e) 中,通过分光光度检测来实施分别测定和评估标志物 Hb 和 LDH 水平。

32. 依照权利要求 29-31 中任一项的方法,其中所述分离装置 (3) 包含用于分开颗粒与体液 (9') 的滤膜 (31),所述分离滤膜 (31) 包含 3mm^2 至 500mm^2 ,优选地小于 150mm^2 的面积。

33. 依照权利要求 29-32 中任一项的方法,其中所述样品是全血样品 (9),且所述分离装置 (3) 包含用于分开血浆 (9') 与所述全血样品 (9) 内的血细胞的滤膜 (31)。

34. 依照权利要求 29-32 中任一项的方法,其中所述样品是如下任一形式的体液 (9): 全血、血浆、血清、尿液、脑脊液 (CSF)、腹膜内流体或唾液。

35. 依照权利要求 29-34 中任一项的方法,其中体液 (9) 样品的体积是 $1\ \mu\text{L}$ - $100\ \mu\text{L}$,更优选地 $10\ \mu\text{L}$ - $75\ \mu\text{L}$ 。

36. 依照权利要求 29-35 中任一项的方法,其中经由所述样品入口 (4) 应用所述体液 (9) 样品至可能通过视觉检测评估缺氧诱导的细胞损伤的时间是小于 5 分钟,优选地小于 2 分钟,甚至更优选地小于 1 分钟。

37. 依照权利要求 29-36 中任一项的方法,其中所述化学手段是干化学手段或湿化学手段形式的试剂组合物。

38. 依照权利要求 37 的方法,其中所述试剂组合物排布为测定 LDH,并且包括四唑化合物,优选地选自下组:硝基蓝四唑 (NBT)、1-(对-碘苯基)-5-(对-硝基苯)-3-苯基甲脒替 (INT) 和 3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-5-(3-羧基甲氧基苯基)-2-(4-磺苯基)-2H-四唑盐 (MTS)。

39. 依照权利要求 37 或 38 的方法,其中所述试剂组合物包含吩嗪硫酸甲酯 (PMS) 或 1-甲氧基-5-甲基吩嗪硫酸甲酯 (mPMS) 形式的介质。

40. 依照权利要求 37-39 中任一项的方法,其中所述试剂组合物进一步包含乳酸盐和 NAD^+ 。

41. 依照前述权利要求中任一项的方法,其中所述试剂组合物中的 pH 是 8-11,优选地 8.5-10,更优选地 8.8-9.8。

42. 依照权利要求 37-40 中任一项的方法,其中所述试剂组合物排布为测定包含 N-甲基-D-葡萄糖胺的缓冲液中的 LDH。

43. 要求权利要求 37 或 42 中任一项的方法,其中所述试剂组合物中的 pH 是 9-11,优选地 9.5-10.5,更优选地 9.8-10.2。

44. 依照权利要求 37 的方法,其中所述试剂组合物排布为测定 Hb,并且包括联苯胺化合物,优选地选自下组:四甲基联苯胺 (TMB) 和 3,3'-二氨基联苯胺 (DAB)。

45. 依照权利要求 44 的方法,其中所述试剂组合物包含过氧化物底物,优选地选自下组:过氧化氢、和叔-丁基过氧化氢 (T-hydro)。

46. 依照权利要求 44 或 45 的方法,其中所述试剂组合物中的 pH 是 3-7,优选地 4.5-5.5。

47. 依照权利要求 29-46 中任一项的方法,其中通过与颜色强度升高的标准参照量表比较来分别评估体液 (9) 样品中的预后标志物诸如 Hb 和 LDH 的总量,其中颜色缺乏或不太强烈的颜色对应于低密度的标志物,而较强烈的颜色对应于高浓度的标志物。

48. 依照权利要求 29-47 中任一项的方法,其中自新生儿收集体液 (9) 样品以评估缺氧,并容许预测出生前窒息后的低氧性缺血性脑病。

49. 依照权利要求 29-48 中任一项的方法,其中在医学方法前收集所述血液样品。

50. 依照权利要求 49 的方法,其中所述医学方法牵涉移植。

51. 依照权利要求 49 的方法,其中所述医学方法是胃肠道手术。

52. 一次性装置用于依照权利要求 29-51 中任一项的方法评估哺乳动物中的缺氧诱导的细胞损伤的用途,所述装置 (2) 至少包含具有用分离装置 (3) 排布的样品入口 (4) 和收集室 (32),其中收集室 (32) 与至少两个,即第一 (5A) 和第二 (5B) 可见检测区室连接,每个所述可见检测室排布有用于直接检测的化学手段,所述第一检测区室 (5A) 排布为测定来自所述哺乳动物的体液 (9) 样品中的血红蛋白 (Hb) 量是否超过预定的水平,并且所述第二检测区室 (5B) 排布为评估所述样品中的乳酸脱氢酶 (LDH) 的总量水平。

53. 依照权利要求 52 的用途,其中所述一次性装置 (2) 包含卡片上排布的超过两个可见检测区室 (5A-C),优选地,所述区室之每一个排布有试剂组合物形式的化学手段。

54. 依照权利要求 53 的用途,其中所述至少两个可见检测区室 (5A-C) 之每个排布有用于直接视觉检测由下列预后标志物组成的组的一个成员的试剂组合物: Hb、LDH、天冬氨酸氨基转移酶 (AST)、丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、乳酸盐、肌酸激酶 (CK)、K、Mg 和 Ca。

用于测定缺氧诱导的细胞损伤的测试系统

技术领域

[0001] 本发明涉及用于评估哺乳动物（包括人）中的细胞损伤，例如由缺氧缺血引起的细胞损伤的测试系统，其包含具有样品收集部分及血浆分离装置的一次性装置（disposable device）。

[0002] 发明背景

[0003] 可以通过测定自收集样品获得的体液内的总乳酸脱氢酶（LDH）来完成哺乳动物中缺氧（氧缺乏）的评估。与别的预后标志物天冬氨酸氨基转移酶（AST）、丙氨酸氨基转移酶（ALT）和乳酸盐组合测量 LDH 的总量揭示了关于部分或完全氧缺乏的哺乳动物状态，该信息可以支承进一步医学作用的决定。期望缺氧检出的医学情况的例子很多，并且包括婴儿的围产期和新生儿监测、急救室中的伤员检别分类（triage）、手术、移植或其它医学方法或手术处理。明显地，期望的是，快速实施所述生物标志的检测，从而尽可能快速地采取足够的措施来避免由于缺氧所致的永久性损伤。

[0004] 测定缺氧的方法披露于申请 no. US12/101, 470，其中可能与 K、Mg、Ca、AST、ALT 和乳酸盐之任一组合测量患者血浆中的总 LDH，而且其中一种或多种这些标志物的数值增加指示患者中的缺氧。还披露了与用于快速定量和 / 或定性测定所提及的标志物的装置组合使用血浆分离装置。一种测定依照 US12/101, 470 的预后标志物水平的方式是通过排布（arrange）有干化学手段（means）的视觉检测。

[0005] 可用测量 LDH 水平的各种其它方式，其中许多基于通过与试剂和染料的化学反应引起的视觉检测。

[0006] US4056485 发现测定某些酶的效用，所述酶引起无色的 2-(对-碘苯基)-3-(对-硝基苯)-5-苯基氯化四唑（INT）还原成鲜红色 1-(对-碘苯基)-5-(对-硝基苯)-3-苯基甲腈（phenylformazan）（INT 甲腈）。US4056485 中披露的有色参照标准水溶液在 500 纳米具有吸光度最大值，并且适合于用于测定例如血清乳酸脱氢酶（LDH）、肌酸磷酸激酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、磷酸腺苷、葡萄糖、葡萄糖-6-磷酸、6-磷酸葡萄糖酸盐等。

[0007] 与目前用于测量生物标志的方法有关的一般问题是它们经常需要访问具有测量感兴趣标志物的可能性的中心实验室，这意味着在一些情况中接受测试结果的时间变为长得期望。在许多地方，甚至没有中心实验室，并且设立一个会需要大量的投资成本。

[0008] 一种中心实验室的备选是小的测量仪，例如利用测试条（testing strip）和测量仪诸如小的足迹（foot-print）仪或手持式分光光度计。此类设备是昂贵的，并且通常需要操作者管理并解读读取结果两者的某种能力。考虑全球前景，许多国家缺乏适当运行且先进的医学治疗系统，并且高技术解决办法可能不适用，这是由于缺乏经济资源，或者仅由于缺乏能够实施此类测试的内科医生或健康护理提供者所致。

[0009] 即使在开发的医学护理系统的情况中，存在着如下的情况，其中长的研制周期（lead time）和 / 或复杂的测试装置不是期望的，特别地若时间是至关重要的，并且仅医学状况的适应症便足以继续进行患者的适当治疗。

[0010] 鉴于上文,需要可适用于各种医学情况(其中时间是至关重要的,并且对患者状态的快速评估对于进一步医学治疗是有价值的)的护理点(point-of-care)测试方法。

[0011] 发明的目的

[0012] 本发明的主要目的是提供评估各种医学情况期间的缺氧诱导的细胞损伤的改善方式,此类改善包括提供快速且用户友好的测试,优选地床边测试,其是小的,优选地不依赖于任何仪器,而且其提供一种几乎即时检测指示哺乳动物中的缺氧的水平升高的选定生物标志的方式。

[0013] 从以下描述和权利要求书看,本发明的其它目的会变得明显。

[0014] 发明概述

[0015] 本发明的目的是通过用于评估哺乳动物,包括人中的缺氧诱导的细胞损伤的测试系统来实现的,所述测试系统包含具有用分离装置排布的样品入口和收集室的一次性装置,其中收集室与至少两个(第一和第二)可见检测区室连接,其中的至少一个排布有用于直接检测的化学手段,所述第一检测区室排布为测定自所述哺乳动物采集的体液样品中的血红蛋白(Hb)量是否超过预定的水平,并且所述第二检测区室排布为依靠所述化学手段评估所述样品中的乳酸脱氢酶(LDH)的总量水平。

[0016] 本发明的目的也是通过评估哺乳动物中的缺氧(hypoxia)诱导的细胞损伤的方法来实现的,所述方法包括下列步骤:提供包含诸如血细胞等颗粒的来自哺乳动物的体液样品,随后依靠分离装置分开所述颗粒与所述体液样品,使所述分开的体液与化学手段接触以直接检测,并测定所述体液中的Hb量是否高于或低于预定的阈值。

[0017] 若Hb的量低于所述阈值,则评估体液中的乳酸脱氢酶(LDH)的总量水平,并通过评估所述体液中的LDH水平来评估缺氧诱导的细胞损伤的风险和/或存在。

[0018] 在本说明书中,“LDH”指乳酸脱氢酶(不是其同工酶)的总量。

[0019] 体液样品可以为全血样品、血清、血浆、尿液、脑脊液(CSF)、腹膜内流体、或唾液形式,然而,下文呈现的例子主要涉及测试血液样品。应当理解,术语“血液样品”可以解释为其它类型的体液,如先前所提及的。

[0020] 通过提供微升体积血液样品,并使用所述发明就选定的预后生物标志而言视觉分析它,提供了如下的测试系统,其是快速的、容易使用、容易解读,而且其可以以小的独立的一次性单元向医学从业人员销售,所述医学从业人员可以在与治疗患者的立即联系中使用它们,无论治疗是手术、伤员检别分类还是监测情况。

[0021] 术语缺氧意指可以由缺血或不充分的氧合或重度贫血引起的部分或完全氧缺乏。缺氧可以或不可导致物理损伤,并且对缺氧的身体应答随患者是谁而不同。例如,在出生期间或接近出生受到缺氧的婴儿中,身体会自“不太重要的”器官再分配血流以有利于脑、心脏和肾上腺。另一方面,成人在不受损伤的情况中不能耐受相同水平的缺氧。严重得足以损伤细胞的缺氧会导致进入循环的酶泄露,并且最终细胞会死亡,这进一步增加血流中的酶浓度。可以用于评估缺氧诱导的细胞损伤的酶和预后标志物是LDH、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、乳酸盐、肌酸激酶(CK)、K、Mg和Ca。

[0022] 在本申请中,术语缺氧指严重得足以产生细胞损伤的氧缺乏。

[0023] 依照本发明的一个实施方案,如下实施哺乳动物中的缺氧诱导的细胞损伤的评估,即首先提供来自哺乳动物(包括人)的血液样品,并在测试系统的样品入口上应用血液

样品以经由所述血浆分离装置来分开红细胞与血浆。接着,产生在所述一次性装置内部的负压以将血浆转移通过血浆分离装置,并进一步进入至少第一和第二检测区室,在那里血浆接触其中布置的试剂。以对要检测的标志物(例如Hb,LDH)特异性的试剂组合物制备每个检测区室。血浆中的标志物与检测区室中布置的试剂组合物(即,化学手段)间的化学反应引起可见的颜色转变,这意味着比色分析是有可能的。例如,在Hb的情况中,若样品中的Hb水平超过某个预定的水平,则可以颜色的变化,否则不会发生颜色转变。优选地,在LDH的情况中,若标志物水平低于预定的水平,则在相应的检测区室中不会发生颜色转变。若标志物水平高于预定的水平,则会发生颜色变化,优选地但不必然地,所述颜色变化与存在于所测试的血浆中的标志物量成比例。

[0024] 优选地,每个检测区室是可见的,这意味着操作者或健康护理提供者会清楚地看出反应是否正在其中发生,而且如此可以分别视觉测定血浆中的Hb和LDH的存在。样品中高于预定水平的Hb的存在指示溶血,并且因为红细胞比血清含有多至150倍的LDH,所以溶血是错误的来源。如此,在高于所述预定水平的Hb存在的情况中,需要再进行测试。若尚未发生溶血,则通过视觉比色检测血浆中的LDH来评估缺氧诱导的细胞损伤的存在。

[0025] 依照本发明的一个方面,可以通过与标准化的参照间隔或颜色表比较来解读由于高于预定水平的标志物的存在所致的颜色变化,将其校正以定量读取标志物量。

[0026] 例如,可以依照呈现升高的颜色强度的量表形式(其中不太强烈的颜色(例如淡紫色)对应于较低浓度的LDH,而较强烈的颜色(例如暗紫色)对应于较高浓度的LDH)的标准化参照间隔指示样品中的LDH量。依照现有技术,比较标志物与试剂组合物间反应后的颜色与标准的参照量表,由此可以评估样品中的标志物水平。

[0027] 明显地,有可能提供呈现不同颜色的标准化参照间隔,其中例如颜色红色指示低浓度的标志物,而紫色指示较高的浓度。

[0028] 依照本发明的另一方面,将标准化的参照间隔分成有限数目的颜色部分,每个部分呈现与标志物的某个间隔对应的颜色强度。这样,获得用于评估标志物水平的基于步进式(step-wise)的参照量表,可以证明其可用于期望关于标志物水平的更为详细的信息的情况。

[0029] 如下测量Hb水平也在本发明的范围内,即试剂组合物在被样品接触时逐渐改变颜色,然而,清楚地指示与预设的Hb阈值对应的颜色强度保证正当地解读测试结果。

[0030] 依照本发明的又一方面,意图用于评估溶血的检测区室没有任何化学手段或试剂。溶血的评估取而代之仅通过视觉观察过滤的样品,优选地血浆(其存在于检测区室内),并基于所述血浆的颜色(或色彩)来测定溶血已经发生与否来实现。一般地,若血浆是透明的,则尚未发生溶血,但是若血浆是粉红色或暗粉红色的,则可以怀疑溶血,并且应当再进行测试。为了便于评估溶血,可以给测试系统提供意图用于与血浆颜色比较的参照颜色表,其包含相应检测区室附近清楚表明的指示溶血的粉红色阴影。应当理解,此类参照颜色表可以与一次性装置整合,但是它可以同样以与一次性装置一起投递的测试系统的独立部分提供。

[0031] 在其最不复杂的形式中,本发明的测试系统可以仅包含阳性-阴性参照。依照此类实施方案,为每种标志物设置预定的水平,并且每个检测区室内的试剂组合物排布为在所述预定的水平转变/改变颜色,从而医学从业人员仅会已知选定标志物的量是否低于或

等于/高于预设的水平。此类测试系统在其足以指示缺氧诱导的细胞损伤风险时可以有利的。

[0032] 依照本发明的又一方面,检测区室排布有干化学手段或湿化学手段形式的化学手段。依照本发明的一方面,每个检测区室排布有针对某种预后标志物,诸如 LDH 和 Hb 的化学手段。用排布为与一种此类标志物起反应的试剂组合物制备每个检测区室。根据特定测试系统的设计,试剂组合物可以是干化学手段或湿化学手段。

[0033] 依照本发明的一个方面,用于检测 LDH 的试剂组合物可以包含四唑化合物形式的试剂,优选地选自下组:1-(对-碘苯基(jodofenyl))-5-(对-硝基苯(nitrofenyl))-3-苯基甲月替(fenylformazan)(INT)和3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-5-(3-羧基甲氧基苯基)-2-(4-磺苯基)-2H-四唑盐(MTS),它们都是用于比色测试系统的公知物质。优选地,试剂组合物还包含吩嗪硫酸甲酯(phenazine methosulphate,PMS)或1-甲氧基-5-甲基吩嗪硫酸甲酯(mPMS)及乳酸盐和NAD⁺形式的介质(mediator)。依照一个例子,用于检测LDH的试剂组合物包含包含N-甲基-D-葡萄糖胺的缓冲液中的四唑化合物(NBT)。优选地,检测区室内部的pH是8-11,优选地8.5-10.5,甚至更优选地9-10.5,以优化发生最佳酶反应的条件。LDH的试剂组合物在实施例1-4中进一步例示。

[0034] 依照本发明的一个方面,用于检测Hb的试剂组合物可以包含联苯胺化合物形式的试剂,优选地选自下组:四甲基联苯胺(TMB)和3,3'-二氨基联苯胺(DAB)。用于Hb的试剂组合物可以进一步包含过氧化物底物,优选地选自下组:过氧化氢、和叔-丁基过氧化氢(T-hydro)。优选地,用于Hb的检测区室5A内部的pH是3-7,优选地4.5-5.5。用于Hb的试剂组合物在实施例5-6中进一步例示。

[0035] 依照本发明的一个方面,湿化学手段在一次性装置内在湿试剂的贮存排布内部,例如在反应孔中或在泡罩包装排布中布置。依照一方面,泡罩包装排布设计为在启动测试系统使用时破裂或被弄裂,例如在将样品加载于一次性装置之前或之后依靠手工破裂。例如,用户可以针对一次性装置表面在导致泡罩包装压缩及其破裂的位置挤压来实施手工破裂。泡罩包装的破裂导致化学手段被释放,并且可以被要测试的样品接触。由于此方面,可以加速试剂化学组分与样品内可能的标志物间的反应。

[0036] 依照本发明的又一方面,一次性装置包含卡片(card)上排布的超过两个检测区室,优选地所述区室的每一个排布有试剂组合物形式的化学手段。

[0037] 优选地,超过两个检测区室各包含用于直接视觉检测由下列预后标志物组成的组的一个成员的化学手段:Hb、LDH、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、乳酸盐、肌酸激酶(CK)、K、Mg和Ca。优选地,每个装置包含两个分别检测Hb和LDH的检测区室,和任选地一个或多个用于检测AST、ALT、乳酸盐、CK、K、Mg和Ca之一或多种的检测区室。

[0038] 依照本发明的又一方面,测试系统包含用于在所述一次性装置内部产生负压的手段,其用于促使来自体液样品的血浆进入到所述分离装置并进入所述至少两个检测区室。

[0039] 附图简述

[0040] 下文会参照附图更为详细地描述本发明的测试系统和方法。应当认为以下描述仅是优选的形式,而在限制的意义上不是决定性的。

[0041] 图1A呈现了依照本发明的一个例子的测试系统的示意性平面视图,

[0042] 图 1B 呈现了依照图 1A 的测试系统的横截面侧视图，

[0043] 图 1C 呈现了包含负压产生装置的测试系统的示意性平面视图，

[0044] 图 2A-B 呈现了依照本发明的另一个例子的测试系统，

[0045] 图 3 呈现了依照本发明的又一个例子的测试系统，

[0046] 图 4A 呈现了具有分开的毛细管样品收集器的依照本发明的一个实施方案的测试系统的透视图，和

[0047] 图 4B 呈现了包含整合毛细管样品收集器的测试系统的透视图。

[0048] 发明详述

[0049] 在以下详细描述中，会参照例示依照本发明的测试系统 1 的多个实施方案的图。然而，应当理解，本发明还涉及用于评估哺乳动物中的缺氧诱导的细胞损伤的方法，并且结合测试系统 1 公开的许多特征也适用于相应的方法。

[0050] 在图 1A-B 中，显示了依照本发明的一个实施方案的测试系统 1，其包含一次性装置 2，优选地其排布有许多不同检测区室 5A-C，如稍后会更为详细地解释的。

[0051] 在图 1A 中示意性显示了测试系统 1 的平面视图，所述测试系统 1 包含具有样品收集部分的筒式装置 (cartridge device) 2 形式的本文中的扁平状体，所述样品收集部分具有用于接收自哺乳动物采集的体液 9 样品，例如全血的样品入口 4。如图 1B 中示意性呈现的，给一次性筒式装置 2 提供接收室 6，其适合于与供应自哺乳动物采集的体液 9 样品的毛细管样品收集器 7 相配。

[0052] 在与接收室 6 的连接中，在其底部，存在着以本身已知的方式保护体液样品进一步转运至分离装置 3 的界面，所述分离装置包含滤膜 (filter) 31 和收集室 32。图 1A 中的滤膜 31 包含环状的形状，并且具有 3mm^2 至 500mm^2 ，优选地小于 150mm^2 的面积。应当理解，滤膜 31 的合适的面积取决于期望的样品体积，并且因此，可以相应地调节滤膜面积 31。优选地经由微射流通道 (microfluidic channel) 33 将收集室 32 与至少两个，即第一 5A 和第二 5B 可见检测区室连接，其中的至少一个，但是可能两者排布有用于直接检测，优选地直接视觉检测至少一种预后生物标志 LDH 的化学手段。排布为测定样品 9' 中的血红蛋白 (Hb) 水平或量的检测 5A 区室可以或不可排布有化学手段。可以通过观察进入相应区室的血浆的色彩来评估溶血，在该情况中，化学手段可以是不必需的。然而，也有可能用化学手段检测 Hb。在血浆收集室 32 和检测区室 5A-C 间，可以给微射流通道 33 提供样品分流器 34 以将血浆 9' 引导入不同检测区室 5A-C 之每一个。

[0053] 依照一个例子，第一检测区室 5A 排布为测定体液样品中的血红蛋白 (Hb) 水平是否超过预定的水平 (阈值)，而第二检测区室 5B 排布为评估所述样品中的乳酸脱氢酶 (LDH) 的总量水平。如图 1A 中用点线指示的，一次性装置 2 可以包括与收集室 32 连接的超过两个检测区室 5A-C，其中区室 5A-C 包含试剂组合物形式的化学手段，其会与预后标志物 (若存在的话) 起反应，从而发生颜色转变，所述颜色转变在可见光谱内，从而它可以容易地通过人眼观察。应当理解，可见光谱指可以通过人眼检测的电磁谱部分，其通常范围为 380nm - 750nm 。

[0054] 依照本发明，测试系统 1 实现对选自下组的标志物的直接视觉检测：Hb、LDH、天冬氨酸氨基转移酶 (AST)、丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、乳酸盐、CK、K、Mg 和 Ca。实际上，仅测试 LDH 和 Hb 的装置 2 在一些应用中可以是足够的。

[0055] 然而,也有可能依靠分光光度检测方法检测读取结果(即颜色转变)。

[0056] 应当理解,可以依照本发明的测试系统容易地分析除了血液样品外或作为血液样品的补充的体液样品,例如尿液、脑脊液(CSF)或唾液。所述分离装置3会清除样品,分开在其它情况中可以干扰分析的不想要的颗粒或其沉积物。

[0057] 如例如在图1A-B中显示的,一次性装置2为长方形筒形式,然而,装置的形状对于本发明不是至关重要的,并且本领域普通技术人员可以容易地选择适合于给定应用的形状或设计。可以使用诸如注射成型或成层等方法自诸如透明塑料,如环烯烃(COC)、聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET)或聚甲基丙烯酸甲酯8(PMMA)等材料构建装置2。然而,优选的是,装置2的尺寸为使得它是便携的,并且小得足以能够被操作者舒适地手持。所述一次性装置2是便携的,并且具有3-15cm,优选地5-10cm的长度L,0.5-5cm,优选地2-4cm的宽度W和0.1-3cm,优选地0.2-2.5cm的厚度d。优选地,所述一次性装置2具有5-50g的重量。

[0058] 现在会描述测试系统1的用途。

[0059] 首先,优选地但不必然依靠装满总计例如约50 μ L的全血的毛细管装置7来提供来自哺乳动物的体液样品,诸如全血样品。在连续步骤中,将毛细管装置7插入筒2的区室6以使血液样品9与一次性装置2形成界面,将血液样品9放置于血浆分离装置3的滤膜31上。技术人员理解,使用毛细管样品收集器7或其它类型的样品收集器将流体样品9应用于筒2的许多方式是有可能的。例如,可以将样品9直接应用于滤膜31上,例如依靠释放其上的样品体积的移液管形式的样品收集器。如此,还应当理解,筒2的设计可以使得滤膜31排布于筒2的上表面,其被暴露为使得可以将样品体积9直接在其上释放。依靠负压产生装置14来产生负压(见图1C),由此引起血液样品9被吸到滤膜31,在其上面滤出选定的颗粒,特别是红细胞。样品的血清(血浆)通过滤器31,并在收集室32内收集,并且继续进一步通过微射流通道33,进入沉积有试剂的不同检测区室5A-C。血清内存在的预后生物标志会与沉积的试剂起反应,引起相应区室内的颜色转变,其可以被用户检出以评估接受样品接受的哺乳动物(例如人)中的缺氧诱导的细胞损伤。

[0060] 因此,本发明的方法包括下列步骤:

[0061] - 提供包含诸如血细胞等颗粒的来自哺乳动物的体液样品,

[0062] - 依靠分离装置分开所述颗粒与所述体液样品,

[0063] - 使所述分开的体液与化学手段接触以直接检测,

[0064] - 测定所述体液中的Hb量是否高于或低于预定的阈值,及Hb的量是否低于所述阈值:

[0065] - 评估所述体液中的乳酸脱氢酶(LDH)的总量水平,并通过评估所述体液中的LDH水平来评估缺氧诱导的细胞损伤的风险和/或存在。

[0066] 应当理解,依照本发明的方法可以依靠依照本发明的测试系统1(例如,包含一次性装置2,其具有滤膜31和检测区室5A-C)来实施,但是实施方法的其它方法也是想得到的。例如,预见的是医学从业人员可以在反应孔中分配过滤的液体样品9',随后添加试剂组合物,其可以例如在一次性剂量容器中投递。

[0067] 在图1C中,显示了测试系统1的一个例示性实施方案,提供了用于在所述收集室32内部产生负压的手段14,其用于促使来自体液样品的血浆进入到所述分离装置3并进入所述至少两个检测区室5A-B。

[0068] 依照本发明的一个方面,所述手段 14 是手工可调动的,并且排布为在收集室 32 和微射流通道 33 内部产生负压,例如包含可密封排气孔 142 的压缩式膜盒式泵 (bellows pump) 14。依照本文中所显示的实施方案,负压产生装置 14 与筒 2 整合,并且经由微射流通道 141A, 141B 与检测区室 5A-C 连接。可以以如下方式实现筒式装置 2 内部的负压产生。操作者针对筒式装置 2 的表面在与负压产生装置 14 的位置对应的,优选地筒 2 表面上指示的位置推进。由此空气会经由可密封排气孔 142 自筒 2 的微射流通道 33、141A、141B、81 离开。在释放负压产生装置 14 后,优选地例如依靠包含单向阀 (check valve), 或者由于用户手动密封孔 142 密封排气孔 142。这会导致负压产生装置 14 的释放在筒式装置 2 内部产生负压 (例如通过再取其初始形状的膜盒式泵实现), 并且由此会促使微射流通道 33、141A、141B、81 内部的流体移到测试系统 1。

[0069] 给一次性装置提供光学观看区 10A-C, 藉此可以观察相应的检测区室 5A-C, 这意味着可能的颜色转变是用户或健康护理提供者容易观察到的。对于 Hb, 优选的是, 只有在 Hb 水平超过预定的水平时会发生颜色转变, 所述水平设置为阈值, 其中高于阈值的数值指示溶血。

[0070] 若区室 5A (对于 Hb) 中观察到颜色转变, 则测试是无效的, 并且需要采用新测试。

[0071] 关于与针对 Hb 不同的检测区室, 颜色转变指示标志物的存在。关于试剂盒组合物的改编和设计解读可能的颜色转变的标准化参照量表, 各种解决办法是有可能的。依照一个例子, 试剂组合物设置为只有在标志物高于预定的浓度存在时才改变或转变颜色。另一种选项是试剂组合物设置为随浓度增加逐渐改变颜色密度, 在该情况中颜色强度与体液中存在的标志物量成比例。明显地, 有可能的是, 只有在标志物水平低于预设的限度时检测区室是无色的, 高于所述限度, 颜色会随标志物浓度而出现程度不同的强度。

[0072] 比较颜色转变强度与标准化参照量表或间隔, 由此可以测定相应标志物的水平, 并且评估缺氧风险。可以依照实际组合物的调节来设计标准化参照量表, 如本文中先前所描述的, 这意味着它可以为许多不连续的颜色部分, 优选地至少两个颜色部分的形式, 其中通过比较任何检测区室中的颜色转变与给定的颜色部分来评估标志物水平。结合图 2 和 3 更为详细地描述了标准化参照量表。

[0073] 应当理解, 根据特定测试系统的设计, 沉积于不同检测区室中的化学手段可以为干化学手段或湿化学手段形式。

[0074] 在湿化学试剂的情况中, 依照本发明的一个例示性的实施方案, 每个检测区室的试剂组合物可以放置于与每个检测区室 5A、5B 连接的位于筒 2 内的保护性泡罩包装内。在与依靠依照本发明的系统启动测试的连接中, 泡罩包装排布为破裂, 如此释放所述试剂组合物形式的内容物。如此, 引入的样品 9' 会与湿试剂组合物混合, 并且会开始反应, 倘若样品包含相应的标志物。可以手工实现所述泡罩包装的破裂, 例如依靠用户针对一次性装置 2 的表面推进, 使得筒 2 内部被压缩得足以引起整合的泡罩破裂。

[0075] 此外, 在干化学手段的情况中, 选定的试剂在检测区室内部是干的。在流体样品 9' 进入相应的区室时, 干的试剂会开始溶解, 使得可以开始反应。为了便于反应组分的再水合, 优选的是对干化学手段添加支持试剂。

[0076] 如先前所述的, 检测区室 5A-C 内的试剂组合物与标志物间的化学反应引起颜色转变, 其警示操作者以缺氧诱导的细胞损伤的风险。为了保护测试系统 1 的稳健性, 期望检

测区室 5A-C 内部发生的反应限于预定的时间跨度,从而所有测试单元是可比较。出于此原因,一次性装置 2 可以包含具有反应停止物 (reaction-stopper) 的区室 8,所述反应停止物用于在测试用户已经产生流体负压后的预定时间时中断生物标志与反应试剂间的反应。这意味着自首先将血液样品吸到滤膜 31 的点至反应停止物中断试剂与生物标志间的反应时的时间跨度总是相同的。

[0077] 如对于技术人员明显的,有可能替代反应停止物,设置定时器,并且在某个预定的时间后评估是否已经发生任何颜色变化。

[0078] 图 1A 中看出反应停止物 8 的概述的例子,其中一次性装置 2 包含如下的区室 8,其含有适合于解读酶活性的物质或化合物,例如酸性或碱性溶液,如 HCl、柠檬酸或 NaOH。此外,有可能使用各种表面活性剂或添加剂作为反应停止物,例如已经证明了十二烷基硫酸钠 (SDS) 作为反应停止物运行良好。

[0079] 依照本发明的一个实施方案,在产生负压时,反应停止物会开始经由微射流通道 81 流向检测区室 5B,其中其意图停止反应。微射流装置 81 的长度会决定反应停止物达到区室 5B 所花费的时间。在图 1A 中,微射流通道 81 是用于延长停止反应前的时间的蜿蜒样通道,然而,许多其它调节通道 81 长度的方式同样有可能。

[0080] 明显地,同样有可能排布筒 2,使得与试剂组合物混合的样品 9' 会例如经由微射流通道 81 在某个反应时间后移到排布有固定的反应停止物 8 的区室。在此类实施方案中,固定的反应 8 停止物可以为干或湿的反应停止物形式。

[0081] 图 1B 以示意方式显示了具有样品入口 4 的一次性装置 2 的透明侧视图,所述样品入口 4 为与室 6 连接的样品入口形式,所述室 6 改编为接受含有全学样品 9 的毛细管装置 7,该毛细管装置 7 排布为放置于血浆分离装置 3 上。优选地,样品入口 4 周围有漏斗样插入槽,其用于将毛细管样品收集器 7 引导入室 6。本文中进一步看到所述光学观看区 10A,其容许观察检测区室 5A-B 内部正在进行中的反应。

[0082] 在图 2A-B 中呈现了依照本发明的一次性装置 2 的例子。图 2A 是从平面顶视图看出,而图 2B 是依照图 2A 中的 IIB 的截面视图。依靠装满总计例如约 50 μ L 的全血的毛细管装置来给本文中的装置 2 供应测试血液 9。根据患者和 / 或装置 2 的特定设计 (例如检测区室的数目,通道大小等),各种量的血液样品是可想象的,并且有可能使用仅 1 μ L,或多达 100 μ L,优选的量是 25-75 μ L。

[0083] 为了便于插入样品,优选地,将样品入口 4 周围的区域凹下以将毛细管装置 7 引导入室 6 中。在图 2A 中,已经将毛细管装置 7 插入筒 2 的区室 6 中以使血液样品 9 与筒 2 形成界面,并且将血液样品 9 放置于血浆分离装置 3 的滤膜 31 上。代替毛细管装置 7,想得到的是,依靠将样品滴释放到筒 2 上的标记区域上的移液管来提供样品 9。手工产生负压,并且推进血浆通过滤膜 31,并进入血浆收集室 32,自该血浆收集室 32 它继续通过微射流通道 33,并且分布到不同检测区室 5A-C 中。如图 2B 中看到的,测试系统包含光学观看区 10B,因为每个检测区室 5B 上方的一次性装置 2 的至少部分 10A-C 是透明的,这意味着每个检测区室 5B 是可见的,并且可以在正在进行中的反应期间观察。

[0084] 依照一个实施方案,用于试剂组合物制备每个检测区室 5A-C,所述试剂组合物排布为与下列预后标志物之一起反应:Hb、LDH、天冬氨酸氨基转移酶 (AST)、丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、乳酸盐、CK、K、Mg 和 Ca。优选地,每个装置 2 包含至少两个分别用于检测 Hb 和

LDH 的检测区室 5A-B, 和任选地一个或多个用于检测 AST、ALT、乳酸盐、CK、K、Mg 和 Ca 之一或多种的检测区室。

[0085] 在预定的时间跨度后, 通过反应停止物来中断反应, 并由测试系统 1 的用途视觉检测任何颜色转变。从应用图 2A 中的血液样品到测试 2C 中的测试结果的总时间小于 5 分钟, 但是优选地在 2 分钟内。

[0086] 图 2A 呈现了已经在检测区室 5A-C 内发生可能的反应后的测试系统的平面视图。为了测定预后标志物的水平, 将每个检测区室 5A-C 中的颜色转变 (若有的话) 与标准参照间隔比较, 所述标准参照间隔优选地与测试系统一起提供。依照本发明的一个实施方案, 给紧邻每个检测区室 5A-C 的区域提供许多参照颜色 11, 由此容易实施标志物水平的评估。在这里, 检测区室 5A 排布为测定 Hb 的存在, 而 5B-C 排布为测定或评估任何其它预后标志物 (LDH、AST、ALT、乳酸盐、CK、K、Mg 或 Ca) 水平。

[0087] 例如在图 2A 中, 例示了如下的情况, 其中尚未在针对 Hb 的区室 5A 中发生颜色转变, 指示测试是无效的。已经在区室 5B 中发生反应, 其颜色转变对应给定参照颜色 11 之一, 而尚未在区室 5C 中发生明显的反应。优选地, 若颜色转变已经导致某种颜色强度, 则指示测试系统 1 的用户起反应。此类指令可以结合例如符号形式的参照间隔标记, 所述符号指示代笔缺氧风险的参照间隔的一部分。

[0088] 在图 2A 中, 区室 5B-C 的标准参照 11 具有三个颜色部分, 然而, 本领域技术人员会理解更大数目的颜色部分是有可能的, 以提高读取的分辨率, 以及有可能具有连续的颜色间隔, 替代如本文中所显示的不连续颜色部分。

[0089] 图 3 中看出可能的参照间隔 11 的又一个例子, 其中标准参照 11 仅具有两个颜色部分, 这意味着读取会仅给用户仅提供阳性或阴性答案。参照标准的此类设计在有可能预设浓度限度 (高于该浓度限度, 总是要求采取医学行动) 的医学情况中或在简单且快速的读取比定量精确测量标志物水平更重要的情况中是合适的。

[0090] 在 4A-B 中, 呈现了依照本发明的其它例子的测试系统, 其中代替具有筒式设计, 一次性装置 2 仅作为棒 (stick) 形成, 所述棒具有伸长的主体及两个相反的短侧 21, 21'。依照本例子, 具有样品入口 4 的样品入口排布于一次性装置 2 的短侧 21 (结合图 4A-B, 又称为“测试棒 2”)。

[0091] 本文中显示了测试棒 2 的两种设计。图 4A 中示意性显示的第一种测试棒 2 具有接受部分, 其具有与图 1-2 中呈现的室相似的室 6。关于测试棒 2 的室 6 的一个特定的优点在于它可以排布为接受整个毛细管装置 7, 从而一旦它被插入室 6 中, 毛细管 7 的部分无一延伸到棒 2 的外部。如此, 使用的测试棒 2 可以作为一个实体处理, 其从污染观点看是有利的, 因为使用的且含有血液的毛细管装置无一会留下未被注意的和偶然破裂的开口。

[0092] 图 4B 中示意性显示了第二测试棒 2, 并且其包含整合的毛细管成员 7, 该毛细管成员 7 自一个短的末端 21 突出, 并且与棒 2 内部的血浆分离装置 3 直接连接。如此, 可以在不需要作为分开单元处理毛细管 7 的情况中将血液样品 9 直接收集入装置 2 中。

[0093] 有益地, 本发明的方法和实施方案容许测定极其多种情况中的缺氧。例如, 本发明的实施方案包括但不限于测定新生儿中的缺氧诱导的细胞损伤, 其通过分析来自新生儿的血液, 例如通过分析自脐带提供的样品来进行。

[0094] 本发明的方法和实施方案可以进一步容许测定胃肠道 (例如, 结肠吻合)、特定器

官（例如，肝和主动脉）、来自腰引流（lumbar drain）的脑脊液、和要移植的器官中的缺氧。另外，本发明的实施方案实现评估和 / 或监测自己知的和 / 或潜在垂危（critically ill）的患者中（例如在潜在患有多器官功能障碍，例如涉及外伤、败血症、出血或广泛手术的哺乳动物中）的一种或多种器官系统的细胞泄漏，预测出生前窒息（低氧性缺血性脑病（hypoxic ischemic encephalopathy），HIE）后的脑损伤，并监测哺乳动物的周围血液循环。

[0095] 已经证明了不同预后标志物和预后标志物的组合可用于评估不同医学情况中的缺氧，如 US2008/0213744 中更为详细描述，在此将其收入本申请。

[0096] LDH 存在于所有身体组织中，并且是一般细胞损伤的理想标志物。

[0097] 然而，通过与其它标志物组合，临床现象可以甚至更清楚。在下文中提供了特定医学情况感兴趣的标志物的组合的几个例子。

[0098] LDH 与器官特异性标志物如 ALT（对肝特异性）组合。

[0099] LDH 与乳酸盐和 / 或 Mg 组合，其是低氧性事件上的更急性标志物，一般在整个生物体中或特定组织中注意。

[0100] LDH 与 AST 和 ALT 组合，它们都具有不同血浆半衰期，使该组合成为较早已经发生的低氧性事件的潜在的暂时标志物。在法医学方面，在发生回顾调查时，在新生儿受到窒息损伤时。

[0101] 下文中，呈现了缺氧是一项严重忧虑的几种医学状况，并且如此，依照本发明的测试系统会是有益的。

[0102] 在出生期间或接近出生，评估缺氧容许预测围产期窒息和 / 或出生前窒息后脑损伤（例如 HIE）。在预测的脑损伤的情况中，给新生儿童提供低温治疗，由此可以避免形成低氧性缺血性脑病（HIE）。由此提供了一种快速的且容易的鉴定有形成 HIE 危险的婴儿的方式，有时其可以挽救无数的来自脑损伤的儿童，尤其是在医学护理系统目的先进得不足以鉴定这些婴儿的国家。

[0103] 在伤员检别分类情况期间，目的是分类等待中的患者，从而大多数紧急的病例首先得到治疗。通过测量一种或多种呈现的标志物评估缺氧是一种能够分类等待室中的患者的方式。

[0104] 在一个实施方案中，在医学方法（procedure）前自感兴趣位置收集第一参照血液样品，并使用依照本发明的测试系统来分析预后标志物。在完成医学方法前，可以自感兴趣的点获得第二血液样品，并以与初始样品相同的方式分析。可以比较第一和第二样品中预后标志物的测定以评估缺氧诱导的细胞损伤的存在。在先前的实施方案中，分析了多种预后标志物。

[0105] 此类实施方案包括测定参照和最终的血液样品两者中的至少 Hb 和 LDH 的量，和任选地一种或多种别的预后标志物的量，所述预后标志物选自基本上由 K, Mg, Ca, AST, ALT, CK 和乳酸盐组成的组。因而，可以比较第一和第二样品中的每种预后标志物的相应量以鉴定吻合的正确位置。在一个实施方案中，医学方法包括胃肠道的吻合。

[0106] 在另一方面，本发明的实施方案可以降低移植疗法后的患者中的发病率和死亡率。影响移植后的患者中的患病率和死亡率的关键因素之一涉及移植物，诸如肝移植中肝移植物的保存损伤（preservation injury）。例如，对灌注液的 LDH、AST 和 ALT 泄露是丧

失干细胞膜完整性的指征。

[0107] 在一个此类实施方案中,用于测定要移植入有此需要的哺乳动物中的器官中缺氧诱导的细胞损伤的存在的方法可以提供血液样品,并如上文所描述的,在移植手术前对样品分析预后标志物。在一个实施方案中,分析样品以测定 Hb 存在和 LDH 总量及样品中的至少一种别的预后标志物,其选自基本上由 K、Mg、Ca、AST、ALT、CK 和乳酸盐组成的组。在一个优选的实施方案中,移植的器官包括肝。

[0108] 在又一方面,可以使用本发明的实施方案来评估医学或手术治疗之前和之后的哺乳动物肢的状态。例如,损伤、骨折和血管阻塞可以影响对周围的肢和肌肉的循环(例如间隔综合征(compartment syndrome))。也呈现于 US2008/0213744 中,存在着缺血性肌肉中的氧与乳酸盐和 LDH 水平间的显著关联,并且与对照值相比,乳酸盐在周围动脉闭塞疾病患者中的股动脉血液中是升高。依照本发明的实施方案的装置使得有可能使用酶和乳酸盐水平来诊断特定肢的缺血,并且还评估大多数治疗的效果。

[0109] 另外,本发明的实施方案包括用于测定缺氧-缺血的方法,其通过分析来自感兴趣的肢的样品,并测定血浆中的 LDH 总量。还可以在手术期间使用所述装置来评估对肢的截肢术期间存活组织的边界。可以在测定 LDH 同时量化其它预后标志物。这容许在医学或手术处理之前和之后评估对哺乳动物肢的血液循环。

[0110] 本发明的实施方案包括用于在床边测定缺氧诱导的细胞损伤的装置和方法,其中至多在大约几分钟里可获得结果。此类实施方案包括获得用于分析的样品,并测定 Hb 和 LDH。在优选的实施方案中,方法包括测定血浆中选自基本上由 AST、ALT 和乳酸盐组成的组的至少一种别的预后标志物的量。

[0111] 通过以下非限制性实施例 1-6 进一步描述分别针对 LDH 和 Hb 的试剂组合物,其中 1-4 涉及检测 LDH,而 5-6 涉及检测 Hb。

[0112] 实施例 1

[0113] 分别将四唑盐硝基蓝四唑(NBT)、2-对-碘苯基-3-对-硝基苯-5-苯基氯化四唑(INT)和 3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-5-(3-羧基甲氧基苯基)-2-(4-磺苯基)-2H-四唑盐(MTS)在二甲基亚砷中溶解,生成 10mM 储备溶液。分别将介质吩嗪硫酸甲酯(phenazine methosulphate, PMS)和 1-甲氧基-5-甲基吩嗪硫酸甲酯(mPMS)在水中溶解,生成 1mM 储备溶液。将 NAD 的储备溶液在缓冲液中制备。将乳酸钠在水中溶解,并用 1M tris 将 pH 调节至约 9。

[0114] 使用对照血清(分别为 2.2 和 4.7 μ katal/l)和来自同事(co-worker)的血液样品。

[0115] 用分离器(Vacurette, Greiner)和钾-EDTA 管(Vacurette, Greiner)将血液样品在 Li-肝素管中收集。将管以 1500xg 离心 15 分钟,并将血样转移至 Eppendorf 管中。

[0116] 在视觉检查外,使用塑料 1ml 比色皿使用 Shimadzu UV-VIS 1610 分光光度计使用常规的分光光度计来实施酶测定法。依照表 1 制备反应混合物,并通过添加 50 μ l NAD 来启动反应。

[0117] 表 1:反应混合物

[0118]

缓冲液Tris/HCl	800 μ l
四唑储液(10mM)	50 μ l
介质储液(1 mM)	50 μ l
乳酸盐储液(0.8M)	50 μ l
样品(血浆或对照血清)	200 μ l
NAD ⁺	50 μ l

[0119] 结果

[0120] 在反应后, NBT 出现暗蓝色, INT 出现紫色, 而 MTS 出现微红的褐色, 在反应某个时间后产生颜色转变。

[0121] 实施例 2

[0122] 在视觉检查外, 使用 96 孔板使用来自 Emax Molecular Devices 的 ELISA 读板仪来实施测定法。使用 96 孔板的底部作为测量的光学表面, 并且每个孔可以含有多至 400 μ l 液体。吸光度会随孔中的溶液深度而有所变化。此实验中使用的板来自 NUNC (高结合能力)。

[0123] 分别将四唑盐硝基蓝四唑 (NBT)、2-对-碘苯基-3-对-硝基苯-5-苯基氯化四唑 (INT) 和 3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-5-(3-羧基甲氧基苯基)-2-(4-磺苯基)-2H-四唑盐 (MTS) 在二甲基亚砷中溶解, 生成 10mM 储备溶液。分别将介质吩嗪硫酸甲酯 (PMS) 和 1-甲氧基-5-甲基吩嗪硫酸甲酯 (mPMS) 在水中溶解, 生成 1mM 储备溶液。将 NAD 的储备溶液在缓冲液中制备。将乳酸钠在水中溶解, 并用 1M tris 将 pH 调节至约 9。

[0124] 使用对照血清 (分别为 2.2 和 4.7 μ katal/l) 和来自同事的血液样品。

[0125] 用分离器 (Vacuette, Greiner) 和钾-EDTA 管 (Vacuette, Greiner) 将血液样品在 Li-肝素管中收集。将管以 1500xg 离心 15 分钟, 并将血样转移至 Eppendorf 管中。

[0126] 分别在总体积 100 和 50 μ l 中完成酶活性的测量。

[0127] 表 2: 100 μ l 反应体积的反应混合物:

[0128]

缓冲液Tris/HCl	5 μ l
四唑储液(10 mM)	5 μ l
介质(1mM)	5 μ l
乳酸盐储液(0.8 M)	5 μ l
样品	75 μ l
NAD ⁺	5 μ l

[0129] 在使用血液样品时也以稀释物 (as diluted) 测试样品, 对应于小于 20 μ l 血浆。

[0130] 表 2: 50 μ l 反应体积的反应混合物:

[0131] 样品 37.5 μ l

[0132] 反应混合物 12.5 μ l

[0133] 在使用血液样品时也以稀释物 (as diluted) 测试样品, 对应于小于 10 μ l 血浆。

[0134] 反应混合物: 在添加至样品前混合等体积的四唑盐储备溶液、介质储备溶液、乳酸盐和 NAD⁺ 储备溶液。

[0135] 结果

[0136] 对所有四唑盐染料成功观察到颜色转变。

[0137] NBT 完全适合于视觉检测 LDH 活性。PMS 和 mPMS 两者都可以充当介质,然而,mPMS 是优选的,因为它对光化分解不太灵敏。足够令人惊讶地,实施例显示了甚至低于 10 μ L 的小体积足以给出视觉检测可接受的颜色转变。

[0138] 实施例 3

[0139] 以下实施例 3 涉及用于评估血浆样品中的 LDH 存在的湿试剂组合物。

[0140] 将四唑盐硝基蓝四唑 (NBT) 在二甲基亚砷中溶解,生成 10mM 储备溶液。分别将介质 1- 甲氧基 -5- 甲基吩嗪硫酸甲酯 (mPMS) 在水中溶解,生成 1mM 储备溶液。将 NAD^+ 的储备溶液在缓冲液中制备。将乳酸钠在水中溶解。将 N- 甲基 -D- 葡萄糖胺在水中溶解 (1M),并用 HCl 将 pH 调节至 10。

[0141] 使用对照血清 (分别为 2.2 和 4.7 μ katal/l) 和来自同事的血液样品。

[0142] 用分离器 (Vacuette, Greiner) 和钾 -EDTA 管 (Vacuette, Greiner) 将血液样品在 Li- 肝素管中收集。将管以 1500xg 离心 15 分钟,并将血样转移至 Eppendorf 管中。

[0143] 反应混合物:在添加至样品前混合等体积的四唑盐储备溶液,介质储备溶液、乳酸盐和 NAD^+ 储液。

[0144] 在 80 μ l 反应混合物和 20 μ l 样品的 100 μ l 总体积中完成酶活性测量。

[0145] 结果

[0146] 成功观察到颜色转变。在视觉上及用分光光度法检测颜色变化。

[0147] 实施例 4

[0148] 以下实施例 4 涉及用于评估血浆样品中的 LDH 存在的干试剂组合物。

[0149] 制备依照表 4 的装备溶液。

[0150] 表 4:反应混合物

[0151] NBT (10mM)

[0152] mPMS (2.5mM)

[0153] NAD (50mM)

[0154] L- 乳酸盐 (5M)

[0155] NMG (2M)

[0156] 使用储备溶液,将 NMG (0.61ml)、NAD (0.467ml)、L- 乳酸盐 (0.440ml)、NBT (1.21ml) 和 mPMS (0.997ml) 混合,并到塑料片上干燥。

[0157] 干燥后,将 5 μ L 掺入 LDH 的血浆应用于干点上,并容许反应进行 2 分钟。用 2M HCl 停止反应。

[0158] 结果

[0159] 清楚地观察到高的和低的 LDH 水平间的颜色描绘。

[0160] 实施例 5

[0161] 以下实施例 5 涉及用于评估血浆中的 Hb 的湿试剂组合物。

[0162] 如下制备试剂溶液。分别将生色化合物 N, N, N', N' - 四甲基联苯胺 (TMB) 和 3, 3' - 二氨基联苯胺 (DAB) 在二甲基亚砷中或者直接在缓冲液溶液 (磷酸盐 - 柠檬酸盐缓冲液) 中溶解。分别将底物过氧化氢和叔 - 丁基过氧化氢 (T-hydro) 在相应的生色化合物

溶液中溶解。将 pH 在范围 4-7 中调节。

[0163] 混合体积 90 μ l 试剂溶液和 10 μ l 血浆（样品）来反应。

[0164] 结果

[0165] 对每种相应的试剂溶液成功显现颜色。TMB 将颜色从透明的黄色（不存在 Hb）转变为绿色（存在 Hb）。DAB 将颜色从透明（不存在 Hb）转变为褐色（存在 Hb）。在视觉上及用分光光度法检测颜色变化。

[0166] 实施例 6

[0167] 以下实施例 6 涉及用于评估血浆中的 Hb 的干试剂组合物。

[0168] 将由 TMB、过氧化氢和缓冲液（pH 5.5）组成的试剂混合物到塑料片上干燥，并通过 10 μ l 含有掺入水平的 Hb 的血浆样品再水合。再水合后，TMB 的浓度是 0.2mg/ml，过氧化氢的浓度是 0.04%，而缓冲液的浓度是 50mM。

[0169] 结果

[0170] 来自运行的颜色显现显示了具有不同浓度 Hb 的样品的良好描绘，在较高浓度的 Hb 具有升高的颜色强度。

[0171] 技术人员认识到，可以在不背离上述说明书的前提下在不使用发明性技术的情况下实施许多修饰，例如使用玻璃或一些其它合适的材料替换塑料等。此外，依靠可见光谱内的分光光度方法来分析测试结果（颜色转变）在本发明的范围内。

[0172] 具有前述说明书和附图中呈现的教导的益处，本文中所列的本发明的许多修饰和其它实施方案会提示本发明所属领域技术人员。因此，应当理解，本发明不应限于所公开的具体实施方案，而且修饰和其它实施方案意图包括在所附权利要求书的范围内。虽然本文中采用具体的术语，但是它们仅以通用且描述性的意义，而不出于限制目的使用。

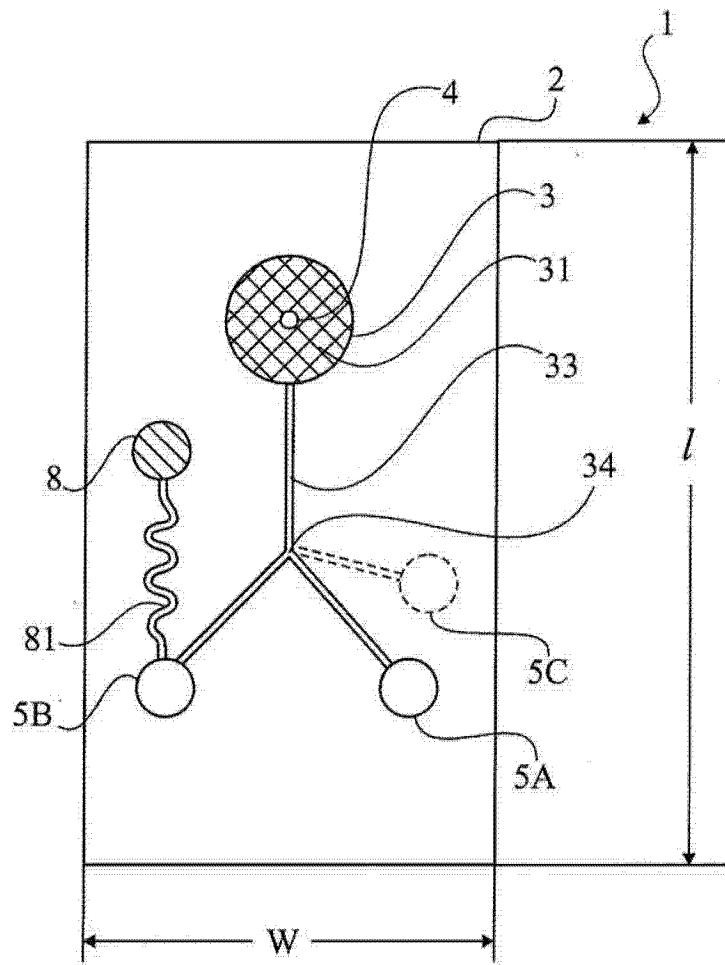


图 1A

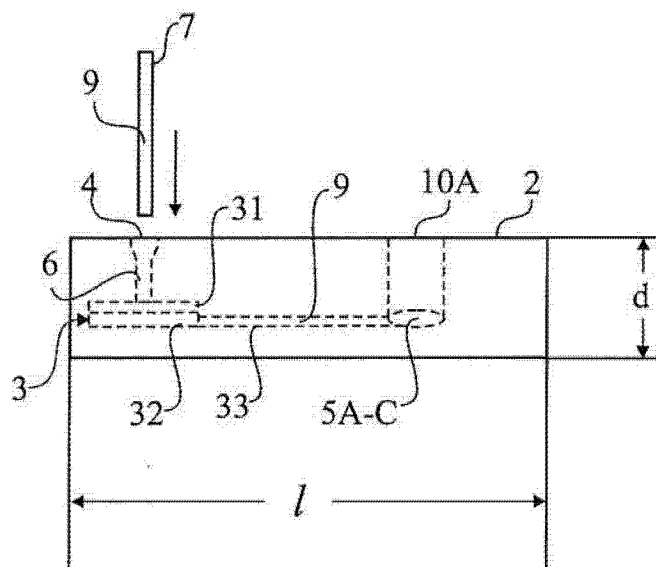


图 1B

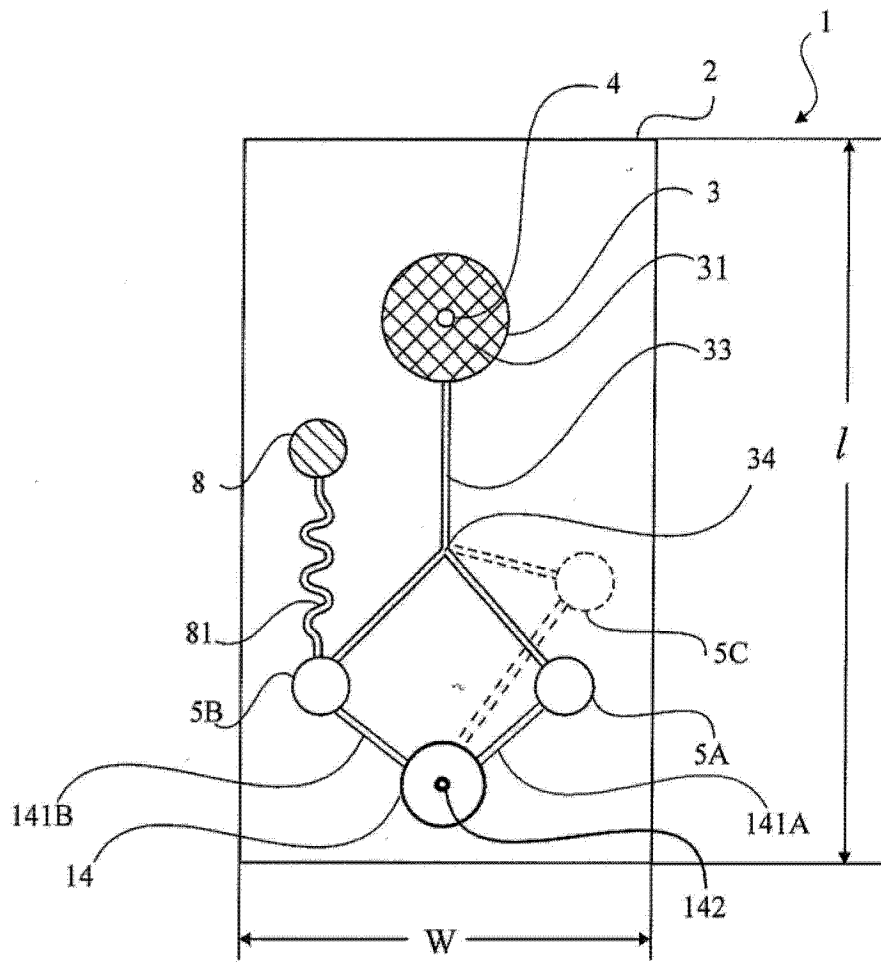


图 1C

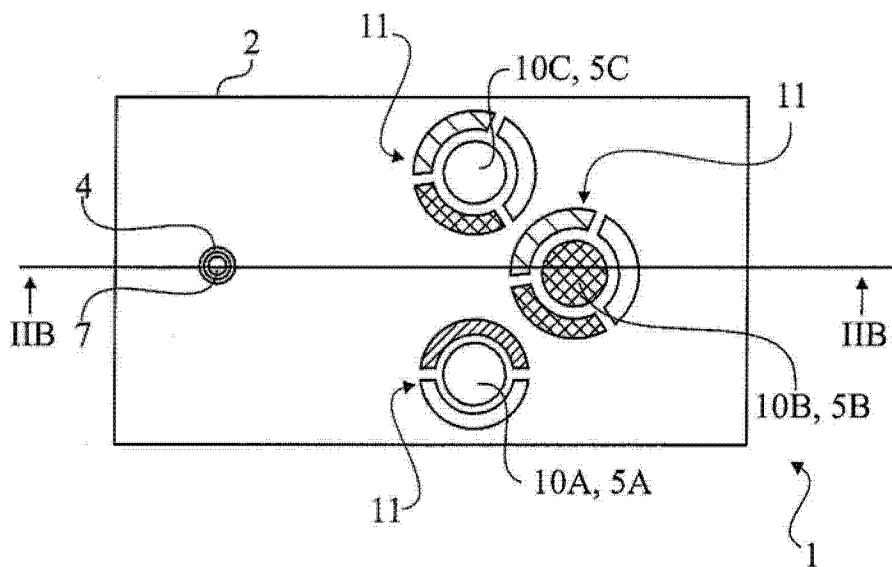


图 2A

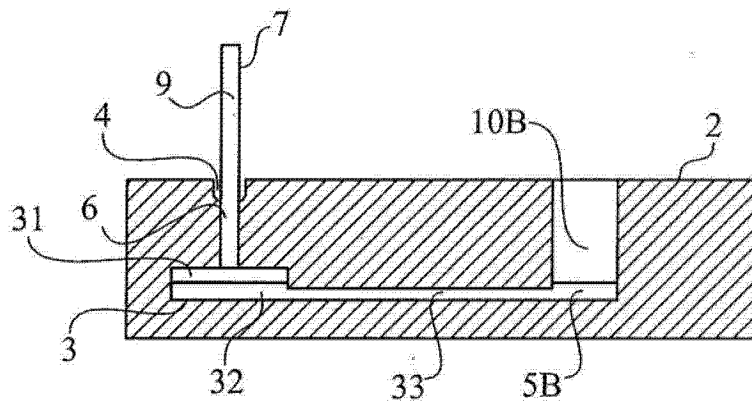


图 2B

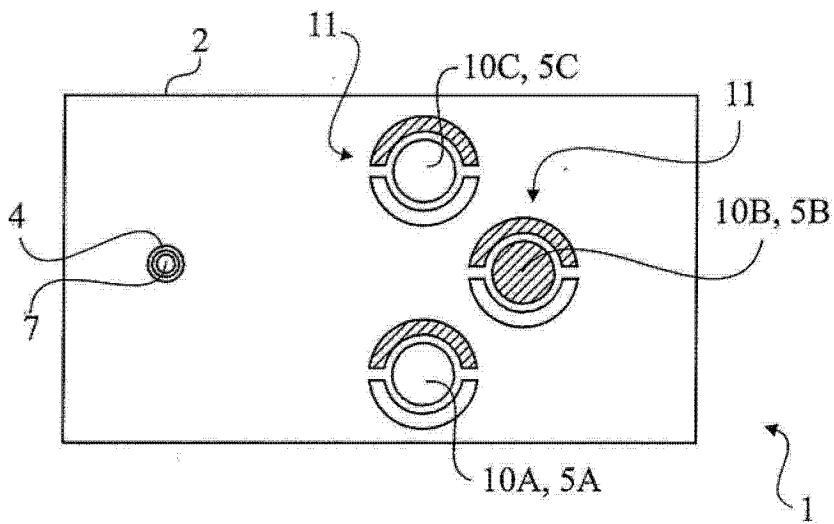


图 3

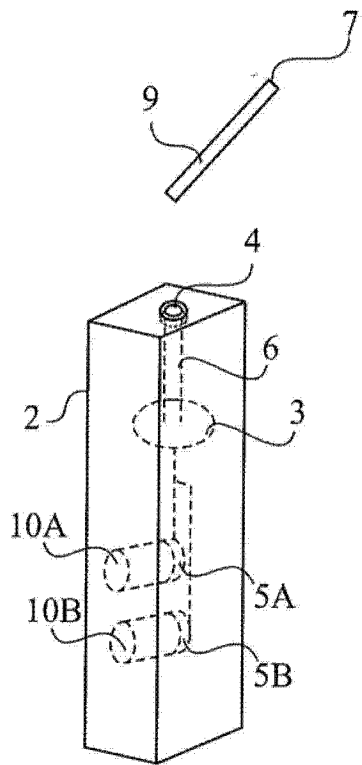


图 4A

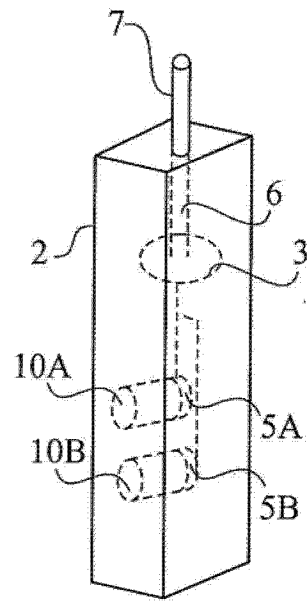


图 4B