



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103197064 B

(45) 授权公告日 2015. 08. 26

(21) 申请号 201310053649. 5

(22) 申请日 2007. 05. 10

(30) 优先权数据

60/799, 442 2006. 05. 10 US

60/800, 939 2006. 05. 16 US

11/746, 535 2007. 05. 09 US

(62) 分案原申请数据

200780016504. 0 2007. 05. 10

(73) 专利权人 赛拉诺斯股份有限公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 E·A·霍姆斯 I·吉博恩斯

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公
司 31100

代理人 韦东

(51) Int. Cl.

G01N 33/569(2006. 01)

G01N 33/68(2006. 01)

(56) 对比文件

WO 2005031355 A1, 2005. 04. 07,

CN 1905835 A, 2007. 01. 31,

US 2002055094 A1, 2002. 05. 09,

张凤梅. 甲型H1N1流感病毒携带者不发病会

传染吗. 《甲型H1N1流感防治手册》. 中国经济出版社, 2009, 38.

Yan Xiaomi et al. Multiplexed Flow Cytometric Immunoassay for Influenza Virus Detection and Differentiation. 《Analytical Chemistry》. 2005, 第 77 卷 (第 23 期),

Lee L James et al. Microfluidic enzyme-linked immunosorbent assay technology. 《Advances in clinical Chemistry》. 2006, 第 42 卷

审查员 李进进

权利要求书4页 说明书21页 附图13页

(54) 发明名称

流感病毒的实时检测

(57) 摘要

本发明涉及流感病毒的实时检测, 提供用于检测指示体液样品中流感病毒感染的分析物的系统和方法。本发明还提供检测多种分析物的系统和方法, 其中至少两种分析物指示体液样品中的流感病毒感染。

1. 第一免疫检测反应物和第二免疫检测反应物在制备用于检测对象体液中的流感病毒颗粒的药筒中的用途,其中,该检测包括:

a) 使怀疑含有所述流感病毒颗粒的所述体液的样品与第一免疫检测反应物和第二免疫检测反应物反应,所述第一免疫检测反应物和第二免疫检测反应物被包含在药筒的免疫检测组件中,其中所述第一免疫检测反应物与血凝素分子结合在所述流感病毒颗粒上形成第一免疫复合物,其中所述第二免疫检测反应物与神经氨酸酶分子结合在所述流感病毒颗粒上形成第二免疫复合物,所述免疫复合物产生一种或多种可检测的信号,指示所述血凝素和神经氨酸酶在所述流感病毒颗粒上同时存在,其中所述第一免疫检测反应物或所述第二免疫检测反应物被固定在固体支持物上;和

b) 检测来自所述免疫复合物的所述一种或多种可检测的信号,其中所述血凝素和神经氨酸酶的同时存在指示存在所述流感病毒颗粒。

2. 权利要求 1 所述的用途,其中所述体液样品小于 500 微升。

3. 权利要求 1 所述的用途,其中所述血凝素和神经氨酸酶的检测指示 A 型流感病毒感染。

4. 权利要求 1 所述的用途,其中所述血凝素选自以下组:H1、H2、H3、H4、H5、H6、H7、H8、H9、H10、H11、H12、H13、H14、H15 和 H16,所述神经氨酸酶选自以下组:N1、N2、N3、N4 和 N5。

5. 权利要求 1 所述的用途,其中所述血凝素是 H5,所述神经氨酸酶是 N1。

6. 权利要求 1 所述的用途,其中所述对象是动物。

7. 权利要求 6 所述的用途,其中所述对象是人或禽类。

8. 权利要求 1 所述的用途,其中所述药筒包含至少一个样品收集单元、包含所述免疫检测反应物的免疫检测组件、和与所述样品收集单元和 / 或所述检测组件流体连通的多个通道。

9. 权利要求 1 所述的用途,还包括驱动所述药筒,并在所述药筒内引导所述免疫检测反应物。

10. 权利要求 1 所述的用途,其中根据外部设备传递的方案,所述怀疑包含所述流感病毒颗粒的体液样品与所述免疫检测组件中包含的所述免疫检测反应物反应。

11. 权利要求 1 所述的用途,还包括传递所述检测到的信号至外部设备的步骤。

12. 权利要求 1 所述的用途,其中所述药筒包括在所述样品收集单元和所述免疫检测组件之间提供流体连通的多个通道。

13. 权利要求 10 所述的用途,其中所述外部设备是服务器。

14. 权利要求 10 所述的用途,其中所述方案从所述外部设备被无线传递。

15. 免疫检测反应物在制备检测人类对象体液样品中的多种分析物的药筒中的用途,其中至少一种分析物指示所述体液样品中的流感病毒感染,并且其中至少一种分析物是所述体液样品中的生物标志物,该生物标志物指示所述病毒感染给人体施加的压力或指示身体对所述感染的反应,该检测包括:

a) 使得怀疑含有所述分析物的所述体液的样品与包含在药筒的免疫检测组件中的免疫检测反应物反应,以产生一种或多种可检测的信号,所述信号指示所述样品中所述分析物的存在;和

b) 检测所述一种或多种可检测的信号。

16. 免疫检测反应物在制备检测同时存在于流感病毒颗粒上的表面糖蛋白分析物的组合的免疫检测组件中的用途,其中所述组合中的至少一种糖蛋白分析物是血凝素,并且所述组合中的至少另一种糖蛋白分析物是神经氨酸酶,其中所述表面糖蛋白的组合指示对象体液中所述流感病毒颗粒的感染,该检测包括:

a) 提供一种流体装置,该装置包括至少一个样品收集单元、一个含有免疫检测反应物的免疫检测组件、与所述样品收集单元和 / 或所述免疫检测组件流体连通的多个通道;

b) 驱动所述流体装置,并在所述流体装置内引导所述免疫检测试剂;

c) 使得怀疑含有所述分析物的体液样品与包含在所述免疫检测组件中的所述免疫检测反应物反应,以产生一种或多种可检测的信号,所述信号指示所述样品中流感病毒颗粒上的分析物组合的同时存在;和

d) 检测来自所述体液样品中所述流感病毒颗粒上的多种分析物的组合的所述可检测的一种或多种信号。

17. 权利要求 16 所述的用途,其中所述体液样品小于 500 微升。

18. 权利要求 17 所述的用途,其中所述病毒类型、分析物、糖蛋白、血凝素、神经氨酸酶和抗体如权利要求 3 或 5 所述。

19. 权利要求 16 所述的用途,还包括检测至少一种分析物,所述分析物是所述体液样品中指示所述病毒感染给人体施加的压力的生物标志物,其中所述生物标记物包含 CRP、TNF α 或白介素。

20. 第一抗体和第二抗体在制备检测怀疑含有 A 型流感病毒颗粒的体液样品中该病毒颗粒的免疫检测组件中的用途,该检测包含:

a) 提供一种免疫检测组件,其中该组件包含与第一抗原特异性结合的第一抗体,其中所述第一抗体与该组件的表面结合;

b) 在包含与第二抗原特异性结合的第二抗体的免疫检测反应物的存在下,使所述免疫检测组件中的所述体液样品反应,其中所述第二抗原与所述第一抗原不同,其中所述第二抗体标记有可检测的标记,其中所述第一抗原包含血凝素并且所述第二抗原包含神经氨酸酶或者所述第一抗原包含神经氨酸酶并且所述第二抗原包含血凝素,并且其中所述反应生成免疫复合物,该免疫复合物包含与所述第一抗原结合的所述第一抗体以及与所述第二抗原结合的所述第二抗体;

c) 洗涤所述组件,以去除过量的免疫检测反应物;和

d) 检测来自所述免疫复合物的所述可检测的标记物所产生的信号,从而指示所述颗粒的存在。

21. 权利要求 20 所述的用途,其中所述血凝素选自以下组:H1、H2、H3、H4、H5、H6、H7、H8、H9、H10、H11、H12、H13、H14、H15 和 H16,所述神经氨酸酶选自以下组:N1、N2、N3、N4 和 N5。

22. 权利要求 20 所述的用途,其中所述血凝素是 H5,所述神经氨酸酶是 N1。

23. 权利要求 20 所述的用途,其中所述血凝素是 H1,所述神经氨酸酶是 N1。

24. 一种药筒,其包含多种免疫检测反应物,其中至少两种免疫检测反应物能与对象体液中流感病毒颗粒上存在的不同分析物结合,其中所述不同分析物是该流感感染亚型的指示物,其中,所述不同的分析物中的至少一种是选自血凝素 1、血凝素 2、血凝素 3、血凝素 4、

血凝素 5、血凝素 6、血凝素 7、血凝素 8、血凝素 9、血凝素 10、血凝素 11、血凝素 12、血凝素 13、血凝素 14、血凝素 15 和血凝素 16 的血凝素 ; 和所述不同的分析物中的至少另一种是选自神经氨酸酶 1、神经氨酸酶 2、神经氨酸酶 3、神经氨酸酶 4 和神经氨酸酶 5 的神经氨酸酶 ; 其中, 所述药筒适于使所述体液与所述多种反应物反应, 产生一种或多种可检测的信号, 所述信号指示所述不同分析物同时在所述体液中的所述流感病毒颗粒上存在, 并且所述药筒包括标识符。

25. 权利要求 24 所述的药筒, 其中所述药筒还包括样品收集单元和包含所述反应物的试验组件。

26. 权利要求 25 所述的药筒, 其中所述试验组件包括免疫检测组件。

27. 权利要求 24 所述的药筒, 其中所述对象是人。

28. 权利要求 24 所述的药筒, 其中所述对象是动物。

29. 权利要求 28 所述的药筒, 其中所述动物是家禽。

30. 权利要求 24 所述的药筒, 其中所述标识符是条形码。

31. 权利要求 30 所述的药筒, 其中所述标识符适于被读取组件来读取。

32. 权利要求 31 所述的药筒, 其中所述标识符被构建成, 当被所述读取组件读取时, 所述标识符提供获取医疗记录或对象历史、临床试验记录、或临床前期试验记录的途径。

33. 权利要求 31 所述的药筒, 其中所述标识符被构建成响应所述标识符触发从外部装置传递方案, 其中所述方案随后实现所述药筒中的反应以产生所述一种或多种可检测的信号。

34. 一种检测多种分析物的系统, 其中所述分析物包含指示对象体液中流感病毒的存在血凝素和神经氨酸酶, 该系统包括

a) 一个药筒, 其中所述药筒包括免疫检测组件和标识符, 其中所述药筒被构建成使体液样品与第一免疫检测反应物和第二免疫检测反应物反应, 所述第一免疫检测反应物和第二免疫检测反应物被包含在所述免疫检测组件中, 其中所述免疫检测反应物中的一种与所述血凝素结合, 所述免疫检测反应物中的另一种与所述神经氨酸酶结合, 产生一种或多种信号, 所述信号指示所述流感病毒上所述血凝素和神经氨酸酶二者的存在 ;

b) 一个读取组件, 该组件包括用于检测所述一种或多种可检测信号的检测组件 ; 和

c) 通信组件, 用于将所述检测到的信号传递至外部设备, 其中所述外部设备被构建成响应于所述药筒上的所述标识符而传递免疫检测方案。

35. 权利要求 34 的系统, 其中所述血凝素选自以下组 : H1、H2、H3、H4、H5、H6、H7、H8、H9、H10、H11、H12、H13、H14、H15 和 H16, 所述神经氨酸酶选自以下组 : N1、N2、N3、N4 和 N5。

36. 权利要求 35 的系统, 其中所述血凝素是 H5, 所述神经氨酸酶是 N1。

37. 权利要求 34 的系统, 其中所述体液样品小于 500 微升。

38. 权利要求 34 的系统, 其中所述标识符是条形码。

39. 权利要求 38 的系统, 其中所述读取组件被构建成读取所述标识符。

40. 权利要求 39 的系统, 其中所述标识符被构建成, 当被所述读取组件读取时, 所述标识符提供获取医疗记录、对象历史、临床试验记录、或临床前期试验记录的途径。

41. 权利要求 34 的系统, 其中所述药筒包含样品收集单元、和与所述样品收集单元和所述免疫检测组件流体连通的至少一个通道。

42. 权利要求 34 的系统,其中所述免疫检测方案从所述外部设备被无线传递。

43. 一种反应混合物,其包含多种免疫检测反应物,其中至少两种与来自对象的体液内的流感病毒颗粒上存在的不同分析物结合,其中所述不同分析物指示流感感染的亚型,其中所述不同分析物中的至少一种是选自以下组的血凝素:血凝素 1,血凝素 2,血凝素 3,血凝素 4,血凝素 5,血凝素 6,血凝素 7,血凝素 8,血凝素 9,血凝素 10,血凝素 11,血凝素 12,血凝素 13,血凝素 14,血凝素 15,血凝素 16,并且所述不同分析物中的至少另一种是选自以下组的神经氨酸酶:神经氨酸酶 1,神经氨酸酶 2,神经氨酸酶 3,神经氨酸酶 4 和神经氨酸酶 5,并且当所述体液与所述多种反应物反应时,适于产生一种或多种可检测的信号,所述信号指示所述体液中所述流感病毒颗粒上所述不同分析物的同时存在。

44. 权利要求 43 的反应混合物,其中所述血凝素是血凝素 5,所述神经氨酸酶是神经氨酸酶 1。

45. 权利要求 43 的反应混合物,其中所述分析物指示 A 型流感病毒感染。

46. 权利要求 43 的反应混合物,其中所述分析物指示 B 型流感病毒感染。

47. 权利要求 43 的反应混合物,其中所述分析物指示 C 型流感病毒感染。

48. 权利要求 43 的反应混合物,其中所述对象是人。

49. 权利要求 43 的反应混合物,其中所述对象是动物。

50. 权利要求 49 的反应混合物,其中所述动物是禽类。

流感病毒的实时检测

[0001] 本发明专利申请是国际申请号为 PCT/US2007/068665, 国际申请日为 2007 年 5 月 10 日、进入中国国家阶段的申请号为 200780016504.0、名称为“流感病毒的实时检测”的发明申请的分案申请。

[0002] 交叉引用

[0003] 本发明申请优先权属于 2006 年 5 月 10 日提交的美国临时专利申请 No. 60/799,442 和 2006 年 5 月 16 日提交的美国临时专利申请 No. 60/800,939。基于所有目的,两者所有内容以引用的方式纳入本文。本发明申请涉及 2006 年 3 月 24 日提交的申请序列号 No. 11/389,409,其全文内容以引用的方式纳入本文。

技术领域

[0004] 本发明涉及流感病毒的实时检测。

背景技术

[0005] 流感(“flu”)是一种能够侵犯大量宿主,包括鸟类和哺乳动物的感染性疾病。流感是由正粘病毒科家族的 RNA 病毒(通常包括 A、B 和 C 型流感病毒)所致。鸟类流感是该家族适应于鸟类的一种病毒所致,因此其也被称为禽流感。目前在亚洲和欧洲受到源于 A 型流感病毒 H5N1 株的空前爆发的大流行的威胁。该病毒株有变异和自适应于包括鸟和人类等多种宿主的能力。国土安全理事会针对当前大流行的威胁在 2005 年 11 月发布了“流感大流行的国家策略”(简称“策略”)。其中首要关注一个重要部分是患者和鸟类禽流感的快速识别。策略寻求改进禽流感的监控和检测。

[0006] 截至 2005 年 11 月,已知导致禽流感大流行威胁的病毒已在四个国家感染 121 人,在过去两年中导致 62 人死亡。感染 H5N1 的人几乎都与感染的鸟类发生过身体接触。尽管目前未显示病毒具有在人与人之间有效传播的能力,从每年人流感病毒流行来看,对病毒通过遗传突变或与人流感病毒基因物质交换而获得此种能力的担忧与日俱增。

[0007] 仅在美国流感每年就导致约 36,000 人死亡和 200,000 人以上住院治疗,每年花费美国超过 100 亿美元。此外,最近的三次大流行,在 1918 年、1957 年和 1968 年,在全世界分别致死 4 千万、2 百万和 1 百万人。

[0008] 为了控制疾病蔓延,迫切需要可以准确、快速检测禽流感病毒存在的装置和方法,以提供大流行的早期预警。理想的系统将能够(1)从该装置收集、传递和分析数据;以及(2)为卫生机构和政府机关提供实时预警系统。本发明能满足此要求并具有相关的优点。

发明内容

[0009] 本发明提供检测受试者体液中指示流感病毒感染的分析物的系统。该系统通常包括 a) 流体装置,所述流体装置包含样品收集单元和试验组件,所述样品收集单元使被怀疑包含所述分析物的体液样品与置于所述试验组件中的反应物反应以产生可检测的信号,该信号可指示所述分析物的存在;b) 读取组件,包含用于检测所述可测信号的检测组件;和

c) 通信组件, 用于传递所述检测到的信号至所述外部设备。该系统能够检测 A、B 和 / 或 C 型流感病毒感染。通常, 分析物可包括流感病毒的表面糖蛋白, 其可以是血凝素 (如 H1、H2、H3、H4、H5、H6、H7、H8、H9、H10、H11、H12、H13、H14 和 H16) 和 / 或神经氨酸酶 (如 N1、N2、N3、N4 和 N5)。体液可取自选自下组的对象, 包括: 人, 家禽或野生鸟。

[0010] 本发明还提供检测多种分析物的系统, 其中至少两种指示对象体液内流感病毒感染。该系统通常包括 a) 流体装置, 所述流体装置包含样品收集单元和试验组件, 所述样品收集单元使被怀疑包含所述多种分析物的体液样品与置于所述试验组件中的反应物反应以产生一种或多种可检测的信号, 该信号可指示所述至少两种分析物的存在; b) 读取组件, 包含用于检测所述一种或多种可测信号的检测组件; 和 c) 通信组件, 用于传递所述检测到的信号至所述外部设备。

[0011] 本发明还包括使用本发明系统的方法。在一方面, 本发明提供检测对象体液中指示流感感染的分析物的方法。该方法涉及以下步骤: a) 提供本发明系统; b) 使体液样品与置于所述试验组件中的反应物反应以产生一可检测的信号, 该信号可指示所述分析物的存在; c) 检测所述可检测信号。在另一方面, 本发明包括步骤: a) 提供流体装置, 包含至少一个样品收集单元, 容纳免疫检测试剂的免疫检测组件, 与所述样品收集单元和 / 或所述免疫检测组件液体连通的多个通道; b) 启动所述流体装置并在所述流体装置中引导所述免疫检测; c) 使疑为含有所述分析物的体液样品与容纳在所述免疫检测组件中的免疫检测试剂反应以产生指示所述样品中存在指示流感病毒感染的分析物的可检测信号; 和 d) 检测来自收集在所述体液样品中的分析物产生的所述可检测信号。如果需要, 用于这种检测的所需体液样品少于 500 微升。可检测多种流感病毒感染。包括但不限于 A、B 和 C 型流感病毒感染。

[0012] 本发明还提供检测多种分析物的方法, 其中至少两种指示对象体液内流感病毒感染。该方法包括以下步骤: a) 提供流体装置, 包含至少一个样品收集单元, 含有免疫检测试剂的免疫检测组件, 与所述样品收集单元和 / 或所述免疫检测组件液体连通的多个通道; b) 启动所述流体装置并在所述流体装置中引导所述免疫检测试剂; c) 使疑为含有所述多种分析物的体液样品与所述容纳在所述免疫检测组件中的免疫检测试剂反应以产生指示所述样品中存在指示流感病毒感染的所述至少两种分析物的一种或多种可检测信号; 和 d) 检测来自收集在所述体液样品中的多种分析物产生的所述一种或多种可检测信号。

[0013] 本发明还提供用于检测流感病毒感染的类型的流体装置。该流体装置包括含有多种反应物的药筒, 其中至少两种与对象体液内存在的不同分析物反应, 其中所述不同分析物指示流感感染的类型。一方面, 至少两种反应物中每一种与流感病毒不同的表面糖蛋白结合。这些不同的表面糖蛋白可以是选自血凝素和神经氨酸酶中的一员。以下表面糖蛋白中的任何两种可以是至少两种反应物的靶分析物: 血凝素 1, 血凝素 2, 血凝素 3, 血凝素 4, 血凝素 5, 血凝素 6, 血凝素 7, 血凝素 8, 血凝素 9, 血凝素 10, 血凝素 11, 血凝素 12, 血凝素 13, 血凝素 14, 血凝素 15, 血凝素 16, 神经氨酸酶 1, 神经氨酸酶 2, 神经氨酸酶 3, 神经氨酸酶 4 和神经氨酸酶 5。在优选实施方式中, 至少两种反应物之一与血凝素 5 结合, 另一个与神经氨酸酶 1 结合。如果需要, 药筒还可包括样品收集单元和试验组件。在一些方面, 试验组件是包括免疫反应物的免疫检测组件。

[0014] 参考内容

[0015] 本说明书中提及的所有出版物和专利申请都以引用的方式纳入本文，引用的程度与将所述出版物和专利申请具体和独立的内容单独引用到本文中相同。

附图说明

[0016] 本发明的新颖特征具体在所附权利要求中阐述。通过参照以下详细描述和示例性实施方式、本发明使用的原理和附图可更好理解本发明特征和优点：

[0017] 图 1 是显示本系统多个部件的一个实施方式。

[0018] 图 2 显示示例流体装置在组装前的不同层面。

[0019] 图 3 和 4 说明示例流体装置中的液体网络。

[0020] 图 5 显示本发明示例试剂室的顶、侧和底视图。

[0021] 图 6 说明与流体装置液体连通的试剂室的示例性侧视图。

[0022] 图 7 说明装满反应物的示例性试剂室。

[0023] 图 8 和 9 说明与读数组件的驱动元件结合的示例流体装置的侧视图。

[0024] 图 10 比较了两步试验和竞争性结合试验。

[0025] 图 11 显示了示例性两步化学发光酶免疫检测。

[0026] 图 12 显示两步化学发光酶免疫检测增加的敏感度。

[0027] 图 13 显示 TOSCA 检测少于理想的样品数量并保持敏感度的能力。

[0028] 图 14 显示示例性 ELISA。

[0029] 图 15 显示一种病毒的示例性 ELISA。

具体实施方式

[0030] 本发明的一方面是检测指示体液样品中存在流感病毒感染的分析物的系统。该分析物可指示 A、B 和 / 或 C 型流感病毒感染。该分析物可包括流感病毒的至少一种表面糖蛋白。示例性表面糖蛋白是，但不限于血凝素和神经氨酸酶。血凝素表面蛋白包括但不限于：H1、H2、H3、H4、H5、H6、H7、H8、H9、H10、H11、H12、H13、H14、H15 和 H16。非限制性神经氨酸酶表面蛋白包括：N1、N2、N3、N4 和 N5。分析物还可包括被感染宿主产生的流感病毒表面糖蛋白的抗体。

[0031] 本发明另一方面是检测多种分析物的系统，其中至少两种分析物指示体液样品中存在的流感病毒感染。类似地，该分析物可指示 A、B 和 / 或 C 型流感病毒感染。该分析物可包括流感病毒的多种表面糖蛋白。在一些实施方式中，所述多种表面糖蛋白包括血凝素和神经氨酸酶。血凝素可选自以下组：H1、H2、H3、H4、H5、H6、H7、H8、H9、H10、H11、H12、H13、H14、H15 和 H16，神经氨酸酶可选自以下组：N1、N2、N3、N4 和 N5。在优选实施方式中血凝素是 H5 而神经氨酸酶是 N1。分析物还可是流感病毒表面糖蛋白的多种特异性抗体。本系统能检测和 / 或定量特别感兴趣的分析物。

[0032] 本发明的另一方面是检测掺入单个实体如病毒颗粒或细胞或细胞碎片中的多种分析物的系统。在此方面，所述多种分析物优选是分析物的组合组合，其中至少两种分析物指示体液样品中的流感病毒感染。该分析物可以是 A、B 和 / 或 C 型流感病毒感染的指标。该多种分析物可包括流感病毒的表面糖蛋白的组合。在一些实施方式中，所述多种分析物可以是表面糖蛋白的组合，包括血凝素和神经氨酸酶的组合。血凝素可选自以下组：H1、H2、

H3、H4、H5、H6、H7、H8、H9、H10、H11、H12、H13、H14、H15 和 H16,神经氨酸酶可选自以下组 : N1、N2、N3、N4 和 N5。在优选实施方式中,分析物组合与诸如 H5N1 组合的流感病毒毒性株关联。本发明这方面能特异性检测多种分析物的组合。它可分辨例如 H5N1 组合的毒性株导致的感染与分析物的不同组合导致的感染。本发明此方面的一个变化是利用一种或多种与一种或多种病毒抗原(如,抗病毒表面糖蛋白抗体)反应的反应物在反应位点俘获病毒颗粒,然后添加另一套反应物(一种或多种反应物)以特异性检测结合的病毒颗粒。一个示例性过程是利用抗-H2 抗体作为俘获抗体,而抗-N5 抗体,优选酶标抗-N5 抗体作为检测试剂。

[0033] 在一些实施方式中,该系统检测多种人抗病毒抗原的抗体,如流感病毒表面糖蛋白的抗体。这些人类抗体可在受感染对象体内循环。

[0034] 在一些实施方式中,感兴趣的分析物可以是指示在体液样品中流感病毒感染的分析物和针对该分析物的人抗体的复合体。该分析物可以是任何指示本文所述流感病毒感染的分析物,但优选 H5 血凝素, N1 神经氨酸酶,或 H5 和 N1 表面糖蛋白的 H5N1 复合体。

[0035] 本发明另一方面是检测多种分析物的系统,其中至少一种分析物是体液样品中流感病毒感染的指标,且其中至少一种分析物是体液样品中的生物标志物,其指示病毒感染给人体施加的压力。该至少一种指示流感病毒感染的分析物可以是任何指示本文所述流感病毒感染的分析物。指示病毒感染给人体施加的压力的示例性生物标志物包括,但不限于 CRP, TNF α , 白介素等。

[0036] 本发明系统通常包括流体装置,具有一种或多种以下部件:样品收集单元,试验组件,读取组件,和通信组件。样品收集单元通常使收集自对象的体液样品与置于试验组件中的反应物反应,用于产生指示感兴趣的分析物存在的信号。读取组件检测该信号,然后经通信组件传递至外部设备供进一步处理。

[0037] 任何疑为含有感兴趣的分析物的体液可与本发明系统或装置结合使用。通常使用的体液包括但不限于血液、血浆、血清、唾液、尿液、胃液和消化液、泪液、粪便、精液、阴道液、组织间液和脑脊液。在优选实施方式中,直接使用本发明流体装置检测体液中存在的分析物,而不需要进行进一步处理。但是,如果需要,可在使用本发明流体装置进行分析前对体液进行预处理。预处理的选择取决于所用体液类型和/或所研究的分析物的特性。例如,当分析物以低水平存在于体液样品时,该样品可经常规方法浓缩以浓集分析物。浓缩分析物的方法包括但不限于干燥、蒸发、离心、沉积、沉淀和扩增。当分析物为核酸时,可根据 Sambrook 等提出的过程(“分子克隆:实验室手册”)使用各种溶胞酶或化学溶液提起,或根据制造商提供的附加建议使用核酸结合树脂提取。当分析物是细胞表面或内部的分子时,可使用裂解剂实现提取,裂解剂包括但不限于变性去污剂例如 SDS 或非变性去污剂如 Thesit[®], 脱氧胆酸钠, Triton[®] X-100, 和 TWEEN[®] 20。在以下实施方式中样品预处理在流体装置中自动进行。

[0038] 用于本发明流体装置的体液的体积一般小于约 500 微升,通常介于约 1 到 100 微升之间。如果需要,可使用 1 到 50 微升或 1 到 10 微升的样品用本发明流体装置检测分析物。

[0039] 本发明的一个好处是只需要极小体积的血液检测动物的感兴趣的分析物。在一些实施方式中抽取约 1 微升到约 50 微升的血液。在优选实施方式中抽取约 1 — 10 微升的血

液。在有效的实施例中,从对象抽取约 5 微升血液。

[0040] 可使用不同方法从对象抽取血液并置于流体装置中,包括但不限于穿刺、注射器或移液管。在一些实施方式中,用刺血针穿刺皮肤,然后通过例如重力、毛吸作用、抽吸或真空力将样品抽吸到流体装置中。刺血针(lancet)可以是流体装置的一部分,或读取装置的一部分,或作为独立部件。需要时,刺血针可通过机械、电子、机电或其它任何触发机制或这些方法联合触发,在不需触发机制的另一实施方式中,对象可简单地提供体液至流体装置,例如针对唾液样品时。收集到的液体可置于流体装置中的样品收集单元中。在另一实施方式中,流体装置包括至少一根刺穿皮肤的细针。该细针可单独与流体装置使用,也可在流体装置插入读取组件后刺穿皮肤。

[0041] 在一些实施方式中细针约为人头发的尺寸并具有集成的微型储器或容器。细针可无痛地刺破对象皮肤并抽取少量血液样品。更优选地,细针收集约 0.01 到约 1 微升,优选约 0.05 到约 0.5 微升更优选约 0.1 到约 0.3 微升的毛细血管血液。在一些实施方式中细针可以是硅构造的,直径约 10 到 200 微米,优选直径约 50 到约 150 微米,最优选直径约 100 微米,使其在皮肤的应用实际上无痛。为保证毛细血管确实被针穿透,可使用多支细针用于样品采集。这些细针可以是佩利坎公司(Pelikan,帕洛阿尔托,加州)和/或库梅提克(Kumetrix,联盟城,加州)销售的型号。美国专利 No. 6,503,231 公布了可用于本发明的细针。

[0042] 可用于制造本文所述的细针的微制造过程包括但不限于平版印刷术;蚀刻技术,例如湿法化学、干法和光蚀刻去除;硅热氧化;电镀和化学镀;弥散法,例如硼、磷、砷、锑的弥散;离子植入;薄膜沉积法,例如蒸汽(丝极(filament)、电子束、闪光及遮蔽和阶梯覆盖),溅射,化学蒸汽沉积(CVD),外延(蒸汽相、液体相和分子束),电镀,丝网印刷术,和叠片法。一般见于 Jaeger,“微电子制造入门”(Introduction to Microelectronic Fabrication)(艾迪生-威尔斯雷出版公司(Addison-Wesley Publishing Co.),Reading Mass. 1988);Runyan 等,集成半导体电路处理技术(Semiconductor Integrated Circuit Processing Technology)(艾迪生-威尔斯雷出版公司,Reading Mass. 1990);IEEE 微电极机械系统学会学报(Proceedings of the IEEE Micro Electro Mechanical Systems Conference)1987-1998;Rai-Choudhury 编,“微刻、微加工和微制造手册”(Handbook of Microlithography, Micromachining & Microfabrication)(SPIE 光工程出版社(SPIE Optical Engineering Press)贝灵汉,华盛顿,1997)。或者,可在硅晶片中模压细针然后使用常规电线切削技术镀镍、金、钛及其它各种生物相容金属。在一些实施方式中细针可用生物高聚物制造。在一些实施方式中细针可用按照 Mukerjee 等,“传感器和制动器”(Sensors and Actuators A),Physical, 第 114 卷,2-3 期,2004 年 9 月 1 日,第 267-275 页的方法所要求的装置制造和使用。

[0043] 在优选实施方式中细针仅一次使用后丢弃。在一些实施方式中一机械驱动装置可从对象插入和退出细针,去除使用后的针,并重新装载新的细针。以非常小的磁盘驱动器而非常高的容量开发和制造的该机械技术具有相似的运动并且造价低。在优选实施方式中该驱动装置是使用类似半导体批量生产方法制造的 MEMS(微型加工电机系统)装置。该驱动装置包括但不限于镍钛合金,纽曼(neumatic)或压电装置。在一些实施方式中细针厚度约 1 微米到约 10 微米,优选约 2 微米到约 6 微米厚度,最优选约 4 微米厚度。在一些实施方式

中细针长度约 10 微米到约 100 微米,优选约 30 微米到约 60 微米长度,最优选约 40 微米长度。

[0044] 图 1 例举了本发明示例性系统。如所示,流体装置提供来自对象的体液并可被插入读取组件。流体装置可采用多种构型,在一些实施方式中流体装置可以是药筒的形式。一标识(ID)检测器可检测流体装置的标识。标识检测器与通信组件经控制器连接,将标识传递至外部装置。需要时,外部设备基于标识将存储在外部设备的协议发送至通信组件。将在流体装置上运行的协议可包括读取组件控制器的指令以在流体装置上实施该协议,包括但不限于具体将运行的试验和将要进行的检测方法。当流体装置进行试验,产生指示体液样品中流感病毒感染的分析物的信号,并由检测组件检测。检测到的信号则可通信至通信组件,在此处可传递至外部设备进行处理,包括但不限于,计算样品中分析物的浓度或确定分析物的存在。

[0045] 图 2 例举了本发明流体装置组装前示例性的流体装置的层面,在下文有更详细的描述。图 3 和 4 分别是示例性流体装置组装后的顶面和底面视图。设计不同的层面,将其组装为形成三维流体通道网络。样品收集单元 4 提供了来自对象体液的实施例。如下文将更详细描述,包括驱动元件(未示出)的读取组件可驱动流体装置启动并引导流体装置中的体液样品和试验试剂流动。在一些实施方式中驱动元件首先使流体装置 2 中的样品从样品收集单元 4 流向反应位点 6,使样品在流体装置中从点 G' 向上移动至点 G,然后到达废液室 8。然后驱动元件启动试剂从试剂室 10 流向点 B',点 C' 和点 D',然后向上分别到达点 B,C 和 D,然后到点 A,向下到 A',然后以与样品相同的方式到达废液室 8。

[0046] 流体装置 2 中的样品收集单元 4 可用任何上文所述方法提供来自对象的体液样品。如有必要,样品可首先在稀释室进行稀释体液的处理,或可在过滤室过滤将红细胞与血浆分离。在一些实施方式中样品收集单元,稀释室,和过滤室可以是同一部件,而在一些实施方式中它们可以是不同部件,和任何两个是同一部件而另一个是独立部件。在一些实施方式中流体装置中可以有超过一个样品收集单元。

[0047] 在一些实施方式中希望检测细胞或病毒表面、细胞或病毒膜或细胞内部存在的分析物。检测这种分析物的困难在于细胞和其它成形的元件是细胞的粒子或组分,不易与传统的针对溶液中的分析物而设计的检测化学物相互作用。细胞表面分析物与表面结合探针反应缓慢、低效,而细胞内部反应物可能根本不与结合探针反应。为了检测这样的分析物,在一些实施方式中流体装置可包括裂解组件以裂解体液样品中的细胞。该裂解组件可包含在样品收集单元,稀释腔室,和 / 或过滤室中。在一些实施方式中,样品收集单元,稀释腔室,和裂解部件在流体装置的同一元件中。在一些实施方式中,裂解部件可如下文所述包含检测试剂。

[0048] 如果需要,可灌注裂解剂然后用多孔垫,玻璃纤维垫,烧结玻璃或颗粒诸如 Porex 的颗粒,纸,或其它类似材料干燥。裂解剂可在平坦表面干燥。也可将裂解剂溶解于液体稀释剂或其它液体试剂中。在优选实施方式中使用多孔材料保存裂解剂,因为其可以将裂解剂以很稳定的干品形式保存。由于当样品穿过多孔材料移动时具有曲折的路径,这些材料还便于使体液样品与裂解剂混合。在优选实施方式中这种多孔材料为碟型,其直径大于厚度。在一些实施方式中,裂解剂可使用冻干法、被动蒸发、暴露于热干气体流或其它已知方法在多孔材料上干燥。

[0049] 在本领域中多种裂解剂可用并适于与本发明流体装置结合使用。优选裂解剂是非变性的,例如非变性去污剂。非变性去污剂的非限制性实施例包括Thesit®,脱氧胆酸钠, Triton®X-100,和TWEEN®20。在试剂被灌入固体多孔材料的实施方式中,试剂优选是非挥发性的。在一些实施方式中裂解剂被混合到一起。其它材料可与裂解剂混合以调节裂解效果。该示例性材料可以非限制性地是,缓冲剂、盐和蛋白质。在优选实施方式中,裂解剂的用量超过溶解细胞所需的最小量。在一些实施方式中,使用可溶解白细胞和红细胞的裂解剂。

[0050] 本发明的一个优点是根据本发明在流体装置中实施检测所需的任何试剂优选的机载的(on-board),或检测前、检测中和检测后置于流体装置中。在此方法中,流体装置的唯一入口或出口优选是流体装置初始提供的体液样品的那一个。该设计还有助于制造方便的一次性流体装置,其中所有流体或液体保留在装置中。这种机载设计还可防止从流体装置泄漏进入读数组件,读数组件应保持不受流体装置的污染。

[0051] 在优选实施方式中有至少一个以上试剂室。在一些实施方式中可以有二个、三个、四个、五个、六个或更多,或任何数量的试剂室,以完成本发明目标。试剂室优选与至少一个反应位点液体连通,当流体装置如本文所述驱动时,保存在所述试剂室中的试剂释放进入流体装置中的流体通道中。

[0052] 根据本发明的试剂包括但不限于洗涤缓冲物,酶底物,稀释缓冲液,结合物,酶标结合物,样品稀释剂,洗涤溶液,样品预处理试剂,包括添加剂例如去污剂,聚合物,螯和剂,白蛋白结合剂,酶抑止剂,酶,抗凝剂,红细胞凝集剂,抗体,或其它在流体装置上进行试验所必需的材料。酶结合物可以是在与合适底物反应后可产生可检测信号的酶标记的多克隆抗体或单克隆抗体。这种酶的非限制性实施例是碱性磷酸酶和辣根过氧化物酶。在一些实施方式中试剂包含免疫检测试剂。

[0053] 在一些实施方式中,试剂室容纳约 50 μ l 到约 1ml 流体。在一些实施方式中该室可容纳约 100 μ l 流体。试剂室中液体的体积可根据正在进行检测的类型或所提供的体液样品改变。在一些实施方式中试剂初始为干品储存,在流体装置运行检测开始后被液化(如,溶解或融化)。

[0054] 图 5 和图 6 例举了密封的试剂室的一个示例实施方式。图 5 显示了试剂室的顶、侧和底视图。顶层 11 包含多个泡或袋 13。底层 15 有结合至流体装置底座 17 的底面,如图 6 所示。底层 15 沿整个表面分布有多个流体通道 19,每个腔室横贯底层 15。试剂室中的流体通过流体通道 19 和室 13 之间的可压破密封 21 容纳在该室中。可压破密封 21 设计为在预定压力下密封破裂,使室 13 中的流体流出进入流体通道 19。

[0055] 图 7 显示了用例如试剂填充试剂室 13 的示例性过程。试剂室 13 可使用填充通道和真空抽取通道装满流体。填充试剂的过程涉及首先从室去除所有空气。这是通过真空抽取通道抽真空来完成。一旦抽真空,在填充通道和真空抽取通道之间即设置永久性密封。下一步,所需试剂通过填充通道进入腔室。然后,在腔室和填充通道间提供永久性密封。这保证了当腔室被压时,流体仅可朝一个方向,即可破裂密封的流动。如果压缩形成大于密封的破裂压的压力,密封破裂,液体流入流体通道。

[0056] 图 8 和 9 阐述了流体装置与本文所述驱动元件一起操作的例子。流体装置 2 包含试剂室 10 和一层封住试剂室的可破裂箔 12。可破裂箔 12 上方是一部分微流体回路 14。一

层粗糙但有弹性的顶部覆盖物 16 作为流体装置 2 的顶层。读取组件包括阀门驱动板 18。紧贴板 18 的是无芯针 20, 这样当板下移时, 针的锐利边缘接触弹性材料覆盖物 16。顶层覆盖物也可由弹性硅材料制造, 可起到潮湿不渗透的密封作用。该实施方式还采用一种通过隔离流体装置中的任何液体试剂与干试剂直到试验开始, 从而解决液体从流体装置蒸发和泄漏的问题的方法。

[0057] 在优选实施方式中试剂室和样品收集单元与反应位点液体连接, 在此处结合的探针可使用该试验检测体液样品中的感兴趣的分析物。然后反应位点提供指示感兴趣的分析物存在的信号, 该信号然后可被检测装置检测, 如下文所述。

[0058] 在一些实施方式中反应位点是平坦的但可采用多种其它表面构型。反应位点优选形成刚性支撑, 其上可固定反应物。同样选择反应位点表面, 以提供合适的吸光特性。例如, 反应位点可以是功能化玻璃, Si, Ge, GaAs, GaP, SiO₂, SiN₄, 改性硅, 或各种凝胶或聚合物中的任意一种, 例如(聚) 四氟乙烯, (聚) 偏二氟乙烯, 聚苯乙烯, 聚碳酸酯, 聚丙烯, 或其组合。可根据本发明使用其它适合材料。

[0059] 固定在反应位点的反应物可以是任何可用于检测体液样品中感兴趣的分析物的物质。例如, 该反应物包括但不限于: 与指示流感病毒感染的分析物特异性反应的抗体, 细胞膜受体, 单克隆抗体和抗血清。可使用各种市场可得反应物, 如针对特定分析物而特别开发的各种多克隆和单克隆抗体。

[0060] 优选的反应物种类是抗体。在本文中, “抗体”(与复数形式互换使用) 是能够通过位于免疫球蛋白分子的可变区中的至少一个抗原识别位点特异性结合靶点(如体液内的分析物) 的免疫球蛋白分子。在本文中, 该术语不仅包括完整的抗体, 还包括其片段, 如 Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, 单链 (ScFv), 其变体, 融合蛋白, 人源化抗体, 和其它任何包含具有所需特异性的抗原识别位点的免疫球蛋白分子的经修饰的构型。

[0061] 本方法和装置可利用市场可得或重新生产的抗体反应物。生产多克隆抗体和单克隆抗体的实验室方法是本领域公知周知的。例如, 见 Harlow 和 Lane, 抗体: 实验手册, 冷泉港出版社(Cold Spring Harbor Laboratory), 纽约(1988) 和 Sambrook 等, (1989)。简单地说, 可用于本发明的单克隆抗体可通过将流感病毒抗原引入动物, 如鼠或兔, 用生物学方法生产。分离动物体内的抗体生成细胞并与骨髓瘤细胞或异种骨髓瘤细胞融合以产生杂合细胞或杂交瘤。

[0062] 单克隆抗体的特异同种型可通过直接选自原始融合体直接制备, 或采用 Steplewski 等〔(1985)Proc. Natl. Acad. Sci. 82:8653〕或 Spira 等〔(1984)J. Immunol. Methods 74:307〕所述的方法, 使用血亲选择技术分离类别转换变体, 从分泌不同同种型的单克隆抗体的亲本杂交瘤中间接制备。

[0063] 抗体反应物可根据特定的检测反应连接(如, 偶联)至合适的可检测标记。

[0064] 在一些实施方式中, 反应物检测指示 A 型、B 型或 C 型流感病毒感染的分析物。该分析物可包含至少一种流感病毒的表面糖蛋白。示例性表面糖蛋白是但不限于: 血凝素和神经氨酸酶。血凝素表面蛋白包括: H1、H2、H3、H4、H5、H6、H7、H8、H9、H10、H11、H12、H13、H14、H15 和 H16。神经氨酸酶表面蛋白包括: N1、N2、N3、N4 和 N5。

[0065] 在一些实施方式中反应物检测多种分析物, 其中至少两种分析物指示体液样品中存在流感病毒感染。该分析物可指示 A、B 和 / 或 C 型流感病毒感染。该分析物可包括流感

病毒的多种表面糖蛋白。在一些实施方式中,多种表面糖蛋白包括血凝素和神经氨酸酶。血凝素可选自以下组:H1、H2、H3、H4、H5、H6、H7、H8、H9、H10、H11、H12、H13、H14、H15和H16,神经氨酸酶可选自以下组:N1、N2、N3、N4和N5。在优选实施方式中血凝素是H5而神经氨酸酶是N1。

[0066] 本领域熟练技术人员应理解有许多将各种反应物固定到可发生反应的支持物上的方法。固定可以是共价的或非共价的,经接头部分或将其连接到固定的部分。这些方法在固相合成和微阵列领域是众所周知的(Beier等,Nucleic Acids Res. 27:1970-1-977(1999))。将核酸或蛋白性分子如抗体粘附到固体支持物的结合部分的非限制性例子包括:链霉亲和素或抗生物素蛋白/生物素键,氨基甲酸酯键,酯键,酰胺,硫酯,(N)-官能化硫脲,官能化马来酰亚胺,氨基,二硫化物,酰胺,腙键及其它。此外,使用本领域已知的方法,甲硅烷基部分可直接连接核酸到例如玻璃的基底上。

[0067] 在一些实施方式中,反应位点超过一个,它们可检测同一个体液样品中的多种感兴趣的分析物。在一些实施方式中有2,3,4,5,6或更多反应位点,或实现本发明的目的所需的其它任何数量的反应位点。

[0068] 在流体装置具有多个反应位点的实施方式中,各反应位点可被一种反应物固定,该反应物不同于不同反应位点上的反应物。例如在一个具有三个反应位点的流体装置中,可有三种不同的探针,每一种连接至不同反应位点以结合样品中三种不同的感兴趣的分析物。在一些实施方式中,如果例如使用具有多个检测区域的CCD作为检测装置,则不同反应物可连接至一个反应位点,这样多种不同的分析物可在单一反应位点被检测。除各反应位点上多个不同探针外,使用多个反应位点的能力也使得本发明具有高通量特征。

[0069] 在本发明优选实施方式中,流体装置包括至少一个废液室以收集或回收所有试验中已使用的液体。在优选实施方式中,有超过一个废液室,其中至少一个与下文描述的标定组件使用。机载废液室也使该装置易处理。废液室优选与至少一个反应位点液体连通。

[0070] 这些通道中至少一个典型地具有小的横截面尺寸。在一些实施方式中尺寸约0.01到约5mm,优选约0.03到约3mm,更优选0.05到约2mm。流体装置中的流体通道可通过例如但不限于精密注模,激光蚀刻,或其它任何本领域已知技术构建以实现本发明的目的。

[0071] 为保证反应位点产生的给定试验反应(如,光子数)与样品中感兴趣的分析物的准确浓度相关,在检测该反应(如,光子数)前标定流体装置是尤其有益的。由于流体装置在使用前可能经过运输,且随温度可能发生变化,因此在制造环节标定流体装置可能不足以保证确定分析物的准确浓度,所以制造时进行的标定不会考虑流体装置的结构或其中所含流体试剂的随后的变化的影响。在本发明优选实施方式中,流体装置具有标定组件,标定组件的组成和设计模仿试验组件,除了标定组件中未加样品。参照图3和4,标定组件占大约流体装置2的一半且包括试剂室32,反应位点34,废液室36,和流体通道38。与试验组件类似,试剂室和反应位点的数量可根据流体装置上进行的试验和待检测的分析物数量而变化。

[0072] 如果需要,随流体装置、读取组件和/或本发明系统的包装中可包括评估使用本发明流体装置检测体液中分析物的可靠性的传感器。该传感器能检测本发明系统通常运行的操作参数的变化。操作参数包括但不限于可影响本发明系统性能的温度、湿度、和压力。

[0073] 流体装置和读取组件在制造后可以是一起或各自被运输到最终用户。当读取组件

反复与多个流体装置一起使用,流体装置和读取组件可能都需要有传感器,以检测例如运输过程中的这种变化。在运输过程中,压力或温度改变可影响本系统多个部件的性能,因此,位于流体装置或读取组件上的传感器可将这些改变传播到,例如外部设备,这样在标定或在外设设备处理数据期间可进行调整。例如,若运输过程中流体装置的压力或温度达到某水平,当用户将其插入读取组件时,位于流体装置上的传感器可检测这种已发生的改变并将该信息传递至读取组件。在读取组件中可有附加的检测装置实现这种作用,或者该装置可包括在其它系统部件中。在一些实施方式中该信息可无线传输至读取组件或外部设备。同样,读取组件中的传感器可检测类似变化。在一些实施方式中,较理想的是运输包装中同样有传感器,用于替代系统部件中的传感器或额外附加。

[0074] 流体通道的制造通常可通过本领域公知的许多微制造技术进行。例如,可选择采用平版印刷技术制造,例如,玻璃,石英或硅基板,使用半导体制造工业公知的方法,例如照相平版印刷蚀刻,等离子体蚀刻或湿法化学蚀刻。或者,可任选采用显微机械加工方法,例如激光钻孔、微研磨等。类似地,对于聚合物基板,也可使用公知的制造技术。这些技术包括例注模或冲压模铸,其中采用例如用于生产大片的微尺度基板的辊模压(rolling stamp)可任选地生产大量的基板;或聚合物微铸造技术,其中基板在显微机械加工的模具中聚合。

[0075] 在一些实施方式中,流体装置不同层中的至少一层可用聚合物基板构造。聚合材料的非限制性实施例包括聚苯乙烯,聚碳酸酯,聚丙烯,聚二甲基硅氧烷(PDMS),聚氨酯,聚氯乙烯(PVC),和聚砜。

[0076] 流体装置可通过印制、热结合、粘合制造,或对于某些基板,例如玻璃、半刚性和非刚性聚合物基板,采用两个部件间的自然粘结。在一些实施方式中流体装置用超声波或声波焊接制造。

[0077] 图2显示了本发明的一个实施方式,其中流体装置2由7层组成。所示的特征例如在聚合物基板中切割,这样,当组装时这些层适当定位将形成流体网络。在一些实施方式中可使用更多或更少的层以构建实现本发明目的流体装置。

[0078] 本发明的一个目的是防止流体装置中的流体接触读取组件的部件,这些部件需要保持干燥和/或不被污染,并防止污染读取组件中的检测装置。流体装置的泄漏可导致流体如试剂或废液从流体装置逸出并污染读取器。在其它实施方式中,液体吸收材料如尿布中使用的聚合物材料,可被置于流体通道部分或废液室部分以吸收废液。这种聚合物的非限制性例子是聚丙烯酸钠。这种聚合物可吸收重量为其重量数百倍的液体。因此,仅需要微量的这种聚合物材料就可以实现这种吸收泄漏液的目的。在一些实施方式中废液室用超强吸收材料填充。在一些实施方式中泄漏液可转化为凝胶或其它固体或半固体形式。

[0079] 本系统的另一目标是提供可在流体装置上进行多种试验的流体装置。依赖于流体装置标识的方案可从外部设备传递,其中方案可存储在读取组件中,以使读取组件能够在流体装置上执行具体的方案。在优选实施方式中,流体装置具有标识符(ID),其由本文所述的标识符检测器检测或读取。然后标识符传输至通信组件,然后可被传递或传输至外部设备。

[0080] 在一些实施方式中标识符可以是具有一系列黑、白线的条形码标识符,可由诸如条形码读取器的标识符检测器读取,这是众所周知的。其它标识符可以是一系列字母数字值,颜色,凸起块,或其它任何可定位在流体装置上并可被标识符检测器检测或读取的标识

符。在一些实施方式中,标识符可包括存储或记忆装置并可传递信息至标识符检测器。在一些实施方式中两种技术都可使用。

[0081] 一旦体液样品加入流体装置,将流体装置插入读取组件。在一些实施方式中流体装置是部分手动插入,然后读取组件中的机械开关自动地使流体装置在读取组件中正确定位。本领域已知的将盘或药筒插入设备的任何其它机械装置也可使用。在一些实施方式中可能只需要手动插入。

[0082] 在一些实施方式中读取组件包括用于检测或读取流体装置上的标识符的标识符检测器,用于自动控制检测组件以及读取组件的机械部件的控制器,如用于控制或引导流体通过流体装置的泵和/或阀门,用于检测流体装置进行的试验产生的信号的检测装置,及用于与外部设备通信的通信组件。

[0083] 标识符检测器检测流体装置上的标识符,通信至通信组件。在一些实施方式中标识符检测器可以是类似于条形码扫描仪的装置,读取流体装置上的条形码。该标识符检测器也可是一个发光的 LED,发光可与反射光的标识符相互作用,被标识符检测器测量以确定流体装置的身份。

[0084] 在优选实施方式中读取组件包括控制器,该控制器控制泵和一系列阀门,以控制和引导流体装置中的液体流动。在一些实施方式中读取组件可包括多个泵。样品和试剂优选真空力抽取通过流体通道,真空力通过按顺序开放或关闭至少一个阀门,同时驱动读取组件中的泵生成。使用至少一个阀门和至少一个泵以生成真空力的方法是众所周知的。虽然可使用负性抽取力,根据本发明也可用至少一个泵和阀门生成正性推动力。在其它实施方式中,流体在流体装置中的运动可依靠电—渗透,毛细管,压电或微驱动作用。

[0085] 图 8 和 9 阐述了在流体装置中启动试剂流动的示例性程序。读取组件中的驱动板 18 包括无芯针或销 20,当向下时使顶盖 16 折叠,顶盖 16 优选由高强度,可弯曲的弹性材料制成。然后由于顶盖 16 的弯曲形成的压力使易破裂箔 12 破裂。位于试剂室下游的阀门刺破流体装置中不同区域的箔,然后与读取组件中的泵串联工作,形成真空力将试剂吸出试剂室 6,进入流体通道,然后引导试剂流至反应位点。至少一个阀门优选流体连接至读取组件中的泵。当流体装置从读取组件移除,无芯针或销 20 从流体装置移除。该实施方式的一个优点是不需要机载的泵,这样至少减小了流体装置的体积和成本,也使装置可一次性使用。

[0086] 反应组件优选包含一检测组件,用于检测流体装置上至少一个试验产生的信号。图 1 例举了本发明检测装置相对于流体装置的示例性位置,它位于流体装置下方。检测组件可在流体装置上方或相对于流体装置取不同的方向,这取决于例如将进行试验的类型和采用的检测机制。

[0087] 在优选实施方式中光学检测器被用作检测装置。非限制性实施例包括光电二极管,光电倍增管(PMT),光子计数检测器,或电荷耦合装置(CCD)。在一些实施方式中可使用针孔二极管(pin diode)。在一些实施方式中可将针孔二极管耦合至放大器形成灵敏度与 PMT 相当的检测装置。一些试验可产生如本文所述的发光,在一些实施方式中检测化学发光。在一些实施方式中检测组件可包括多条成束地连接到 CCD 检测器或 PMT 矩阵的纤维光缆。纤维光缆束可由不连续的纤维构成或由许多细纤维融合在一起形成固体束。这样的固体束可从市场上得到并便于与 CCD 检测器连接。

[0088] 在一些实施方式中,检测系统可包含非光学检测器或传感器,用于检测对象的特殊参数。这样的传感器可包括温度,导电性,电压,和电流,针对被氧化和还原的化合物,例如, O_2 , H_2O_2 , 和 I_2 , 或可氧化 / 可还原的有机化合物。

[0089] 通信组件优选置于读取组件中,能够从外部设备传递和接收无线信号。该无线通信可以是蓝牙或 RTM 技术。可使用多种通信方法,例如使用调制解调器的拨号有线连接,诸如 T1, ISDN, 或电缆线的直接链接。在优选实施方式中使用示例性无线网络诸如手机 (cellular), 卫星, 寻呼网络, GPRS, 或局域数据传输系统如以太网或局域网的令牌环建立无线连接。在一些实施方式中信息在无线网络中传输前是加密的。在一些实施方式中通信组件可包含无线红外通信部件用于传送和接收信息。

[0090] 在一些实施方式中通信组件可具有记忆或存储设备,例如本地 RAM, 其中可存储收集到的信息。如果由于如暂时无法无线连接至网络,信息不能在给定时间传递,可能需要存储设备。信息可与存储设备中的流体装置标识符关联。在一些实施方式中通信组件可在一定时间后重试发送存储的信息。在一些实施方式中存储设备可在被删除前存储信息达十天时间。

[0091] 在优选实施方式中外部设备与读取组件中的通信组件通信。外部设备可与读取组件无线通信,但也可与第三方通信,包括但不限于患者,医务人员,临床医生,实验室人员或其他医疗或生产人员。

[0092] 在一些实施方式中外部设备可以是计算机系统,服务器,或其它能够存储信息或处理信息的电子设备。在一些实施方式中外部设备包括一个或多个计算机系统,服务器,或其它能够存储信息或处理信息的电子设备。在一些实施方式中外部设备可包括对象信息数据库,例如但不限于,医疗记录或对象历史,临床试验记录,或临床前期试验记录。在优选实施方式中,外部设备存储将在流体装置上执行的方案,当已收到指示哪种流体装置已被插入读取组件的标识符后方案可被传递至读取组件的通信组件。在一些实施方式中协议可取决于流体装置标识符。在一些实施方式中外部设备为每个流体装置存储一种以上方案。在其它实施方式中外部设备中的对象信息包括一个以上方案。在优选实施方式中外部服务器存储数学算法,用于处理从通信组件发送的光子数,以在一些实施方式中计算体液样品中的分析物浓度。

[0093] 在一些实施方式中外部设备可包括一个或多个如本领域所知的和市场上可得的服务器。该服务器可在一个或多个服务器或外部设备的其它部件失效的情况下提供负载平衡,任务控制和备份能力,以改善服务器的可用性。服务器也可在存储器和处理器单元的分布式网络上实现,如本领域所知,其中本发明的数据处理驻留在类似计算机的工作站上,从而不需要服务器。

[0094] 服务器可包括数据库和系统处理。数据库可驻留在服务器中,或可驻留在该服务器可访问的另一个服务器系统中。由于数据库中的信息可包括敏感信息,可使用安全系统防止未授权用户访问数据库。

[0095] 本发明的一个优点是信息不仅可从外部设备传递回读取组件,还可回到其它部件或其它外部设备,例如但不限于, PDA 或手提电话。这种通信可通过本文所述的无线网络实现。在一些实施方式中,经计算的分析物浓度或其它对象信息可被发送给,例如但不限于医务人员或该对象。

[0096] 使用方法

[0097] 本发明的装置和系统提供了实时检测指示对象体液中存在流感病毒感染的分析物的有效方法。

[0098] 本发明的一方面是检测指示体液样品中存在流感病毒感染分析物的方法。该分析物可指示 A、B 或 C 型流感病毒感染。该分析物可包括流感病毒的至少一种表面糖蛋白。示例性表面糖蛋白是,但不限于血凝素和神经氨酸酶。血凝素表面蛋白包括但不限于:H1、H2、H3、H4、H5、H6、H7、H8、H9、H10、H11、H12、H13、H14、H15 和 H16。非限制性神经氨酸酶表面蛋白包括:N1、N2、N3、N4 和 N5。分析物还可包括流感病毒表面糖蛋白的抗体。

[0099] 本发明的一方面是检测多种分析物的方法,其中至少两种分析物是指示体液样品中流感病毒感染。该分析物可以是 A、B 或 C 型流感病毒感染的指标。该分析物可包括流感病毒的多种表面糖蛋白。在一些实施方式中,多种表面糖蛋白包括血凝素和神经氨酸酶。血凝素可选自以下组:H1、H2、H3、H4、H5、H6、H7、H8、H9、H10、H11、H12、H13、H14、H15 和 H16,神经氨酸酶可选自以下组:N1、N2、N3、N4 和 N5。在优选实施方式中该方法检测血凝素 H5 和神经氨酸酶 N1。在一个实施方式中该方法能在同一病毒颗粒中检测 H5 和 N1(见图 15)。

[0100] 本发明的另一方面是检测包含在单个实体(例如病毒颗粒或细胞或细胞片段)中的多种分析物的方法。在此方面,多种分析物优选是分析物的组合或复合体,其中至少两种分析物指示体液样品中流感病毒感染。该分析物可以是 A、B 或 C 型流感病毒感染的指标。该多种分析物可包括流感病毒的表面糖蛋白的组合或复合体。在一些实施方式中,多种分析物可以是表面糖蛋白的组合,包括血凝素和神经氨酸酶的组合。血凝素可选自以下组:H1、H2、H3、H4、H5、H6、H7、H8、H9、H10、H11、H12、H13、H14、H15 和 H16,神经氨酸酶可选自以下组:N1、N2、N3、N4 和 N5。在优选实施方式中分析物组合与流感病毒毒性株诸如 H5N1 组合相关。本发明这方面尤其涉及检测多种分析物的组合。它可分辨例毒性株如 H5N1 组合导致的感染与分析物不同组合导致的假定感染。

[0101] 在一些实施方式中本方法检测多种病毒抗原的人抗体,例如抗流感病毒表面糖蛋白的抗体。

[0102] 在一些实施方式中感兴趣的分析物可以是指示体液样品中流感病毒感染的分析物和针对该分析物的人抗体的复合体。该分析物可以是任何指示本文所述流感病毒感染的分析物,但优选 H5 血凝素, N1 神经氨酸酶,或 H5 和 N1 表面糖蛋白的 H5N1 复合体。

[0103] 本发明的又一方面检测多种分析物的方法,其中至少一种分析物指示体液样品中流感病毒感染,其中至少一种分析物是体液样品中的生物标志物,指示病毒感染施加于人体的压力或指示身体对感染的反应。该至少一种指示流感病毒感染的分析物可以是任何本文所述的指示流感病毒感染的分析物。指示流感病毒施加于人体的压力的示例性生物标志物包括但不限于,CRP, TNF α , 白介素等。指示人体对病毒的防御反应的示例性生物标志物包括抗病毒抗体,尤其是 IgM 亚型。

[0104] 本装置和系统的使用范围是,例如疾病诊断和疾病检测。

[0105] 因此,在一个实施方式中,本发明提供了检测指示对象体液样品中流感病毒感染的分析物的方法,包括提供包含流体装置,该流体装置包括至少一个样品收集单元的,含有免疫检测试剂的免疫检测组件,与所述样品收集单元和/或所述免疫检测组件液体连通的多个通道;驱动所述流体装置并在所述流体装置内引导所述免疫检测试剂;使疑为含有所

述分析物的体液样品与所述检测用免疫检测组件中所含的所述免疫检测试剂反应,以产生指示所述体液样品中存在所述分析物的可检测信号;和检测最初收集在所述体液样品中的所述分析物生成的所述可检测信号。优选一个或更多这种应用中使用少于约 500ul 的体液样品。

[0106] 在本文中,术语“对象”和“患者”互换使用,指动物,尤指禽类(鸟类)或哺乳类(例如人类)。术语禽类在本文中包括家禽。哺乳动物包括但不限于,鼠类,猿类,人类,家畜,比赛用动物,和宠物。

[0107] 在本文中,在一些情况下术语“试剂”和“反应物”互换使用。

[0108] 在一些实施方式中,体液样品可首先用本文描述的任一方法加入流体装置。然后将流体装置插入读取组件。置于读取组件中的身份检测器检测流体装置的标识符并将该标识符通信至通信组件,通信组件优选位于读取组件中。然后通信组件将标识符传递至外部设备,外部设备基于标识符将在流体装置上运行的方案传递至通信组件。优选位于读取组件中的控制器控制驱动元件,驱动元件至少包括一个泵和一个阀门,两者与流体装置相互作用,控制和引导装置内的流体运动。在一些实施方式中试验的第一个步骤是洗涤周期,其中流体装置中的所有表面使用洗涤缓冲液湿润。然后使用标定组件通过使与将用于试验的相同试剂流过标定反应位点,从而对流体装置进行标定,然后检测装置检测反应位点发出的发光信号,该信号用于标定流体装置。包含分析物的样品引入流体通道。样品可被稀释并在过滤器进一步分离为血浆或其它所需部分。经分离的样品现在流经反应位点,存在于其中的分析物将结合至结合在反应位点上的反应物上。然后样品液的血浆被从反应壁清洗入废液室。根据所进行的检测,引导合适的试剂通过反应位点以进行检测。用于不同步骤中(包括标定步骤)的所有洗涤缓冲液和其它试剂被收集进洗涤槽。然后通过本文描述的任一方法检测反应位点中产生的信号。

[0109] 根据本发明在流体装置上可进行多种试验以在样品中检测感兴趣的分析物。本领域有许多种标记物可供采用以实施本发明的检测。在一些实施方式中通过分光,光化学,生物化学,免疫化学或化学方法检测这些标记物。例如,有用的核酸标记物包括 32P, 35S, 荧光染色,电子致密试剂,酶,生物素,地高辛,或存在抗血清或单克隆抗体的半抗原和蛋白质。已知多种适于标记生物组分的标记物,并在科技和专利文献中大量报道,一般都可用于本发明来标记生物组分。合适的标记物包括放射性核素,酶,底物,辅因子,抑制剂,荧光部分,化学发光部分,生物发光标记物,测热标记物,或磁性粒子。标记剂可选地包括,例如单克隆抗体,多克隆抗体,蛋白质,或其它聚合物例如亲和基质,碳水化合物或脂质。可采用各种已知的方法进行检测,包括分光光度法或放射性或荧光标志物的光学示踪,或其它基于大小、电荷或亲和力的示踪分子的方法。可检测部分可以是任何具有可检测的物理或化学属性的材料。这种可检测标记物已在凝胶电泳,柱层析,固体底物,分光技术等领域中得到很好开发,通常在这些方法中使用的标记物可应用于本发明。因此,标记物包括但不限于可通过分光法,光化学,生物化学,免疫化学,电学,光学,热或化学方法检测的任何组合物。

[0110] 在一些实施方式中标记物根据本领域公知方法直接或间接与待检测分子如产物,底物或酶偶联。如上文所述,使用多种标记物,标记物的选择取决于所需的灵敏度,与化合物偶联的难易,稳定性要求,可用的仪器,和处置规定。非放射性标记物常采用间接方法连接。通常,配体分子共价结合至聚合物。然后配体结合至固有可检测地或共价连接至信号

系统的抗一配体分子,例如可检测酶,荧光化合物,或化学发光化合物。可使用许多配体和抗一配体。对于具有天然抗一配体的配体,例如生物素,甲状腺素和皮质醇,可用于与经标记的抗一配体结合。或者,任何半抗原或抗原性化合物可用于与抗体结合。

[0111] 在一些实施方式中标记物也可直接连接至信号生成化合物,例如与酶或荧光团连接。作为标记物的感兴趣的酶主要是水解酶,尤其是磷酸酶,酯酶和糖苷酶,或氧化还原酶,尤其是过氧化物酶。荧光化合物包括荧光素及其衍生物,若丹明及其衍生物,丹磺酰,和 7-羟基香豆素(umbelliferone)。化学发光化合物包括虫荧光素,和 2,3-二氢邻苯二甲酰肼(2,3-dihydrophthalazinediones),例如鲁米诺(luminol)和 1,2-二噁二酮(dioxetane)。

[0112] 检测标记物的方法是本领域技术人员公知的。例如,当标记物是放射性标记时,检测方法包括闪烁计数器或如放射自显影法所用的摄影胶片。当标记物是荧光标记时,可通过以下方法检测:用适当波长的光激发荧光染料,用例如显微镜,视觉检查,经摄影胶片,通过使用电子检测器诸如数码相机,电荷耦合装置(CCD)或光电倍增器和光电管,或其它装置检测所产生的荧光。类似地,酶标记通过提供合适的酶底物并检测得到的反应产物来检测。最后,单比色标记物常简单地通过观察标记物相关的颜色来检测。例如,结合的金常显示粉红色,而不同的结合珠显示珠的颜色。

[0113] 在一些实施方式中可检测信号可由发光源产生。术语“发光”通常指除了由于提高温度之外的其它原因光从物质的发射。通常,当从“激发态”到较低能量状态时(通常是基态)原子或分子发射具有电磁能量的光子(即光线)。存在很多原因的激发。如果激发原因是光子,发光过程被称为“光致发光”。若激发原因是电子,发光过程被称为“电致发光”。更具体地,电致发光如下形成:由电子的直接注入或失去形成电子—空穴对,随后该电子—空穴对再复合而发射光子。化学反应导致的发光通常称为“化学发光”。活生物体产生的发光常称为“生物发光”。如果光致发光是可跃迁转化所致(如单体—单体转化,三体—三体转化),则光致发光过程常称为“荧光”。经典地,荧光发射在激发原因去除后不持续,因为这是短期存在的激发状态,通过这种可跃迁的转化会迅速弛豫。若光致发光是不可跃迁转化所致(如三体—单体转化),光致发光过程常被称为“磷光”。经典地,磷光发射在激发原因去除后持续长时间,因为这是长时间的激发状态,只有通过这种不可跃迁转化可弛豫。“发光标记”可有上述属性中的任何一种。

[0114] 合适的化学发光源包括通过化学反应成为电激发,然后可发射光的化合物,该光可作为可检测信号或将能量传递到荧光受体。已发现很多种类的化合物在许多条件下能够化学发光。一个化合物种类是 2,3-二氢-1,4-邻苯二甲酰肼。常用的化合物是鲁米诺,它是一种 5-氨基化合物。该种类的其它成员包括 5-氨基-6,7,8-三甲氧基-和二甲氨基[ca]苯并类似物。这些化合物可用碱性过氧化氢或次氯酸钙和碱使其发光。另一类化合物是 2,4,5-三苯基咪唑,以洛粉碱(lophine)作为母体产物的通用名。化学发光物类似物包括对-二甲基氨基和-甲氧基取代物。化学发光也可在碱性条件下用草酸盐获得,通常是草酸活性酯,例如,p-硝苯基和过氧化物例如过氧化氢。其它已知的有用的化学发光化合物包括 N-烷基吡啶酯和 1,2-二噁二酮类。或者,虫荧光素可与荧光素酶或光泽精(lucigenin)结合使用以提供生物发光。

[0115] 在一些实施方式中免疫检测在流体装置上进行。虽然可在一些实施方式中进行本

领域公知的竞争性试验,但在某些实施方式中使用两步方法,它不必在将混合物暴露于抗体前将偶联物和样品混合,这在可能在使用极小体积的样品和偶联物时是需要的,例如在本发明流体装置中。当与本文所述流体装置一起使用时,两步法检测比竞争性结合试验有其它优点。它集使用方便和夹心(竞争性结合)免疫检测的高灵敏度于一身,能够检测小分子。

[0116] 在图 10 所示的示例性两步法检测中,包含分析物(“Ag”)的样品首先流过含有抗体(“Ab”)的反应位点。。抗体结合样品中存在的分析物。在样品通过表面后,含有以高浓度结合至标志物(“标记的 Ag”)的分析物的溶液通过表面。偶联物结合任何尚未结合分析物的抗体。在达到平衡和任何预结合的未标记分析物移位发生前,高浓度偶联物溶液被洗去。然后用合适的技术测量结合至表面的偶联物的量,被检测的偶联物与样品中分析物存在的量成反比。

[0117] 两步法检测的示例性测量技术是图 11 所示的化学发光酶免疫检测。如本领域所知,标志物可以是市场上可得的标志物,例如递欧系酮(dioxitane)-磷酸盐,它不是发光性的但在用例如碱性磷酸酶水解后成为发光性的。诸如碱性磷酸酶的酶也经过底物使标志物发光。在一些实施方式中底物溶液增加了增强剂,例如但不限于混合胶粒中的荧光素,可溶性聚合物,或 PVC,较单独的发光体相比,它们形成更亮的信号。并且,采用了比用于商业化试验具有更高转化数的碱性磷酸酶偶联物。这使信号产生过程更快并得到更强的总体信号。两步法化学发光酶免疫检测(TOSCA)增加的灵敏度在图 12 中说明。图 12 显示,对皮摩尔浓度的分析物,TOSCA 能够提供比竞争性结合试验更强的信号(更高灵敏度)。因此两步法结合试验的使用有助于本发明的较高的灵敏度性能。

[0118] 此外,TOSCA 对基质的效果的灵敏度较其它方法低。这可以对未使用标准实验室技术(例如固相分离和色谱法)进行足够预处理的样品进行检测。TOSCA 检测少于理想样品并保持所需灵敏度的能力在图 13 中说明。与竞争性结合试验比较,对于所有的样品制品(和稀释品),TOSCA 灵敏度优于竞争性结合。

[0119] 在流体装置上可进行的免疫检测是 ELISA (酶联免疫吸附试验)。ELISA 的实施通常涉及至少一种能够结合感兴趣的抗原(即指示流感病毒感染的分析物)的抗体。包含或疑为包含感兴趣的抗原的样品被非特异性(如经吸收在表面)或特异性(如经同一抗原的另一特异性抗体俘获,在“三明治”ELISA 中)地固定在支持物上(如微滴定板,孔或其它具有供固定的表面的支持物)。抗原固定后加入检测抗体,与抗原形成复合体。检测抗体可连接至酶,或本身可被转而连接酶的第二抗体检测。在加入被连接的酶的底物后,检测指示样品中抗原存在和 / 或数量的可检测信号。底物的选择基于结合的酶。合适的底物包括荧光性和发色性底物。本领域技术人员熟悉可修改以增加检测信号的各种参数以及其它本领域所知 ELISA 的其它变化。

[0120] 图 14 说明了典型的 ELISA。如图所示,固相俘获表面可包括粘附的第一抗体,在其中加入稀释的血浆(样品)。如果样品中存在分析物,则分析物可结合至第一抗体并被固定。可加入酶试剂,包括例如连接或偶联至酶(例如碱性磷酸酶)的抗体。若酶试剂的抗体部分可结合分析物,则酶试剂也被固定在俘获表面上。加入酶的底物可产生产生结果的产物,例如如图所示可被测量和记录的光。在这种方法中样品中存在的分析物的量可被测量。

[0121] 图 15 说明了用于本发明流体装置的示例性 ELISA。如图所示,装置的固相俘获表

面可包括第一抗体,“固相抗体 1”,是表面固定和试验抗原特异性的(如,病毒神经氨酸酶特异性抗体)。如果试验抗原在试验样品(如血液)中存在,暴露于固相抗体 1 则试验抗体可被固定(俘获)于俘获表面。随后提供对第二试验抗原特异的并包含连接的可检测化合物的第二抗体,标示为“酶标抗体 2”(如病毒血凝素特异性酶标抗体),这可在试验样品(如血液)之后加入。第二结合抗体在俘获表面的结合和随后的检测可指示第一和第二试验抗原在测试样品中的存在。在使用中,第一和第二试验抗原可包括本文所述的任何神经氨酸酶和血凝素类型。

[0122] 尽管示例性实施例中使用不同的第一和第二抗原(和抗体),可以想象使用同一抗体的两种形式(即抗原俘获的固定的固相形式和供检测的酶标形式)检测单一类型的试验抗原。

[0123] 本发明术语“分析物”包括但不限于药物,前药,药物试剂,药物代谢物,生物标志物诸如表达的蛋白质和细胞标志物,抗体,抗原,病毒,血清蛋白质,胆固醇,多糖,核酸,生物学分析物,生物标志物,基因,蛋白质,或激素,或它们的任何组合。在分子水平,分析物可以是多肽,糖蛋白,聚糖,脂质,核酸和它们的组合。

[0124] 感兴趣的是与具体疾病或具体疾病阶段相关的生物标志物。这些分析物包括但不限于与自身免疫疾病相关的分析物。

[0125] 同样感兴趣的是指示微生物的分析物,示例性微生物包括但不限于细菌,病毒,真菌和原生动物。

[0126] 该分析物可指示 A、B 或 C 型流感病毒感染。该分析物包括流感病毒的至少一种表面糖蛋白。示例性表面糖蛋白是,但不限于血凝素和神经氨酸酶。血凝素表面蛋白包括:H1、H2、H3、H4、H5、H6、H7、H8、H9、H10、H11、H12、H13、H14、H15 和 H16。神经氨酸酶表面蛋白包括:N1、N2、N3、N4 和 N5。

[0127] 本发明的一方面是检测多种分析物的系统,其中至少两种分析物指示体液样品中流感病毒感染。该分析物可以是指示 A、B 或 C 型流感病毒感染。该分析物可包括流感病毒的多种表面糖蛋白。在一些实施方式中,多种表面糖蛋白包括血凝素和神经氨酸酶。血凝素可选自以下组:H1、H2、H3、H4、H5、H6、H7、H8、H9、H10、H11、H12、H13、H14、H15 和 H16,神经氨酸酶可选自以下组:N1、N2、N3、N4 和 N5。在优选实施方式中血凝素是 H5,神经氨酸酶是 N1。该系统能够检测和 / 或定量有特殊兴趣的分析物。

[0128] 通过检测例如病毒抗原或该抗原的抗体的存在,流体装置可检测一种类型的流感病毒在对象体液样品中的存在。

[0129] 本方法可检测的分析物还包括选自以下非限制性组的血液携带的病原体,包括:表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*),埃希氏大肠杆菌(*Escherichia coli*),甲氧西林耐受金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MSRA),金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*),人葡萄球菌(*Staphylococcus hominis*),粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*),铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*),头状葡萄球菌(*Staphylococcus capitis*),沃氏葡萄球菌(*Staphylococcus warneri*),肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*),流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*),模仿葡萄球菌(*Staphylococcus simulans*),肺炎葡萄球菌(*Streptococcus pneumoniae*)和白假丝酵母菌(*Candida albicans*)。

[0130] 本方法可检测的分析物还包括多种选自以下组的性传播疾病：淋病(淋病奈瑟球菌 (*Neisseria gonorrhoeae*)), 梅毒(苍白螺旋体 (*Treponema pallidum*)), 衣原体病(砂眼衣原体 (*Chlamydia trachomatis*)), 非淋菌性尿道炎(解脲支原体 (*Ureaplasma urealyticum*)), 霉菌感染(白假丝酵母菌 (*Candida albicans*)), 软性下疳(杜克雷嗜血杆菌 (*Haemophilus ducreyi*)), 滴虫病(阴道毛滴虫 (*Trichomonas vaginalis*)), 生殖器疱疹(I 和 II 型 HSV), HIV I, HIV II 和 A、B、C、G 型肝炎, 以及 TTV 导致的肝炎。

[0131] 也本发明也包括在一些实施方式中对病原体的感染进行监测, 如直接通过检测病原体, 或间接地例如通过检测与病原体相关的分析物(如病毒抗原), 甚至检测与病原体相关的部分或产物的抗体(如病毒抗原的抗体)。还考虑通过免疫相关的对病原体的反应间接检测病原体。病原体的检测可对无症状或有症状的对象试验样品进行。病原体的检测可在对象在病原体感染前, 期间或感染后的试验样品上进行。这样, 可以预见可对早期感染(如一些无症状感染病例中), 或任何晚期感染中的感兴趣的病原体进行监测。

[0132] 如上文所述使用本发明可直接或间接检测对象样品中很大的病原体浓度范围。试验样品中病原体存在的量可以本领域公知的任何方法表达。非限制性的例子中, 病原体的数量可表达为病毒负载(如感染为病毒感染时), 感染单位(IU), 和 / 或每百万细胞或毫升的感染单位(IUPM)。在一个实施例中, 可采用本发明检测试验样品中浓度从 100IU 每毫升样品到 1×10^9 IU 每毫升的病原体。在另一个实施例中, 可采用本发明检测浓度从 1,000IU 每毫升样品直到 1×10^6 IU 每毫升的病原体。

[0133] 在一个独立实施方式中, 本发明提供监测一种以上可用于评估抗流感治疗剂的效果和 / 或毒性的药理学参数。该方法包括将从给予抗流感治疗剂的对象采集的体液样品提供给流体装置, 供监测所述一种以上药理学参数, 所述流体装置包括至少一个样品收集单元, 含有免疫检测反应试剂的试验组件; 驱动所述流体装置并在所述流体装置中引导所述免疫检测试剂; 使所述体液样品与免疫检测试剂反应, 以产生指示所述样品中一种以上药理学参数值的可检测信号; 并检测所述体液样品产生的所述可检测信号。如果需要, 本方法还涉及通过无线信号与该对象联系以一定时间间隔重复该步骤。

[0134] 对本发明的目标, “治疗剂” 的含义包括任何具有治疗作用和 / 或潜能的物质。这样的物质包括但不限于生物性或化学性化合物, 例如单一或复合的有机或无机分子, 肽, 蛋白质(如抗体)或多聚核苷酸(如反义的)。可合成多种化合物, 如聚合物例如多肽和多核苷酸, 和基于各种核心结构的合成有机化合物, 这些物质同样包括在术语“治疗剂”中。此外, 多种天然来源可提供供筛选的化合物, 如植物或动物提取物等。应理解, 尽管未总是清楚说明药剂是单独使用或与其它药剂联合使用, 但这些治疗剂可具有与本发明识别的药剂相同或不同的生物学活性。药剂或方法同样意图与其它疗法联合。

[0135] 本发明的药效(PD)参数包括但不限于物理参数例如温度、心率 / 脉搏、血压、和呼吸频率, 和生物标志物例如蛋白质, 细胞和细胞标志物。生物标志物可指示疾病或可以是药物作用的结果。本发明的药代动力学(PK)参数包括但不限于药物和药物代谢物浓度。从样品体积实时识别和定量 PK 参数对药物的正确安全性和有效性是极其需要的。如果药物和代谢物浓度在理想范围之外和 / 或由于药物的非预期反应产生了非预期的代谢物, 必须及时处理以保证对象的安全。同样, 如果在治疗方案中任何药效(PD)参数在理想范围之外, 同样需要立即采取行动。

[0136] 在优选实施方式中,物理参数数据被存储在生物信息系统中或与该系统存储的物理参数数据特征比较,生物信息系统可位于外部设备,将药物基因组学(pharmacogenomic)和药代动力学数据加到它的确定毒性和剂量的模型中。这不仅可比目前方法早很多年生成临床试验数据,而且通过实时连续监测也能够消除药物的表观有效性和实际毒性间存在的差异。在临床研究的有效/无效决定过程中,使用存储在数据库中的数据可进行大规模的对照性群体研究。这种汇编的数据和实时监测使更多对象以早于目前允许的方式以安全的方式进入临床试验。在另一实施方式中人体组织研究中发现的生物标志物可通过该装置以改进的精确度确定,以确定癌症研究中的药物途径和有效性。

[0137] 在另一实施方式中,本发明提供了检测至少两种不同的指示对象体液样品中不同浓度流感病毒感染的分析物的方法,包括提供流体装置,该流体装置包含样品收集单元,试验组件,和与所述样品收集单元和/或所述试验组件流体连通的多个通道;使体液样品与包含在所述试验组件中的多种反应物反应,以产生指示所述至少两种分析物浓度的信号;检测指示至少所述两种不同分析物存在或不存在的所述信号,其中所述信号在3个数量级范围内可检测。

[0138] 目前,存在检测一种以上以很大的浓度范围存在的指示流感病毒感染的分析物的需要,例如一种分析物为pg/ml浓度而另一种为ng/ml浓度。化学发光-ELISA能够同时测定以很大浓度范围存在于同一样品中的分析物。能够检测以大浓度范围存在的不同分析物的浓度的另一个优点是能够将这些分析物的浓度比与给予对象的多种药物的安全性和有效性关联。例如,非预期的药物-药物间的反应可能是药物不良反应的常见原因。测量不同分析物的实时、并行测量技术将帮助避免药物-药物间不良反应的潜在灾难性后果。

[0139] 能够监测对象一段时间内分析物浓度或PD或PK的变化率,或进行浓度、PD或PK的趋势分析,不论是药物浓度或其代谢物的浓度,都可帮助防止潜在的危險状况。例如,如果葡萄糖是感兴趣的分析物,在给定时间里样品中葡萄糖的浓度以及在给定的时间段中葡萄糖浓度的变化率对预测和避免例如低血糖事件是非常有用的。这种趋势分析在药物剂量制定中具有广泛应用价值。当用于多种药物及其代谢物时,常需要描记趋势和采取提前测量的能力。

[0140] 因此,本发明提供了对指示对象流感病毒感染的分析物的浓度进行趋势分析的方法。该方法包括a)提供流体装置,该流体装置包含至少一个样品收集单元,容纳免疫检测试剂的免疫检测组件,与所述样品收集单元和/或所述免疫检测组件液体连通的多个通道;b)启动所述流体装置并在所述流体装置内引导所述免疫检测试剂;c)使体液样品与容纳在所述免疫检测组件中的免疫检测试剂反应,以产生指示所述样品中存在所述分析物的可检测信号;和d)检测来自收集在所述体液样品中的分析物产生的所述可检测信号;和e)一段时间内对同一对象重复步骤a)到d)以检测所述分析物的浓度,从而实施所述的趋势分析。

[0141] 在一些实施方式中,提供了使用从外部设备传递的试验检测在对象体液样品中指示流感病毒感染的分析物的方法。该方法包括提供流体装置,该流体装置包含至少一个样品收集单元和包含免疫检测试剂的免疫检测组件;检测所述流体装置并无线传递免疫检测方案到所述装置;使用所述传递的免疫检测方案,使体液样品与免疫检测试剂反应,产生指示所述分析物存在的可检测信号;并检测所述可检测信号。

[0142] 读取组件和外部存储设备之间的通信使本发明读取组件能够基于流体装置的身

份下载针对该流体装置的方案,以在该流体装置上实施。这使读取装置与本文所述任何合适的流体装置可互换使用。此外,外部设备可存储与给定流体装置相关的多个方案,并基于例如对象的治疗方案或计划,可从外部设备将不同的方案传递至读取组件,以在流体装置上运行,以检测指示流感病毒感染的多种分析物。外部设备也可存储多种方案,这些方案不仅与流体装置相关,还与特定对象或对象群相关,这样一个方案可与对象以及流体装置相关。

[0143] 本发明允许对对象药理学参数自动定量,同时能够自动将该参数与例如可包括该对象受监测参数的历史的医疗记录,或其他组对象的医疗记录比较。实时分析物监测与可存储数据以及进行任何类型数据处理或运算的外部设备的耦合提供了可辅助典型对象护理的装置,它可包括例如,将当前对象数据与以前的对象数据比较。因此本发明建立了有效实现至少部分对象监测的商业方法,这些监测目前由医务人员实现。

[0144] 预想的网络的一个显著优点在图 20 中说明。由于所有信息通过因特网安全沟通,它允许信息与不同的感兴趣组织同时共享,同时满足适当的临床、管理和商业需求。

[0145] 在一些实施方式中,本发明提供经手提设备传递对象药理学参数的方法,包括提供流体装置,该流体装置包含至少一个样品收集单元和试验组件;使体液样品与包含在所述试验组件中的反应物反应,产生指示流感病毒的分析物的存在的可检测信号;检测所述可检测信号;传递所述信号至外部设备;在所述外部设备中处理所述信号;经手提设备传递所述经处理的信号。

[0146] 本发明的一个优点是试验结果可基本即刻通信至可从该结果受益的任何第三方。例如,一旦在外部设备确定了分析物浓度,该浓度即可被传递至患者或可能需要采取进一步措施的医务人员。与第三方的通信步骤可如本文所述以无线方式进行,通过将数据传递到第三方的手提设备,实际上可在任何时间、任何地点通知第三方检测结果。因此,在时间灵敏度方面,若需要紧急的医疗行为,可在任何地方立即联系患者。

[0147] 在一些实施方式中,自动选择一个方案在流体装置上运行的方法包括:提供包含标识检测器和标识符的流体装置;用所述标识检测器检测所述标识;将所述标识符传送到外部设备;在外部设备上从多个方案中选择一个与标识符相关的将在所述流体装置上运行的方案。

[0148] 在其插入读取组件后通过基于与流体装置相关的标识符检测每个流体装置,本发明的系统允许从外部设备下载流体装置特异的方案并在流体装置上运行。在一些实施方式中外部设备可存储与流体装置相关的或与具体对象或对象组相关的多个方案。例如,当标识符传递到外部设备,外部设备的软件可获取标识符。一旦获得,外部设备上的软件,例如数据库,可使用该标识符识别存储在数据库中与标识符关联的方案。如果,例如只有一个方案与标识符关联,则数据库可选择该方案,然后外部设备的软件可传递此方案至读取组件上的通信组件。使用与流体装置特异性相关的方案的能力使任何合适的流体装置能与单个读取组件一起使用,因此实际上任何感兴趣的分析物可用一个读取组件检测。

[0149] 在一些实施方式中,多个方案可与一个标识符相关。例如,如果对同一对象的某个分析物每星期检测一次,而另一种分析物每周两次是有益的话,外部设备上与标识符相关的方案也可分别与一星期不同的天关联,这样当检测到该标识符时外部设备上的软件可选择与该星期的那一天关联的具体方案。

[0150] 在一些实施方式中,一个对象可使用多个流体装置以检测多种分析物。例如,一个对象可在一个星期不同天使用不同的流体装置。在一些实施方式中外部设备上的将方案与标识符关联的软件可包括比较当天与基于临床试验将使用流体装置的那一天的方法。如果,例如,一星期中的两天是不同的,外部设备可使用任何本文所述方法或本领域已知方法无线发送通知给对象,通知他们读取组件中有不正确的流体装置,以及那天应使用的正确的流体装置。该实施例仅是说明性的,可被方便地发展到,如提醒对象一个流体装置未在一天正确的时间使用。

[0151] 在一些实施方式中,本发明提供了获取可用于评估实验动物抗流感药物制剂有效性和 / 或毒性的药理学数据的方法。该方法涉及以下步骤 a) 提供流体装置,该流体装置包含至少一个样品收集单元,一个试验组件,与所述样品收集单元和 / 或所述试验组件液体连通的多个通道 ;b) 使少于约 50u1 的生物液体样品与容纳在所述试验组件中的反应物反应,以产生指示流感病毒感染的分析物产生的可检测信号,所述分析物最初在所述样品中收集,所述分析物指示药理学参数 ;和 c) 检测所述可检测信号 ;和 d) 对来自同一实验动物的第二生物液体样品重复反应和检测步骤。在相关实施方式中,本发明提供一种方法,该方法包括 a) 提供流体装置,包含至少一个样品收集单元,一个试验组件,与所述样品收集单元和 / 或所述试验组件液体连通的多个通道 ;b) 使生物液体样品与容纳在所述试验组件中的反应物反应,以产生从最初在所述样品中收集的指示药理学参数的分析物产生的可检测信号 ;和 c) 检测所述可检测信号 ;和 d) 对来自同一实验动物的第二生物液体样品重复反应和检测步骤,其中动物未进行麻醉。

[0152] 当使用实验动物进行抗流感药物试剂的临床前实验时,常需要处死实验对象以采集足够的血液进行测定,以检测感兴趣的分析物。由于可从实验动物抽取一定数量的血液而不必处死动物,这从经济上和伦理上都是有意义的。此外,可允许同一实验动物在不同时间用多种药物试剂进行实验,从而可进行更多有效的临床前试验。小鼠的平均总血容量是每 100 克体重 6 — 8 毫升血液。本发明的一个益处是对于小鼠或其它小型实验动物仅需要极少量的血液进行临床前试验。在一些实施方式中抽取约 1 微升到约 50 微升血液。在优选实施方式中抽取约 1 微升到约 10 微升。在优选实施方式中抽取约 5 微升血液。

[0153] 保留实验动物生命的另一个优点在临床前时间段研究中是明显的。例如当使用多只小鼠监测实验对象体液中的分析物随时间的水平时,使用多个对象加入的变量被引入试验中。但是,当在一段时间内可使用单个实验动物作为其自身对照时,可实现更精确和有益的临床前试验。

[0154] 虽然已在本文中显示和描述本发明的优选实施方式,显然对本领域技术人员而言这些实施方式仅作为示例提供。在不背离本发明的情况下本领域技术人员可进行各种更改、变化和替换。应理解在实现本发明时可采用本文描述的本发明的实施方式的不同变化。以下权利要求意在限定本发明的范围,这些权利要求范围内的方法和结构及其等价体包含在本发明的范围内。

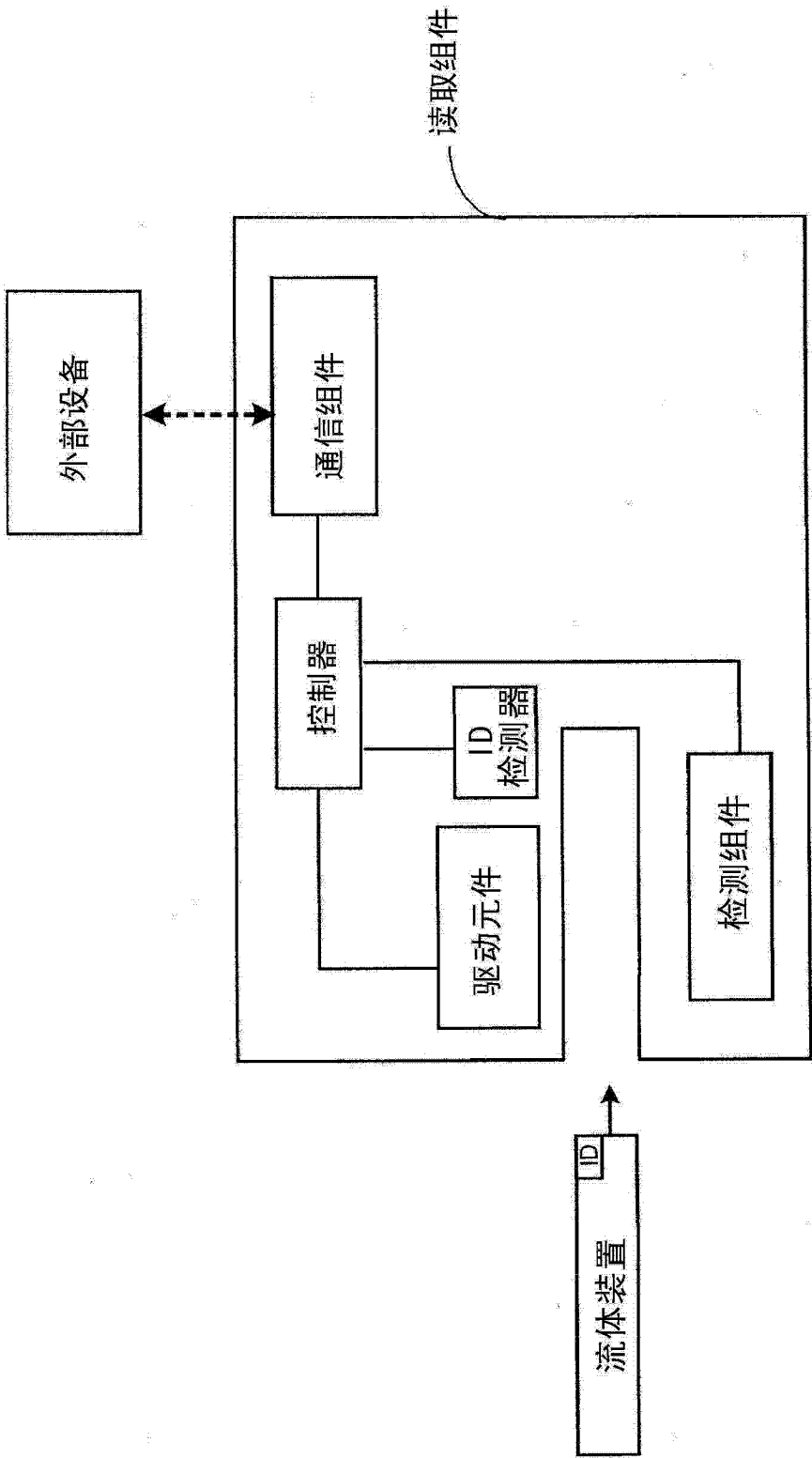


图 1

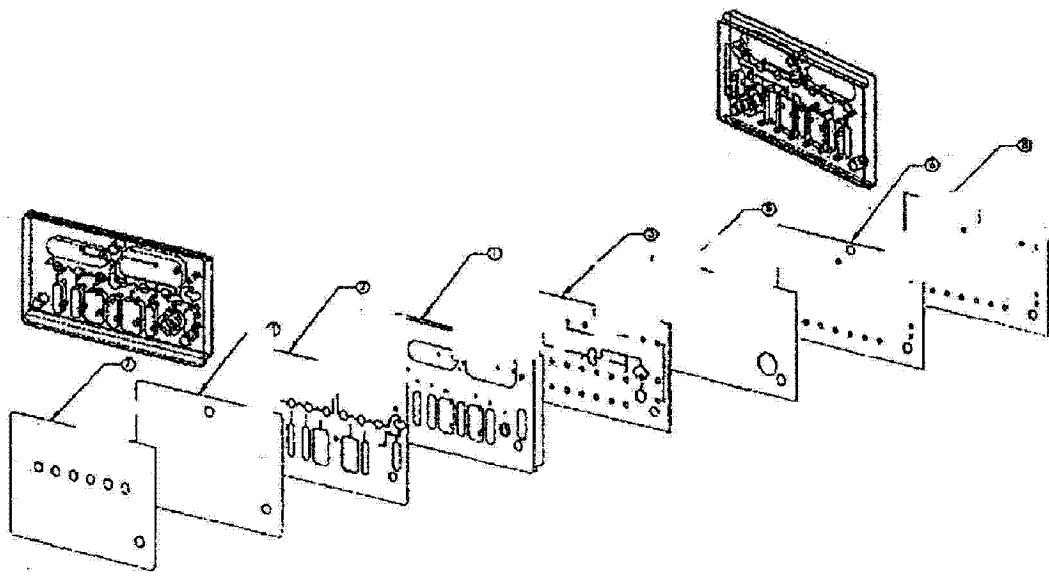


图 2

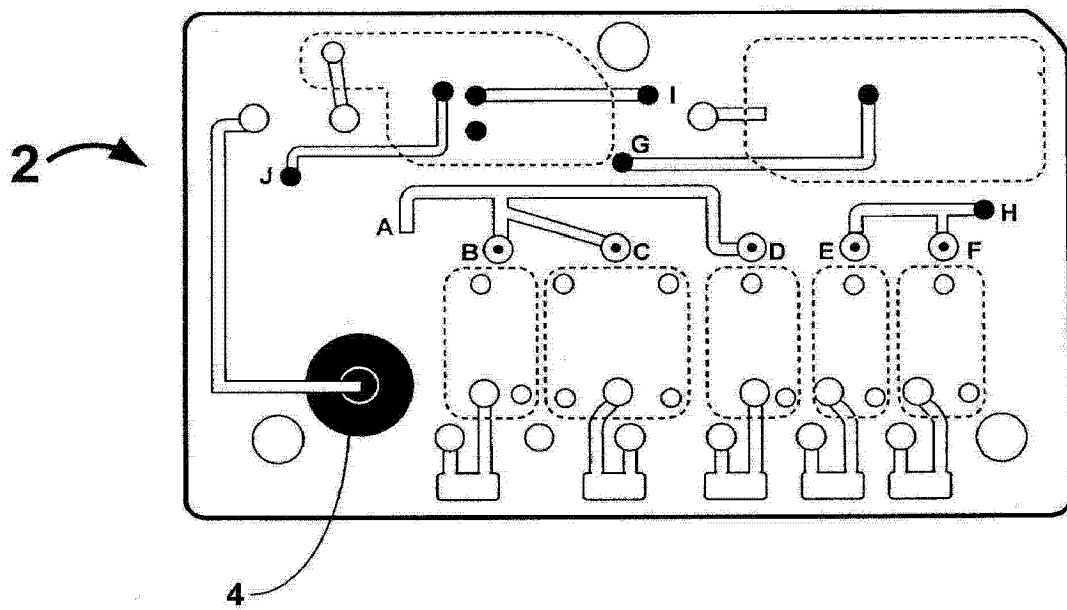


图 3

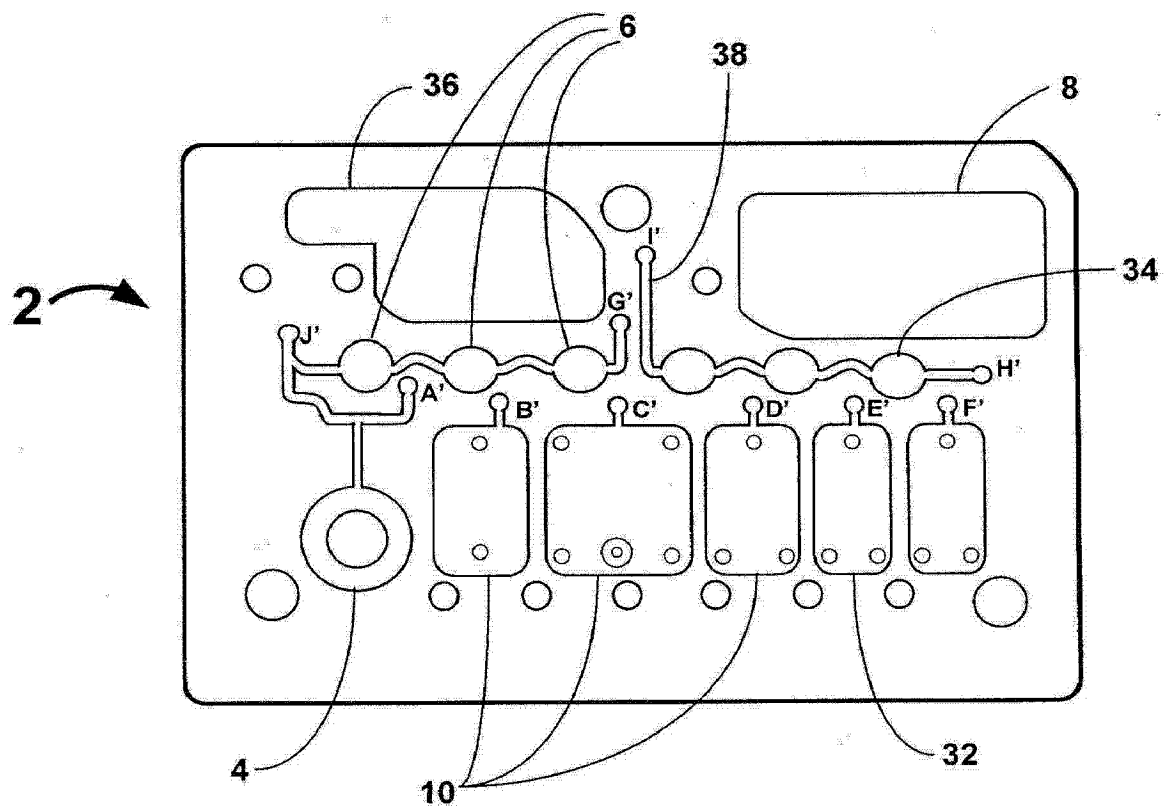


图 4

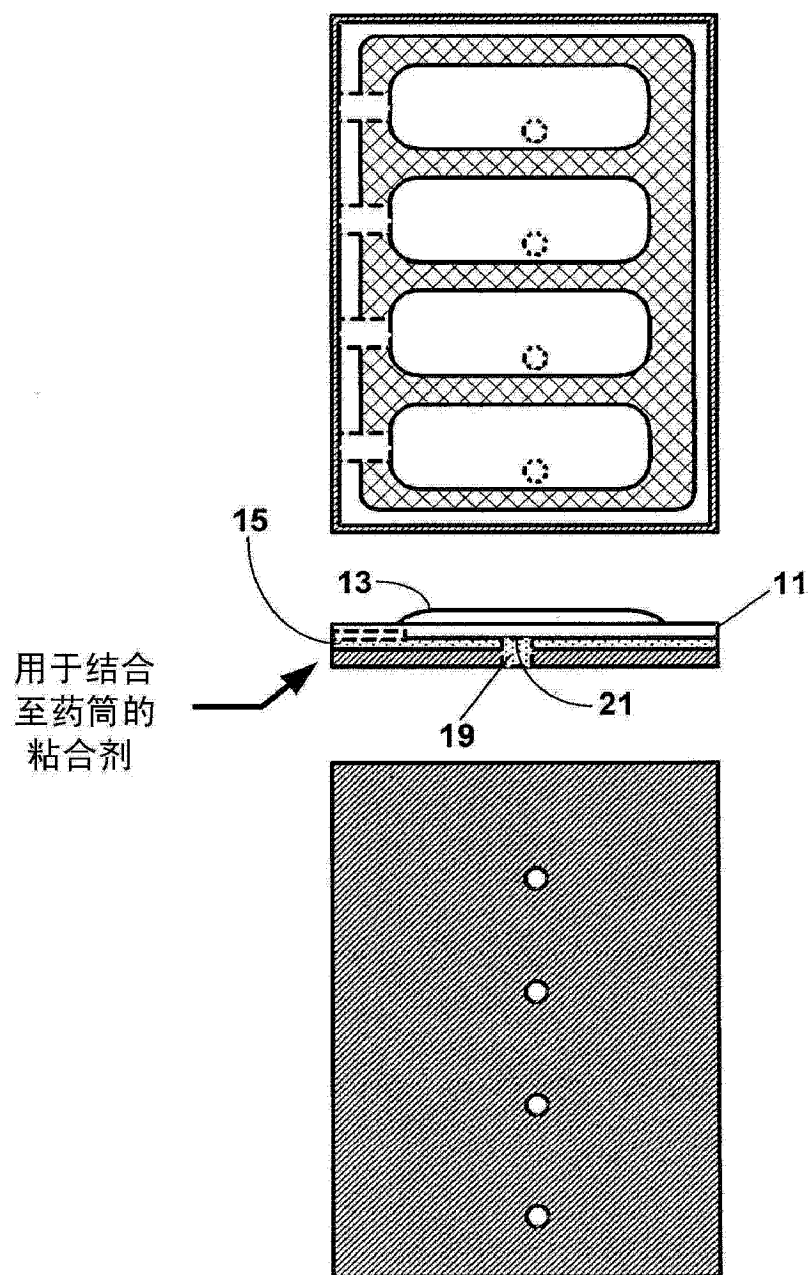


图 5

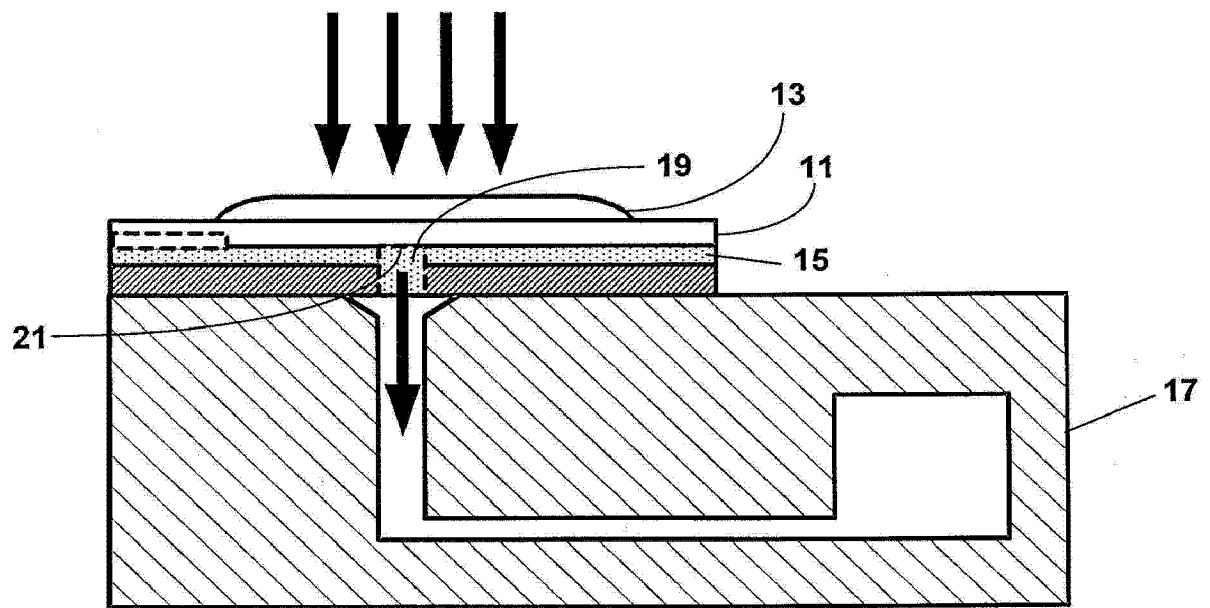


图 6

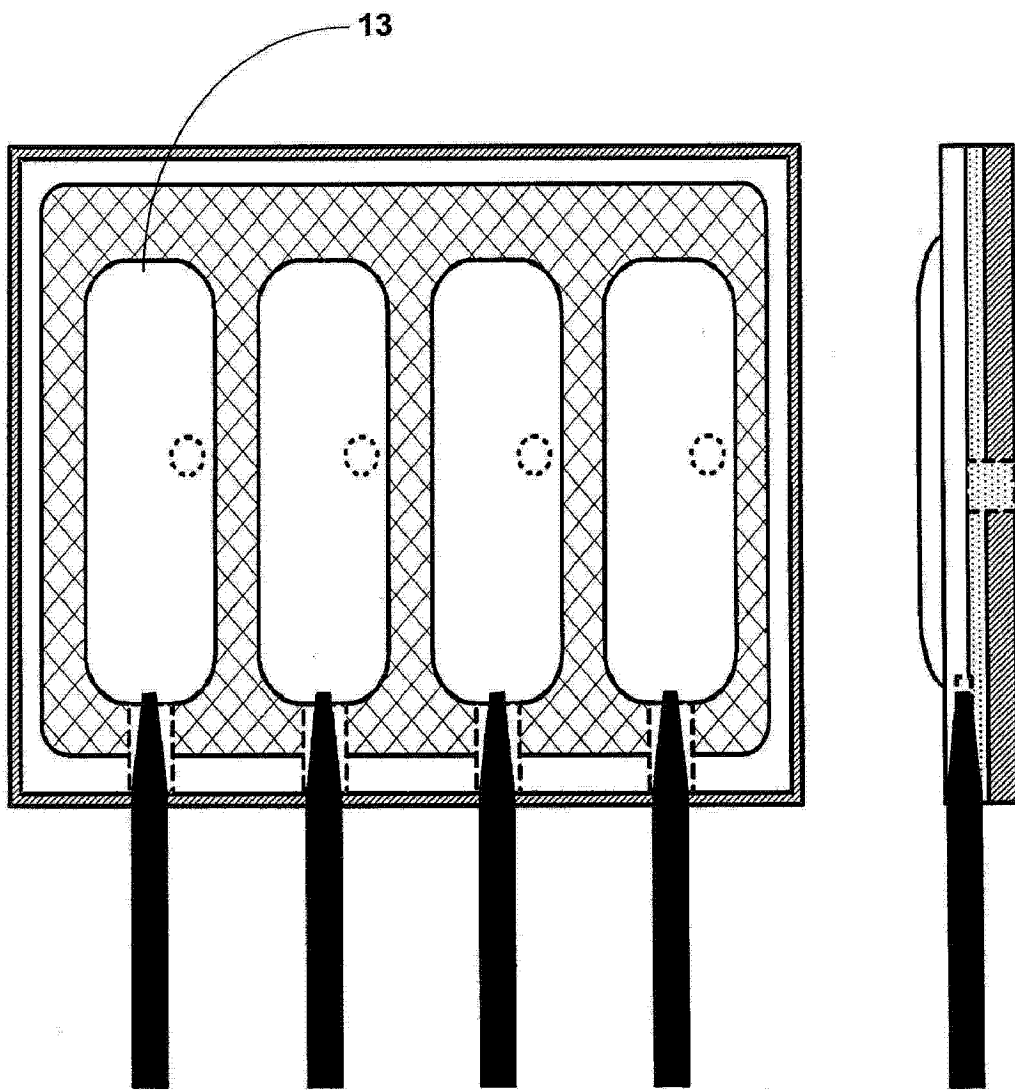


图 7

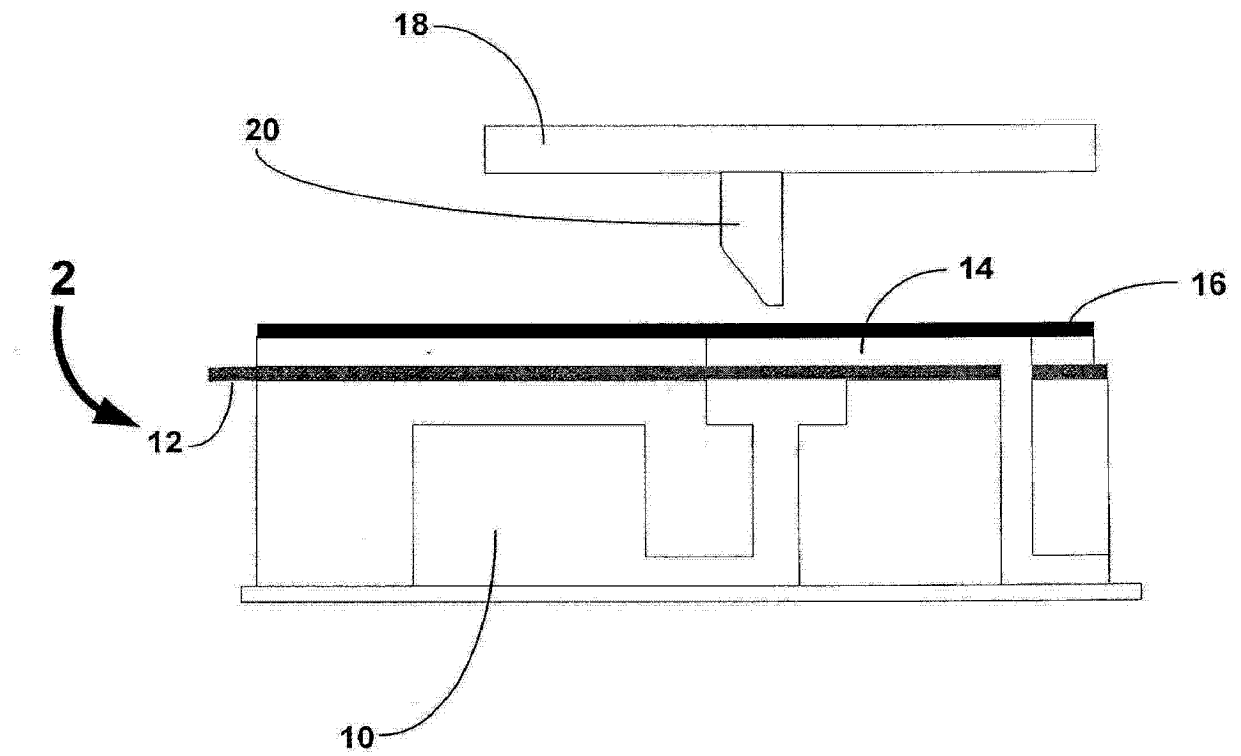


图 8

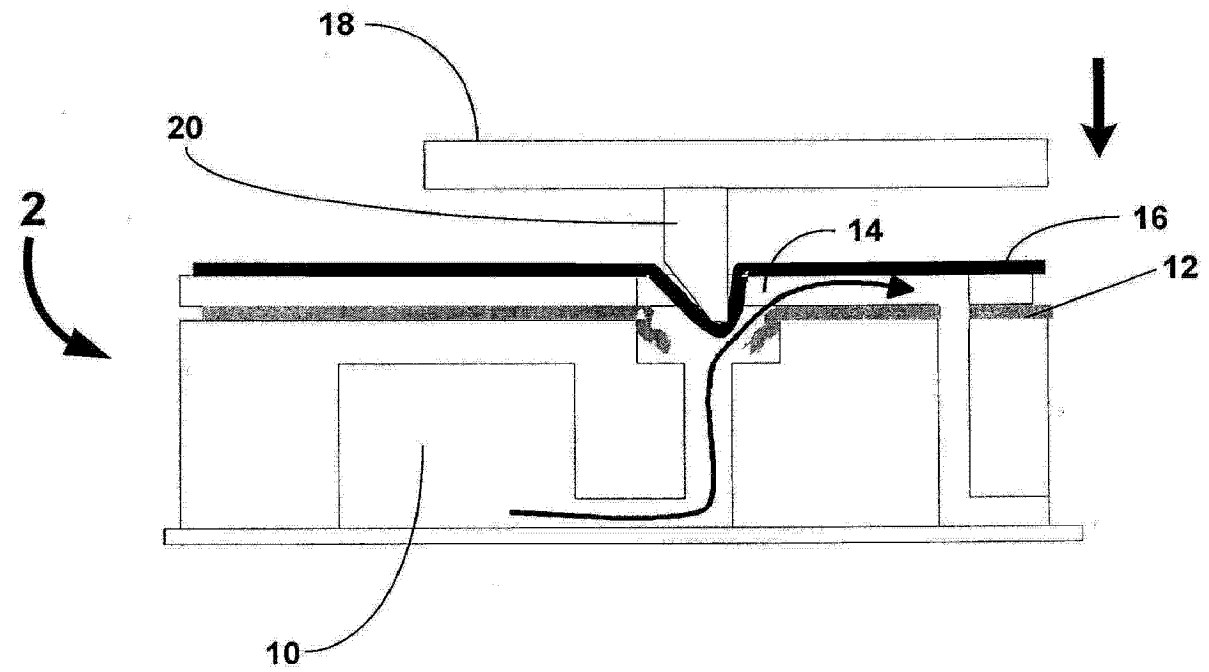


图 9

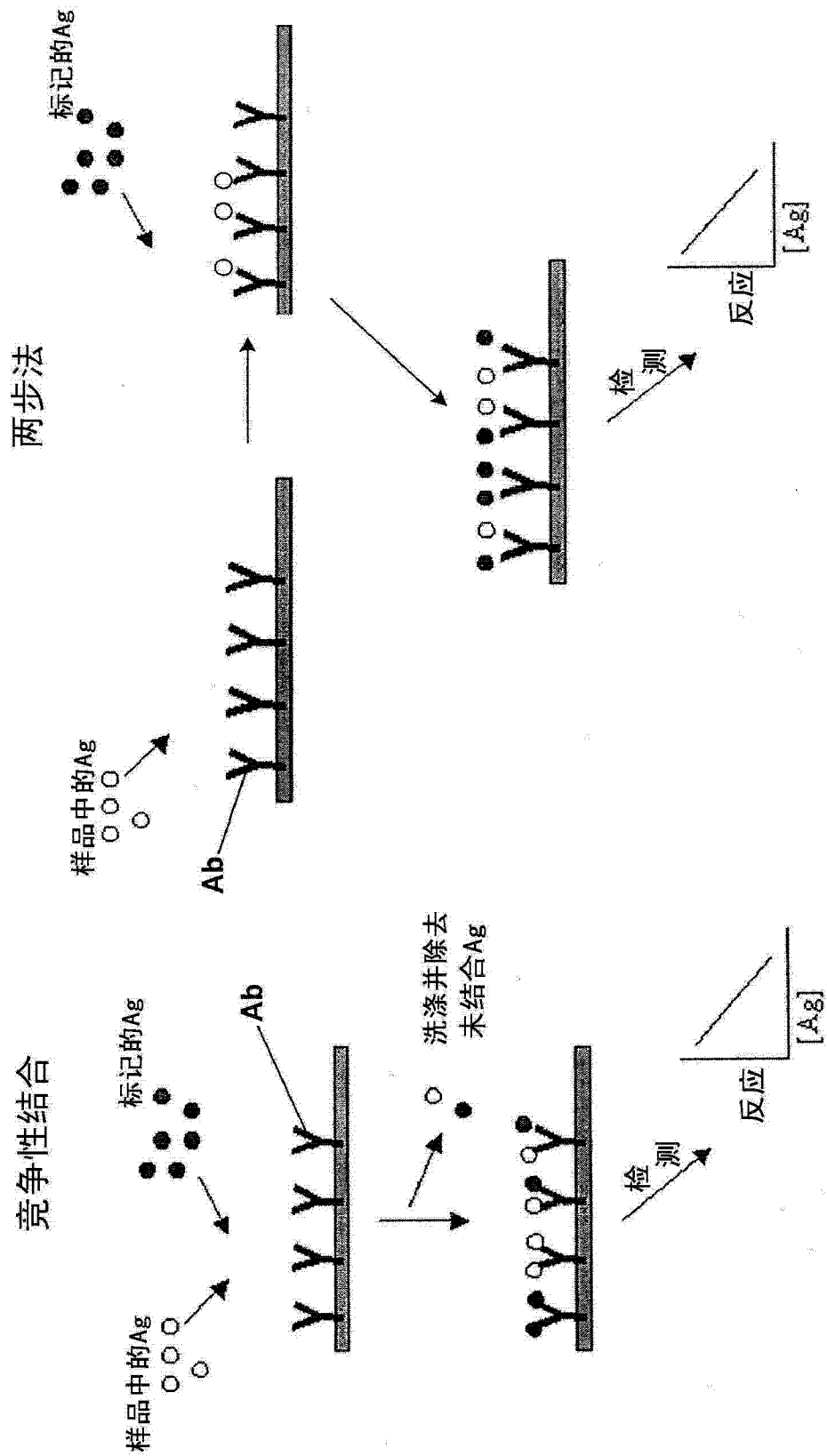


图 10

化学发光酶免疫检测

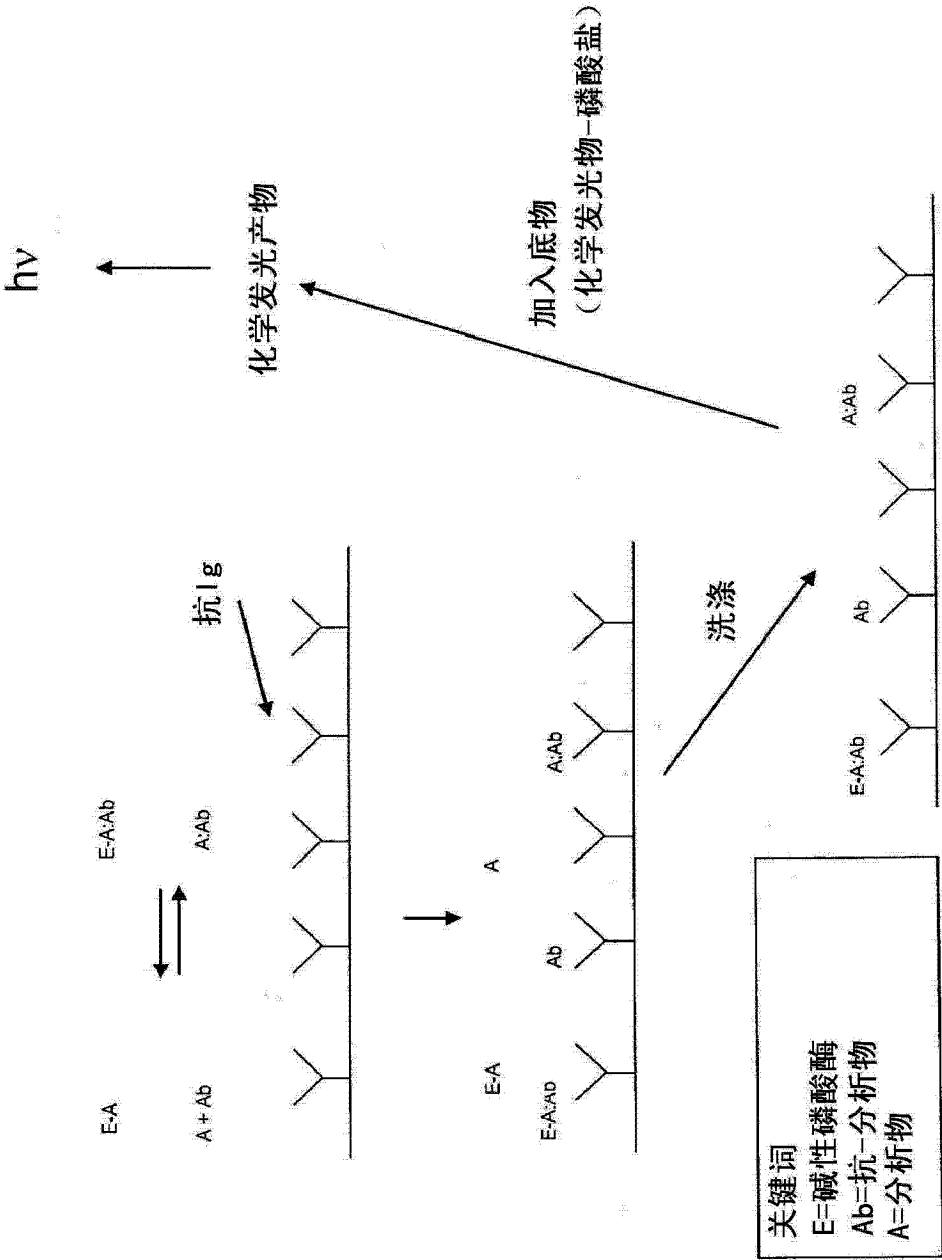


图 11

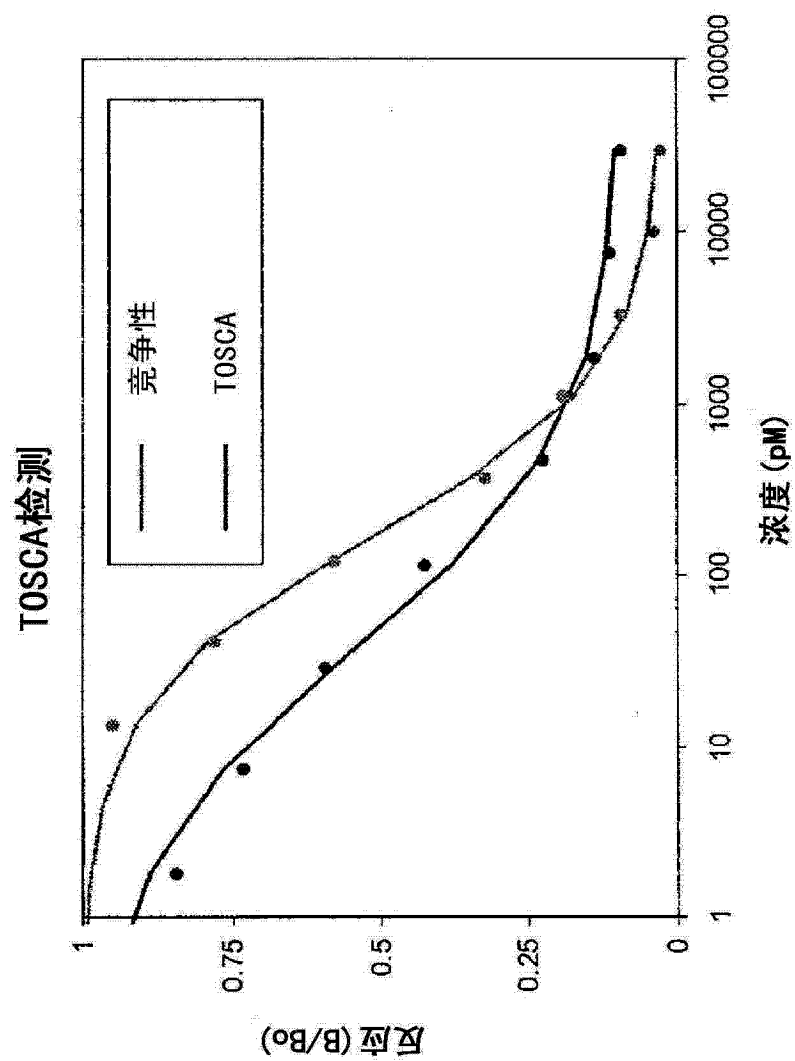
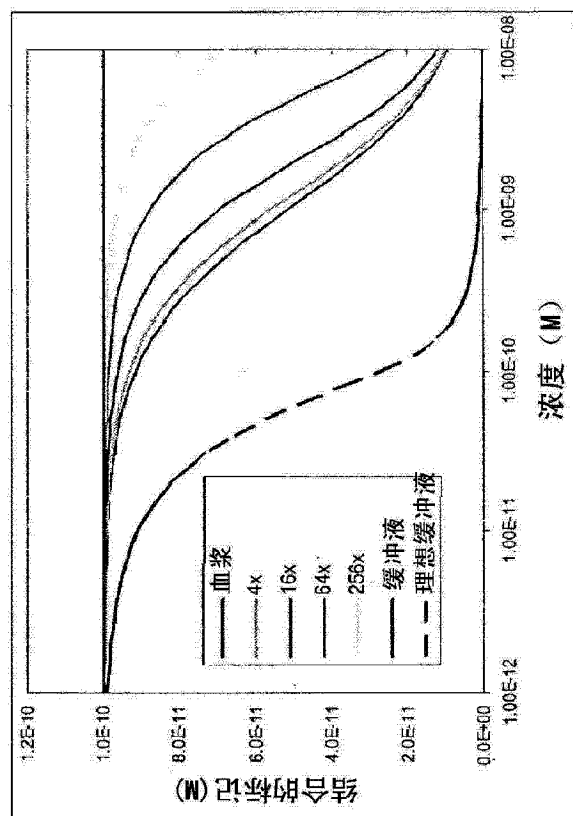


图 12

血浆效果

两步法



竞争性结合

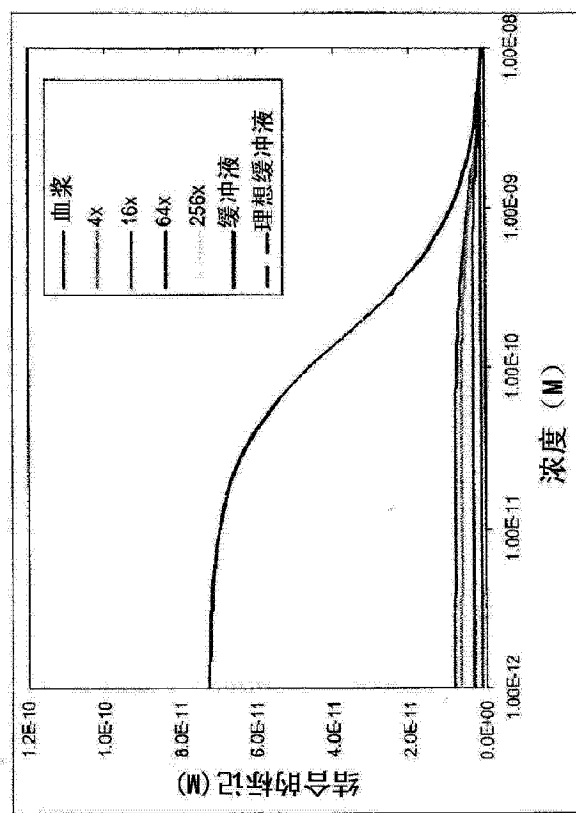


图 13

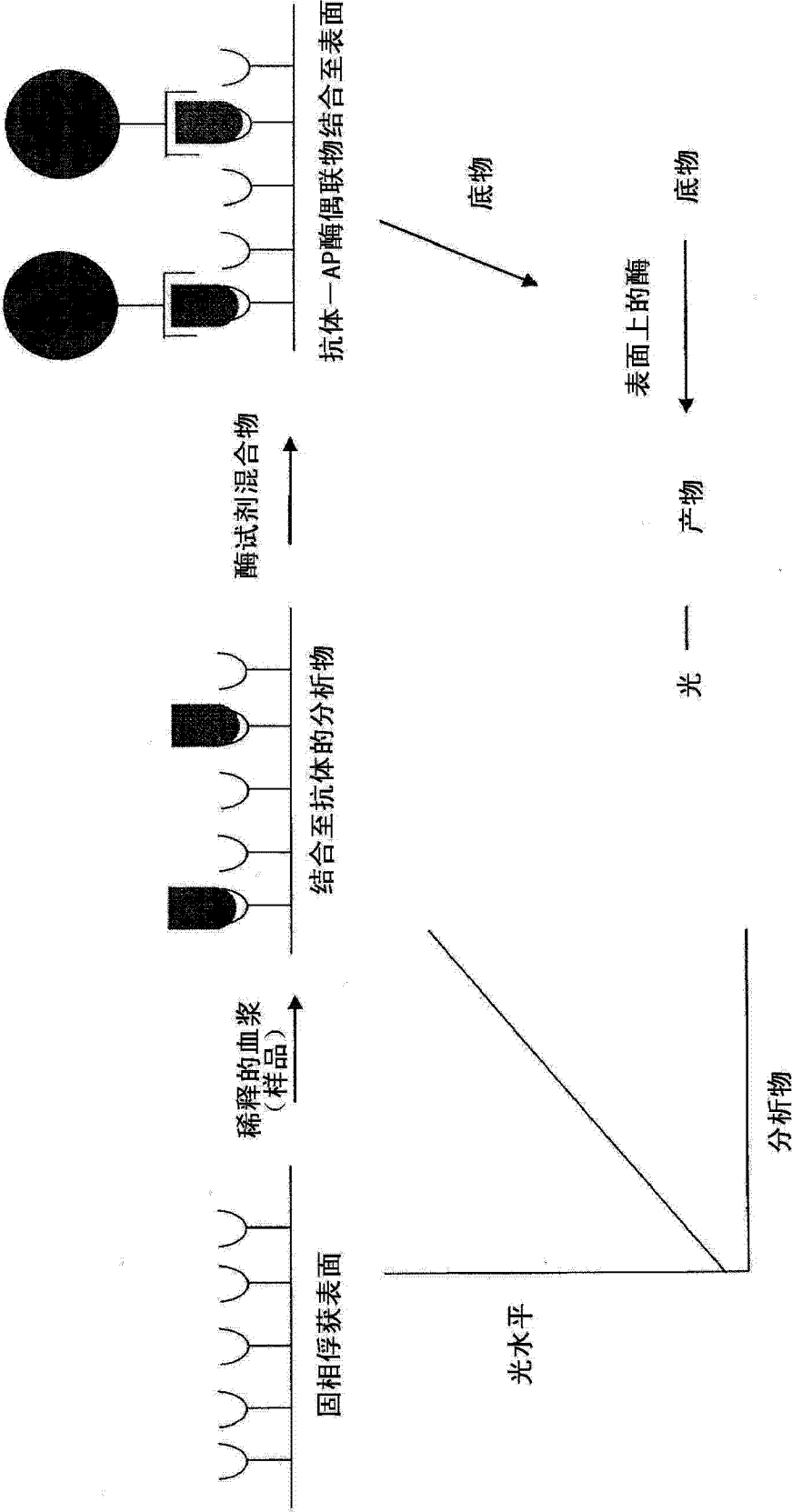


图 14

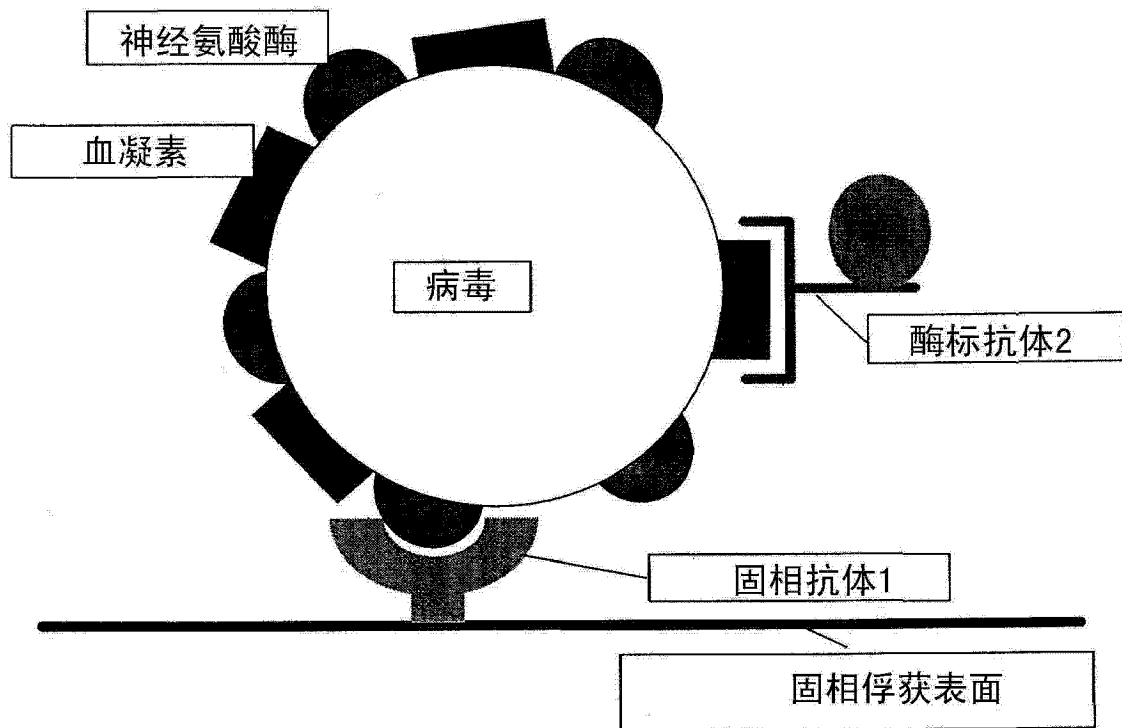


图 15