



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109964130 A

(43)申请公布日 2019.07.02

(21)申请号 201780055740.7

(22)申请日 2017.07.28

(30)优先权数据

2016902981 2016.07.28 AU

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.03.11

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/AU2017/050788 2017.07.28

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/018095 EN 2018.02.01

(71)申请人 麦克法兰布奈特医疗研究与公共健

康研究所有限公司

地址 澳大利亚墨尔本

(72)发明人 大卫·安德森 里亚·帕尔乔杜里

苏珊娜·克罗 克洛维斯·帕默尔

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

代理人 郑斌 彭鲲鹏

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

权利要求书3页 说明书32页 附图17页

(54)发明名称

估计细胞群体

(57)摘要

一种用于帮助诊断患者/受试者的败血症或重度感染的免疫测定,所述测定包括以下步骤:(i)任选地,使来自所述患者的包含嗜中性白细胞的测试样品与使嗜中性白细胞渗透化或溶解的试剂接触;(ii)与(i)同时或依序,使所述样品与特异性结合所述样品中的CD64并形成CD64-结合剂复合物a的结合剂接触;(iii)与(i)和/或(ii)同时或依序,使所述样品与特异性结合所述样品中的嗜中性白细胞数目标志物(NNM)并形成嗜中性白细胞标志物-结合剂复合物b的第二结合剂接触;(iv)采用复合物a和复合物b的量来确定所述样品中CD46的相对水平和NNM的相对水平。

1. 一种适于帮助诊断败血症或重度感染的用于评估测试样品嗜中性白细胞活化的免疫测定,所述测定包括以下步骤:

(i) 任选地,使所述样品与使嗜中性白细胞渗透化或溶解的试剂接触;

(ii) 与(i)同时或依序,使所述样品与特异性结合所述样品中的CD64并形成CD64-结合剂复合物a的结合剂接触;

(iii) 与(i)和/或(ii)同时或依序,使所述样品与特异性结合所述样品中的嗜中性白细胞数目标志物(NNM)并形成嗜中性白细胞标志物-结合剂复合物b的第二结合剂接触;

(iv) 采用复合物a和复合物b的量来确定所述样品中CD46的相对水平和NNM的相对水平;以及

(v) 直接或间接地将所述样品评分为包含对照(例如健康)或超常水平的嗜中性白细胞CD64/活化。

2. 一种用于帮助诊断患者/受试者的败血症或重度感染的免疫测定,所述测定包括以下步骤:

(i) 任选地,使来自所述患者的包含嗜中性白细胞的测试样品与使嗜中性白细胞渗透化或溶解的试剂接触;

(ii) 与(i)同时或依序,使所述样品与特异性结合所述样品中的CD64并形成CD64-结合剂复合物a的结合剂接触;

(iii) 与(i)和/或(ii)同时或依序,使所述样品与特异性结合所述样品中的嗜中性白细胞数目标志物(NNM)并形成嗜中性白细胞标志物-结合剂复合物b的第二结合剂接触;

(iv) 采用复合物a和复合物b的量来确定所述样品中CD46的相对水平和NNM的相对水平;以及

(v) 直接或间接地将所述样品以及因此将所述患者评分为不被指示有败血症或重度感染或被指示有败血症或重度感染。

3. 如权利要求1或2所述的测定,其中步骤(i)包括使所述样品与使嗜中性白细胞渗透化或溶解的试剂接触以便确定CD64的总(即内部和外部)量。

4. 如权利要求1或2或3所述的测定,其中所述样品是全血细胞样品。

5. 如权利要求1或2所述的测定,其中使所述样品消滅一种或多种白细胞诸如单核细胞或巨噬细胞,或所述样品已被消滅了一种或多种白细胞诸如单核细胞或巨噬细胞。

6. 如权利要求1至5中任一项所述的测定,其中步骤(v)包括将所述测试样品中CD64和/或NNM的水平与从对照健康样品预先确定的相应CD64和/或NNM水平进行比较。

7. 如权利要求1至6中任一项所述的测定,其中步骤(v)包括确定来自所述测试样品的CD64和NNM的比率(CD64:NNM)。

8. 如权利要求1至7中任一项所述的测定,其中步骤(v)包括当CD64水平高于健康对照群体的预定平均值加2个或更多个标准偏差时,评分为嗜中性白细胞活化或败血症或重度感染。

9. 如权利要求1至7中任一项所述的测定,其中步骤(v)包括当NNM水平高于健康对照群体的预定平均NNM水平加3个或更多个标准偏差时,评分为嗜中性白细胞活化或败血症。

10. 如权利要求1至8中任一项所述的测定,其中步骤(v)包括当相较于预定乘数的针对所选对照群体的CD64相对于NNM的最佳拟合线,来自所述测试样品的CD64水平相对于NNM水

平得以升高时,评分为嗜中性白细胞活化或败血症或重度感染。

11. 一种用于帮助诊断或预测患者/受试者的败血症或重度感染的免疫测定,所述测定包括以下步骤:

(i) 任选地,使来自所述患者的包含嗜中性白细胞的测试样品与使嗜中性白细胞渗透化或溶解的试剂接触;

(ii) 与(i)同时或依序,使所述样品与特异性结合所述样品中的CD64并形成CD64-结合剂复合物a的结合剂接触;

(iii) 与(i)和/或(ii)同时或依序,使所述样品与特异性结合所述样品中的嗜中性白细胞数目标志物(NNM)并形成嗜中性白细胞标志物-结合剂复合物b的第二结合剂接触;

(iv) 采用复合物a和复合物b的量来确定所述样品中CD46的(相对)水平和NNM的(相对)水平;以及

(v) 直接或间接地将所述样品以及因此将所述患者评分为不被指示有败血症或重度感染或被指示有败血症或重度感染,并且其中步骤(v)包括将所述测试样品评分为包含以下项中的一者或两者或三者:(i) 相对于对照群体,高于平均值加2个或更多个标准偏差的升高CD64;(ii) 相对于对照群体,高于平均值加3个或更多个标准偏差的升高NNM;和(iii) CD64相对于NNM得以升高。

12. 如权利要求11所述的测定,其中步骤(i)包括使所述样品与使嗜中性白细胞渗透化或溶解的试剂接触以便确定CD64的总(即内部和外部)量。

13. 如权利要求11或12所述的测定,其中所述所选对照群体是新生儿受试者群体。

14. 如权利要求1所述的测定,其包括如果CD64/NNM比率超过随所述测试样品中所述NNM的量而变化来预先确定的截止水平(针对嗜中性白细胞数目加以内部修正),那么将所述受试者诊断为具有超常量的嗜中性白细胞CD64/活化。

15. 如权利要求7所述的测定,其中所述样品中所述CD64与NNM的比率针对使用所述样品中的所述NNM水平确定的所述样品中的所述嗜中性白细胞数目加以内部修正。

16. 如权利要求1至15中任一项所述的测定,其中所述NNM选自:嗜中性白细胞弹性蛋白酶(NE)、乳铁传递蛋白、髓过氧化物酶和人嗜中性白细胞载脂蛋白。

17. 如权利要求1至16中任一项所述的测定,其中所述测定是床旁测定。

18. 如权利要求1至17中任一项所述的测定,其中所述测定是基于酶联免疫吸附(ELISA)类型、流式细胞计量术、珠粒阵列、侧流、盒体、微流体或免疫色谱的方法等。

19. 如权利要求1至18中任一项所述的测定,其中所述结合剂是抗体或其抗原结合片段或衍生物、抗原结合构建体诸如affimer、适体或配体或其结合部分。

20. 如权利要求1至19中任一项所述的测定,其中所述结合剂被固定在载体上。

21. 如权利要求1至20中任一项所述的测定,其中在步骤(ii)中,通过将所述样品施加到免疫测定装置的样品部分来使所述样品与步骤(ii)和(iii)的所述结合剂接触,其中所述装置样品部分可操作地连接到所述装置的经分隔捕获部分,并且借此所述样品的组分从所述装置样品部分流向并穿过所述装置捕获部分,并且其中一个捕获部分包含特异性结合所述样品中的CD64的所述结合剂,以使CD64在所述捕获部分中由所述结合剂捕获以形成结合剂-CD64复合物,并且其中第二捕获部分包含特异性结合所述样品中的NNM的所述结合剂,以使NNM在所述捕获部分中由所述结合剂捕获以形成结合剂-嗜中性白细胞数目标志物

复合物。

22. 如权利要求1至21中任一项所述的测定,其中使用分别结合CD64或NNM,并且直接或间接地提供可目视定量或通过仪器定量的可检测信号的结合剂检测CD64复合物的量和NNM结合剂复合物的量,所述结合剂为诸如抗体或抗原结合片段、配体、适体或affimer。

23. 如权利要求22所述的测定,其中包含软件的所述仪器用于输入基于CD64和NNM的观察量/水平的数据,并且任选地,遵循本文公开的诊断算法诸如在前述权利要求中限定的那些诊断算法,相对于包含来自对照受试者/群体的数据的数据的数据库对所述数据进行管理/处理。

24. 如权利要求1至23中任一项所述的测定,其中所述结合剂缀合到可检测标记或包含可检测标记的微粒,所述可检测标记或包含可检测标记的微粒提供可检测信号。

25. 如权利要求21至24中任一项所述的测定,其中所述捕获部分是测试线。

26. 如权利要求1至25中任一项所述的测定,其中所述败血症是新生儿败血症。

27. 一种诊断试剂盒或部件,其包括(i)免疫测定(诸如POC)装置,所述免疫测定装置包括微通道或多孔膜可操作地连接到样品部分、两个或更多个捕获(测试)部分,以及任选可操作地连接到以下项中的一者或多者:缀合物(检测标记)部分、吸器部分、适合控制部分以及细胞裂解剂、稀释剂或溶解剂部分,和(ii)特异性结合样品中的CD64并形成CD64-结合剂复合物的结合剂,和特异性结合样品中的NNM并形成NNM-结合剂复合物的第二结合剂,其中所述结合剂被固定到单独捕获部分和/或包含于缀合物部分内,和(iii)任选地,用于使用适于帮助诊断败血症或重度感染的用以评估测试样品中的嗜中性白细胞活化的所述试剂盒或部件的说明书。

28. 如权利要求27所述的试剂盒或诊断,其中所述样品部分包含或在使用时包含嗜中性白细胞裂解剂/溶液。

29. 如权利要求27或28所述的试剂盒或诊断,其中所述结合剂是抗原结合构建体诸如affimer、适体、配体,或抗体或其抗原结合片段或衍生物。

30. 如权利要求27至29中任一项所述的试剂盒或诊断,其用于如权利要求1至26中任一项所述的测定中。

31. 一种床旁装置,其包括如权利要求27或28中一项所述的诊断部件。

32. 一种用于增强以下测定的灵敏性和/或特异性的测定步骤,所述测定通过测量样品中嗜中性白细胞(白细胞)的表面的细胞表面CD64的水平来评估样品嗜中性白细胞(白细胞)活化,所述测定步骤包括通过以下方式来测量所述样品中CD64的总水平:使嗜中性白细胞(白细胞)渗透化/溶解以允许使用CD64结合剂检测所述样品中的细胞内以及表面CD64(总CD64)。

33. 一种用于增强以下测定的灵敏性和/或特异性的测定步骤,所述测定通过测量样品中嗜中性白细胞(白细胞)的表面的细胞表面CD64的水平来评估样品嗜中性白细胞(白细胞)活化,所述测定步骤包括通过以下方式来测量所述样品中CD64和NNM的总水平:使嗜中性白细胞(白细胞)渗透化/溶解以允许检测所述样品中的细胞内以及表面CD64和NNM。

34. 如权利要求32或33所述的测定,其中所述测定步骤是采用流式细胞计量定量技术、微流体、盒体、IFA、ELISA类型和侧流装置中的一者或多者,任选连同仪器读取器和/或相关软件一起来评估嗜中性白细胞活化的测定的测定步骤。

估计细胞群体

技术领域

[0001] 本说明书的领域广泛来说涉及诊断学以及估计细胞生物群体的生物标志物表达水平。更具体来说,提供用于鉴定或监测包括新生儿受试者在内的受试者中的嗜中性白细胞活化、在嗜中性白细胞活化之后的病理生理性病征,以及特别是败血症或重度感染或发展出败血症或重度感染的风险的测定和试剂盒。本发明测定可以广泛范围的免疫测定形式加以应用,并且被开发来用于基于算法的诊断测定,所述诊断测定的范围是从快速床旁测定和装置至采用硬件和软件来输入和处理数据(包括通过算法来评定改变的生物标志物水平的统计显著性)以及制定能够与病理学平台系统整合的输出数据的更数据丰富的应用。

背景技术

[0002] 本说明书中的参考文献的文献目录细节也列于说明书的末尾。

[0003] 在本说明书中对任何先前技术的提及都并非而且不应视为承认或任何形式暗示该先前技术形成任何国家的公知常识的一部分。

[0004] 各种技术在研究、分析、开发中以及在临床上用于检测目标细胞。手动或自动化技术可用于在容许评估样品中的细胞数目的特别设计腔室中对细胞进行计数。细胞可用特定染色剂染色以区分细胞类型。组织化学技术可应用于进一步区分样品中的细胞。细胞通过增殖或产生细胞因子来对特定抗原起应答、结合其它细胞、吞噬其它细胞或由于趋化性而移动的能力也可为诊断性的。细胞表面标志物尤其可用于区分细胞类型以及评估样品中特定细胞的数目和样品中此类细胞的生物状态变化。许多技术使用抗体来检测标志物的存在。

[0005] 流式细胞计量术是一种用于对细胞进行鉴定和计数的强有力工具。流式细胞仪对连续穿过激光束的单个细胞进行检测和计数。通过检查大量细胞,流式细胞计量术可给出关于携带不同分子的细胞的百分比的定量数据,所述分子为诸如表征B细胞的表面免疫球蛋白、称为CD3的T细胞受体相关分子、以及区分主要T细胞亚群的CD4和CD8共受体蛋白质。将混合群体内的单个细胞用被荧光染料标记的特定抗体加以标签化,或例如依次用特定抗体和经标记抗免疫球蛋白抗体加以标签化。接着迫使经标记细胞的悬浮混合物穿过孔口,从而产生含有以间隔单独分隔的细胞的精细液流。当各细胞穿过激光光束时,各细胞使激光散射,并且结合于细胞的任何染料分子都将被激发并将发出荧光。灵敏光电倍增管检测给出关于细胞的尺寸和颗粒度的信息的散射光与给出关于经标记抗体的结合以及因此关于由各细胞进行的细胞表面蛋白质表达的信息的荧光发射两者。如果使用两种或更多种各自偶联于不同荧光染料的抗体,那么数据可以二维散点图形式或以等高线图形式显示,其中将一种经染料标记抗体的荧光相对于第二经染料标记抗体的荧光进行绘图,结果是用一种抗体标记的细胞群体可基于它与第二抗体的反应性来进一步细分。

[0006] 免疫测定是利用抗体-抗原反应或其它结合相互作用的特异性、强度和多样性来分析样品以及检测或定量其中特定组分的测定的另一尤其可用的形式。广泛范围的免疫测定技术是可用的,诸如Wild D. "The Immunoassay Handbook" Nature Publishing Group,

第4版,2013中所述的那些免疫测定技术以及后续革新。

[0007] 侧流测定,以及更新近地,非侧流测定和微流体测定提供用于生物测定的可用设置。此类测定可为定性的、定量的或半定量的。在微流体装置中,使小体积的液体移动穿过在例如芯片或盒体中产生的微通道。广泛范围的检测试剂是可用的,包括金属纳米粒子、有色物质或发光物质。生物缀合金属纳米粒子的共振增强吸收(REA)提供快速处理时间和其它优势。这些装置已与条形码技术组合来鉴定所测试的患者和分析物。本公开涵盖用于评估输入数据的计算机软件和硬件。

[0008] 广泛范围的用于检测针对特定抗原的抗体的方法也是已知的。举例来说,酶联免疫吸附测定(ELISA)、蛋白质印迹测定和点印迹测定、以及放射免疫测定(RIA)常规用于实验室中。也采用阵列和高通量筛选方法。

[0009] 提供中间性或确定性诊断的定性测定需要容许将样品评分为可能具有或不具有某一病征的综合截止值、门限或窗口。仪器读取器和软件常常用于整理数据,并且通过诊断算法或决策树来对所述数据进行处理。

[0010] 败血症是全球健康护理挑战,其被报道在世界范围内每年每100000人中有56-91例病例发生,伴有30%的报道致死率(Jawad, I. 等人, J. Glob. Health 2, 010404 (2012))。重度感染和败血症仍然是死亡的重要原因,并且常常导致幸免于急性发作者的长期健康不佳或失能。尽管急剧,但败血症的强大感染特征在其它方面是健康的成人之中相比较来说是罕见的,它构成免疫受损个体、处于重症监护下的重病患者、烧伤患者和幼儿中增加的风险。在一定比例的病例中,明显可治疗的感染导致发展成败血症;调控异常的不当感染应答表征为进行性循环性虚脱,从而导致肾衰竭和呼吸衰竭、凝血异常、严重和不响应低血压,以及在约30%的病例中导致死亡。败血症或重度感染可在任何年龄的患者中具有快速致死性,但它在儿童中是尤其危险的,在新生儿中是甚至更危险的,并且在早产儿中是最不利的;每年约15%或100万的全球新生儿死亡归因于新生儿败血症(重度细菌性感染)(WHO千年发展目标(Millennium Development Goal) 4)。在对败血症的适当管理和抗生素治疗方面的一个障碍已在于在发展出败血症的病征或症状之后的前几个小时内,或更优选是在可能最终导致败血症的感染的早期病征之后但在发展出更独特特征诸如器官衰竭之前区分受感染个体和非感染个体。败血症诊断的困难更详细描述于当前对败血症的统一定义中(Singer, M. 等人, JAMA 315, 801 (2016))。在一些环境下,可在不存在特定诊断的情况下对显示败血症或重度感染样症状的患者给与抗生素,但此类治疗对于症状不指示败血症或重度感染的大多数患者可为不必要的,并且此类治疗与不利药物效应和其它并发症以及促进使抗生素抗性显现的隐患的风险相关联,而确实患有败血症或重度感染的其它患者可能未在不存在特定诊断的情况下接受及时和适当治疗。这些问题在新生儿败血症的情况下最为严重,其中这些患者的非特定病征和症状的组合连同快速进展和高死亡率一起使得前线健康护理工作人员极其难以作出可挽救生命以及防止存活者的长期病态的适当决定。

[0011] 因此,存在对可用于鉴定具有高度败血症可能性或可或不导致败血症的重度感染前期的患者的有效诊断测试的需要,其中强烈偏好的是可以在最短时长内给出结果,并且无需将限制它“昼夜不停”使用以及在资源贫乏环境下使用的复杂实验室程序的测试。优选地,这种测试对于在床旁(POC)或在POC附近使用将是可适用的。

[0012] 对感染性生物体(细菌、酵母和真菌)的血液培养是用于败血症的特异性诊断的

“金标准” (Mancini, N. 等人, *Clin. Microbiol. Rev.* 23, 235-51 (2010))。然而, 该测试需要在无菌技术和用于适当收集大体积的血液而不受皮肤菌丛污染的静脉穿刺方面对护理人员进行训练、实验室、采购含有培养液的无菌血液培养瓶、孵育器和显微镜。血液培养通常花费24至48小时来得到结果, 并且需要经过训练的科学家或精密自动化设备来解释结果。必须比这早得多地作出启动或停用抗生素疗法的决定, 以挽救受败血症影响的个体的生命。

[0013] 用以开发针对败血症的POC诊断的方法已包括在传统上被视为可经受POC技术诸如侧流免疫色谱法的简单可溶性蛋白质生物标志物。候选生物标志物包括C反应蛋白 (CRP)、降钙素原 (procalcitonin)、IL-10, 并且已考查其它可溶性感染和炎症标志物 (Wagner, T.A. 等人, *J. Glob. Health* 1, 210-23 (2011))。然而, 这些可溶性生物标志物都尚未显示足以用作用以在疑似败血症的情况下引导临床决定的独立测试的灵敏性、特异性或阳性预测值或阴性预测值。举例来说, CRP在败血症期间仅持续短时段升高, 并且在许多其它炎症性病症诸如创伤和心肌梗塞的情况下也升高。

[0014] 血液标志物的测量结果, 诸如白血细胞计数升高或降低或嗜中性白细胞计数升高或降低, 提供对败血症可能性的一定指示, 但测量这些标志物也需要精密设备诸如自动分析仪, 或经过训练的科学家使用显微镜, 并且他们独自不足以进行诊断。

[0015] 根据本公开, 最有前景的生物标志物可能是细胞表面生物标志物, 诸如作为对广泛范围的感染的先天性免疫应答的一部分被诱导的受体。在理想情况下, 这些生物标志物将在感染或败血症发作之后早期得以升高, 并且将不会太快地受推定抗生素治疗影响, 以致即使患者已开始采用抗生素, 他们也可仍然被鉴定为需要进一步支持和管理。

[0016] 已被充分研究并验证为败血症生物标志物的一种此类细胞表面生物标志物是以高亲和力结合免疫球蛋白 (Ig) G的细胞表面蛋白CD64, 也称为高亲和力FC γ 受体1 (FC γ R1)。尽管CD64组成性地在单核细胞和巨噬细胞的表面上表达, 但在不存在感染或败血症的情况下, 它仅以极低水平在嗜中性白细胞上表达, 但在这些病症期间, 较高水平的嗜中性白细胞表达被快速诱导。CD64不在其它丰富血细胞诸如T细胞上表达, 而是它在数量较少的树突细胞上表达。由于相对于嗜中性白细胞, 循环树突细胞的数目极低, 所以在此处将不进一步考虑它们。

[0017] 已报道数目日益增加的关于嗜中性白细胞CD64指标的研究 (Wagner, T.A. 等人, (2011)), 其强调它作为败血症并且尤其是新生儿败血症的生物标志物的强大价值。CD64是以高亲和力结合免疫球蛋白 (Ig) G的白细胞表面抗原, 即FC γ 受体1 (FC γ R1) (Masuda, M. 和Roos, D. *J. Immunol.* 151, 7188-95 (1993))。CD64是包括FC γ RII (CD32) 和FC γ RIII (CD16) 的三种主要类别的白细胞FC γ 受体的一部分 (Masuda, M. 和Roos, D. (1993); Hoffmann, J. *J. M. L. Clin. Chem. Lab. Med.* 47, 903-16 (2009))。FC受体作为免疫球蛋白恒定区的配体在免疫性方面起协调作用, 并且介导诸如胞吞作用、吞噬作用、抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC) 和细胞因子产生的功能 (van Vugt, M. J. 等人, *Blood* 94, 808-17 (1999))。CD64组成性地在抗原递呈细胞 (单核细胞、巨噬细胞和树突细胞) 上表达, 在较小程度上在嗜酸性粒细胞上表达, 但仅在极低程度上在静息嗜中性白细胞上表达 (Masuda, M. 和Roos, D. (1993); Hoffmann, J. *J. M. L.* (2009); van Vugt, M. J. 等人, *Blood* 94, 808-17 (1999))。CD64表达上调以及在嗜中性白细胞表面上展示被视为是对细菌性感染的先天性免疫应答中的早期步骤 (Davis, B. H., Olsen, S. H., Ahmad, E. 和Bigelow, N. *C. Arch. Pathol. Lab. Med.* 130,

654-61 (2006))。从感染发作之后约3天开始,nCD64的水平保持较高(Aikaterini等人,CID (2014))。

[0018] 许多研究已将嗜中性白细胞CD64表达作为用于检测成人、儿童和新生儿的败血症的潜在生物标志/指标加以考虑。一个包括13个研究的先前元分析在2010年公布(Cid,J., Aguinaco,R., Sánchez,R., García-Pardo,G.和Llorente,A.J. *Infect.* 60,313-9 (2010)), 并且一个对26个研究的分析在2013年公布(Li,S.等人, *Int. J. Infect. Dis.* 17,e12-23 (2013))以评估用嗜中性白细胞CD64表达来诊断败血症的精度。两个研究显示分别是0.79 (95%置信区间(CI) 0.70-0.86)和0.76 (95%CI 0.74-0.78)的汇总灵敏性,以及分别是0.91 (95%CI 0.85-0.95)和0.85 (95%CI 0.83-0.86)的汇总特异性。鉴于全球败血症病例的数目较高,这个较低普通灵敏性与不能检测重大数目的败血症阳性受试者一致。

[0019] 然而,结果表明nCD64比率可在极其早期用作区分受败血症感染患者与非感染患者的指标。然而,对流式细胞计量术、精密设备以及有经验和训练有素工作人员的需要迄今为止即使在发达世界也已妨碍nCD64比率的普遍采用,并且在资源贫乏环境下已几乎完全排除它的使用。因为nCD64比率需要鉴定一个特定亚群的白血细胞(嗜中性白细胞)上的特异性表面蛋白质表达(CD64),所以它尚未被考虑为用于开发POC败血症测试的可行生物标志。此外,即使在现有基于流动的测试中,nCD64作为败血症标志物的灵敏性也不理想。

[0020] 即使在高等三级护理医院诸如墨尔本阿尔弗雷德医院(The Alfred Hospital, Melbourne)的环境下,重症监护室(ICU)中也仅有约30-40%的强烈疑似败血症患者得到指示阳性血液培养的实验室结果。这可归因于在被许可进入医院ICU之前早期暴露于由GP或急诊室施用的抗生素。然而,nCD64值不随抗生素暴露而变化(Du,J.等人, *PLoS One* 9, e102647 (2014);Aikaterini等人,CID (2014))。此外,一些患者可具有受不能使用血液培养加以培养的生物体的感染。

[0021] 因此,存在对用于败血症或重度感染的快速诊断测试的需要,所述快速诊断测试可在全球帮助前线健康工作人员为被许可处于医院和ICU中的患者的数百万例重度细菌性感染提供及时治疗安排和治疗,并且排除患有可具有类似病征和症状的其它疾病诸如疟疾或病毒性感染的患者中所述感染的可能性。如果有可能使诊断败血症的时间减少,并且优选也使诊断败血症的成本降低,那么益处是明显的:任何年龄的患者的存活率增加和发病性降低,住院成本和时长降低,不必要的抗生素暴露和抗生素抗性风险降低,以及在新生儿和儿童期败血症的情况下,减轻父母担心和婴儿苦难。因此,存在对可在床旁进行的新颖快速可负担灵敏性和特异性败血症测试的极大需要。增强用于进行嗜中性白细胞CD64测定的现有平台的灵敏性也是本公开的一个有价值方面。

发明内容

[0022] 在整篇本说明书中,除非上下文另外需要,否则用词“包含”或变化形式诸如“包括”或“含有”应被理解为暗示包括一个所陈述要素或整数或一组要素或整数,但不排除任何其它要素或整数或任何其它组要素或整数。就“由.....组成”来说,其意指包括并且限于在短语“由.....组成”之后的任何事物。因此,短语“由.....组成”指示所列要素是需要的或强制的,并且不可存在其它要素。就“基本上由.....组成”来说,其意指包括在所述短语之后列出的任何要素,并且限于不干扰或促进本公开中对所列要素指定的活性或作用

的其它要素。

[0023] 除非上下文另外明确规定,否则如本文所用,单数形式“一个(种)(a/an)”和“该(种)(the)”包括复数个方面。因此,举例来说,提及“一种组合物”包括单一组合物以及两种或更多种组合物;提及“一种试剂”包括一种试剂以及两种或更多种试剂;提及“该公开内容”包括该公开内容的单一方面和多个方面,诸如此类。

[0024] 在一广泛实施方案中,本说明书使适于但不限于床旁的免疫测定和诊断装置成为可能,所述免疫测定和诊断装置可用于检测来自受试者的生物样品中的嗜中性白细胞CD64的水平升高或改变,以及有助于诊断败血症或重度感染。具体地,基于算法的测定被描述为包括例如呈床旁侧流形式的适于目测的简单形式,或需要仪器和数据处理软件的更复杂形式。在一个实施方案中,对显示被确定为差异性存在的CD64的受试者进行败血症/重度感染治疗。抗生素当前是针对败血症的第一防线,通常在静脉内施用广谱抗生素。

[0025] 在本文中提及败血症包括重度感染。所述术语也涵盖感染风险和重度感染风险。活化的嗜中性白细胞展示CD64升高作为级联的早期步骤,此未必将导致败血症,但根据本发明将鉴定为具有败血症风险的重度感染-以及即使不进展至败血症,也鉴定为需要治疗的重度感染。

[0026] 术语“差异性存在”等在本文中用于描述生物标志物的水平,并且是指相对于在对照受试者或对照群体中检测的量,测试样品中检测到的CD64和/或NNM的量增加或降低,并且涵盖相对于参照样品的,测试样品中的生物标志物的水平更高或更低。在某些实施方案中,如果从测试受试者获得的包括血液的生物样品中的CD64和/或NNM的水平是从对照受试者或对照群体获得的参照样品的相应CD64和/或NNM的量或活性的至少110%、120%、130%、140%、150%、160%、170%、180%、190%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%或1000%、或至多约95%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、0.01%、0.001%或0.0001%,那么CD64和/或NNM是差异性存在的。在某些实施方案中,如通过应用本文所述的用以诊断败血症或重度感染的算法所确定,CD64和/或NNM是差异性存在的。

[0027] 在一些实施方案中,确定CD64的总量。在一些实施方案中,确定CD64和NNM的总量。因此,在这些实施方案中,测定和诊断包括使样品与使嗜中性白细胞渗透化或溶解的试剂接触以便确定CD64或CD64和NNM的总(即内部和外部)量。

[0028] 术语“参照样品”包括来自被确定为“健康”或具有已知疾病状况的受试者的可用于确定参照数据以及预定对照CD64水平和NNM水平(当适当时)的任何样品。在一个实施方案中,参照样品是来自所选的健康受试者参照群体的一个或多个健康参照样品。在采用NNM的一些实施方案中,如将由本文公开的结果显而易见,来自对照群体的样品在适当时窗内展现在来自健康受试者的样品中所见的CD64水平与NNM水平之间的密切关系。

[0029] 提及CD64和NNM生物标志物包括其经修饰或同源物形式。经修饰形式包括衍生物、多态性变体、截短形式(截短物)以及聚集或多聚形式或具有扩展元件(例如氨基酸扩展元件)的形式。确定嗜中性白细胞活化的先前技术免疫测定方法和败血症诊断已使用对完整细胞上细胞表面CD64的评估。根据本发明的一个特定方面,已出乎意料地确定当检测是细胞表面结合(细胞外)CD64与内部(细胞内)CD64两者的CD64(或CD64和NNM)的总水平时,实现了对败血症的改进诊断。另外,也将检测已从细胞表面(CD64)或细胞表面或内部(NNM)脱

落进入血浆部分中的任何可溶性CD64或NNM。

[0030] 水平“改变”意指CD64和/或NE的水平或比率增加或升高或降低或减小。确定生物标志物的水平使得能够建立基于相对于对照的水平或比率的诊断规则。或者，诊断规则基于应用统计方差分析和/或机器学习程序。此类算法使用在对照受试者中观察到的生物标志物与疾病或健康状况之间的关系来推断接着用于预测具有未知状况的患者的状况的关系。可采用提供患者不被指示有败血症或被指示有败血症或重度感染的概率的可目视检测评分或指数的算法。在一些实施方案中，算法执行多变量或单变量分析功能。

[0031] 术语嗜中性白细胞标志物、嗜中性白细胞数目标志物和NNM可互换使用。所述标志物被选择来代表样品中嗜中性白细胞的数目，并且预期会显示在健康对照患者中与CD64水平具有密切关联。

[0032] 在一个实施方案中，使用分别结合CD64或NNM，并且直接或间接地提供可目视定量或通过仪器定量的可检测信号的结合剂检测CD64的水平和嗜中性白细胞数目标志物(NNM)的水平，所述结合剂诸如不限于抗体或抗体的抗原结合片段。术语“水平”也涵盖生物标志物的水平的比率。

[0033] 如本文所用，“免疫测定”是指能够检测和定量所需生物标志物的免疫测定，通常但不仅仅是夹心式测定。免疫测定可为熟练技术人员已知的一定范围的免疫测定形式中的一者。

[0034] ECLIA、ELISA和Luminex LabMAP免疫测定是适于检测生物标志物的水平的测定的实例。在一个实例中，第一结合试剂抗体衔接至载体表面，并且包含可检测基团的第二结合试剂/抗体结合所述第一抗体。可检测基团的实例包括例如且不限于：用于结合第二结合试剂的荧光染料、酶、表位（例如当第二结合试剂/抗体是小鼠抗体时，其通过经荧光标记的抗小鼠抗体来检测），例如抗原或结合对的成员诸如生物素。表面可为平坦表面，诸如在典型格栅型阵列（例如但不限于96孔板和平坦微阵列）的情况下，或非平坦表面，如同经涂布珠粒阵列技术的情况，其中各个“种类”的珠粒用例如荧光染料（诸如美国专利号6,599,331、6,592,822和6,268,222中所述的Luminex技术）或量子点技术（例如如美国专利号6,306,610中所述）标记。此类测定也可被认为是实验室信息管理系统(LIMS)。

[0035] 在珠粒型免疫测定中，可利用Luminex LabMAP系统。LabMAP系统包含用两种在光谱方面不同的荧光染料在内部染色的聚苯乙烯微球体。在使用精确比率的这些荧光染料的情况下，产生由具有特定光谱地址的不同组微球体组成的阵列。各组微球体都可在它的表面上具有不同反应物。因为各组微球体可通过它们的光谱地址来区分，所以它们可加以组合，从而允许在单一反应容器中同时测量多达100种不同分析物。偶联于报道体分子的第三荧光染料对已在微球体表面发生的生物分子相互作用进行定量。快速流动液流中的微球体在它们于Luminex分析器中经过两个单独激光时被个别地探询。高速数字信号处理以每个样品数秒时间将微球体基于它的光谱地址分类，并且对表面上的反应定量。

[0036] 适合生物样品包括全血或消减了某些血细胞或白细胞（诸如单核细胞和巨噬细胞）的血液。在一个实施方案中，单核细胞和巨噬细胞通过本领域认可的方法诸如红细胞凝集或磁珠方法来加以大致上消减。

[0037] 本文涵盖的受试者通常是人受试者，并且也可被称为患者、个体或接受者。人受试者可为男性或女性新生儿或婴儿、儿童、青少年、少年、年轻成人、成人或年长成人。对照受

试者常常是被称为受试者/患者群体的所选受试者组。测试样品通常来自被怀疑患有败血症或处于败血症的风险下的受试者,然而,样品也可在个别或一般性群体筛选中从受试者收集以排除败血症或重度感染风险。对照样品可反映不同子组诸如新生儿受试者。任何受试者组都可适用地用作对照群体,包括“不健康”受试者诸如免疫受损或老年群体。

[0038] 结合剂可适宜地是抗体或其抗原结合片段。其它适合结合剂在本领域中是已知的,并且包括抗原结合构建体诸如affimer、适体或适合CD64或嗜中性白细胞标志物配体或其部分。

[0039] 术语“结合剂”和类似术语是指能够特异性或大致上特异性(也就是说具有有限交叉反应性)结合生物标志物上的表位的任何化合物、组合物或分子。“结合剂”通常具有单一特异性。然而,本文也涵盖具有针对两种或更多种生物标志物的多种特异性的结合剂。结合剂(或配体)通常是抗体,诸如单克隆抗体或其衍生物或类似物,但也包括不限于:Fv片段;单链Fv(scFv)片段;Fab'片段;F(ab')₂片段;人源化抗体和抗体片段;骆驼源化抗体和抗体片段以及前述各物的多价形式。适当时也可使用多价结合试剂,包括不限于:单特异性或双特异性抗体;诸如二硫键稳定化Fv片段、scFv串联物[(scFv)₂片段]、微型双功能抗体、微型三功能抗体或微型四功能抗体,其通常是共价连接或以其它方式加以稳定的(即亮氨酸拉链或螺旋稳定化)scFv片段。“结合剂”也包括如本领域中所述的适体。

[0040] 制备包括抗体和它们的衍生物和类似物以及适体的抗原特异性结合剂的方法在本领域中是熟知的。多克隆抗体可通过使动物免疫来产生。单克隆抗体可根据标准(杂交瘤)方法制备。包括人源化抗体的抗体衍生物和类似物可通过以下方式来重组制备:根据标准方法从编码单克隆抗体的DNA分离DNA片段,以及将适当V区亚克隆至适当表达载体中。噬菌体展示和适体技术描述于文献中,并且容许在体外克隆扩增具有十足亲和力、低交叉反应性的抗原特异性结合试剂。噬菌体展示试剂和系统可商购获得,并且包括可从Amersham Pharmacia Biotech, Inc. (Piscataway, New Jersey) 商购获得的重组噬菌体抗体系统(RPAS)和可从MoBiTec, LLC (Marco Island, Florida) 商购获得的pSKAN噬菌粒展示系统。举例且不加限制地来说,适体技术描述于美国专利号5,270,163;5,475,096;5,840,867和6,544,776中。

[0041] 在一个广泛实施方案中,免疫测定包括(i)评估CD64的水平作为嗜中性白细胞活化标志;以及(ii)评估嗜中性白细胞数目标志物(NNM)的水平以及处理数据/水平以获得诊断评分。在一些实施方案中,进一步步骤是(iii)相对于样品中嗜中性白细胞的数目,或替代地,相对于由从对照受试者确定的水平获得的预选阈值,分析来自(i)和(ii)的水平以获得指示受试者可能患有还是不患有败血症或重度感染的评分。具体地,在一个实施方案中,如本文所述的观察到的CD64与NNM之间的非线性正性关联已产生本文所述的用于诊断败血症或重度感染的决策树。

[0042] 在进一步实验中,为改进测定用以诊断败血症或重度感染的能力,确定了健康患者中NE水平与CD64水平之间的密切关联(图7)。这提供这两种标志物的健康水平的“门限”,其中败血症患者超出这个健康“门限”范围。每个细胞(或NE单位)的CD64水平在较低NE值下较高,并且在约2.5-5.0μg/ml的NE下达到平稳值的观察结果也可在决策树中加以控制。

[0043] 因此,尽管一个选项在于确定如图5中预期的nCD64i相对于NE的算术关系,但其它门控方法已鉴于图7中说明的以上观察结果加以开发。

[0044] 熟练人士将能够设计旨在获得类似结果的变化门控策略。

[0045] 在一个说明性决策树或算法中,败血症通过以下项中的一者或多者来鉴定:

[0046] (1) 总CD64升高,高于健康对照群体的平均值加2个(或更多个)标准偏差;

[0047] (2) NE升高,高于健康对照群体的平均值加3个标准偏差;

[0048] (3) 当NE水平小于约 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ 或更优选小于约 $2.5\mu\text{g}/\text{ml}$ 时,CD64相对于NE得以升高(图10、图11),并且由此相对于乘以适合因数诸如1.5的针对健康受试者的CD64相对于NE的最佳拟合方程来确定CD64的正常水平上限(图11),从而包括将被确定为嗜中性白细胞减少,因此不具有足够嗜中性白细胞来产生在(1)中检测的总CD64升高的患者。

[0049] 在一个实施方案中,CD64(平均值加2SD)和NE(平均值加3SD)的“简单”截止值尤其充分适合于与先前由一些本发明者对于CD4和丙氨酸转氨酶所述的测试(参见例如国际公布号W0 2008/037026)相同的方式进行目视解释的POC测试,而“复杂”截止值(通过使用NE/NNM和算法来关于嗜中性白细胞数目加以调整)更适合于自动读取器仪器诸如Axxin AX-2x。

[0050] 主题测定和试剂盒的实施方案通过将测试样品中CD64和NE的升高水平相对于它们见于健康对照样品中的水平进行比较来描述。因此,相较于对照,水平升高指示嗜中性白细胞活化和败血症。为熟练人士显而易见的等效方法将在于通过设法与对照“健康”水平对比来在测试样品中鉴定非败血症受试者。

[0051] 或者,对于任何NE给定值,CD64的截止水平都可表示为适合乘数诸如1.6或1.5乘以针对健康受试者的CD64相对于NE的最佳拟合方程,所述方程在图12C中表示为4阶乘多项式方程 $y = -0.0137x^4 + 0.6094x^3 - 9.857x^2 + 65.776x$ ($R^2 = 0.74$)。因为这个方程产生十分类似于使用平均值加3个标准偏差的NE上部水平截止值,所以(图12A和图12B)或图12C的方法可单独或组合用于获得适合截止值。

[0052] 根据本公开和本发明的关于败血症或重度感染或其风险的正性评分容许当适当时即时施用抗生素。因此,本公开延展至治疗和防治方法,其涉及根据本文公开的免疫测定筛选受试者,以及视测定结果而定,向受试者施用抗生素。因此,采用另一表达方式,本公开教导本文公开的测定和试剂盒以及算法诊断和治疗和/或防治败血症或重度感染或其风险的用途。

[0053] 本发明测定和试剂盒以及诊断和相关算法用于治疗 and/或防治败血症或重度感染。所述方法完全在熟练人士或管理医师的见识范围内。

[0054] 因此,在一个实施方案中,本描述提供一种适于帮助诊断败血症或重度感染的用于评估测试样品嗜中性白细胞活化的免疫测定,所述测定包括以下步骤:

[0055] (i) 任选地,使所述样品与使嗜中性白细胞渗透化或溶解的试剂接触;

[0056] (ii) 与(i)同时或依序,使所述样品与特异性结合所述样品中的CD64并形成CD64-结合剂复合物a的结合剂接触;

[0057] (iii) 与(i)和/或(ii)同时或依序,使所述样品与特异性结合所述样品中的嗜中性白细胞数目标志物(NNM)并形成嗜中性白细胞标志物-结合剂复合物b的第二结合剂接触;

[0058] (iv) 采用复合物a和复合物b的量来确定所述样品中CD46的相对水平和NNM的相对水平。

[0059] 在一个实施方案中,本描述提供一种适于帮助诊断败血症或重度感染的用于评估测试样品嗜中性白细胞活化的免疫测定,所述测定包括以下步骤:

[0060] (i) 任选地,使所述样品与使嗜中性白细胞渗透化或溶解的试剂接触;

[0061] (ii) 与(i)同时或依序,使所述样品与特异性结合所述样品中的CD64并形成CD64-结合剂复合物a的结合剂接触;

[0062] (iii) 与(i)和/或(ii)同时或依序,使所述样品与特异性结合所述样品中的嗜中性白细胞数目标志物(NNM)并形成嗜中性白细胞标志物-结合剂复合物b的第二结合剂接触;

[0063] (iv) 采用复合物a和复合物b的量来确定所述样品中CD46的相对水平和NNM的相对水平;以及

[0064] (v) 直接或间接地将所述样品评分为包含对照(例如健康)或超常水平的嗜中性白细胞CD64/活化。

[0065] 在另一相关实施方案中,描述一种用于帮助诊断患者/受试者的败血症或重度感染的免疫测定,所述测定包括以下步骤:

[0066] (i) 任选地,使来自所述患者的包含嗜中性白细胞的测试样品与使嗜中性白细胞渗透化或溶解的试剂接触;

[0067] (ii) 与(i)同时或依序,使所述样品与特异性结合所述样品中的CD64并形成CD64-结合剂复合物a的结合剂接触;

[0068] (iii) 与(i)和/或(ii)同时或依序,使所述样品与特异性结合所述样品中的嗜中性白细胞数目标志物(NNM)并形成嗜中性白细胞标志物-结合剂复合物b的第二结合剂接触;

[0069] (iv) 采用复合物a和复合物b的量来确定所述样品中CD46的相对水平和NNM的相对水平。

[0070] 在一个实施方案中,描述一种用于帮助诊断患者/受试者的败血症或重度感染的免疫测定,所述测定包括以下步骤:

[0071] (i) 任选地,使来自所述患者的包含嗜中性白细胞的测试样品与使嗜中性白细胞渗透化或溶解的试剂接触;

[0072] (ii) 与(i)同时或依序,使所述样品与特异性结合所述样品中的CD64并形成CD64-结合剂复合物a的结合剂接触;

[0073] (iii) 与(i)和/或(ii)同时或依序,使所述样品与特异性结合所述样品中的嗜中性白细胞数目标志物(NNM)并形成嗜中性白细胞标志物-结合剂复合物b的第二结合剂接触;

[0074] (iv) 采用复合物a和复合物b的量来确定所述样品中CD46的相对水平和NNM的相对水平;以及

[0075] (v) 直接或间接地将所述样品以及因此将所述患者评分为不被指示有败血症或重度感染或被指示有败血症或重度感染。

[0076] 在一特定实施方案中,步骤(i)包括使样品与使嗜中性白细胞渗透化或溶解的试剂接触以便确定CD64的总(即内部和外部)量。

[0077] 在一个实施方案中,样品是全血细胞样品。在另一实施方案中,使样品消减一种或

多种白细胞诸如单核细胞或巨噬细胞,或样品已被消滅了一种或多种白细胞诸如单核细胞或巨噬细胞。

[0078] 在一个实施方案中,步骤(v)包括将测试样品中CD64和/或NNM的水平与从对照健康样品预先确定的相应CD64和/或NNM水平进行比较。

[0079] 在一个实施方案中,步骤(v)包括确定来自测试样品的CD64和NNM的比率(CD64:NNM)。

[0080] 在一个实施方案中,步骤(v)包括当CD64水平高于健康对照群体的预定平均值加2个或更多个标准偏差时,评分为嗜中性白细胞活化或败血症或重度感染。

[0081] 在一个实施方案中,步骤(v)包括当NNM水平高于健康对照群体的预定平均NNM水平加3个或更多个标准偏差时,评分为嗜中性白细胞活化或败血症。

[0082] 在一个实施方案中,步骤(v)包括当相较于预定乘数的针对所选对照群体的CD64相对于NNM的最佳拟合线,来自测试样品的CD64水平相对于NNM水平得以升高时,评分为嗜中性白细胞活化或败血症或重度感染。

[0083] 在一个实施方案中,本描述提供一种用于帮助诊断或预测患者/受试者的败血症或重度感染的免疫测定,所述测定包括以下步骤:

[0084] (i) 任选地,使来自所述患者的包含嗜中性白细胞的测试样品与使嗜中性白细胞渗透化或溶解的试剂接触;

[0085] (ii) 与(i)同时或依序,使所述样品与特异性结合所述样品中的CD64并形成CD64-结合剂复合物a的结合剂接触;

[0086] (iii) 与(i)和/或(ii)同时或依序,使所述样品与特异性结合所述样品中的嗜中性白细胞数目标志物(NNM)并形成嗜中性白细胞标志物-结合剂复合物b的第二结合剂接触;

[0087] (iv) 采用复合物a和复合物b的量来确定所述样品中CD46的(相对)水平和NNM的(相对)水平;以及

[0088] (v) 直接或间接地将所述样品以及因此将所述患者评分为不被指示有败血症或重度感染或被指示有败血症或重度感染,并且其中步骤(v)包括将所述测试样品评分为包含以下项中的一者或两者或三者:(i) 相对于对照群体,高于平均值加2个或更多个标准偏差的升高CD64;(ii) 相对于对照群体,高于平均值加3个或更多个标准偏差的升高NNM;和(iii) CD64相对于NNM得以升高。

[0089] 在一个实施方案中,步骤(i)包括使样品与使嗜中性白细胞渗透化或溶解的试剂接触以便确定CD64的总(即内部和外部)量。

[0090] 在一个实施方案中,所选对照群体是新生儿受试者群体。

[0091] 在一个实施方案中,测定包括如果CD64/NNM比率超过随测试样品中NNM的量而变化来预先确定的截止水平(针对嗜中性白细胞数目加以内部修正),那么将受试者诊断为具有超常量的嗜中性白细胞CD64/活化。

[0092] 在一个实施方案中,样品中的CD64与NNM比率针对使用样品中NNM的水平确定的样品中嗜中性白细胞数目加以内部修正。

[0093] 在一个实施方案中,NNM选自:嗜中性白细胞弹性蛋白酶(NE)、乳铁传递蛋白(lactoferrin)、髓过氧化物酶(myeloperoxidase)和人嗜中性白细胞载脂蛋白。

- [0094] 在一个实施方案中,测定是床旁测定。
- [0095] 在一个实施方案中,测定是基于酶联免疫吸附 (ELISA) 类型、流式细胞计量术、珠粒阵列、侧流、盒体、微流体或免疫色谱的方法等。
- [0096] 在一个实施方案中,结合剂是抗体或其抗原结合片段或衍生物、抗原结合构建体诸如affimer、适体或配体或其结合部分。
- [0097] 在一个实施方案中,将结合剂固定在载体上。
- [0098] 在一个实施方案中,在步骤(ii)中,通过将样品施加于免疫测定装置的样品部分来使样品与步骤(ii)和(iii)的结合剂接触,其中装置样品部分可操作地连接于装置的经分隔捕获部分,并且借此样品的组分从装置样品部分流向并穿过装置捕获部分,并且其中一个捕获部分包含特异性结合样品中的CD64的结合剂,以使CD64在捕获部分中由结合剂捕获以形成结合剂-CD64复合物,并且其中第二捕获部分包含特异性结合样品中的NNM的结合剂,以使NNM在捕获部分中由结合剂捕获以形成结合剂-嗜中性白细胞数目标志物复合物。
- [0099] 在一个实施方案中,使用分别结合CD64或NNM,并且直接或间接地提供可目视定量或通过仪器定量的可检测信号的结合剂检测CD64复合物的量和NNM结合剂复合物的量,所述结合剂诸如抗体或抗原结合片段、配体、适体或affimer。
- [0100] 在一个实施方案中,包含软件的仪器用于输入基于CD64和NNM的观察量/水平的数据,并且任选地,遵循本文公开的诊断算法诸如在前述权利要求中限定的那些诊断算法,相对于包含来自对照受试者/群体的数据的数据库对所述数据进行管理/处理。
- [0101] 在一个实施方案中,结合剂缀合到可检测标记或包含可检测标记的微粒,所述可检测标记或包含可检测标记的微粒提供可检测信号。
- [0102] 在一个实施方案中,捕获部分是测试线。
- [0103] 在一个实施方案中,败血症是新生儿败血症。
- [0104] 在另一方面,本公开使包括以下各物的诊断试剂盒或部件成为可能:(i)免疫测定(诸如POC)装置,其包括微通道或多孔膜可操作地连接于样品部分、两个或更多个捕获(测试)部分,以及任选可操作地连接于以下项中的一者或多者;缀合物(检测标记)部分、吸器部分、适合控制部分以及细胞裂解剂、稀释剂或溶解剂部分,和(ii)特异性结合样品中的CD64并形成CD64-结合剂复合物的结合剂,和特异性结合样品中的NNM并形成NNM-结合剂复合物的第二结合剂,其中结合剂被固定于单独捕获部分和/或含于缀合物部分内,和(iii)任选地,用于使用适于帮助诊断败血症或重度感染的用以评估测试样品中的嗜中性白细胞活化的所述试剂盒或部件的说明书。
- [0105] 在这个方面的一个实施方案中,样品部分包含或在使用时包含嗜中性白细胞裂解剂/溶液。
- [0106] 在另一实施方案中,结合剂是抗原结合构建体诸如affimer、适体、配体,或抗体或其抗原结合片段或衍生物。
- [0107] 在一个实施方案中,试剂盒或诊断用于进行本文公开的测定的全部或一部分。
- [0108] 在一个实施方案中,本公开使能够进行本文公开和要求保护的测定的床旁装置成为可能,并且提供所述床旁装置。
- [0109] 在另一广泛方面,本描述使用于增强以下测定的灵敏性和/或特异性的测定步骤成为可能,所述测定通过测量样品中嗜中性白细胞(白细胞)的表面的细胞表面CD64的水

平来评估样品嗜中性白细胞(白细胞)活化,所述步骤包括通过以下方式来测量所述样品中CD64的总水平:使嗜中性白细胞(白细胞)渗透化/溶解以允许使用CD64结合剂检测所述样品中的细胞内以及表面CD64(总CD64)。

[0110] 在一个实施方案中,用于增强通过测量样品中嗜中性白细胞(白细胞)的表面上细胞表面CD64的水平来评估样品嗜中性白细胞(白细胞)活化的测定的灵敏性和/或特异性的测定步骤包括通过以下方式来测量所述样品中CD64和NNM的总水平:使嗜中性白细胞(白细胞)渗透化/溶解以允许检测所述样品中的细胞内以及表面CD64和NNM。

[0111] 在一个实施方案中,测定步骤是采用流式细胞计量定量技术(例如荧光微珠粒)、微流体、盒体、IFA、ELISA类型和侧流装置等中的一者或多者,任选连同仪器读取器和/或相关软件一起来评估嗜中性白细胞活化的测定的测定步骤。

[0112] 采用另一表达方式,提供一种治疗或防治方法,其包括进行如本文所描述和要求保护的测定或步骤,以及如由所述测定的结果所指示,向受试者施用针对败血症或重度感染的治疗或防治措施。

[0113] 在一个实施方案中,提供针对CD64和NNM的结合剂制造用以诊断败血症或重度感染的诊断或预测试剂盒的用途。

[0114] 在一个实施方案中,提供针对CD64的结合剂和嗜中性白细胞裂解溶液制造用以诊断败血症或重度感染的诊断或预测试剂盒的用途。

[0115] 在另一实施方案中,提供针对CD64的结合剂和针对NE的结合剂以及嗜中性白细胞裂解溶液制造用以诊断败血症或重度感染的诊断或预测试剂盒的用途。

[0116] 本文所述的测定和诊断适于快速床旁测定和装置诸如侧流装置,其中例如本文所述的简单算法可借助于代表生物标志物的水平的目视或仪器可检测测试线加以运用。

[0117] 本文所述的测定容许整合至现有或新近开发的病理学架构或平台系统中。举例来说,本文所述的方法允许使用者关于与嗜中性白细胞活化相关的病理生理学状况诸如败血症或重度感染来确定受试者的状况,测定包括:

[0118] (a) 通过通信网络来从所述使用者接收呈测试样品中CD64和NNM的水平的形式的数据;

[0119] (b) 通过算法来处理受试者数据,所述算法通过将CD64和NNM的水平和/或比率与来自预定对照水平的那些进行比较来提供评分或疾病指数值。

[0120] 在一些实施方案中,通过通信网络来向使用者转送对受试者的状况的指示。也应了解,在一个实例中,终端站可为能够通过通信网络诸如因特网来将受试者数据转送至基站,以及接收报告的手持装置,诸如PDA、移动电话等。当使用服务器时,它通常是客户服务器,或更具体地是简单对象应用协议(SOAP)。

[0121] 具体地,实施例1和图3至图6中所述的实施方案提供一种基于测量CD64和NE的相对水平来确定败血症截止值的方式。其它实施例和附图说明基于原始研究结果的简化分析方法,其中健康患者中NE水平与CD64水平之间的密切关联(图7)提供这两种标志物的健康水平的“门限”,其中败血症患者超出这个健康“门限”范围-但仍然伴有每个细胞(或NE单位)的CD64水平在较低NE值下较高,并且在约2.5-5.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的NE下达到平稳值的观察结果。

[0122] 在一个实施方案中,教导一种“决策树”或算法,其中败血症通过以下项中的一者或多者来鉴定:(1) 总CD64升高,高于健康对照群体的平均值加2个(或更多个)标准偏差;

(2) NE升高,高于健康对照群体的平均值加3个标准偏差;(3) 当NE水平小于约5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 或更优选小于约2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时,CD64相对于NE得以升高(图10、图11),并且由此相对于乘以适合因数诸如1.5的针对健康受试者的CD64相对于NE的最佳拟合方程来确定CD64的正常水平上限(图11),从而包括将被确定为嗜中性白细胞减少,因此不具有足够嗜中性白细胞来产生在(1)中检测的总CD64升高的患者。这个分析可采用主成分分析,但仅需要2种标志物。

[0123] 或者,对于任何NE给定值,CD64的截止水平都可表示为适合乘数诸如1.6或1.5乘以针对健康受试者的CD64相对于NE/NNM的最佳拟合方程,所述方程在图12C中表示为4阶多项式方程 $y = -0.0137x^4 + 0.6094x^3 - 9.857x^2 + 65.776x$ ($R^2 = 0.74$)。因为这个方程产生十分类似于使用平均值加3个标准偏差的NE上部水平截止值,所以(图12A和图12B)或图12C的方法可单独或组合用于获得适合截止值。

[0124] 本公开的各个方面以各种范围提供数值。高于和低于所陈述范围的微小变化可用于实现与范围内的值实现的结果大致上相同的结果。此外,这些范围意图是包括最小值与最大值之间的每个值的连续范围。此外,本公开延展至CD64水平与NE水平的比率,从而提供与嗜中性白细胞活化状态、败血症或重度疾病相关联的数值。

[0125] 在一个实施方案中,对于针对NNM的评分或诊断,不必提供准确嗜中性白细胞数目。

[0126] 在一个实施方案中,可明晰的是不需要单核细胞/巨噬细胞标志物诸如CD163作为对照。

[0127] 以上发明内容无论如何都不被并且不应被视为是对本公开的所有实施方案的详尽叙述。

附图说明

[0128] 图1示出在文献中评估的大量候选败血症生物标志物。

[0129] 图2示出由伯内特研究院(Burnet Institute)的一些本发明者开发的Visitect CD4测试(由Omega Diagnostics,UK在授权下生产)。在CD4 T细胞测试中,单核细胞和巨噬细胞通过与RosetteSep试剂(StemCell Technologies,Vancouver,Canada)相互作用,从而导致它们与红血细胞一起在样品垫(孔“A”)中凝集来从全血样品(30 μl)消减。与单核细胞/巨噬细胞分开的含有血浆和白血细胞的剩余血液部分朝向测试区流动,并且与清洁剂(曲通X-100)相互作用,从而使白血细胞裂解以及使T细胞上细胞相关全长CD4溶解于样品中。样品接着流动通过是针对CD4的细胞质结构域的结合试剂(单克隆抗体)的测试线,所述细胞质结构域仅见于细胞相关CD4中而非血浆中可溶性CD4部分中。捕获的CD4接着用与针对CD4的细胞外结构域的第二单克隆抗体复合的胶体金检测,通过将缓冲液添加至金缀合物垫(孔“B”)中来引发。因此,测试线的强度代表样品中T细胞相关CD4的总量,并且根据推理代表CD4 T细胞的数目,因为每个细胞的CD4分子量是大致上恒定的。也就是说,CD4的量与CD4 T细胞的数目成正比。接着目视或通过仪器读取器将测试信号相对于一个或多个代表CD4 T细胞的临床相关水平的参照线进行比较,在图中,所述临床相关水平的实例是由WHO关于在HIV感染的情况下对抗逆转录病毒疗法进行优先排序所推荐的每 μl 350个T细胞。

[0130] 图3示出CD4 T细胞测试和SepsiTest nCD64i测试的原理。在HIV感染朝向获得性免疫缺陷综合征(AIDS)进展的情况下,CD4 T细胞的数目可下降,而各剩余细胞上CD4的量

保持恒定。因此,CD4的量与CD4 T细胞的数目成比例,以相同比例存在。在侵袭性感染或败血症的情况下,嗜中性白细胞的数目可增加、降低或保持相同,但CD64(显示为细胞表面上的蓝色分子)的表达水平得以实质上增加。嗜中性白细胞的数目可使用与嗜中性白细胞相关的抗原诸如但不限于嗜中性白细胞弹性蛋白酶,与T细胞数目以相同方式测量。CD64的量与CD4可以相同方式测量,并且细胞相关CD64或细胞相关CD64与可溶性CD64两者可使用本领域中熟知的方法测量,包括仅仅用于细胞相关跨膜蛋白质的方法(美国专利8,409,818和其它领域)。然而,在CD64的情况下,每个细胞的量在健康个体中将较低,或在重度感染或败血症的情况下升高,并且这个差异将被检测为CD64与嗜中性白细胞特异性蛋白质(在这个实例中是嗜中性白细胞弹性蛋白酶)之间的比率增加。

[0131] 图4是健康个体之中嗜中性白细胞弹性蛋白酶、CD64和嗜中性白细胞计数的图解表示。4A显示ELISA嗜中性白细胞弹性蛋白酶(嗜中性白细胞特异性标志物)与嗜中性白细胞(粒细胞)计数之间的良好关联($R^2=0.89609$)。4B显示CD64/NE比率(nCD64指数)与粒细胞计数之间的良好关联($R^2=0.86146$),但在较低嗜中性白细胞计数下,CD64指数的水平惊人较高。4C显示全血溶解产物中CD64相对于粒细胞计数的良好关联($R^2=0.9151$),伴有在具有较低嗜中性白细胞(粒细胞)计数的样品中,CD64量较高,从而导致见于图4B中的所观察可变关系的出乎意料观察结果。

[0132] 图5是示出使用CD64值和NE值来估计nCD64指数的潜在诊断截止值的图解表示。测量来自健康成人志愿者的单核细胞经消减全血中的NE和CD64的总量,并且计算nCD64指数比率。结果显示高度显著关联($P=.0166$),并且再次显示在较低嗜中性白细胞计数下nCD64i较高的可变关系。红色虚线显示所述关系的下部95%置信区间和上部95%置信区间,并且预测对于所测量NE浓度,nCD64i落在上部95%置信区间上方的样品将受到关于败血症的强烈怀疑。

[0133] 图6示出测量嗜中性白细胞CD64指数的侧流免疫色谱POC败血症测试的一种形式。Visitect CD4测试(A),提出的nCD64指数测试的扩展视图和示意图(B,红色框),以及Axxin AX-2读取器(C)。对于目视解释,CD64线的强度大于NE线可被视为具有诊断性,然而,在使用读取器诸如Axxin AX-2读取器(图6C)的情况下,截止值将根据嗜中性白细胞的总量(NE数量)加以调整,并且计算适于即时患者样品的截止值。

[0134] 图7示出健康受试者的全血中NE和CD64的ELISA结果。通过ELISA来评估健康受试者($n=30$)的全血中的NE和CD64,并且显示在健康受试者中,全血中CD64的总量与全血中NE的总量密切相关联($R^2=0.74$)。

[0135] 图8示出败血症患者的全血中NE和CD64的ELISA结果。通过ELISA来评估败血症患者(红色标记, $n=11$)以及如图7中所示的健康受试者(蓝色标记)的全血中的NE和CD64。

[0136] 图9示出与图7和图8相同的结果,但强调根据基于CD64的平均值加2SD和NE的平均值加3SD的截止值对败血症患者样品的四个不同分类。根据这些准则,1名患者呈仅NE阳性,5名患者呈NE与CD64两者均阳性,4名患者呈仅CD64阳性,而1名患者呈NE与CD64两者均阴性,两种标志物均具有极低值,并且表明所述患者可具有低水平的嗜中性白细胞。

[0137] 图10示出对在低NE值的情况下CD64相对于NE的分析。X轴以ng/mL显示总CD64,并且X轴以 $\mu\text{g/mL}$ 显示总NE。

[0138] 图11示出对在低NE值的情况下CD64相对于NE的分析。X轴以ng/mL显示总CD64,并

且X轴以 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 显示总NE。

[0139] 图12示出CD64的健康水平相对于NE的健康水平的门限。小图A、B和C。

[0140] 图13示出Leuko64和主题测定(呈ELISA形式)用以鉴定败血症患者的比较结果。相比于对于健康对照,Leuko64对于败血症患者显示高度显著更高值,但使用制造商推荐的截止值1.2,用这个测试仅鉴定出8/11败血症患者,这与文献中显示这个方法具有约70-80%的灵敏性的许多报道一致。类似地,通过ELISA来检测单独总全血CD64显示相比于健康对照,败血症患者的值高度显著更高,但使用是平均值加2SD的截止值(209ng/ml),用这个测试仅鉴定出9/11败血症患者。

[0141] 图14示出对于患者SEP009进行的这个分析(图13)的结果,所述患者具有图13中的最低NE水平。在小图A中,显示来自这个患者的嗜中性白细胞具有CD64的高表面表达水平(红线),这与在Leuko64的情况下相对CD64表达极高(小图B)一致,但当也检测细胞内CD64时,每个细胞的CD64水平甚至更高(蓝线)。然而,这个患者的低NE水平(小图D)和假定低嗜中性白细胞计数导致总CD64结果低于基于单独CD64的截止值(小图C),但可使用图8-图12中说明以及本文描述的算法检测。这个结果也表明鉴于这个患者具有极高Leuko64结果,所以对于具有低NE水平的患者,Leuko64方法或其它方法可具有额外效用。

[0142] 图15示出对于患者SEP010进行的相同分析,所述患者具有升高水平的CD64,但恰好低于图9中的由健康受试者的CD64平均值加2SD获得的截止值。在这个患者中,存在CD64的最小表面染色(小图A,关于表面染色比较红线和同种型对照),这与在Leuko64的情况下相对CD64表达较低(小图B)一致,但当也使细胞内CD64染色时,有高水平的CD64被检测到(小图A蓝线)。与这个观察结果一致,根据ELISA,患者SEP010具有适度水平的总CD64,但仍然恰好低于基于平均值加2SD的总CD64截止值(小图C),而0.7的Leuko64结果远低于用于那个测试的制造商截止值1.2(小图B)。然而,当检查NE时,观察到患者SEP010具有极其高度升高水平的NE,从而在使用由NE平均值加3SD获得的截止值的情况下,以及也在使用由趋势线方程获得的截止值的情况下提供明确败血症诊断。

[0143] 图16示出对于患者SEP011进行的相同分析,所述患者具有升高水平的CD64与NE两者。在这个患者中,存在细胞内CD64与表面CD64两者的显著表面染色(小图A,关于表面染色比较红线和同种型对照,关于总染色比较蓝线和同种型对照),这与在Leuko64的情况下相对CD64表达较高(小图B)一致,远高于制造商截止值。根据ELISA,患者SEP011具有高度升高水平的总CD64(小图C),并且也具有高度升高水平的NE(小图D),从而在使用由NE平均值加3SD获得的截止值和由CD64平均值加2SD获得的截止值的情况下,以及也在使用由趋势线方程获得的截止值的情况下提供明确败血症诊断。

[0144] 图17是根据van der Poel (2011)修改的图解,其示出在健康个体中低水平的CD64(Fc γ R1)如何在细胞表面上表达,并且这些CD64由不导致细胞信号传导或抗原复合物内化的单体IgG饱和(图17A)。在由干扰素 γ 或与细菌性感染或败血症相关的其它刺激物对嗜中性白细胞进行初始刺激后,额外CD64被合成,并且易位至嗜中性白细胞的表面并与膜微结构域缔合,从而共同允许达成呈免疫复合物形式的多聚Ig的结合,此导致细胞信号传导(图17B)。

[0145] 图18示出具有不同水平的表面CD64的活化嗜中性白细胞,尽管它们具有相同升高水平的总CD64。在左侧,示意性显示具有在表面上表达的低水平的CD64的“健康”嗜中性白

细胞。这些细胞也可含有少量预先形成的细胞内CD64。在败血症的情况下,在右侧显示“活化”嗜中性白细胞,各自具有相较于健康嗜中性白细胞得以显著增加的同等大量CD64,但分布在表面上(类似于患者样品SEP09,图14),或均匀分布在表面与细胞内之间(类似于患者样品SEP011,图16),或主要分布于细胞内区室(类似于患者样品SEP010,图15)。因此,允许检测细胞表面CD64与细胞内CD64两者的任何方法都可能使得对败血症的诊断改进。

具体实施方式

[0146] 除非另外定义,否则本文所用的所有技术和科学术语都具有与由本公开所属领域中的普通技术人员通常理解相同的含义。类似或等效于本文所述的材料和方法的任何材料和方法都可用于实施或测试本公开。对于为本领域技术人员所知的技术定义和术语以及其它方法,从业者应特别贯注于Wild D. “The Immunoassay Handbook” Nature Publishing Group,第4版,2013以及Ausubel等人,Current Protocols in Molecular Biology,补编47,John Wiley&Sons,New York,1999;Colowick和Kaplan编,Methods In Enzymology,Academic Press,Inc.;Weir和Blackwell编,Handbook of Experimental Immunology,第I-IV卷,Blackwell Scientific Publications,1986。免疫测定可以本领域中已知的任何适宜形式进行。

[0147] 由于能够大量产生抗体,并且产品具有同质性,所以抗体常常用于免疫测定中。对用于单克隆抗体产生的杂交瘤细胞系的制备通过使永生细胞系和针对目标抗原加以敏化的淋巴细胞融合来获得,或可通过为本领域技术人员所熟知的技术来进行。(参见例如Douillard和Hoffman,Basic Facts about Hybridomas,Compendium of Immunology第II卷,Schwartz编,1981;Kohler和Milstein,Nature 256:495-499,1975;European Journal of Immunology 6:511-519,1976或更新近参考书目Sambrook,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第3版,CSHLP,CSH,NY,2001)。可在体外操作编码抗体的DNA,并且将其回引至淋巴样细胞系中,由此允许产生经遗传工程改造抗体。在过去十年,用于产生天然复杂蛋白质的短暂哺乳动物表达系统的使用已有所增加(参见S.Geisse,B.Voedisch Methods Mol.Biol.,899(2012),第203-219页),由高效转染方案的公布和在高密度下生长的悬浮细胞系的可用性加以推动。对于短暂表达,主要已应用HEK-293和CHO-K1细胞系。两种细胞系均可适合于悬浮培养,并且在化学成分确定的培养基中在高细胞密度下生长的亚克隆是可用的。由于人胚肾293细胞系容易转染、表达产率较高以及达成天然人糖基化,所以它可被使用。

[0148] 抗体和它们的较小形式诸如scFv和Fab片段可在本领域中已知的任何细胞类型中产生。无细胞蛋白质合成,也被称为体外翻译,有助于通过在不使用活细胞下利用翻译机构来产生给定靶标蛋白质。无细胞系统已成功用于高通量产生蛋白质文库以及高产率合成所选靶标蛋白质。具体地,使用线性DNA模板会促进无细胞翻译系统的简易性和速度,因为在蛋白质产生之前需要不具有耗时克隆步骤。给定靶标蛋白质的抗体花费约1至2天,而包括克隆程序和细胞转化的基于细胞的表达可花费多达2周。噬菌体展示技术是最通常用于抗体片段的体外选择和进化的技术。

[0149] 作为特异性结合剂的抗体替代物描述于文献中,并且由于它们具有尤其使测定可重现性和稳定性改进的潜力而在本领域中得到认可。抗体替代物的综述由并入本文的

McLeod等人, The Scientist 2016年2月提供, 并且包括适体和affimer。任何所述结合剂都可在不进行过度实验下用于本发明测定和试剂盒中。

[0150] 可使用ELISA类型程序评估复合物的存在。广泛范围的免疫测定技术是可用的, 如可通过参照美国专利号4,016,043、4,424,279和4,018,653而得见。这些包括非竞争性类型的单位点测定与双位点或“夹心式”测定两者, 以及传统竞争性结合测定。熟练人士将了解对已知标记系统的选择和实施仅涉及常规实验。

[0151] 夹心式测定属于最适用和通常使用的测定。存在夹心式测定技术的许多变化形式, 并且全都意图由本发明涵盖。简要来说, 在典型正向测定中, 将结合剂固定在固体或半固体基底上, 并且使待测试样品与经结合分子接触。在一段适合孵育期之后, 即持续一段足以允许形成结合剂-抗原复合物的时期, 接着添加用能够产生可检测信号的报道体分子标记的对抗原具有特异性的第二结合剂并孵育, 允许有时间足以形成结合剂-抗原-经标记结合剂的另一复合物。将任何未反应物质都洗除, 并且通过观察由可检测标记(报道体分子)产生的信号来确定标志物的存在。通过简单观察可见信号, 结果可为定性的或定量的, 或结果可通过与含有已知量的标志物的对照样品进行比较来定量。正向测定的变化形式包括同时测定, 其中将样品与经标记结合剂两者同时添加至经结合结合剂中。这些技术为本领域技术人员所熟知, 包括如将显而易见的任何微小变化。根据本发明, 样品通常是包含生物液体的生物样品, 并且最适宜是可用抗凝剂处理的全血样品, 诸如毛细血管血液或静脉血液。

[0152] 在典型正向夹心式测定中, 使对标志物具有特异性的第一结合剂共价或被动结合于固体或半固体载体。载体通常是玻璃或聚合物, 其中最通常使用的聚合物是硝化纤维素、纤维素、聚丙烯酰胺、尼龙、聚苯乙烯、聚氯乙烯、聚丙烯或这些的混合物或衍生物。固体载体可呈管、珠粒、盘或微板、或适于进行免疫测定的任何其它表面的形式。结合过程在本领域中是熟知的, 并且通常由使聚合物-结合剂复合物共价交联结合于或物理吸附于固体表面, 接着洗涤所述固体表面以为测试样品作准备来组成。接着将待测试样品的等分试样添加至固相复合物中, 并且持续一段足以允许结合结合剂中存在的任何亚单位的时期(例如2-40分钟或过夜(如果更方便))以及在适于允许结合结合剂中存在的任何亚单位的条件(例如从室温至约37°C, 包括25°C)下进行孵育。在孵育时期之后, 洗涤结合剂亚单位固相, 并且使其与对抗原的一部分具有特异性的第二结合剂一起孵育。第二结合剂连接于用于指示第二结合剂与抗原的结合的可检测标记。

[0153] 一替代性方法涉及将生物样品中的靶标分子固定, 接着使经固定靶标暴露于可用或可未用可检测标记加以标记的特异性结合剂。视靶标的量和来自可检测标记的信号的程度而定, 经结合靶标可通过用结合剂直接标记来检测。或者, 使对第一结合剂具有特异性的第二经标记结合剂暴露于靶标-第一结合剂复合物以形成靶标-第一结合剂-第二结合剂三重复合物。通过由报道体分子发出的信号来检测复合物。基于珠粒的方法的一显著改进涉及用独特鉴定标签诸如寡核苷酸或电泳标签使各珠粒标签化, 以便有助于鉴定各文库成员的氨基酸序列。这些改进的基于珠粒的方法描述于国际公布号W0 93/06121中。

[0154] 在其它实施方案中, 方法是液相方法。在液相免疫测定的一个实例(参见例如美国专利号6,632,603)中, 使样品与能够结合标志物的试剂和包含可目视检测剂的检测剂诸如经胶体金或银标记检测剂接触。测试样品通过于不溶性多孔载体薄膜的限定区上流动来施加, 所述薄膜具有在标志物与它的靶标之间, 以及如果所述靶标存在, 那么连同结合物质和

检测物质一起形成的复合物不可通过,但在不存在所需靶标下保持未复合时的结合物质和检测物质可通过的孔尺寸。如果靶标存在于测试试样中,那么检测物质与靶标和结合物质结合以在多孔载体薄膜的表面上形成可目视检查复合物。在将测试样品施加于多孔载体之后,目视检查多孔载体的表面的颜色以确定所测定标志物的存在和数量或不存在。

[0155] 在另一测定中,结合标志物的磁性抗体用于使标志物标签化,并且高Tc超导量子干涉装置用于测量靶标蛋白质的量。脂质体免疫迁移液相竞争条带免疫测定例如描述于 Glorio-Paulet等人, *J Agric Food Chem* 48 (5):1678-1682,2000中。

[0156] 用于进行各种形式的ELISA的一般性形式和方案公开于本领域中,并且为诊断领域技术人员所知。举例来说,可参照Ausubel(编) *Current Protocols in Molecular Biology*,第5版,John Wiley&Sons,Inc,NY,2002的第11章。Rundström,G等人描述针对全血中嗜酸性粒细胞和嗜中性白细胞的使用铈(III)螯合物微粒和时间分辨荧光进行的侧流免疫测定。*Clinical Chemistry* 53,342-348(2007),其并入本文中。

[0157] 如果需要,那么各种方法可用于使单核细胞或红血细胞从血液消减。在一些实施方案中,通过使样品与结合于固体或半固体载体的抗CD14抗体或其它相关抗体接触来使样品中的单核细胞消减。在另一实施方案中,通过使样品与结合于固体或半固体载体的抗血型糖蛋白A抗体接触来使样品中的红血细胞消减。

[0158] 在一些实施方案中,提供一种色谱装置,其包含具有允许或有助于方法的组分的毛细流动的孔尺寸的物质。在一些实施方案中,装置包括包含具有不同孔尺寸的物质或非多孔物质的各部分,所述物质与第一物质邻接,并且被设计来接收样品或接收或储存方法的组分。在一些实施方案中,色谱装置各部分是单独的,邻接的,或重叠的,或被设计来在使用时集合在一起。

[0159] 在一些实施方案中,样品垫色谱性地连接于装置的测试部分,所述测试部分包含结合剂,诸如抗体或其抗体结合片段、抗原结合构建体诸如affimer或配体或其部分。在一说明性实施方案中,受试者是哺乳动物,并且测试部分包含在适当条件下识别和结合CD64的抗体或affimer。在一说明性实施方案中,受试者是哺乳动物,并且第二测试部分包含在适当条件下识别和结合嗜中性白细胞特异性标志物诸如NE的抗体或affimer。

[0160] 在一些实施方案中,样品垫色谱性地连接于装置的测试部分,所述测试部分包含抗体或其抗体结合片段、affimer、适体或配体或其部分。在一说明性实施方案中,受试者是哺乳动物,并且测试部分包含在适当条件下识别和结合嗜中性白细胞特异性标志物的抗体。

[0161] 在一些实施方案中,当待测试样品的色谱活性部分从样品垫朝向并穿过测试部分移动时,NE和CD64被捕获于装置的测试部分或控制部分上,而从样品垫流动的样品的其余部分未被捕获。在一些实施方案中,测试样品的未捕获组分被色谱收集至相对于测试部分以任何定向加以定位的吸收垫中。

[0162] 受试者样品的组分诸如红血细胞或特定白血细胞可例如通过选择具有适合筛孔尺寸或孔尺寸的垫料和/或通过包括结合和保留这些组分的特异性试剂诸如抗体或凝集素来保留在样品垫中。举例来说,单核细胞可使用抗CD14抗体来保留。抗血型糖蛋白抗体可用于保留/移除红血细胞。

[0163] 在一些实施方案中,一旦免疫色谱装置的测试部分已暴露于受试者样品中的CD64

和嗜中性白细胞特异性标志物,方法即通过使得在测试部分与检测结合剂之间接触来继续进行。在一些实施方案中,检测标记储存在试剂盒的单独部分中。

[0164] 在一些实施方案中,检测标记包含可目视检测报道体分子,并且阳性结果可基本上立刻在免疫色谱装置的测试部分和/或控制部分中观察到。

[0165] 渗透化剂和溶液也可导致白细胞裂解、固定或溶解,并且所述术语在本文中广泛用于涵盖这些事件(如果优选)。进行渗透化以有助于对细胞内的细胞标志物(内部)的获取。

[0166] 细胞的渗透化可通过本领域中已知的任何适合方法来进行。这些方法包括但不限于暴露于清洁剂(诸如CHAPS、胆酸、脱氧胆酸、毛地黄皂苷(digitonin)、正十二烷基- β D-麦芽糖苷、月桂基硫酸盐、甘氨酸脱氧胆酸、n-月桂酰基肌氨酸、皂素和曲通X-100(Triton X-100))。其它渗透化方法包括使用致使膜渗透化的某些肽或毒素。也可通过将有机醇添加至细胞中来进行渗透化。对适当渗透化剂以及缓冲液(如果需要)的选择可易于由本领域普通技术人员进行。渗透化可与固定步骤并行发生。固定溶液包括例如Cytotfix/Cytoperm(BD Biosciences)。通常使用的细胞固定剂包括但不限于甲醛、多聚甲醛、戊二醛、乙酸、苦味酸、甲醇、乙醇和丙酮。适于全血样品的说明性固定缓冲液是Phosflow裂解/固定缓冲液(BD Biosciences)。固定剂已用于检测表面抗原与细胞内抗原两者。一些固定剂包括醇和甲醛/多聚甲醛。说明性固定剂描述于美国专利号5,422,277和美国专利号5,597,688中。

[0167] 在其它实施方案中,检测标记可使用诸如将为本领域普通技术人员所熟知的其它检测方案和装置来检测。举例来说,适宜使用胶体金属或金属氧化物粒子或胶体非金属粒子或染料或有色乳胶。

[0168] 在实施例1中所述的早期实验中,通过评估CD64与NNM比率来确定诊断门限或截止值。

[0169] 在一个实施方案中,测定包括:

[0170] (i) 任选地,使样品与使嗜中性白细胞裂解或溶解的试剂接触;

[0171] (ii) 使样品与特异性结合样品中的CD64并形成CD64-结合剂复合物的结合剂和特异性结合样品中的嗜中性白细胞标志物并形成嗜中性白细胞标志物-结合剂复合物的第二结合剂接触;以及

[0172] (iii) 测量和确定来自步骤(ii)的各复合物的相对量以获得指示或代表样品中每个嗜中性白细胞的平均CD64量的修正CD64指数(CD64与NNM比率)。

[0173] 在另一早期实施方案中,来自步骤(iii)的CD64指数关于样品中通过步骤(iii)中测量的嗜中性白细胞标志物-结合剂复合物的量确定的嗜中性白细胞数目加以修正。

[0174] 在一个实施方案中,测定进一步包括如果CD64指数超过高于其时指示样品中嗜中性白细胞CD64的量超常的截止水平,那么将包括新生儿受试者的受试者诊断为患有包括新生儿败血症的败血症或具有显现包括新生儿败血症的败血症的风险。截止水平可尤其视受试者的年龄而加以修正。

[0175] 在一个实施方案中,将来自步骤(iii)的CD64指数与样品中通过步骤(iii)中测量的嗜中性白细胞标志物-结合剂复合物的量确定的嗜中性白细胞数目进行比较,或相对于所述嗜中性白细胞数目加以绘制,并且截止nCD64指数关于样品中嗜中性白细胞的数目加以修正。如图4C中所示,在健康供体中,在总CD64与嗜中性白细胞计数之间存在强烈关联。

然而,在具有较低嗜中性白细胞计数的样品中,表达的CD46的总量实际上是较高的。这惊人地意味着为达成准确度增加,指示败血症或败血症风险的截止nCD4比率不应是恒定值,而是应在某一病例的情况下基于病例来关于样品中嗜中性白细胞的总数(例如将嗜中性白细胞表示为细胞数/体积)加以修正。因为指数值可为嗜中性白细胞计数的函数,所以通过对截止值进行调整来获得更大准确度,此在单独使用流式细胞计量术时是不可能的,因为在无单独参照方法下,没有办法通过流式细胞计量术来得到绝对嗜中性白细胞计数。在一个实施方案中,简单算法通过仪器读取器来嵌入或可获得以对于嗜中性白细胞计数的任何给定值设置截止值。举例来说,在一个实施方案中,截止值高于CD64/NE比率的最佳拟合线的95%置信区间,如图3B中所示。这在图5中加以说明。

[0176] 在一个实施方案中,将结合剂固定在载体上。适合载体在本领域中是熟知的,如本文所述。

[0177] 在一些实施方案中,进行测定,其中在步骤(ii)中,通过将样品施加于免疫色谱装置或微流体装置的样品部分来使样品与步骤(ii)的结合剂接触,其中装置样品部分可操作地连接于装置的经分隔捕获部分,并且借此样品的组分从装置样品部分流向并穿过装置捕获部分,并且其中一个捕获部分包含特异性结合样品中的CD64的结合剂,以使CD64在捕获部分中由结合剂捕获以形成结合剂-CD64复合物,并且其中第二捕获部分包含特异性结合样品中的嗜中性白细胞标志物的结合剂,以使嗜中性白细胞标志物或其结合部分在捕获部分中由结合剂捕获以形成结合剂-嗜中性白细胞标志物复合物。

[0178] 在一个实施方案中,使用分别结合CD64或嗜中性白细胞标志物,并且直接或间接提供可目视定量或以光度测量方式包括以荧光测量方式(通过仪器读取器)定量的可检测信号的结合剂检测CD64复合物和嗜中性白细胞标志物结合剂复合物的量,所述结合剂诸如抗体或抗原结合片段。

[0179] 关于这个实施方案,结合剂可缀合到可检测标记或包含可检测标记的微粒,所述可检测标记或包含可检测标记的微粒提供可检测信号。说明性粒子和方法描述于 Rundström, G等人, Lateral Flow Immunoassay Using Europium(III) Chelate Microparticles and Time-Resolved Fluorescence for Eosinophils and Neutrophils in Whole Blood. *Clinical Chemistry* 53, 342-348 (2007) 中。

[0180] 在一个实施方案中,捕获部分是测试线。

[0181] 在一个实施方案中,来自CD64测试线的目视或以光度测量方式/仪器计算信号和来自嗜中性白细胞标志物测试线的目视或以光度测量方式/仪器计算信号的比率提供指示样品中每个嗜中性白细胞的CD64量的修正嗜中性白细胞CD64指数。

[0182] 明确涵盖免疫色谱测试试剂盒,并且本说明书的另一方面提供一种试剂盒,其包括(i)色谱装置,其包括多孔膜可操作地连接于样品部分、两个或更多个捕获(测试)部分,以及任选可操作地连接于以下项中的一者或多者:缀合物(检测标记)部分、吸器部分、适合控制部分以及细胞裂解或溶解部分,和(ii)特异性结合样品中的CD64并形成CD64-结合剂复合物的结合剂,和特异性结合样品中的嗜中性白细胞标志物(NNM)并形成嗜中性白细胞标志物-结合剂复合物的第二结合剂,其中结合剂被固定于单独捕获部分和/或含于缀合物部分内,和(iii)任选地,用于使用所述装置来测定修正嗜中性白细胞CD64指数和/或评估败血症的说明书。

[0183] 在一个实施方案中,试剂盒适于逆流或侧流免疫色谱形式。

[0184] 在一个实施方案中,结合剂是抗体或其抗原结合片段或衍生物、配体或其受体结合部分、或抗原结合构建体诸如affimer。

[0185] 说明性结合剂包括包含蛋白质骨架连接于一个或多个表位结合结构域的抗原结合构建体,其中抗原结合构建体具有至少两个抗原结合位点,其中至少一者来自表位结合结构域,并且其中至少一者来自配对VH/VL结构域。

[0186] 在一个实施方案中,嗜中性白细胞特异性标志物选自包含嗜中性白细胞弹性蛋白酶、乳铁传递蛋白、髓过氧化物酶和人嗜中性白细胞载脂蛋白或其嗜中性白细胞上的量与嗜中性白细胞数目有效相关联的等效细胞标志物的组。

[0187] 在一个实施方案中,嗜中性白细胞特异性标志物选自包含嗜中性白细胞弹性蛋白酶、乳铁传递蛋白和人嗜中性白细胞载脂蛋白或其嗜中性白细胞上的量与嗜中性白细胞数目有效相关联的等效细胞标志物的组。

[0188] 为标志物充当嗜中性白细胞数目的准确指标所需的线性或可重现非线性关联的水平将视采用的标志物和测定而变化。通常,不小于约70%的关联将是有效的。涵盖71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的水平。

[0189] 如实施例2中所说明,本说明书教导NNM可在与嗜中性白细胞数目无强烈绝对关联下提供关于嗜中性白细胞数目进行的适用修正。这是因为NNM的效用不必取决于与嗜中性白细胞数目良好相关联,而是取决于与嗜中性白细胞CD64水平相关联以及与嗜中性白细胞数目相关。

[0190] 因此,在一些实施方案中,NNM生物标志物可与嗜中性白细胞数目具有小于约70%的正性关联,但与嗜中性白细胞特异性CD64的关联不小于约70%,并且这将是有效的。

[0191] 就“约”来说,其意指关于参照测量结果、数量、水平、活性、数值、数目、频率、百分比、大小、尺寸、量、重量或长度变化多达10、9、8、7、6、5、4、3、2或1%的测量结果、数量、水平、活性、数值、数目、频率、百分比、大小、尺寸、量、重量或长度。

[0192] 除非另外明确陈述,否则本说明书中的各实施方案都将在加以必要的变更下应用于每个其它实施方案。

[0193] 在一个实施方案中,本说明书使对从受试者获得的全血样品或大致上消减了红细胞、单核细胞和巨噬细胞中的一者或多者的全血样品进行以确定修正嗜中性白细胞CD64指数的适于床旁使用的免疫测定成为可能。

[0194] 如本文所用,短语“大致上消减”意指不含至少70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的诸如单核细胞和巨噬细胞的细胞。

[0195] 在一些实施方案中,受试者是人,并且包括人新生儿。然而,本发明延展至灵长类动物、家畜动物、实验室测试动物、伴侣动物和禽物种以及非哺乳动物动物诸如爬行动物。因此,测定在人、家畜、兽医学和野生生物治疗和诊断中具有应用。

[0196] 全血是指来自受试者的基本上未处理的血液样品,当血液通过静脉收集来获得时,通常已添加抗凝剂,或如果血液通过手指刺扎或手指针刺收集来获得并在床旁无延迟加以使用,那么此举可省略或不省略。

[0197] 描述尤其在实施例1和图1至图6中所述的测定和试剂盒的实施方案的经编号条款也如下加以提供；

[0198] 1. 一种对从受试者获得的全血样品或大致上消减了红血细胞、单核细胞和巨噬细胞中的一者或多者的全血样品进行以确定修正嗜中性白细胞CD64指数的适于床旁使用的免疫测定,所述测定包括:

[0199] (ii) 任选地,使所述样品与使嗜中性白细胞裂解或溶解的试剂接触;

[0200] (iii) 使所述样品与特异性结合所述样品中的CD64并形成CD64-结合剂复合物的结合剂和特异性结合所述样品中的嗜中性白细胞标志物并形成嗜中性白细胞标志物-结合剂复合物的第二结合剂接触;以及

[0201] (iv) 测量和确定来自步骤(ii)的各复合物的相对量以获得指示所述样品中每个嗜中性白细胞的平均CD64量的修正CD64指数(比率)。

[0202] 2. 如条款1所述的测定,其进一步包括如果所述CD64指数超过指示所述样品中嗜中性白细胞CD64的量超常的截止水平,那么将所述受试者诊断为具有超常量的嗜中性白细胞CD64,其中所述截止水平随步骤(iii)中测量的所述嗜中性白细胞标志物-结合剂复合物的量而变化来确定。

[0203] 3. 如条款1所述的测定,其进一步包括如果所述CD64指数超过指示所述样品中嗜中性白细胞CD64的量超常的截止水平,那么将所述受试者诊断为患有败血症或具有显现败血症的风险,其中所述截止水平随步骤(iii)中测量的所述嗜中性白细胞标志物-结合剂复合物的量而变化来确定。

[0204] 4. 如条款1所述的测定,其中所述CD64指数关于所述样品中通过步骤(iii)中测量的所述嗜中性白细胞标志物-结合剂复合物的量确定的嗜中性白细胞数目加以修正。

[0205] 5. 如条款1至4中的任一者所述的测定,其中所述测定是酶联免疫吸附(ELISA)类型、流式细胞计量术或免疫色谱方法。

[0206] 6. 如条款1至5中的任一者所述的测定,其中所述结合剂是抗体或其抗原结合片段、抗原结合构建体诸如affimer、或配体或其结合部分。

[0207] 7. 如条款5或6所述的测定,其中所述测定是酶联免疫吸附(ELISA)类型或色谱方法,并且所述结合剂被固定在载体上。

[0208] 8. 如条款1至7中的任一者所述的测定,其中在步骤(ii)中,通过将所述样品施加于免疫色谱装置的样品部分来使所述样品与步骤(ii)的所述结合剂接触,其中所述装置样品部分可操作地连接于所述装置的经分隔捕获部分,并且借此所述样品的组分从所述装置样品部分流向并穿过所述装置捕获部分,并且其中一个捕获部分包含特异性结合所述样品中的CD64的所述结合剂,以使所述CD64在所述捕获部分中由所述结合剂捕获以形成结合剂-CD64复合物,并且其中第二捕获部分包含特异性结合所述样品中的嗜中性白细胞的所述结合剂,以使所述嗜中性白细胞或其结合部分在所述捕获部分中由所述结合剂捕获以形成结合剂-嗜中性白细胞标志物复合物。

[0209] 9. 如条款1至8中的任一者所述的测定,其中使用分别结合CD64或嗜中性白细胞标志物,并且直接或间接提供可目视定量或以光度测量方式包括以荧光测量方式(通过仪器读取器)定量的可检测信号的结合剂检测CD64复合物的量和嗜中性白细胞标志物结合剂复合物的量,所述结合剂诸如抗体或抗原结合片段、配体或affimer。

[0210] 10. 如条款9所述的测定,其中所述结合剂缀合到可检测标记或包含可检测标记的微粒,所述可检测标记或包含可检测标记的微粒提供可检测信号。

[0211] 11. 如条款8至10中的任一者所述的测定,其中所述捕获部分是测试线。

[0212] 12. 如条款11所述的测定,其中来自CD64测试线的目视或以光度测量方式计算信号和来自嗜中性白细胞标志物测试线的目视或以光度测量方式计算信号的比率提供指示所述样品中每个嗜中性白细胞的CD64量的修正嗜中性白细胞CD64指数。

[0213] 13. 如条款1至12中的任一者所述的测定,其中嗜中性白细胞特异性标志物选自包含嗜中性白细胞弹性蛋白酶、乳铁传递蛋白和人嗜中性白细胞载脂蛋白或其在嗜中性白细胞上的量与嗜中性白细胞数目相关联的等效细胞标志物的组。

[0214] 14. 如条款1至12中的任一者所述的测定,其中单核细胞和巨噬细胞通过例如红细胞凝集来加以大致上消减。

[0215] 15. 一种试剂盒,其包括(i) 色谱装置,其包括多孔膜可操作地连接于样品部分、两个或更多个捕获(测试)部分,以及任选可操作地连接于以下项中的一者或多者:缀合物(检测标记)部分、吸器部分、适合控制部分以及细胞裂解或溶解部分,和(ii) 特异性结合样品中的CD64并形成CD64-结合剂复合物的结合剂,和特异性结合样品中的嗜中性白细胞并形成嗜中性白细胞标志物-结合剂复合物的第二结合剂,其中所述结合剂被固定于单独捕获部分和/或含于缀合物部分内,和(iii) 任选地,用于使用所述装置来测定修正嗜中性白细胞CD64指数和/或评估败血症的说明书。

[0216] 16. 如条款14所述的试剂盒,其适于逆流或侧流免疫图谱形式。

[0217] 17. 如条款14或15所述的试剂盒,其中所述结合剂是抗原结合构建体诸如affimer、配体,或抗体或其抗原结合片段。

[0218] 18. 如条款17所述的试剂盒,其中所述结合剂是affimer。

[0219] 19. 如条款14至17中的任一者所述的试剂盒,其中嗜中性白细胞特异性标志物选自包含嗜中性白细胞弹性蛋白酶、乳铁传递蛋白和人嗜中性白细胞载脂蛋白或其在嗜中性白细胞上的量与嗜中性白细胞数目相关联的等效细胞标志物的组。

[0220] 20. 如条款15至19中的任一者所述的试剂盒,其用于如条款1至1中的任一者所述的测定中。

[0221] 以下试剂盒/试剂说明在开发本文所述的测定中使用的试剂。

[0222] 使用的ELISA试剂盒:

[0223] 物品描述:人FCGR1A/CD64 ELISA试剂盒

[0224] 目录号:LS-F4795

[0225] 公司名称:LS Bio

[0226] 物品描述:PMN弹性蛋白酶人ELISA试剂盒

[0227] 目录号:ab119553

[0228] 公司名称:Abcam

[0229] 使用的抗体和重组蛋白:

[0230] 物品描述:嗜中性白细胞弹性蛋白酶,重组蛋白

[0231] 目录号:MBS957715

[0232] 公司名称:MyBioSource

- [0233] 物品描述:供给人嗜中性白细胞弹性蛋白酶
- [0234] 目录号:INHE
- [0235] 公司名称:Cardinal Bioresearch
- [0236] 物品描述:小鼠单克隆抗嗜中性白细胞弹性蛋白酶抗体
- [0237] 目录号:ab41179
- [0238] 公司名称:Abcam
- [0239] 物品描述:兔多克隆抗嗜中性白细胞弹性蛋白酶抗体
- [0240] 目录号:ab126154
- [0241] 公司名称:Abcam
- [0242] 物品描述:抗嗜中性白细胞弹性蛋白酶抗体(生物素)
- [0243] 目录号:ab79962
- [0244] 公司名称:Abcam
- [0245] 物品描述:重组人CD64
- [0246] 目录号:1257-FC
- [0247] 公司名称:R&D Systems
- [0248] 物品描述:抗CD64抗体[10.1](生物素)
- [0249] 目录号:ab27928
- [0250] 公司名称:Abcam
- [0251] 物品描述:兔多克隆抗CD64抗体
- [0252] 目录号:ab95244
- [0253] 公司名称:Abcam
- [0254] 物品描述:小鼠单克隆抗CD64抗体[3D3]
- [0255] 目录号:ab140779
- [0256] 试剂盒、步骤和测定的实施方案用以下说明性实施例加以进一步认证。
- [0257] 实施例1
- [0258] 开发基于流式细胞计量的嗜中性白细胞活化测定的适用于床旁(POC)的替代方案。使用CD64与NNM比率评估免疫测定截止值。
- [0259] 在认识到用于测量嗜中性白细胞活化(nCD64i)的POC测试将具有极大临床效用的情况下,如本文所述设计一种新型方法,其将允许使用算法和独立地适合于在POC测量的标志物的组合的值来测量流式细胞计量术nCD64i值的类似值或等效值。
- [0260] 在一些方面,本发明方法利用一些本发明者在开发用于测量CD4T细胞的侧流POC测试时的经验(美国专利8,409,818和其它领域)。
- [0261] 根据本发明者关于CD4 POC测试的经验,了解到每个细胞的CD4量是恒定的,因此CD4的量与CD4 T细胞的数目成正比。相比之下,嗜中性白细胞上CD64的量是可变的(在败血症的情况下升高),并且通过流式细胞计量术测量的nCD64i值代表每个嗜中性白细胞的平均CD64蛋白量(并且有时表示为平均荧光指数)。因此,nCD64i可被表示为数值分数(消减了单核细胞和巨噬细胞的血液中的总CD4)/(嗜中性白细胞的总数)或CD64/嗜中性白细胞。在流式细胞仪中,此被测量为各个别细胞的荧光强度,接着相对于取样的嗜中性白细胞的总数(通常是50,000个细胞或100,000个细胞)加以平均化。

[0262] 本发明者预测如果他们能够在移除单核细胞和巨噬细胞之后例如使用CD4测试的实例中所示的相同方法测量全血中CD64的总量,那么那将给出CD64/嗜中性白细胞分数的分子。对CD64的这个测量可通过使用简单实验室设施进行的诸如酶联免疫吸附测定(ELISA)类型测定很少使用酶,但仍然被称为ELISA)的方法,或更优选通过POC方法诸如遵循Visitect CD4 T细胞测试中CD4 T细胞的实例进行的侧流免疫色谱法来实现。

[0263] 本发明者进一步认识到代表CD64/嗜中性白细胞分数的分母的嗜中性白细胞数目可使用与CD4 T细胞测试相同的方法,基于某一蛋白质来测量,所述蛋白质对于各嗜中性白细胞来说显示恒定或可预测表达水平,以致所述蛋白质的量与嗜中性白细胞数目成比例。作为一个实例,可测量嗜中性白细胞特异性蛋白质嗜中性白细胞弹性蛋白酶(NE),但也可尤其使用诸如乳铁传递蛋白和髓过氧化物酶的其他蛋白质。用于检测和计数嗜中性白细胞以及嗜酸性粒细胞的说明性侧流方法和放射免疫测定方法已报道于文献中,所述方法使用蛋白质嗜酸性粒细胞蛋白X (EPX) 和人嗜中性白细胞载脂蛋白(HNL),并且显示与传统细胞计数方法一致的可接受水平(Rundström,G等人,Lateral Flow Immunoassay Using Europium(III)Chelate Microparticles and Time-Resolved Fluorescence for Eosinophils and Neutrophils in Whole Blood.Clinical Chemistry 53,342-348 (2007))。

[0264] 对血浆或细胞培养物使用用于检测NE的先前技术方法,其中它们检测已由于嗜中性白细胞脱粒而释放的NE。相比之下,在本发明测定中,测量全血中的总NE,包括在完整嗜中性白细胞内部的NE。相较于细胞内量,血浆中的量低得多,并且基本上是无关系的。

[0265] NE已被视为败血症自身的标志物,但仅涉及血浆/血清量,因为全血量改为充当嗜中性白细胞计数的标志。NE应答于感染而释放,但释放与转换之间的平衡被认为过于可变以致不能使此适用作败血症标志物。

[0266] 因此,预测通过使用用于并行测量(在同时操作的同一测定中)全血中嗜中性白细胞CD64的总量与嗜中性白细胞的绝对数目(例如使用嗜中性白细胞弹性蛋白酶作为标志物)两者的免疫测定诸如侧流免疫色谱免疫测定,可获得CD64/NE的简单算术分数,并且其将提供对nCD64指数或(也称为nCD64比率)的替代性床旁(POC)友好测量。用于对CD4 T细胞数目计数的测试(Visitect CD4)和本文所述的POC友好nCD64i测试(其可被称为SepsiTest)的原理显示于图3中。

[0267] 为测试可获得CD64/NE的简单算术分数作为nCD64指数的替代性测量结果的预测,ELISA用于测量来自健康志愿者的全血中嗜中性白细胞弹性蛋白酶(NE)和CD64的总量。对于这些初始实验(图4),未首先移除单核细胞和巨噬细胞,作为单核细胞和巨噬细胞的总数比嗜中性白细胞的数目小得多,因此不预期这些细胞的影响是问题,然而,在最终测试中,预期单核细胞和巨噬细胞将被大致上/任选消减。

[0268] 使用ELISA获得的实验数据(参见图4)显示健康供体中嗜中性白细胞特异性蛋白质嗜中性白细胞弹性蛋白酶(NE)的总量与嗜中性白细胞(粒细胞)计数之间的强烈关联(图4A; $p=0.0002$, $R^2=0.896$)。

[0269] 类似地,在健康供体中,在总CD64与嗜中性白细胞(粒细胞)计数之间存在强烈关联(图4C, $p=0.0003$, $R^2=0.915$)。然而,得到惊人观察结果,即在健康个体中,每个细胞的CD64量不是恒定的,而是受嗜中性白细胞/粒细胞的总数影响。也就是说,在具有低水平的

嗜中性白细胞(接近嗜中性白细胞减少症的水平)的样品中,CD64的总量实际上是较高的,代表即使在健康个体中,每个细胞的CD64量也较高。据我们所知,这尚未在先前被观察到。

[0270] 因此,CD64与NE之间的比率提供nCD64指数,显示于图4B中。因为在具有较低总嗜中性白细胞计数的样品中,CD64的相对量较高,所以在nCD64指数的计算值的情况下见到类似关系,其中具有低嗜中性白细胞计数的样品的nCD64i值较高($R^2=0.861$)。这个新颖观察结果可能在开发基于CD64表达的更有效败血症测试中具有强烈临床重要性,因为它表明nCD64i的截止比率不应是如Leuko64流式细胞计量术试剂盒中所推荐的恒定值,而是应在各实验室中经受个别优化[Beckman Coulter-参见以Trillium Diagnostics LLC名义申请的美国专利公布号2013/0230867-这个试剂盒包含对CD64(FITC缀合)和CD163(藻红素缀合)具有特异性的三种单克隆抗体的混合物以及用于仪器校正和人血液白细胞上白细胞CD64和CD163表达的标准化的专有荧光珠粒混悬液。所述试剂盒也含有红细胞裂解溶液浓缩物]。

[0271] 更确切来说,视各即时样品中的总嗜中性白细胞计数而定,截止值应是可变值。可使用本领域中熟知的方法来构建算法以对于嗜中性白细胞计数的任何给定值设置截止值,例如将截止值设置为高于图3B中所示的CD64/NE比率的最佳拟合线的95%置信区间。这个计算的一实例显示于图5中,其中在单核细胞消减之后计算较大健康对照样品组的nCD64指数,并且在不同量的NE(代表嗜中性白细胞计数)下的估计nCD64指数的下部95%置信区间和上部95%置信区间显示为红色点线。因此,高于上部说明性95%置信区间的任何nCD64i值都将受到高度怀疑代表败血症。

[0272] 在一些实施方案中,截止值被设置高于约90%与99%之间的任何值。对截止值的选择将通过扩展临床研究和接收器操作特征(ROC)分析来确定。

[0273] 鉴于所观察的取决于嗜中性白细胞浓度的CD64水平变化对截止值的修正可通过本领域中已知的各种方法来进行。在一个实施方案中,将校正因数应用于CD64指数,诸如通过使它成为半对数比率,或用嗜中性白细胞计数的倒数来乘以它。或者,调整截止数值以具有相同效果。

[0274] 用于使针对CD64和NE的个别ELISA测定换变成POC测试诸如侧流免疫测定的方法在本领域中是熟知的,并且由Rundström等人(Rundström,G等人,Lateral Flow Immunoassay Using Europium(III)Chelate Microparticles and Time-Resolved Fluorescence for Eosinophils and Neutrophils in Whole Blood.Clinical Chemistry 53,342-348(2007))描述的Visitect CD4测试和嗜中性白细胞/嗜酸性粒细胞测试是整体并入本文的相关实例。

[0275] 出于使用侧流免疫色谱法或其它POC方法来计算nCD64指数的目的,预期诸如图6中示意性显示的简单排列将是有效的。在这个预测性实例中,测试将与Visitect CD4 T细胞测试具有类似形式,包括并入那个测试中的用于大致上移除红血细胞、单核细胞和巨噬细胞的方法。然而,替代CD4的测试线和代表350个CD4 T细胞的截止值的参照线,在一个实施方案中,将存在2个测试线,其中一个测量CD64的量,并且另一个测量NE或其它嗜中性白细胞特异性标志物的量。为确定截止值,将接着通过目视检查或通过仪器读取器诸如Axxin AX-2仪器(参见例如以引用的方式整体并入本文的美国公布号2013/0162981)来计算两个

线的测量强度之间的算术比率,并且个别样品的截止值将根据NE或其它嗜中性白细胞特异性标志物的测量量计算。测量nCD64i将接着与即时NE依赖性截止值诸如健康样品的上部95%置信区间进行比较,并且将报告关于“可能有败血症”或“不可能有败血症”的判定。

[0276] 实施例2

[0277] 描述进一步开发,并且特别是总CD64水平和总NNM水平(即内部和外部水平)以及不同截止值确定法在诊断败血症方面的效用。

[0278] 在(图4C)中,说明的是在具有较低嗜中性白细胞/粒细胞计数的样品中,CD64相较于NE的量(通过ELISA测量的nCD64i)较高,同时新颖地表明需要CD64i的随NE值而变化的可变截止值以改进使用CD64来诊断败血症(也参见图5)。值得注意的是,那个实验中的结果是使用已利用磁珠来使单核细胞/巨噬细胞消减的全血加以获得。

[0279] 在进一步工作中,这些观察结果已被延展,并且描述一种仅需要使用来自单核细胞/巨噬细胞未消减的全血的NE值和CD64值的简化方法。单核细胞/巨噬细胞消减是任选步骤,尤其对于其中相比于在具有较高NE值的样品的情况下单核细胞/巨噬细胞CD64的相对贡献将较高的具有低NE值的样品,例如在具有全血中小于约1.0或小于约0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ NE的NE值的患者样品的情况下。

[0280] 在改进方法中,并非计算nCD64i(每个嗜中性白细胞的CD64)以及将那个数值与NE的绝对值进行比较(图5),而是CD64的绝对值用于与NE的绝对值比较。也就是说,方法源于实施例1中所述的工作,但提供对用于在广泛范围的免疫测定中共同使用CD64和NNM作为灵敏诊断的系统和额外策略的额外见地。并非使NNM的量与绝对嗜中性白细胞/粒细胞计数相关联,而是健康受试者中CD64与NNM之间的密切关联用于对于NNM的任何给定水平确定CD64的阈值“健康”水平。

[0281] 图7示出健康受试者($n=30$)的全血中NE和CD64的ELISA结果,并且显示在健康受试者中,全血中CD64的总量与全血中NE的总量密切相关($R^2=0.74$)。这可能反映NE与嗜中性白细胞/粒细胞计数的关联,但出于我们的测定的目的,NE和嗜中性白细胞/粒细胞计数的这个关联不是必要的-重要的是NE浓度本身(或可替代NE的其它嗜中性白细胞数目标志物(NNM))。与我们在图4C中的观察结果一致,但相较于已知技术是新颖的,当NE达到约5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时,CD64的水平达到平稳状态,从而表明在健康受试者中存在当NE水平(并且推测嗜中性白细胞计数也如此)处于较高正常范围或升高超过正常时可限制CD64表达的反馈机制。根据这个图,预测败血症患者将具有在相应患者的样品中存在的CD64相对于NE量的水平升高,并且对于具有平均水平或较高水平的NE的样品,可预期是健康样品的平均值加2个标准偏差的推定CD64截止值(209ng/ml)。

[0282] 图8示出败血症患者(红色标记, $n=11$)以及如图7中所示的健康受试者(蓝色标记)的全血中NE和CD64的ELISA结果。可见实际上9/11败血症患者具有高于平均值加2SD的高度升高水平的CD64。然而,出乎意料的是,也发现6/11败血症患者具有高于健康受试者的平均值加3SD(17.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$)的NE水平,此表明基于NE水平的额外败血症截止值。这个额外NE截止值明确鉴定出恰好低于209ng/ml的CD64截止值的额外样品。

[0283] 图9示出相同结果,但强调根据基于CD64的平均值加2SD和NE的平均值加3SD的截止值对败血症患者样品的四个不同分类。根据这些准则,1名患者呈仅NE阳性,5名患者呈NE与CD64两者均阳性,4名患者呈仅CD64阳性,而1名患者呈NE与CD64两者均阴性,两种标志物

均具有极低值,并且表明所述患者可具有低水平的嗜中性白细胞。这个结果强调相比于使用单独NE或CD64,NE和CD64的组合对于诊断败血症更灵敏,可能与随着NE的超常水平递增,在败血症的情况下CD64的诱导表达可在某种程度上由如在健康受试者中观察的反馈机制限制的新颖观察结果相关。尽管这些结果表明NE和CD64的简单截止值将提供用于诊断在全血中具有正常水平或升高水平的NE以及根据推理具有正常或升高嗜中性白细胞计数的患者的败血症的高度灵敏性方法,但存在具有低嗜中性白细胞计数(嗜中性白细胞减少症)的患有败血症或处于败血症高风险下的许多患者,例如许多新生儿和已经受用于癌症治疗的化学疗法或放射疗法的患者。

[0284] 对于这些嗜中性白细胞减少症患者,可利用健康受试者中NE相对于CD64的密切关联,即使当NE水平较低时。如图10中所示,当对NE相对于CD64的分析限于具有 $\leq 2.5\mu\text{g}/\text{ml}$ 的NE的那些健康受试者时,观察到极其强烈关联($R^2=0.88$),并且观察到相比于健康受试者(蓝色标记),使用图8和图9的NE和CD64截止值未鉴定出的单一败血症患者(红色标记)具有CD64相对于NE的更高水平。这进一步说明于图11中,其中将替代性CD64截止值计算为某一乘数的健康受试者中CD64相对于NE的趋势线。在这个情况下,乘数是趋势线的1.6倍,并且趋势线由方程 $y=5.6953x^2+45.769x$ 描述,其中y是CD64(ng/ml),并且x是NE($\mu\text{g}/\text{ml}$)。将明显的是这个截止值可被外推直至它达到如同图8和图9中的由是平均值加2SD的简单截止值描述的同CD64水平,或如可为使测定的特异性改进所需的更高水平,例如平均值加3SD或更高。

[0285] 在此基础上,NE标志物和CD64标志物的组合可用于使用败血症算法来诊断败血症,当满足一个或多个以下条件时,指示败血症:CD64>健康受试者的平均值加2SD,或NE>健康受试者的平均值加3SD,或CD64>具有低于 $2.5\mu\text{g}/\text{ml}$ 或具有较高量诸如 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ 的NE水平的健康受试者的由趋势线预测的CD64水平的1.6倍。

[0286] 然而,由于观察到CD64截止值也可由某一乘数的健康受试者中NE相对于CD64的多项式趋势线描述而表明一种更简单算法,如图12A中所示,其中所述乘数是1.6,并且趋势线由方程 $y=-0.0137x^4+0.6094x^3-9.857x^2+65.776x$ 描述,其中y是CD64(ng/ml),并且x是NE($\mu\text{g}/\text{ml}$)。在这个实例中,红色阴影化区域界定代表CD64和NE的“健康”(非败血症)水平的值的“门限”,其中NE上部水平代表健康受试者的平均值加3SD。图12B显示将败血症患者叠加在这个模型上,其中11/11(100%)败血症患者得以正确鉴定。

[0287] 通过进一步外推由某一乘数的CD64相对于NE的趋势线获得的截止值来实现一种甚至更简单算法。如图12C中所示,对其中乘数是1.6,并且趋势线由方程 $y=-0.0137x^4+0.6094x^3-9.857x^2+65.776x$ (其中y是CD64(ng/ml),并且x是NE($\mu\text{g}/\text{ml}$))描述的截止值的外推给出与图12B中获得的门限类似的CD64的健康水平相对于NE的健康水平的“门限”。因此,在其中 $\text{CD64}(\text{ng}/\text{ml}) > 1.6 \times (-0.0137x^4+0.6094x^3-9.857x^2+65.776x)$ (其中x是NE($\mu\text{g}/\text{ml}$))的任何受试者的情况下都将指示败血症。将为本领域技术人员显而易见的是这些各种截止值计算的任何组合或修改都可用于使用由全血获得的NE值和CD64值来实现灵敏性和特异性败血症诊断,并且趋势线方程中使用的实际值以及对乘数的选择可使用来自健康受试者的任何适当样品组以及CD64与NE或其它嗜中性白细胞特异性标志物组合,和用于测量这些相应分析物的任何替代性方法以及ELISA来确定。

[0288] 实施例3

[0289] 为更好了解本文所述的测定的效用,使用通过流式细胞计量术来测量嗜中性白细胞上CD64的细胞表面表达的商业Leuko64测定来检查败血症患者和一子组健康受试者。

[0290] Leuko64试剂盒[参见例如Beckman Coulter-参见以Trillium Diagnostics LLC名义申请的美国专利公布号2013/0230867]包含对表面CD64 (FITC缀合) 和表面CD163 (藻红素缀合) 具有特异性的三种单克隆抗体的混合物以及用于仪器校正和人血液白细胞上白细胞CD64和CD163表达的标准化的专有荧光珠粒混悬液。所述试剂盒也含有红细胞裂解溶液浓缩物。这个试剂盒的变化形式是可用的,诸如Accellix CD64盒和读取器 (LeukoDx)。

[0291] 如图13中所示,相比于对于健康对照,Leuko64对于败血症患者显示高度显著更高值,但使用Leuko64试剂盒制造商推荐的截止值1.2,用这个测试仅鉴定出8/11败血症患者,这与文献中显示这个方法具有约70-80%的灵敏性的许多报道一致。类似地,通过ELISA来检测单独总全血CD64显示相比于健康对照,败血症患者的值高度显著更高,但使用是平均值加2SD的截止值 (209ng/ml),用这个测试仅鉴定出9/11败血症患者。总CD64和NE值通过与和可商购获得试剂盒一起提供以及在各测定操作中测试的参照标准 (标准曲线) 比较来测定,接着关于测定中使用的样品稀释度加以调整。

[0292] 个别败血症患者样品接着通过以下方式来更详细检查:将通过Leuko64检测的CD64量 (仅表面CD64) 相对于通过标准流式细胞计量术方法检测的CD64量进行比较,在所述标准流式细胞计量术方法中,将细胞以用于Leuko64的相同方式染色 (仅表面CD64),或在首先使用包含清洁剂的嗜中性白细胞裂解溶液使细胞渗透化以允许检测细胞表面CD64与细胞内CD64两者之后染色。

[0293] 图14示出对于患者SEP009进行的这个分析的结果,所述患者在我们的较早分析中具有最低NE水平。在小图A中,显示来自这个患者的嗜中性白细胞具有CD64的高表面表达水平 (红线-中间峰),这与在Leuko64的情况下相对CD64表达极高 (小图B) 一致,但当也检测细胞内CD64时,每个细胞的CD64水平甚至更高 (在右手侧的蓝线“总”峰)。然而,这个患者的低NE水平 (小图D) 和假定低嗜中性白细胞计数导致总CD64结果低于基于单独CD64的截止值 (小图C),但可使用算法 (图8-图12) 检测。这个结果也表明鉴于这个患者具有极高Leuko64结果,所以对于具有低NE水平的患者,Leuko64方法或其它方法可具有额外效用。

[0294] 图15示出对于患者SEP010进行的相同分析,所述患者具有升高水平的CD64,但恰好低于图9中的由健康受试者的CD64平均值加2SD获得的截止值。在这个患者中,存在CD64的最小表面染色 (小图A,关于表面染色比较红线和同种型对照),这与在Leuko64的情况下相对CD64表达较低 (小图B) 一致,但当也使细胞内CD64染色时,有高水平的CD64被检测到 (小图A蓝线,右手峰)。与这个观察结果一致,根据ELISA,患者SEP010具有适度水平的总CD64,但仍然恰好低于基于平均值加2SD的总CD64截止值 (小图C),而0.7的Leuko64结果远低于用于那个测试的制造商截止值1.2 (小图B)。然而,当检查NE时,观察到患者SEP010具有极其高度升高水平的NE,从而在使用由NE平均值加3SD获得的截止值的情况下,以及也在使用由趋势线方程获得的截止值的情况下提供明确败血症诊断。

[0295] 图16示出对于患者SEP011进行的相同分析,所述患者具有升高水平的CD64与NE两者。在这个患者中,存在细胞内CD64与表面CD64两者的显著表面染色 (小图A,关于表面染色比较红线和同种型对照,关于总染色比较蓝线 (中间峰) 和同种型对照),这与在Leuko64的情况下相对CD64表达较高 (小图B) 一致,远高于制造商截止值。根据ELISA,患者SEP011具有

高度升高水平的总CD64(小图C),并且也具有高度升高水平的NE(小图D),从而在使用由NE平均值加3SD获得的截止值和由CD64平均值加2SD获得的截止值的情况下,以及也在使用由趋势线方程获得的截止值的情况下提供明确败血症诊断。

[0296] 图13、图14、图15和图16中的结果显示本发明方法的另一优势是使用ELISA或其它方法和溶解化全血或渗透化完整细胞来检测总CD64,并非如使用Leuko64或其它方法所常规进行的仅检测细胞表面CD64。

[0297] 对这个新颖观察结果的可能生物学解释是在任何给定时间在嗜中性白细胞的表面上仅存在可变比例的CD64。这示意性说明于图17和图18中。在根据van der Poel 2011修改的图17中,在健康个体中,在细胞表面上表达低水平的CD64($Fc\gamma R1$),并且这些CD64由不导致细胞信号传导或抗原复合物内化的单体IgG饱和(图17A)。在由干扰素 γ 或与细菌性感染或败血症相关的其它刺激物对嗜中性白细胞进行初始刺激后,额外CD64被合成,并且易位至嗜中性白细胞的表面并与膜微结构域缔合,从而共同允许达成呈免疫复合物形式的多聚Ig的结合,此导致细胞信号传导(图17B)。

[0298] 然而,CD64的另一功能是使所述免疫复合物中的抗原内化以允许达成抗原加工和递呈。如图18中所示,这可产生具有不同水平的表面CD64的活化嗜中性白细胞,尽管它们具有相同升高水平的总CD64。在左侧,示意性显示具有在表面上表达的低水平的CD64的“健康”嗜中性白细胞。这些细胞也可含有少量预先形成的细胞内CD64。在败血症的情况下,在右侧显示“活化”嗜中性白细胞,各自具有相较于健康嗜中性白细胞得以显著增加的同等大量CD64,但分布在表面上(类似于患者样品SEP09,图14),或均匀分布在表面与细胞内之间(类似于患者样品SEP011,图16),或主要分布于细胞内区室(类似于患者样品SEP010,图15)。因此,允许检测细胞表面CD64与细胞内CD64两者的任何方法都将使得对败血症的诊断改进。

[0299] 也应注意本发明方法可用于类似地检测已从细胞表面脱落进入血浆部分中的可溶性CD64,以及已从活化嗜中性白细胞(有时称为嗜中性白细胞细胞外诱捕网或NET)释放的NE,此可为我们的全血CD64和NE分析方法的另一优势。在已知领域中,已测量血清或血浆部分中而非将并有完整细胞与处于各种活化和脱粒阶段的细胞两者的全血部分中的可溶性NE和CD64。

[0300] 因此,本公开提供嗜中性白细胞的渗透化/裂解/固定用以允许达成总CD64染色以使用于检测作为败血症生物标志物的CD64的流式细胞计量术和其它方法的灵敏性改进的用途。

[0301] 本领域技术人员应了解可在不脱离本公开的广泛一般性范围的情况下对上述实施方案进行众多变化和/或修改。因此,本发明实施方案应在所有方面都被视为具有说明性而非限制性。

[0302] 参考文献

[0303] 1. Jawad, I., Lukšić, I. & Rafnsson, S. B. Assessing available information on the burden of sepsis: global estimates of incidence, prevalence and mortality, *J. Glob. Health* 2, 010404 (2012).

[0304] 2. Mancini, N. et al. The era of molecular and other non-culture-based methods in diagnosis of sepsis. *Clin. Microbiol. Rev.* 23, 235-51 (2010).

- [0305] 3.Wagner.T.A.et al.Emerging biomarkers for the diagnosis of severe neonatal infections applicable to low resource settings.J.Glob.Health 1,210-23 (2011) .
- [0306] 4.Masuda,M.&Roos,D.Association of all three types of Fc gamma R(CD64, CD32,and CD16) with a gamma-chain homodimer in cultured human monocytes.J.Immunol.151,7188-95(1993) .
- [0307] 5.Hoffmann,J.J.M.L.Neutrophil CD64:a diagnostic marker for infection and sepsis.Clin.Chem.Lab.Med.47,903-16(2009) .
- [0308] 6.van Vugt,M.J.et al.The FcgammaR1a(CD64) ligand binding chain triggers major histocompatibility complex class II antigen presentation independently of its associated FcR gamma-chain.Blood 94,808-17(1999) .
- [0309] 7.Davis,B.H.,Olsen,S.H.,Ahmad,E.&Bigelow,N.C.Neutrophil CD64 is an improved indicator of infection or sepsis in emergency department patients, Arch,Pathol,Lab.Med.130,654-61(2006) .
- [0310] 8.Cid,J.,Aguinaco,R.,Sánchez,R.,García-Pardo,G.&Llorente,A.Neutrophil CD64 expression as marker of bacterial infection:a systematic review and meta-analysis.J.Infect.60,313-9(2010) .
- [0311] 9.Li,S.et al,Neutrophil CD64 expression as a biomarker in the early diagnosis of bacterial infection:a meta-analysis.Int.J.Infect.Dis.17,e12-23 (2013) .
- [0312] 10.Du,J,et al.Diagnostic utility of neutrophil CD64 as a marker for early-onset sepsis in preterm neonates.PLoS One 9,e102647(2014) ,
- [0313] 11.Aikaterini,Dimoula;Olivier Pradier;Zaina,Kassengera;Dyanne, Dalcomune;Turkan,Hulya;Vincent,J.-L.Serial Determinations of Neutrophil CD64 Expression for the Diagnosis and Monitoring of Sepsis in Critically III Patients.CID(2014) .cid.oxfordjournals.org/content/58/6/820.full.
- [0314] 12.Rundstrom,G et al.Lateral Flow Immunoassay Using Europium(III) Chelate Microparticles and Time-Resolved Fluorescence for Eosinophils and Neutrophils in Whole Blood.Clinical Chemistry 53,342-348(2007) .
- [0315] 13.Singer,M.et al.The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock(Sepsis-3) .JAMA 315,801(2016) .
- [0316] 14.Ausubel et al.,Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley& Sons Inc,Chapters 10 and 16,1994.
- [0317] 15.Ausubel et al.,Current Protocols in Molecular Biology,Supplement 47,John Wiley&Sons,New York,1999.
- [0318] 16.Rose et al.,A Laboratory Course Manual,Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Bate,C.A.W.and Kwiatkowski,D. (1994) Infection and Immunity 62:5261-5266.
- [0319] 17.Bate,C.A.W.,Taverne,J.,Kwiatkowski,D.,and Playfair,J.H.L. (1993)

Immunology 79:138-145.

[0320] 18. Bate, C.A.W., Taverne, J., Bootsma, H.J., Mason, R.C.S.H., Skalko, N., Gregoriadis, G., and Playfair, J.H.L. (1992b) Immunology 76:35-41.

[0321] 18. Hassan et.al. A microfluidic biochip for complete blood cell counts at the point of care. Technology 3, 201-213 (2015). 19.

[0322] 19. van der Poel, J. Immunol. 186 (5):2699-704, 2011.

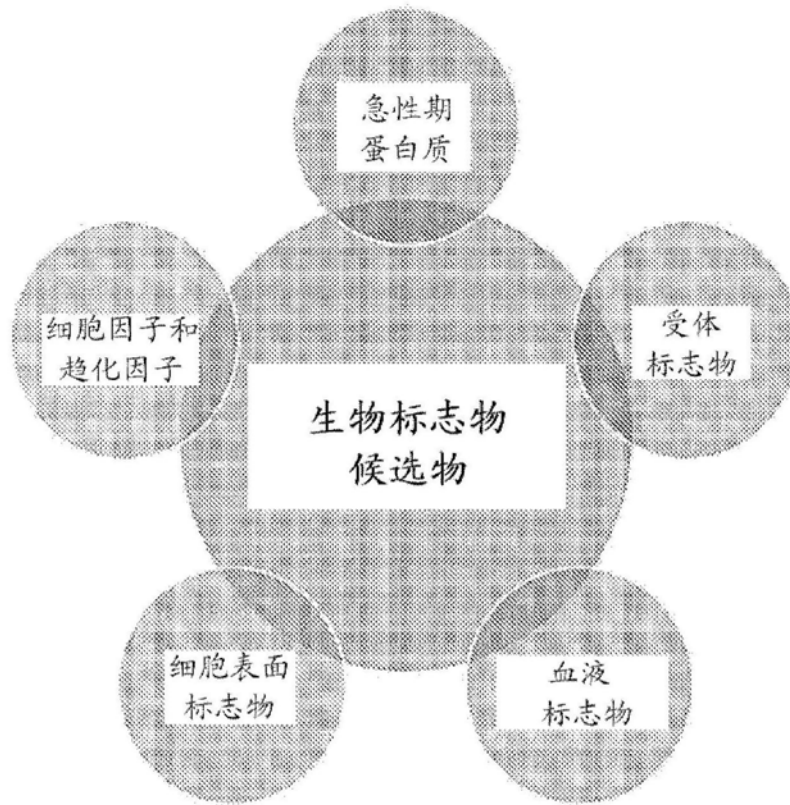


图1. 在文献中评估的候选败血症生物标志物。

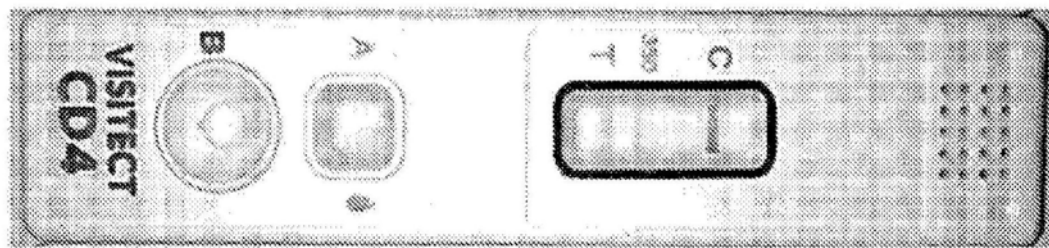
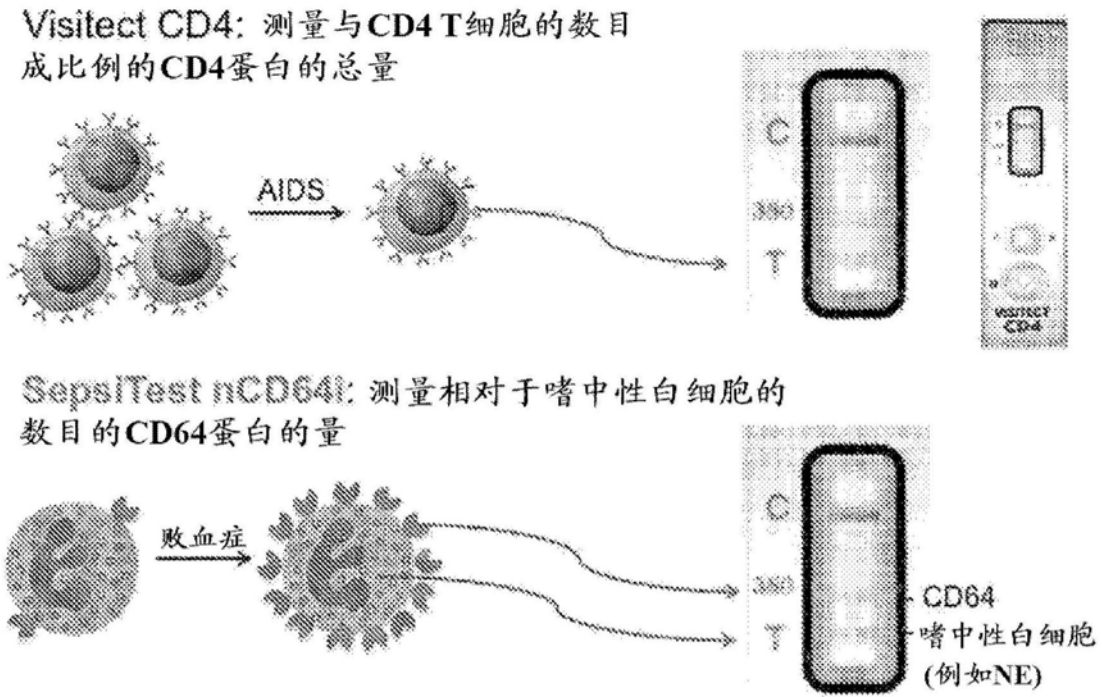


图2. 由伯内特研究院的一些本发明者开发的Visitect CD4测试。



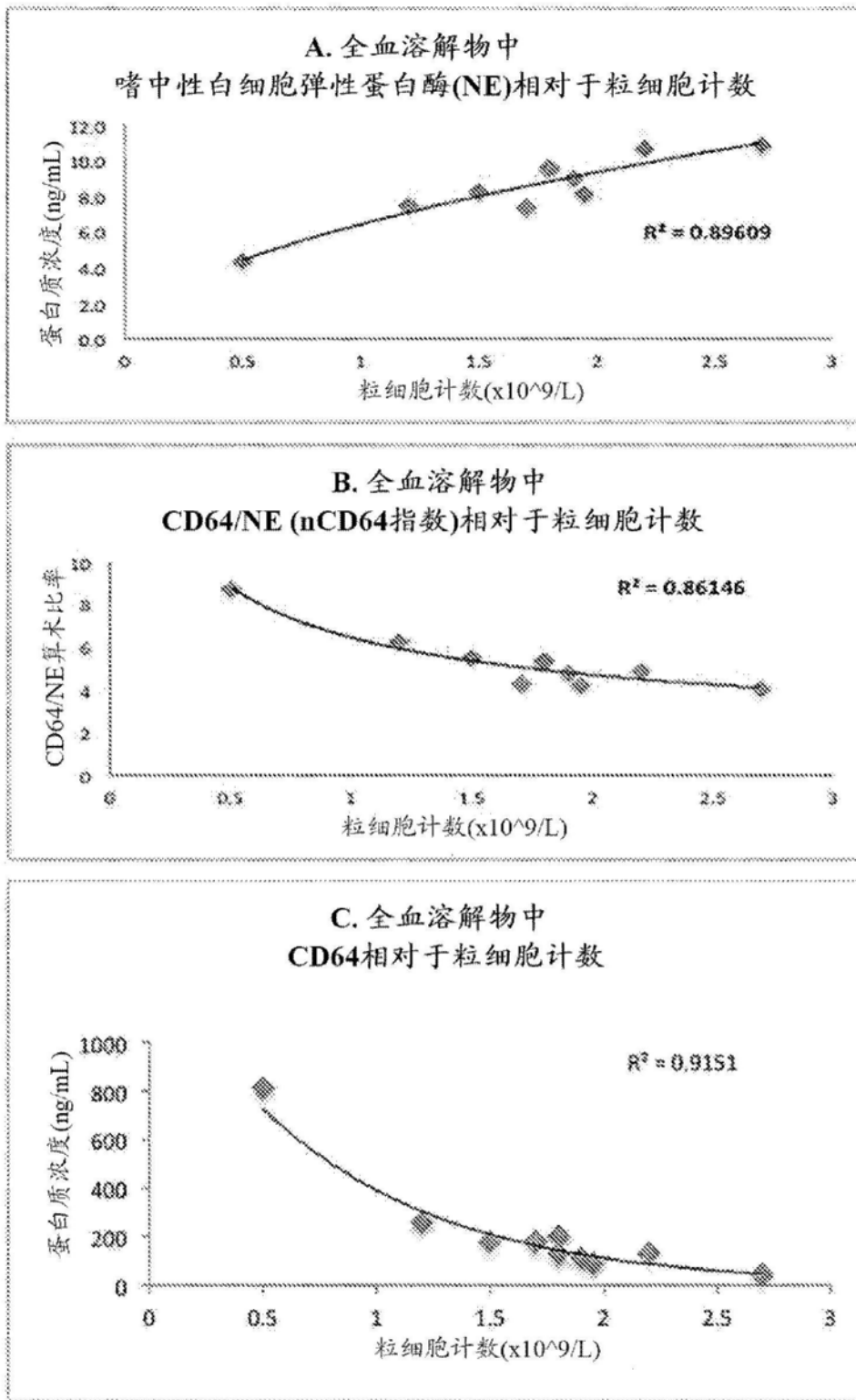


图4.嗜中性白细胞弹性蛋白酶、CD64和嗜中性白细胞计数

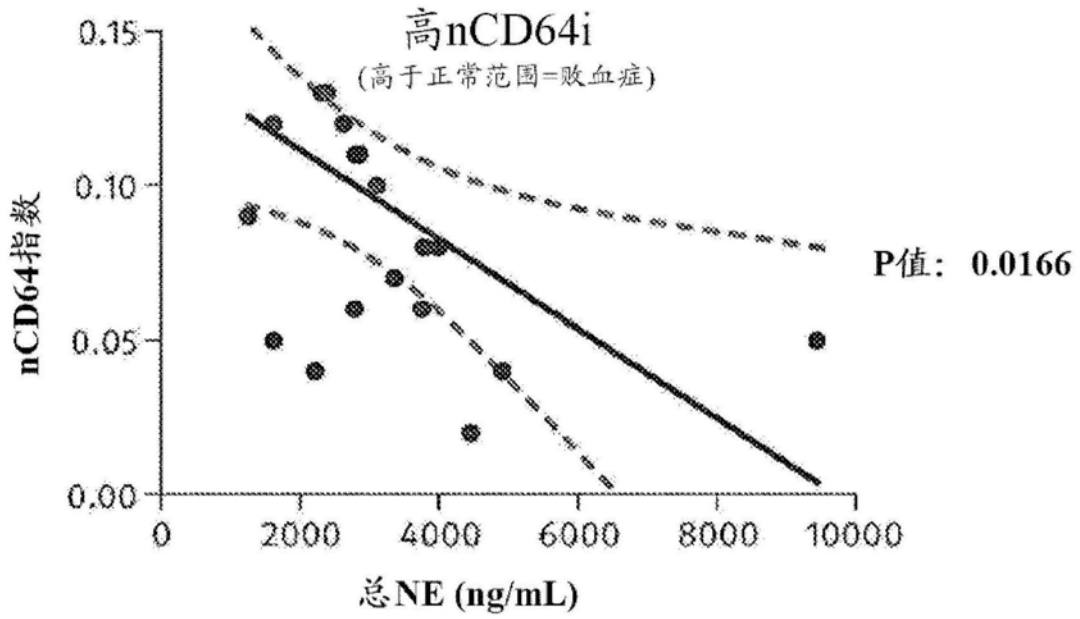


图5. 使用CD64值和NE值对nCD64指数的潜在诊断截止值的估计。

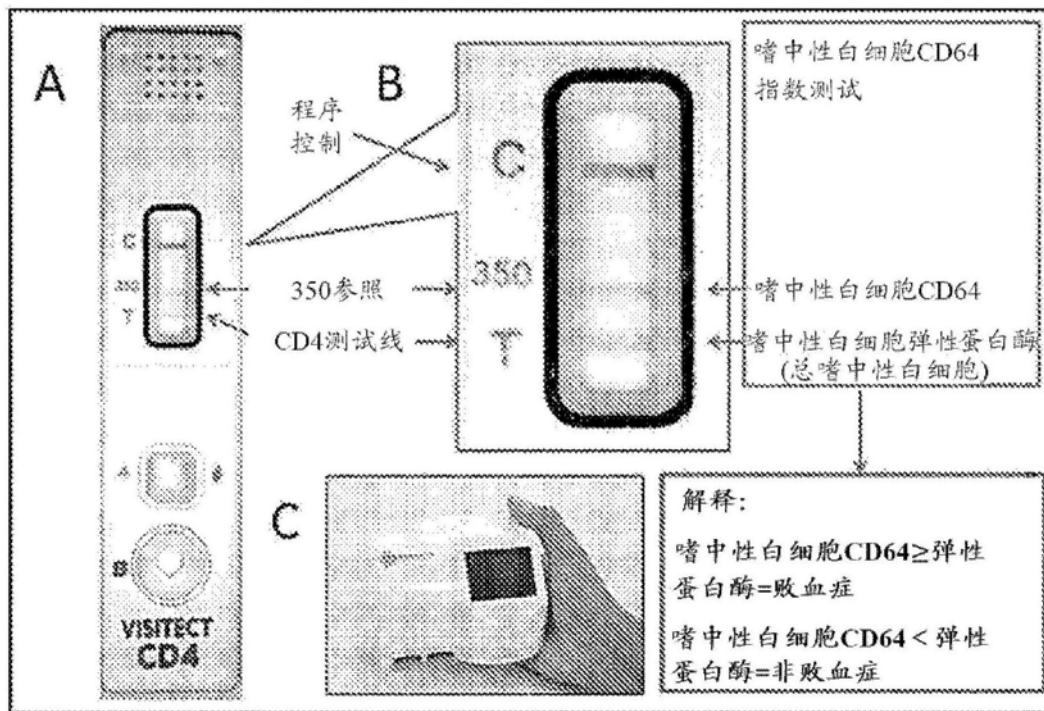


图6. 测量nCD64指数的侧流免疫色谱POC败血症测试的可能形式。

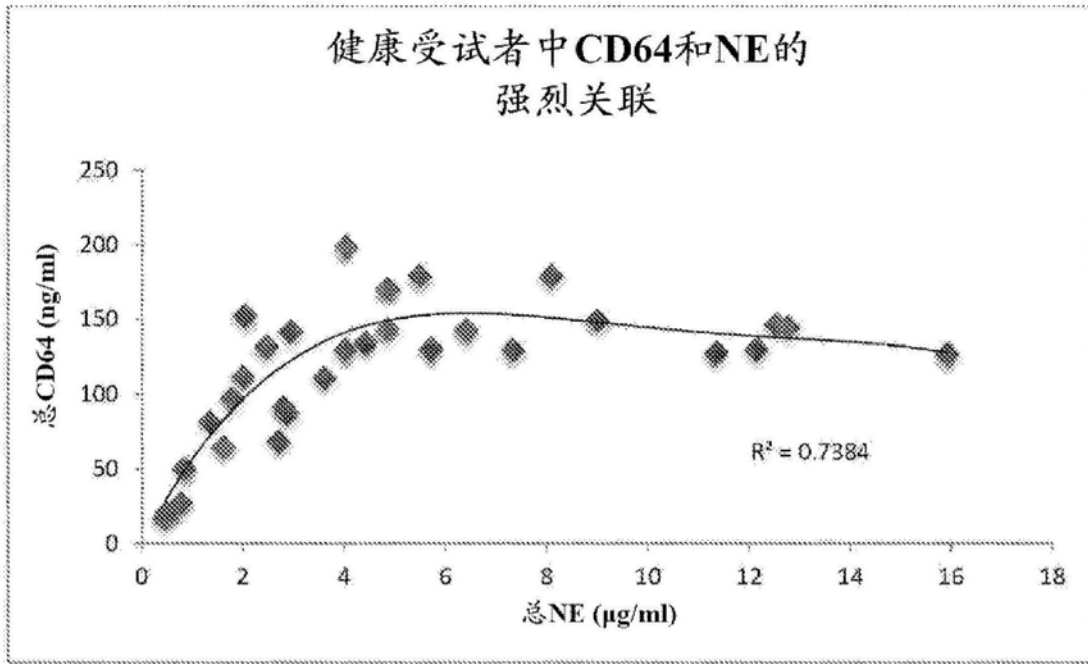


图7

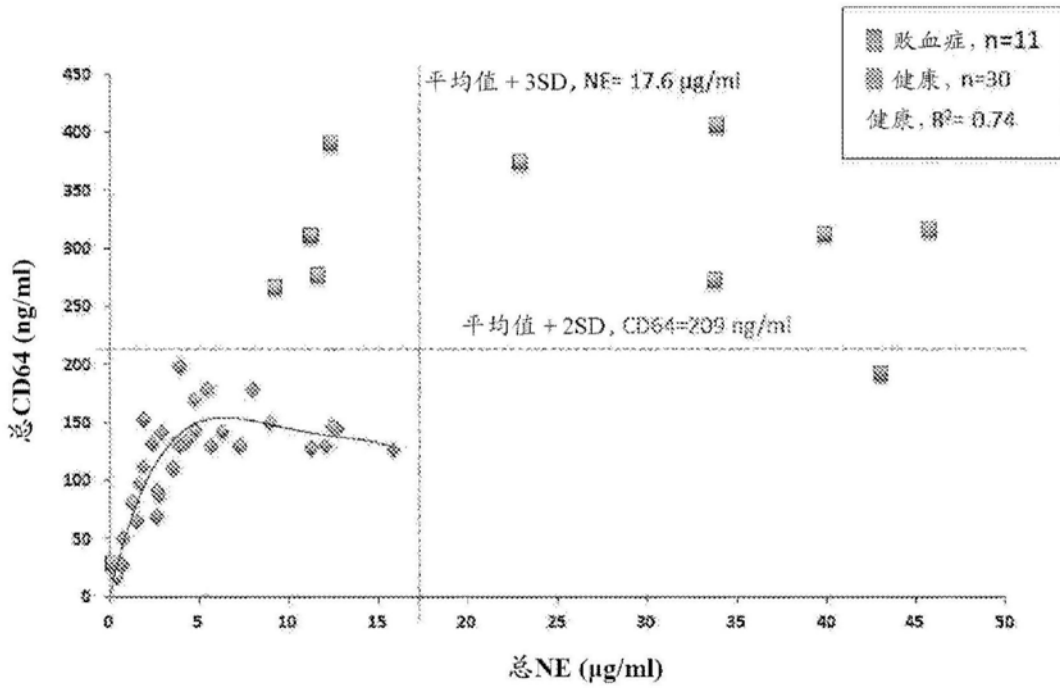


图8

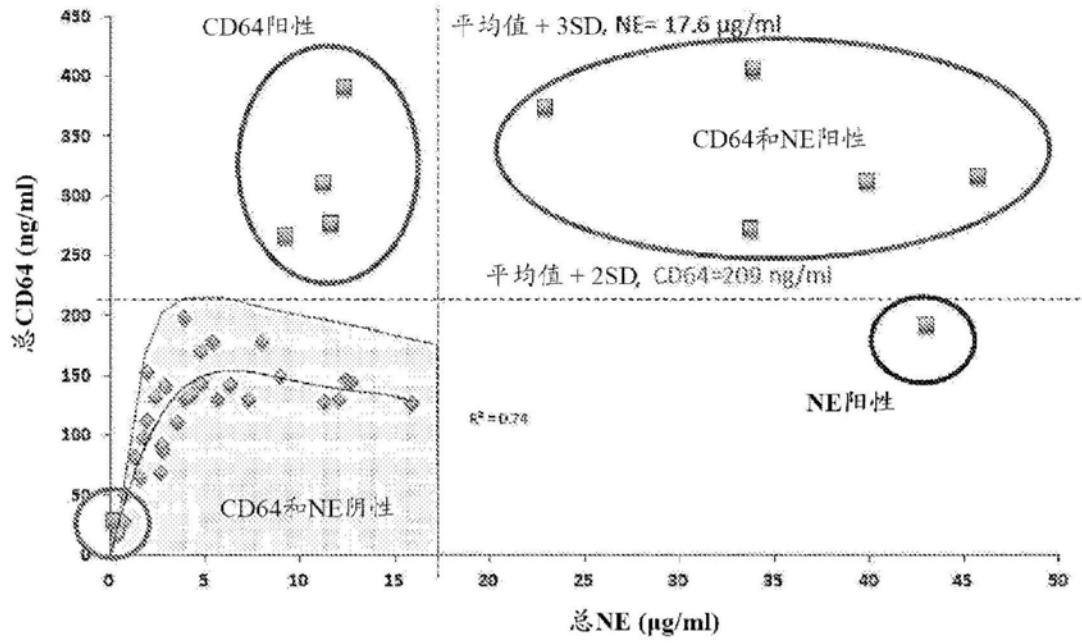


图9

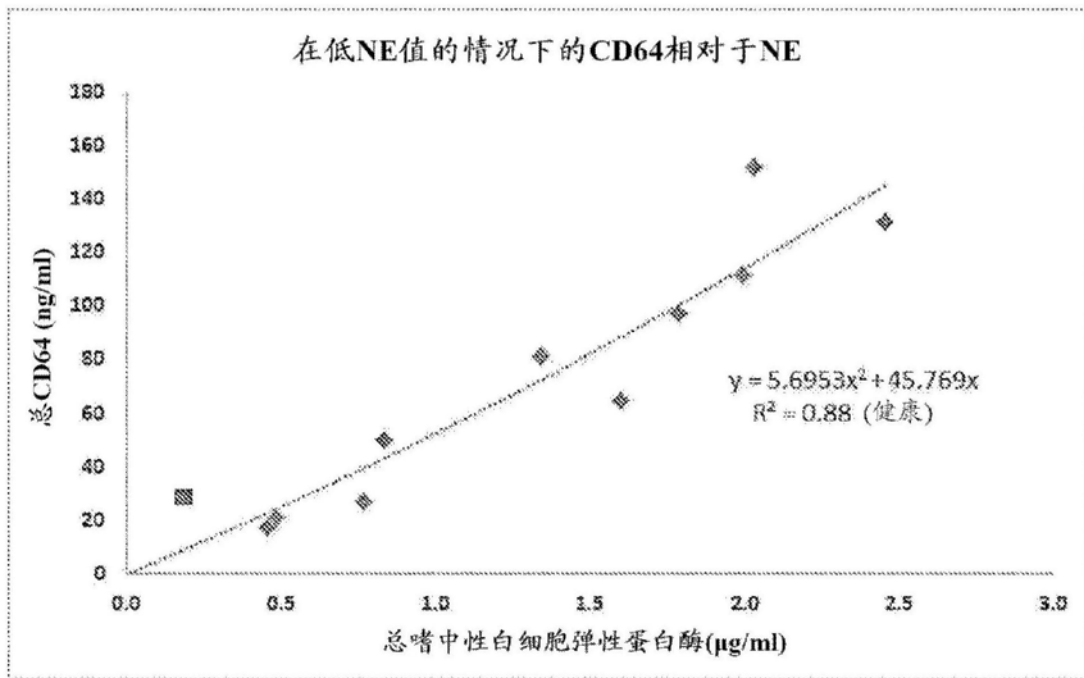


图10

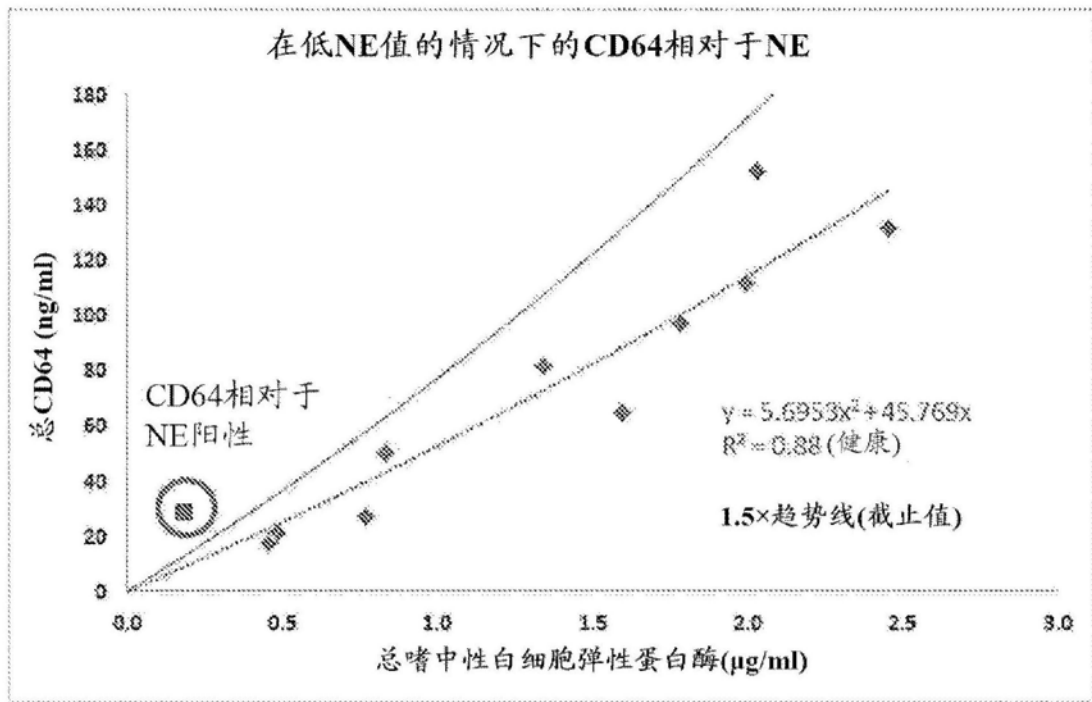


图11

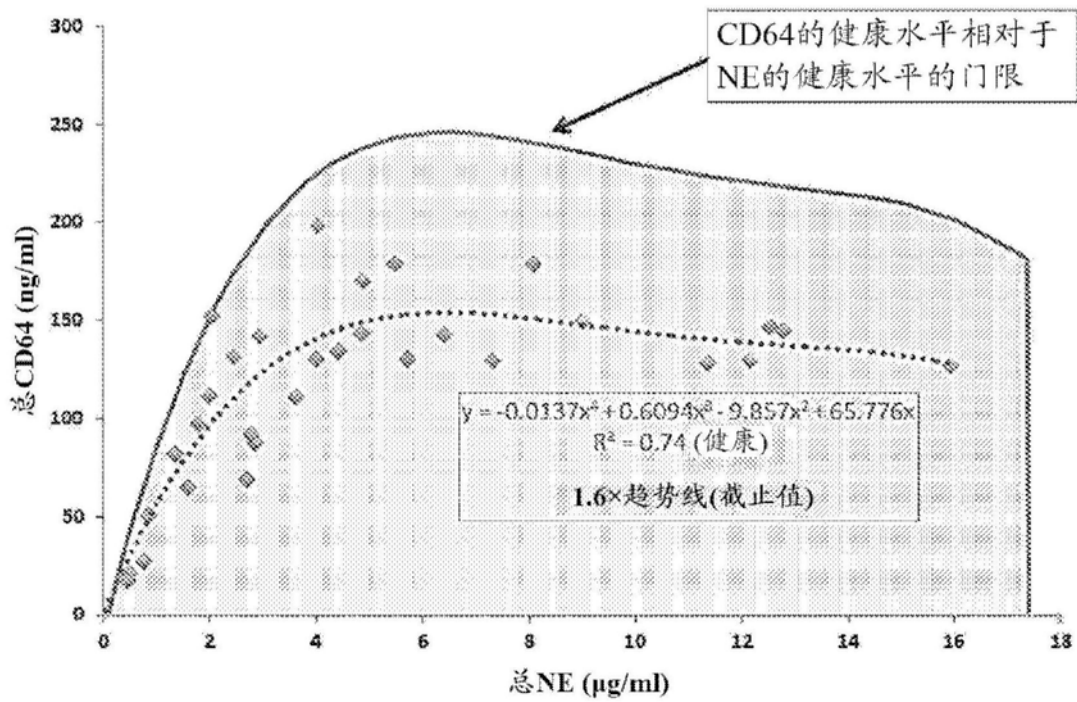


图12A

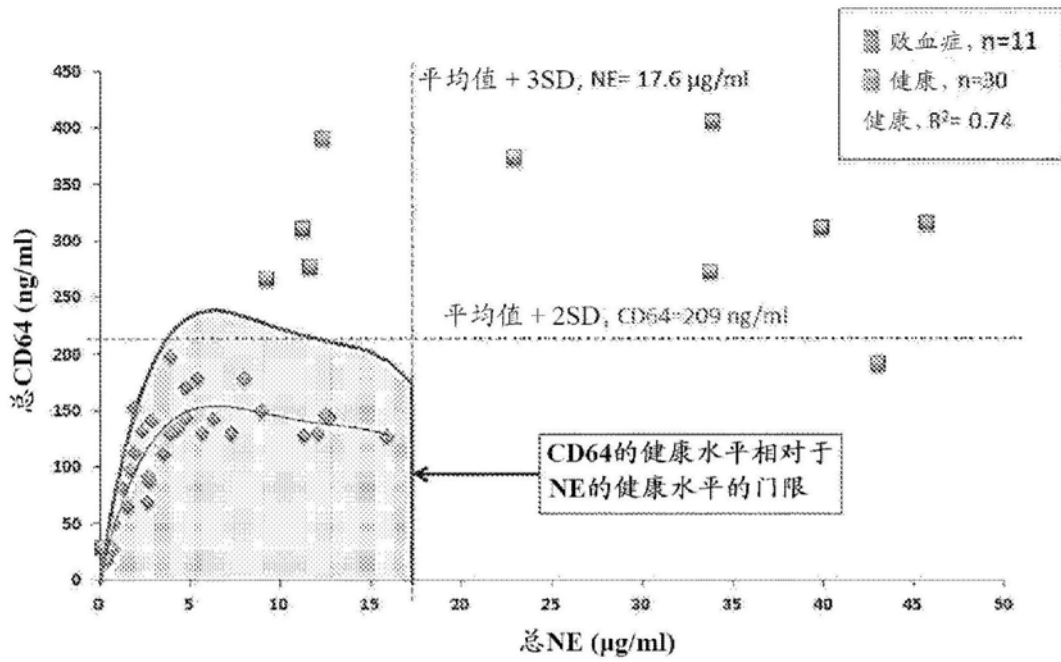


图12B

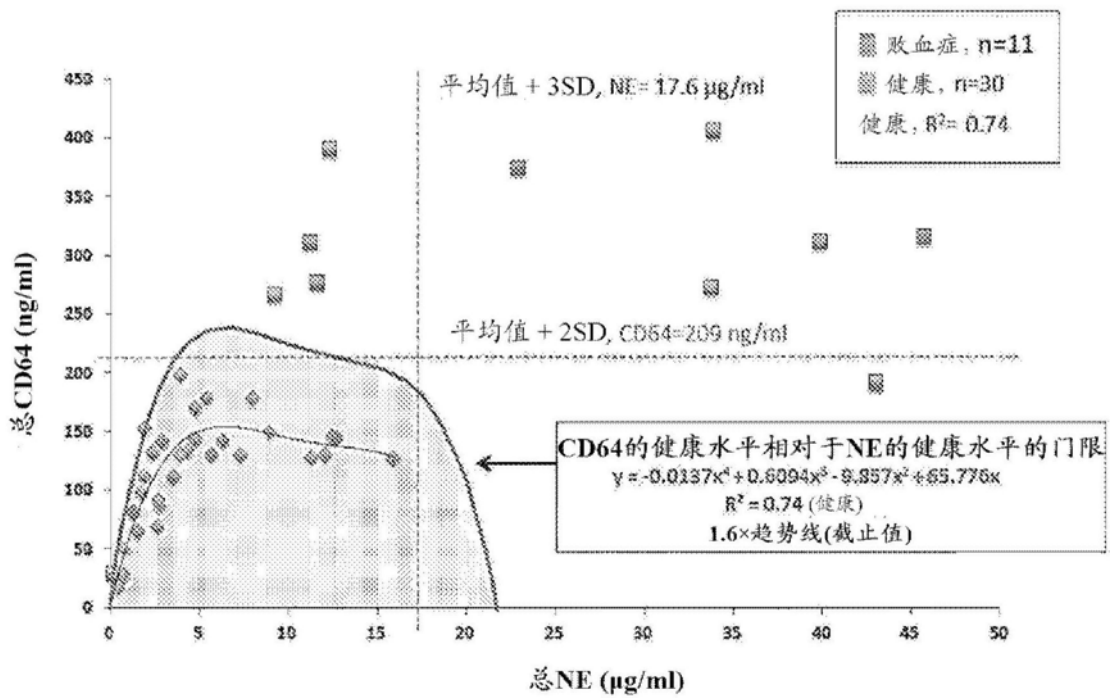


图12C

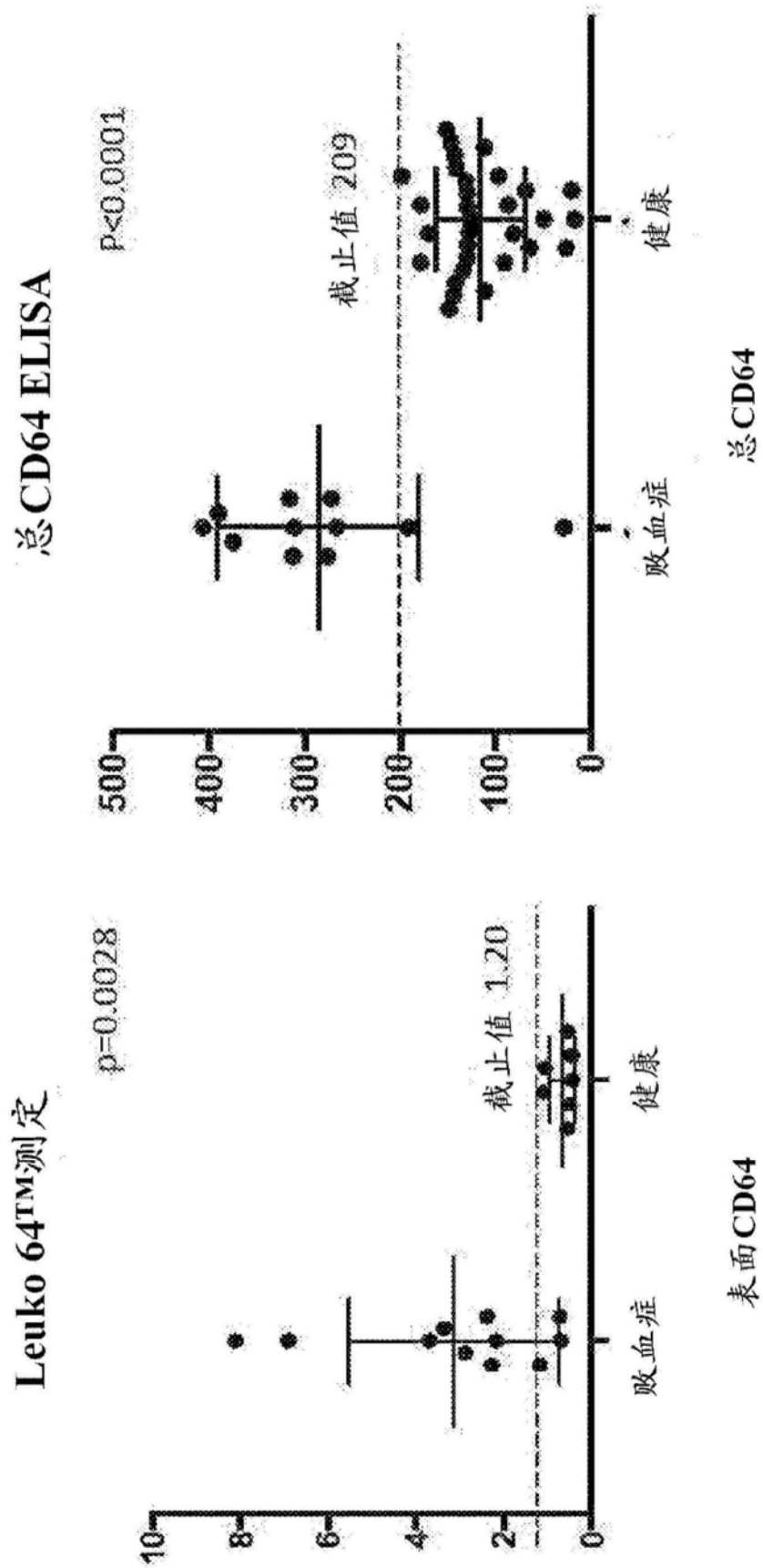


图13

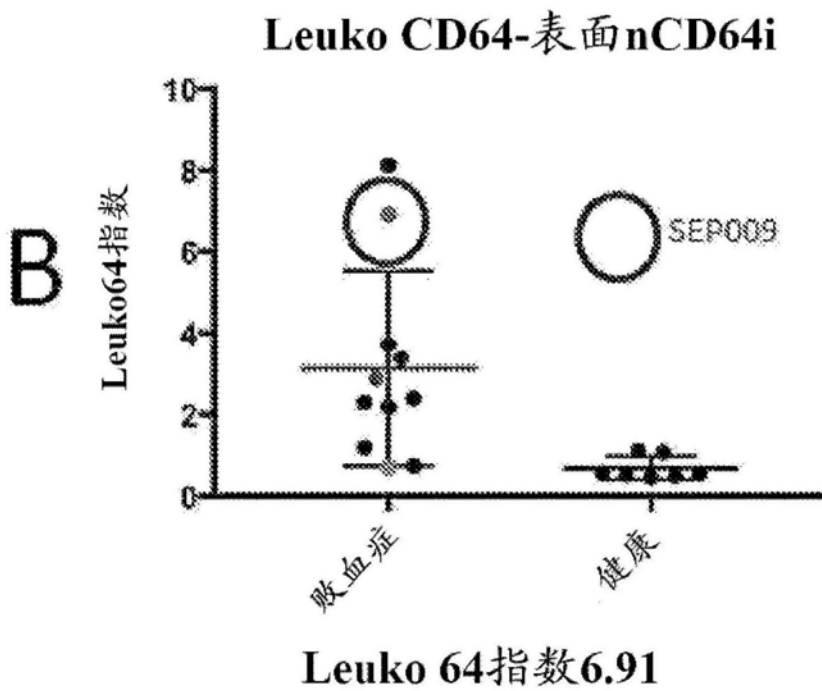
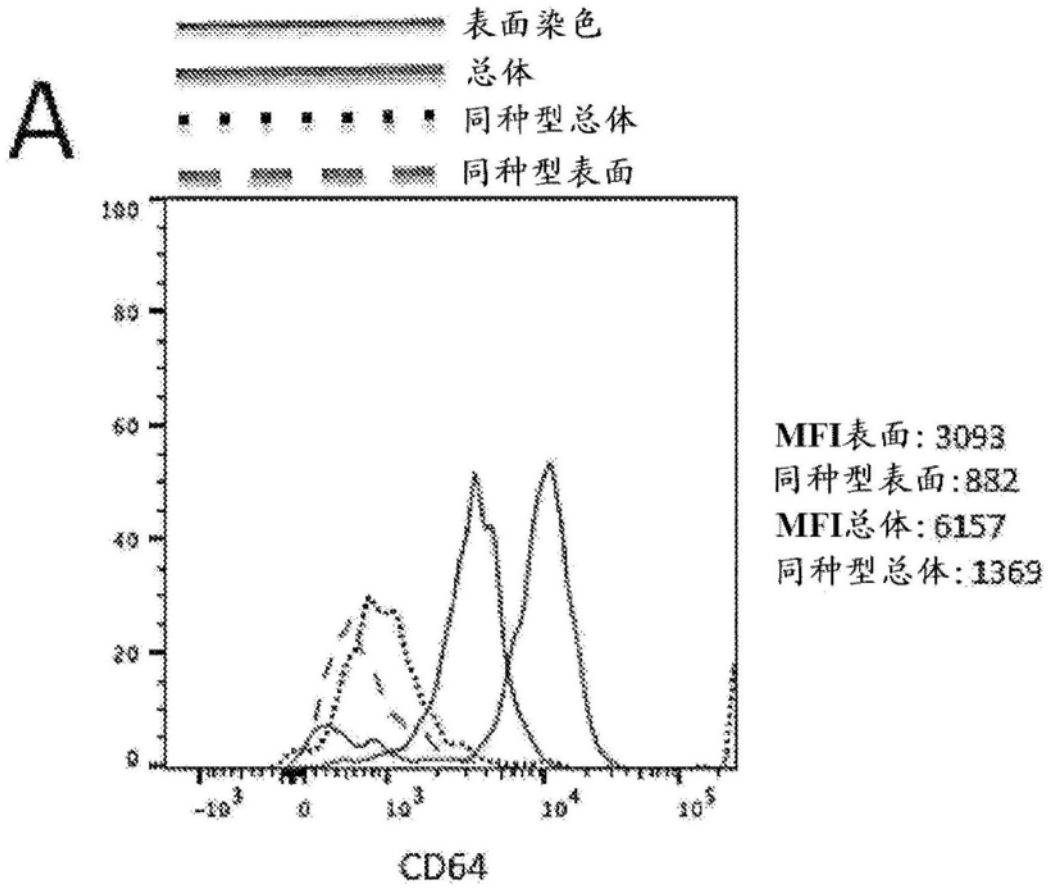


图14

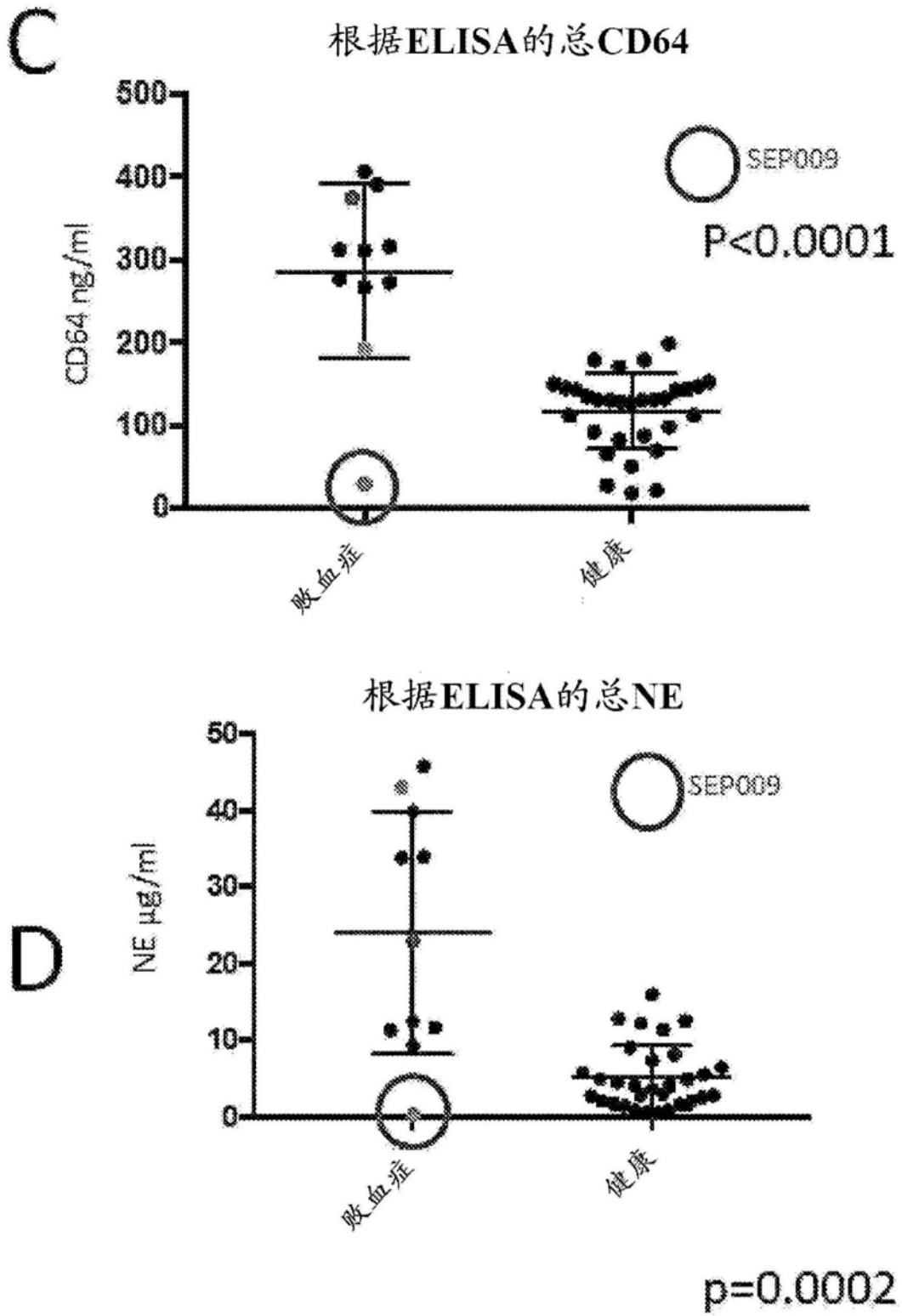


图14(续)

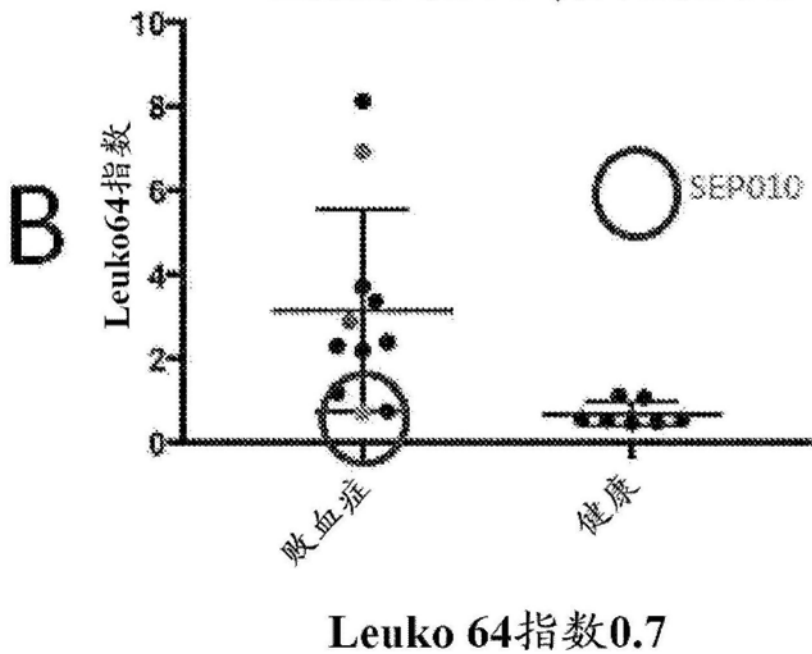
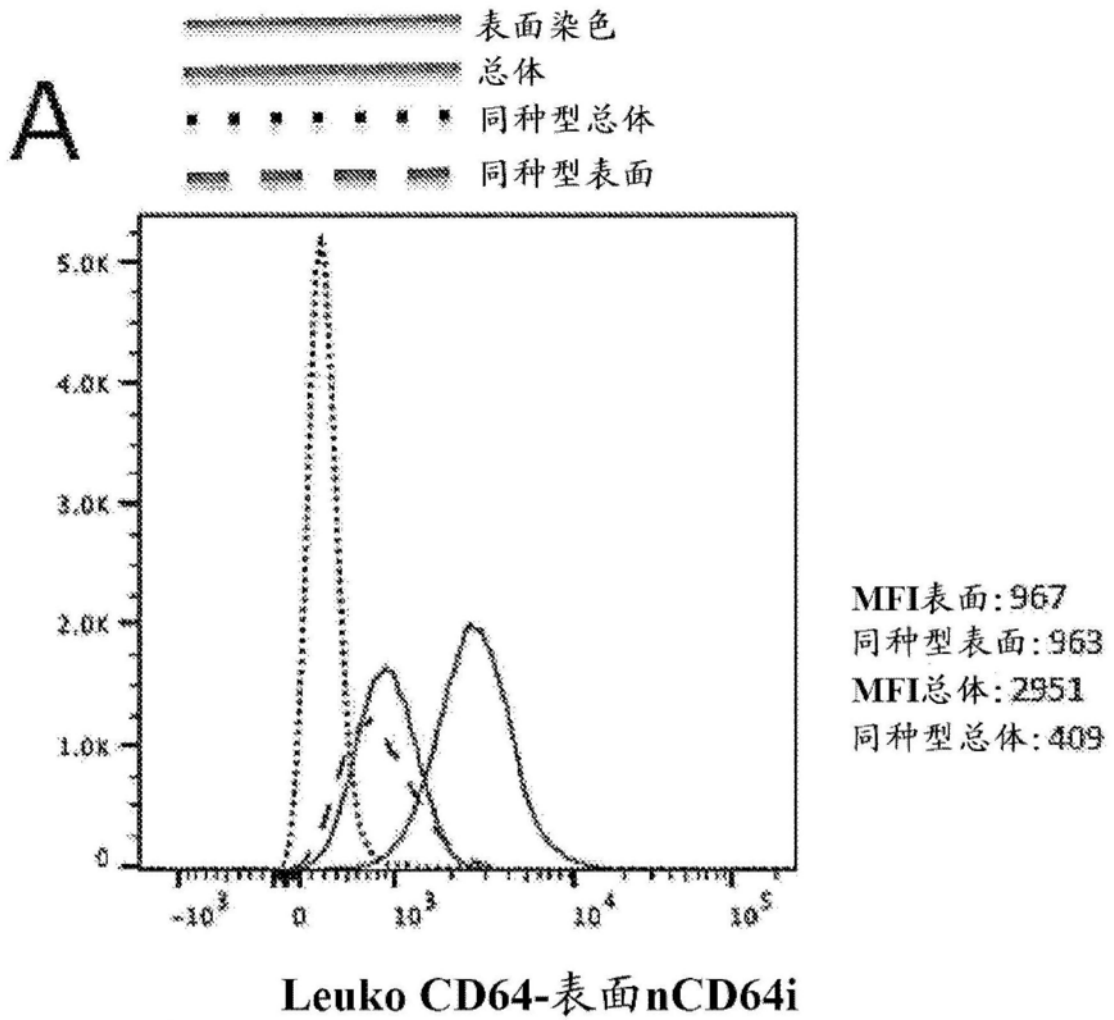


图15

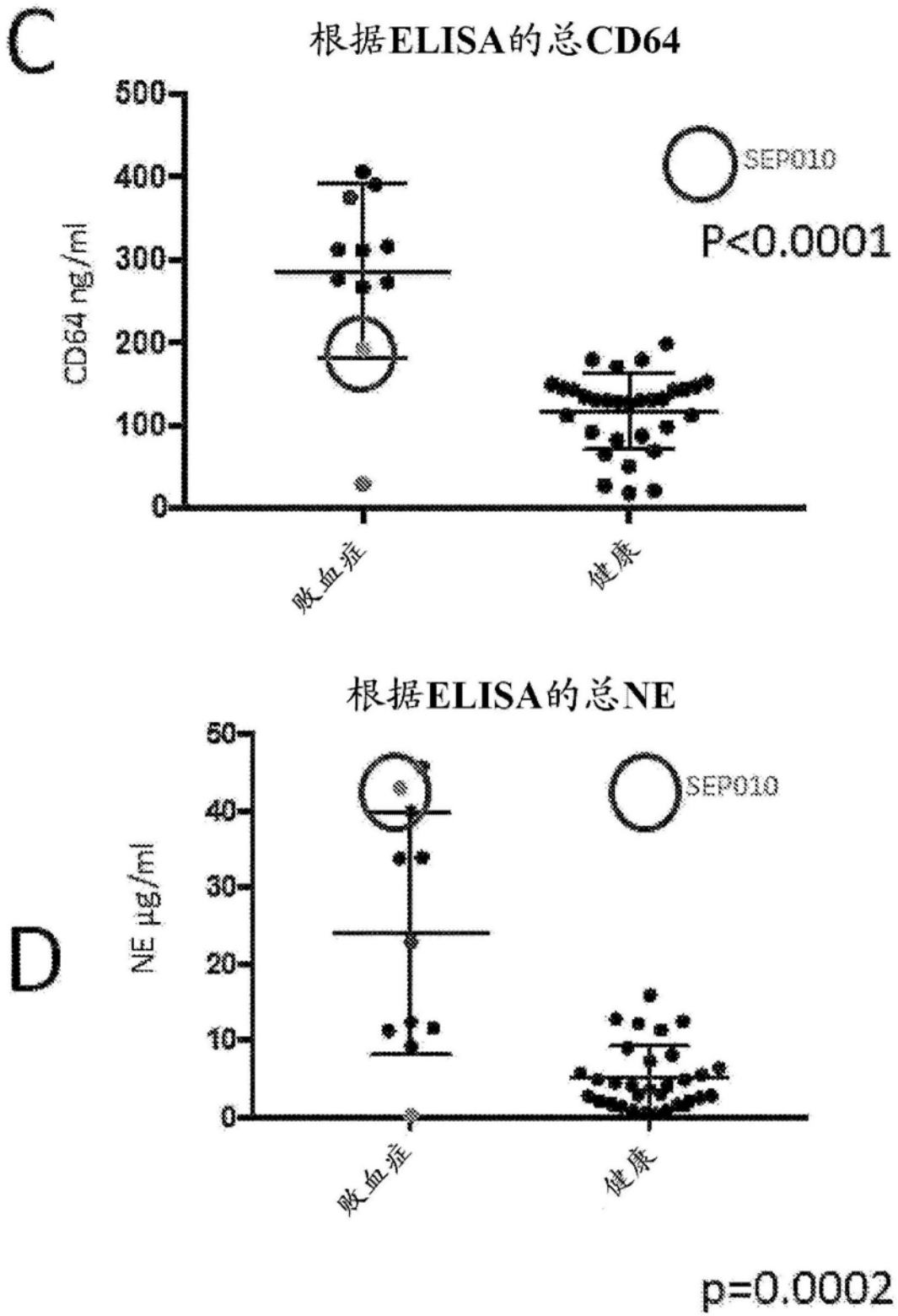


图15(续)

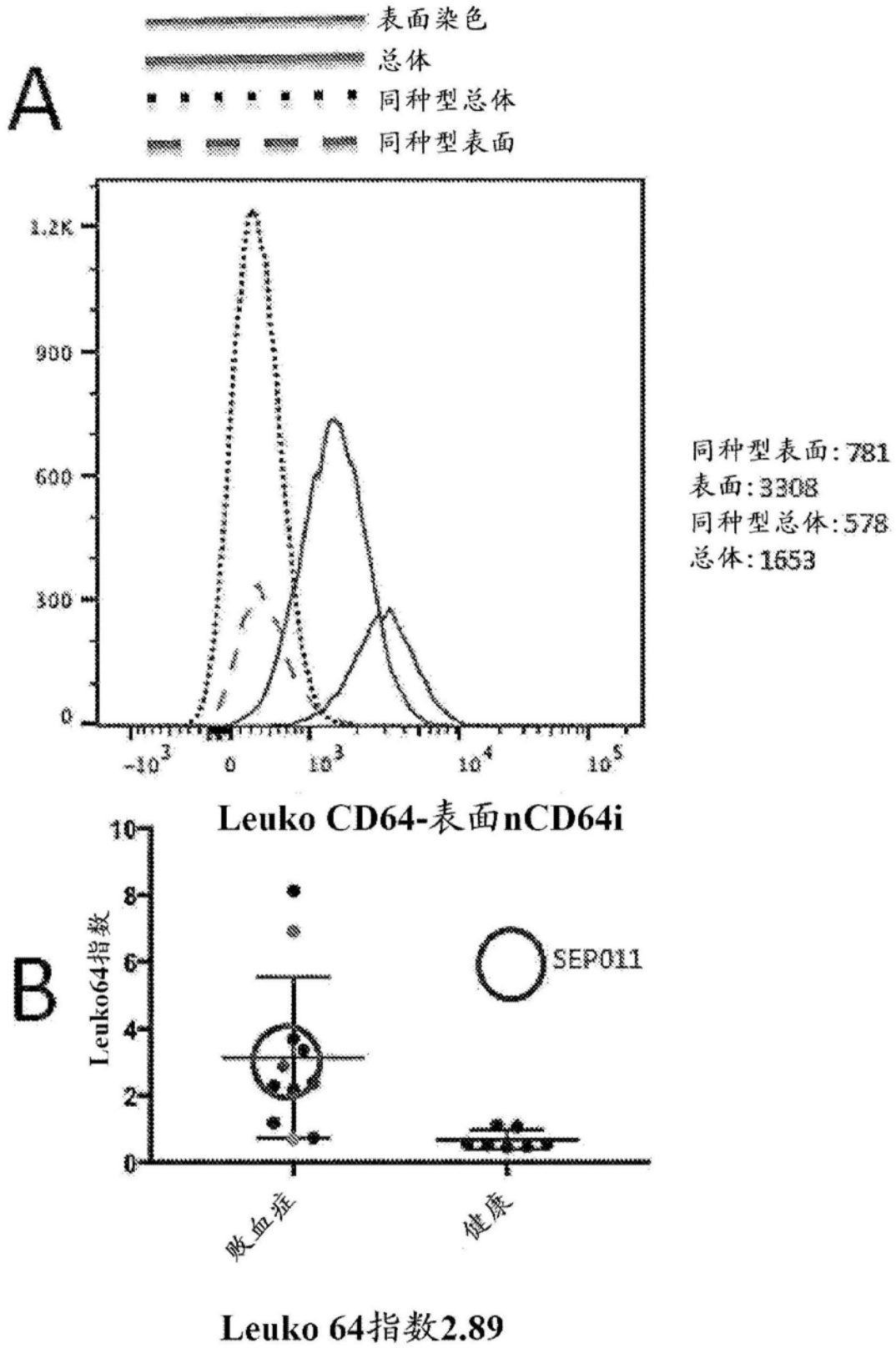


图16

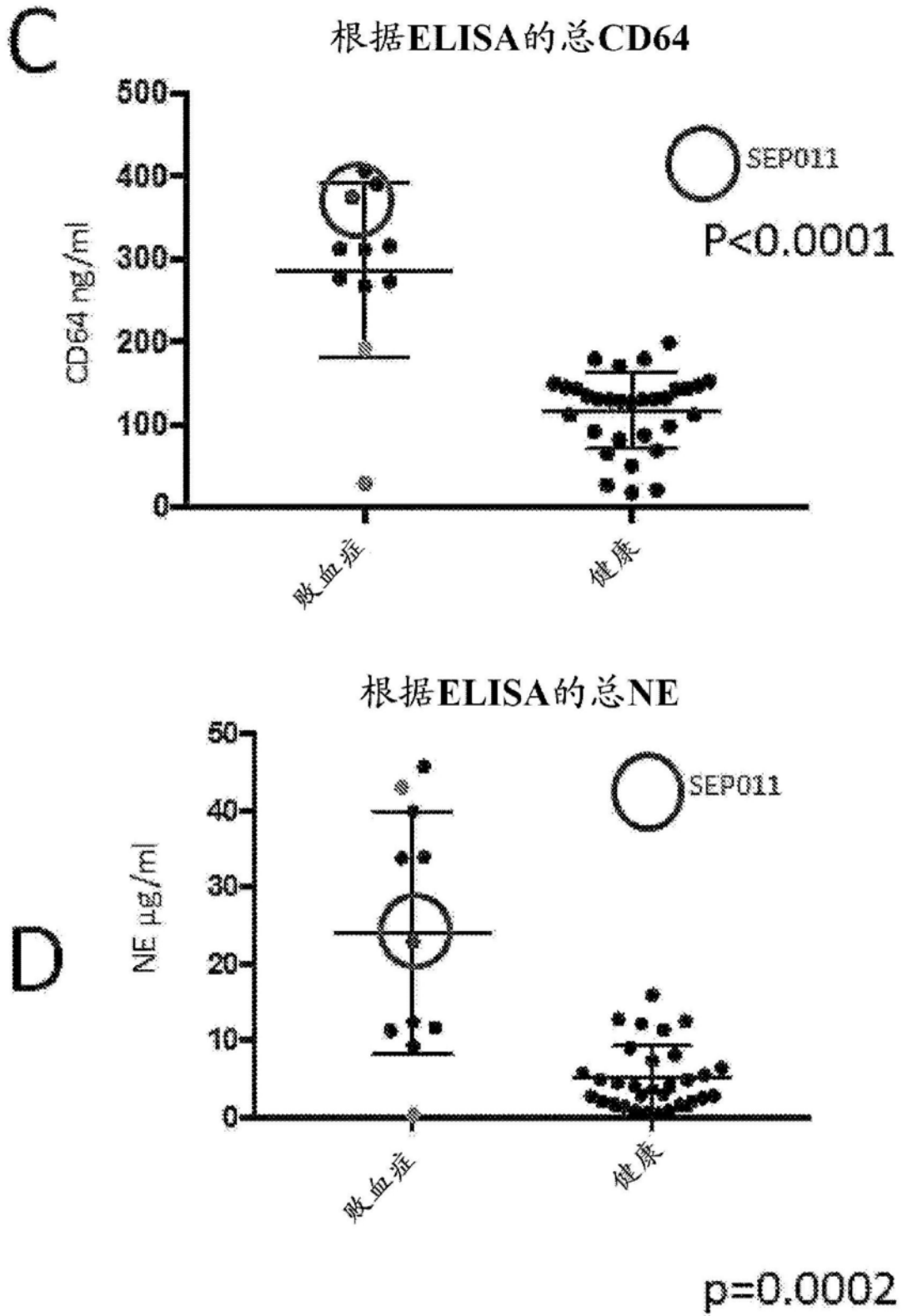


图16(续)

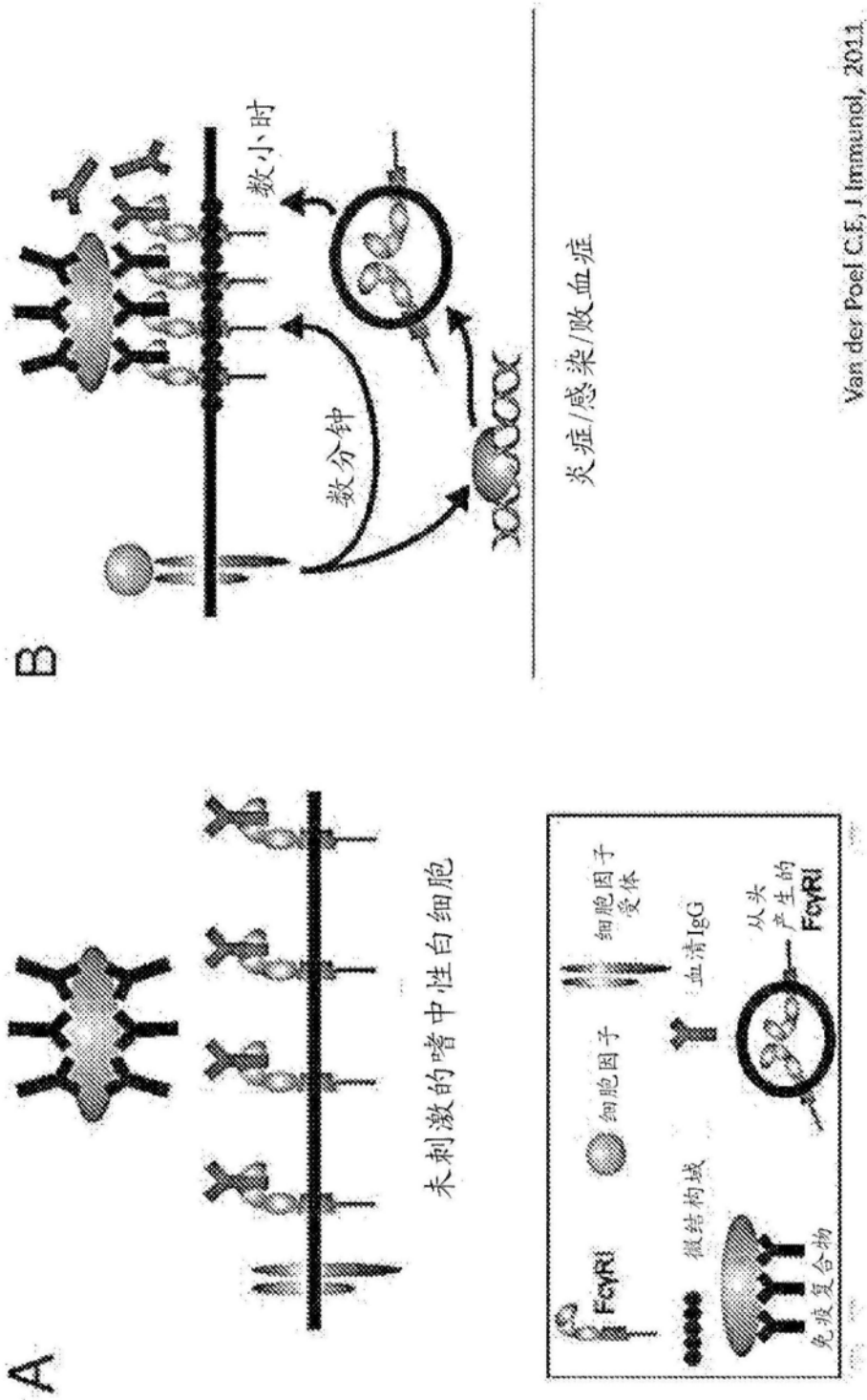


图17

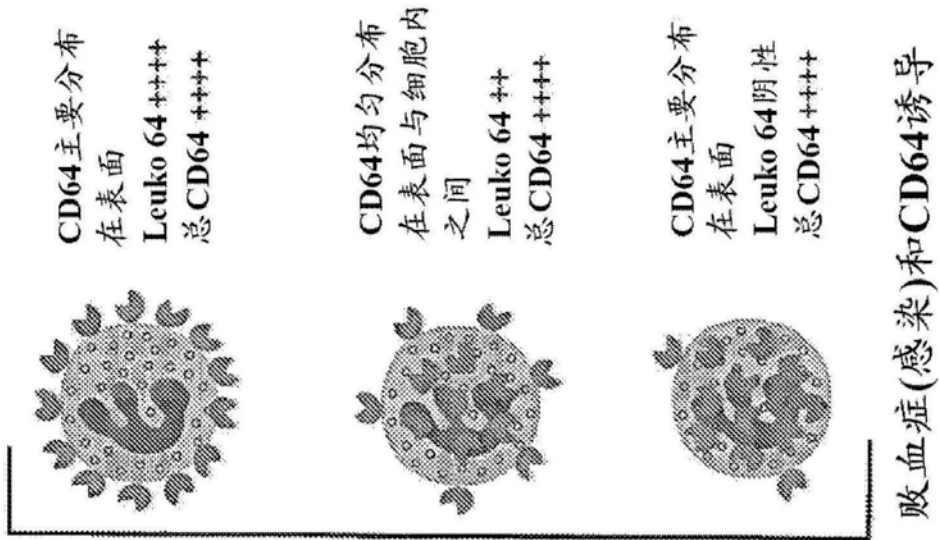


图18

专利名称(译)	估计细胞群体		
公开(公告)号	CN109964130A	公开(公告)日	2019-07-02
申请号	CN201780055740.7	申请日	2017-07-28
[标]申请(专利权)人(译)	麥克法蘭博尼特醫學健康研究公司		
申请(专利权)人(译)	麦克法兰布奈特医疗研究与公共健康研究所有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	麦克法兰布奈特医疗研究与公共健康研究所有限公司		
[标]发明人	大卫安德森		
发明人	大卫·安德森 里亚·帕尔乔杜里 苏珊娜·克罗 克洛维斯·帕默尔		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/56972 G01N2333/70535 G01N2800/26		
代理人(译)	郑斌		
优先权	2016902981 2016-07-28 AU		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种用于帮助诊断患者/受试者的败血症或重度感染的免疫测定，所述测定包括以下步骤：(i)任选地，使来自所述患者的包含嗜中性白细胞的测试样品与使嗜中性白细胞渗透化或溶解的试剂接触；(ii)与(i)同时或依序，使所述样品与特异性结合所述样品中的CD64并形成CD64-结合剂复合物a的结合剂接触；(iii)与(i)和/或(ii)同时或依序，使所述样品与特异性结合所述样品中的嗜中性白细胞数目标志物(NNM)并形成嗜中性白细胞标志物-结合剂复合物b的第二结合剂接触；(iv)采用复合物a和复合物b的量来确定所述样品中CD46的相对水平和NNM的相对水平。

