



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112352159 A

(43) 申请公布日 2021.02.09

(21) 申请号 201980040570.4

(22) 申请日 2019.04.18

(30) 优先权数据

2018901305 2018.04.19 AU

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2020.12.16

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/AU2019/050354 2019.04.18

(87) PCT国际申请的公布数据

W02019/200438 EN 2019.10.24

(71) 申请人 思迪奇细胞私人有限公司

地址 澳大利亚昆士兰

(72) 发明人 程锵 李安琪 K·I·里奥斯

E·瓦尔加斯

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 陈迎春 黄革生

(51) Int.Cl.

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/49 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

C12M 1/34 (2006.01)

C12M 3/00 (2006.01)

权利要求书4页 说明书44页 附图42页

(54) 发明名称

传染病中的白细胞募集情况

(57) 摘要

本公开涉及一些测定,包括但不限于于白细胞粘附功能测定(LAFA),以及进行所述测定时所涉及的设备和/或方法。本公开还涉及所公开实施例在诊断、分析和/或预后应用中的使用,特别是异常宿主免疫应答相关疾病的诊断、分析和/或预后应用。

1. 一种用于区分受试者感染性和非感染性炎症免疫反应的方法,所述方法包括:
对受试者的血液样本进行至少一次白细胞功能测定(LAFA),其中LAFA评估白细胞募集、粘附和/或迁移(向至少一种内皮细胞分子);和
至少部分基于至少一次LAFA的一个或多个结果,确定受试者是否有感染性炎症免疫反应或非感染性炎症免疫反应。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中至少一次LAFA定量和/或半定量地评估白细胞募集、粘附和/或迁移。
3. 根据权利要求1或2所述的方法,其中所述方法包括获得受试者的血液样本。
4. 根据权利要求1-3中的一项或多项所述的方法,其中从VCAM-1、MadCAM-1、IL-8、SDF-1 α 、E-选择素、P-选择素和ICAM-1中选择至少一种内皮细胞分子。
5. 根据权利要求4所述的方法,其中,至少一种内皮细胞分子包括VCAM-1、MadCAM-1、IL-8、SDF-1 α 、E-选择素、P-选择素和ICAM-1中的两种或两种以上。
6. 根据权利要求1-5中的一项或多项所述的方法,其中至少一次LAFA测量以下一个或多个参数:检测到的滚动白细胞的量化、检测到的粘附白细胞的量化、检测到的蠕动细胞的量化、检测到的个体白细胞的平均速度,检测到的个体白细胞的平均直线度,检测到的个体白细胞的平均位移和个体细胞的平均停留时间。
7. 根据权利要求1-6中的一项或多项所述的方法,其中来自受试者的血液样本的至少一次LAFA结果用作生成一个或多个参数的参考水平,该一个或多个参数用于生成一个或多个指数。
8. 根据权利要求1-7中的一项或多项所述的方法,其中来自至少一个健康血液样本的至少一次LAFA结果用作生成用于生成一个或多个参数的参考水平,该一个或多个参数用于生成一个或多个指数。
9. 根据权利要求1-8中的一项或多项所述的方法,其中基于来自受试者血液的至少一次LAFA结果除以来自受试者Mn²⁺处理血液样本的至少一次LAFA的结果,生成受试者血液的活化潜力比。
10. 根据权利要求1-9中的一项或多项所述的方法,其中该方法还包括检测一个或多个白细胞细胞表面标志物。
11. 根据权利要求10所述的方法,其中从CD4、CD8、CD14、CD15、CD16、CD19和CD25中选择一个或多个白细胞标志物。
12. 根据权利要求1-11中的一项或多项所述的方法,其中受试者有或被怀疑有全身炎症反应综合征(SIRS)。
13. 根据权利要求1-12中的一项或多项所述的方法,其中该方法包括将白细胞募集、粘附和/或迁移与白细胞招募、粘附和/或迁移的参考水平进行比较。
14. 根据权利要求13所述的方法,其中白细胞招募、粘附和/或迁移的参考水平来自于一个已建数据集。
15. 根据权利要求14所述的方法,其中已建数据集包括已知有感染性炎症免疫反应的受试者群体和/或已知有非感染性炎症免疫反应的受试者群体的白细胞招募、粘附和/或迁移的测量值。
16. 根据权利要求15所述的方法,其中已知有感染性炎症免疫反应的受试者群体已知

患有败血症。

17. 根据权利要求15所述的方法, 其中已知有非感染性炎症免疫反应的受试者群体已知患有SIRS。

18. 根据权利要求1-17中的一项或多项所述的方法, 其中LAFA结果包括:

- i. 募集和/或粘附白细胞水平较高或较低;
- ii. 募集和/或粘附中性粒细胞百分比较高或较低; 和/或
- iii. 募集和/或粘附单核细胞水平较高或较低;

与参考水平相比后, 发现是败血症的指征, 其中参考水平来自已知有非感染性SIRS的受试者群体。

19. 根据权利要求1-16或18中的一项或多项所述的方法, 其中所述方法包括确定所述受试者有感染性炎症免疫反应, 并给所述受试者施用抗菌或抗病毒组合物。

20. 根据权利要求1-15、17或18中的一项或多项所述的方法, 其中所述方法包括:
确定所述受试者有非感染性炎症免疫反应, 并给所述受试者施用抗炎症组合物。

21. 根据权利要求1-15、17、18或20中的一项或多项所述的方法, 其中所述方法包括: 确定受试者有非感染性炎症反应, 并给受试者施用一种能够改变白细胞募集、粘附和/或迁移的药物。

22. 根据权利要求21所述的方法, 其中所述药物是可干扰白细胞粘附分子与内皮细胞分子结合的抗体。

23. 一种治疗受试者感染性炎症免疫反应的方法, 该方法包括执行如权利要求1-16、18或19中一项或多项所述方法、确定受试者有感染性炎症免疫反应、并对受试者进行感染性炎症免疫反应治疗。

24. 根据权利要求23所述的方法, 其中所述受试者患有败血症。

25. 根据权利要求24所述的方法, 其中治疗患者败血症包括使用抗生素、血管加压素和皮质类固醇中的一种或多种治疗患者。

26. 一种评估受试者对适于治疗感染性疾病的药物的反应或潜在反应的方法, 该方法包括:

对受试者的血液样本进行至少一次白细胞功能测定 (LAFA), 其中LAFA评估白细胞募集、粘附和/或迁移 (向至少一种内皮细胞分子); 和

至少部分地根据至少一次LAFA的一个或多个结果, 评估患者对治疗感染性疾病的药物的反应或潜在反应。

27. 一种检测有炎症免疫反应的受试者的白细胞亚群的方法, 该方法包括对受试者的血液样本进行至少一次白细胞功能测定 (LAFA), 其中LAFA评估白细胞募集、粘附和/或迁移 (向至少一种内皮细胞分子);

检测一个或多个白细胞表面标志物, 和

至少部分基于至少一次LAFA的一个或多个结果和对一个或多个白细胞表面标志物的检测, 确定与炎症免疫反应相关的白细胞亚群。

28. 根据权利要求27所述的方法, 其中受试者有炎症状况或感染性疾病。

29. 根据权利要求27或28所述的方法, 其中受试者患有或被怀疑患有SIRS。

30. 根据权利要求29所述的方法, 其中所述受试者患有败血症。

31.一种确定受试者炎症原因的方法,该方法包括对受试者的血液样本进行至少一次白细胞功能测定(LAFA),其中,LAFA评估白细胞募集、粘附和/或迁移(向至少一种内皮细胞分子);以及

至少部分基于至少一次LAFA的一个或多个结果,确定受试者炎症的病因。

32.根据权利要求31所述的方法,其中该方法还包括检测一种或多种白细胞细胞表面标志物。

33.根据权利要求32所述的方法,其中从CD4、CD8、CD14、CD15、CD16、CD19和CD25中选择一个或多个白细胞标志物。

34.根据权利要求31-33中的一项或多项所述的方法,其中受试者炎症病因被确定为是感染性的。

35.根据权利要求34所述的方法,其中炎症的感染原因是细菌、病毒或寄生虫感染。

36.根据权利要求35所述的方法,其中从肠道细菌、沙雷菌属、假单胞菌属、大肠杆菌和金黄色葡萄球菌中的一种或多种引起的感染中选择细菌感染。

37.根据权利要求31-33中的一项或多项所述的方法,其中受试者炎症病因被确定为是非感染性的。

38.根据权利要求37所述的方法,其中炎症的非感染性原因选择自心肌梗死、哮喘、出血、动脉瘤和/或肺炎。

39.一种用于根据权利要求1-38中一项或多项所述方法执行至少一次LAFA的系统。

40.一种用于根据权利要求1-38中一项或多项所述方法执行至少一次LAFA的设备。

41.一种用于区分受试者感染性和非感染性炎症免疫反应的方法,所述方法包括:

对受试者的血液样本进行至少一次白细胞功能测定(LAFA),其中LAFA捕获白细胞募集、粘附和/或迁移到至少一种内皮细胞分子的视频数据;和

将机器学习应用于视频数据,以确定受试者是否有感染性炎症免疫反应或非感染性炎症免疫反应。

42.根据权利要求41所述的方法,其中所述视频数据包括多个图像,且将机器学习应用于所述视频数据包括:

将多幅图像组合成一幅图像;以及机器学习应用到单个图像。

43.根据权利要求42所述的方法,其中组合多个图像包括执行最大强度投影以将多个图像组合为单个图像。

44.根据权利要求42或43所述的方法,其中应用机器学习包括将卷积神经网络应用于单个图像。

45.根据权利要求44所述的方法,其中将卷积神经网络应用到单幅图像上,包括对具有感染性和非感染性炎症免疫反应的多个训练样本中的每个样本使用一幅训练图像来训练卷积神经网络,以及将训练好的卷积神经网络应用到被检查受试者的单幅图像上。

46.根据权利要求41-45中的一项或多项所述的方法,进一步包括:执行细胞追踪,确定细胞追踪参数值;将机器学习应用于细胞追踪参数值。

47.根据权利要求46所述的方法,其中将机器学习应用于所述细胞追踪参数值,包括将随机森林应用于所述细胞追踪参数。

48.根据权利要求47所述的方法,其中细胞追踪参数由随机森林中的树节点表示。

49. 根据权利要求48或49所述的方法, 其中将随机森林应用于单一图像包括对具有感染性和非感染性炎症免疫反应的多个训练样本中的每一个样本使用单一训练图像来训练随机森林, 以及将训练后的随机森林应用于被检查受试者的单一图像上。

50. 一种确定受试者炎症原因的方法, 该方法包括: 对受试者的血液样本进行至少一次白细胞功能测定 (LAFA), 其中, LAFA捕获白细胞募集、粘附和/或迁移到至少一种内皮细胞分子的视频数据; 以及将机器学习应用到视频数据中, 以确定受试者炎症的原因。

传染病中的白细胞募集情况

技术领域

[0001] 本公开涉及一些测定,包括但不限于于白细胞粘附功能测定(LAFA),以及进行所述测定时所涉及的设备和/或方法。本公开还涉及所公开实施例在诊断、分析和/或预后应用中的使用,特别是异常宿主免疫应答相关疾病的诊断、分析和/或预后应用。

[0002] 背景

[0003] 全身炎症反应综合征(SIRS)是一种复杂的、对非感染性或感染性侵袭的全身炎症反应。非感染性病因包括大手术、外伤、烧伤和严重组织损伤;而感染性病因,如细菌、真菌或病毒,临床上定义为败血症综合征。在临床上,感染性和非感染性的SIRS具有几乎相同的病理生理学特征。

[0004] 由于病因不同,非感染性和感染性病因的全身炎症的治疗方法有显著差异。抗生素治疗和源控制是败血症的一线治疗方法,而抗生素治疗不适用于非感染性病因。然而,对于大多数入住重症监护室的全身炎症患者,由于这两种疾病有很高的相似性,很难快速准确地确定疾病的发病机制。目前的做法是,一旦怀疑有潜在感染,就给患者使用抗生素,这常常导致非感染性病因的患者过度使用抗生素。抗生素的使用会持续,直至负责治疗的临床医生确信引起全身炎症的原因不是败血症。在非感染性病因的患者中不当使用抗生素可能会导致耐药病原体的出现以及其他可避免的副作用。因此,在临床上,准确、快速地将败血症与非感染性SIRS区分开来,有助于及早应用更有针对性的治疗方案,提高生存率,避免治疗副作用。

[0005] 为了区分败血症和非感染性SIRS,大多数工作集中在病人血液和/或组织中潜在病原体的检测及定性。目前,对于SIRS患者,血液培养是鉴定感染病原体的金标准。然而,血液培养的结果周转通常需要12-72小时,而指导方针建议在怀疑感染后1小时内必须使用抗生素。最近,其他用于微生物检测的分子测试也已商业化包括Prove-itTM assay、Verigene[®]、FilmArray[®]和PNA-FISH。然而,由于速度慢、灵敏度和特异性低下,这些技术在临床中的广泛应用一直受阻。尽管培养阳性是败血症状态的有用指示,但研究发现高达50%的败血症患者血液培养结果为阴性,所以培养阳性对败血症诊断而言并非是强制性的。另外,疾病状况不仅表现为感染本身,还表现为宿主免疫系统对感染的反应。已经进行了鉴定宿主免疫系统中生物标志物的工作,旨在确定宿主免疫应答状态,并协助诊断败血症。这些标志物包括降钙素原(PCT)、C反应蛋白(CRP)、髓样细胞表达触发受体1(TREM-1)和诱饵受体3(DCR3)。但是,在测定这些标记物时,缺乏快速性和特异性仍是这些技术的一个显着缺陷。

[0006] 因此,临床上仍然需要一些方法、系统和/或设备来区分败血症和非感染性炎症状态,并预测受试者对感染性和非感染性全身炎症治疗的潜在反应。

[0007] 发明概述

[0008] 在一些实施例中,本公开提供了一种用于区分受试者的感染性和非感染性炎症免疫反应的方法,所述方法包括:

[0009] 对受试者的血液样本进行至少一次白细胞功能测定(LAFA),其中,LAFA评估白细

胞募集、粘附和/或迁移到至少一种内皮细胞分子;以及

[0010] 至少部分基于至少一次LAFA的一个或多个结果,确定受试者是否具有感染性炎症免疫反应或非感染性炎症免疫反应。

[0011] 在一个实施例中,至少一次LAFA定量和/或半定量地评估白细胞募集、粘附和/或迁移。

[0012] 在一个实施例中,该方法包括从受试者获取血液样本。

[0013] 在一个实施例中,从VCAM-1、MadCAM-1、IL-8、SDF-1 α 、E-选择素、P-选择素和ICAM-1中选择至少一种内皮细胞分子。

[0014] 在一个实施例中,所述至少一种内皮细胞分子包括两个或两个以上的VCAM-1、MadCAM-1、IL-8、SDF-1 α 、E-选择素、P-选择素和ICAM-1。

[0015] 在一个实施例中,所述至少一次LAFA测量一个或多个以下参数:检测到的滚动白细胞的量化、检测到的粘附白细胞的定量、检测到的蠕动细胞的定量、检测到的个体白细胞的平均速度,检测到的个体白细胞的平均直线度,检测到的个体白细胞的平均位移和个体细胞的平均停留时间。

[0016] 在一个实施例中,来自受试者的血液样本的至少一次LAFA的结果被用作生成一个或多个参数的参考水平,该一个或多个参数用于生成一个或多个指数。

[0017] 在一个实施例中,来自至少一个健康血液样本的至少一次LAFA的结果用作生成一个或多个参数的参考水平,该一个或多个参数用于生成一个或多个指数。

[0018] 在一个实施例中,基于来自受试者血液的至少一次LAFA的结果除以来自受试者的Mn²⁺处理的血液样本的至少一次LAFA的结果,生成受试者血液的活化潜力比。

[0019] 在一个实施例中,该方法还包括检测一个或多个白细胞细胞表面标志物。

[0020] 在一个实施例中,从CD4、CD8、CD14、CD15、CD16、CD19和CD25中选择一个或多个白细胞标志物。

[0021] 在一个实施例中,受试者患有或被怀疑患有全身炎症反应综合征(SIRS)。

[0022] 在一个实施例中,该方法包括将白细胞募集、粘附和/或迁移与白细胞招募、粘附和/或迁移的参考水平做比较。

[0023] 在一个实施例中,白细胞募集、粘附和/或迁移的参考水平来自于一个已建数据集。

[0024] 在一个实施例中,已建数据集包括已知有感染性炎症免疫反应的受试者群体和/或已知有非感染性炎症免疫反应的受试者群体的白细胞募集、粘附和/或迁移的测量值。

[0025] 在一个实施例中,已知有感染性炎症免疫反应的受试者群体已知患有败血症。

[0026] 在一个实施例中,已知有非感染性炎症免疫反应的受试者群体已知有SIRS。

[0027] 在一个实施例中,LAFA结果包括:

[0028] i) 募集和/或黏附白细胞水平较高或较低;

[0029] ii) 募集和/或黏附中性粒细胞水平较高或较低;和/或

[0030] iii) 募集和/或黏附单核细胞水平较高或较低;

[0031] 是败血症的指征(与参考水平相比),其中参考水平来自已知患有非感染性SIRS的受试者群体。

[0032] 在一个实施例中,所述方法包括确定受试者有感染性炎症免疫反应,并给受试者

施用抗菌或抗病毒组合物。

[0033] 在一个实施例中,所述方法包括确定受试者有非感染性炎症免疫反应,并给受试者施用抗炎症组合物。

[0034] 在一个实施例中,该方法包括确定受试者有非感染性炎症反应,并给受试者施用改变白细胞募集、粘附和/或迁移的药物。

[0035] 例如,在一个实施例中,所述药物可能是干扰白细胞粘附分子与内皮细胞分子结合的抗体。

[0036] 在某些实施例中,所述药物可能是干扰 $\alpha 4$ 整合素与其内皮分子结合的抗体。所述药物可能是一种抗人 $\alpha 4$ 整合素抗体。在某些实施例中,所述药物为那他珠单抗。

[0037] 在某些实施例中,所述药物可能是一种干扰 $\alpha 4\beta 7$ 整合素与MAdCAM-1结合的抗体。例如,所述药物可能是维多珠单抗。

[0038] 在某些实施例中,所述药物可能是一种干扰CD11a (αL) 和ICAM-1结合的抗体。例如,所述药物可能是依法珠单抗或奥度莫单抗。

[0039] 在某些实施例中,所述药物可能是一种干扰CD11b (αM) 与ICAM-1结合的抗体。例如,所述药物可能是UK279或UK276。

[0040] 在某些实施例中,所述药物可能是干扰 $\beta 2$ 整合素与其内皮分子之间结合的抗体。例如,所述药物可能是厄利珠单抗或罗维珠单抗。

[0041] 在某些实施例中,所述药物可能是一种干扰 $\beta 7$ 整合素与其内皮分子之间结合的抗体。例如,所述药物可能是依托珠单抗。

[0042] 在一些实施例中,提供了一种治疗受试者感染性炎症免疫反应的方法,该方法包括执行本文所述的方法,确定受试者有炎症免疫反应并治疗受试者的炎症免疫反应。

[0043] 在一个实施例中,受试者患有败血症。

[0044] 在一个实施例中,治疗受试者的败血症包括使用抗生素、血管加压素和皮质类固醇中的一种或多种治疗患者。

[0045] 在一些实施例中,提供了一种方法来评估受试者对适合治疗传染病的药物的应答或潜在应答,该方法包括:

[0046] 对受试者的血液样本进行至少一次白细胞功能测定 (LAFA), 其中LAFA评估白细胞募集、粘附和/或迁移(向至少一种内皮细胞分子); 和

[0047] 至少部分地基于至少一次LAFA的一个或多个结果,评估病人对治疗传染病的药物的应答或潜在应答。

[0048] 在一些实施例中,提供了一种检测有炎症免疫反应的受试者中的白细胞亚群的方法,该方法包括对受试者的血液样本进行至少一次白细胞功能测定 (LAFA), 其中LAFA评估白细胞募集、粘附和/或迁移(向至少一种内皮细胞分子);

[0049] 检测一个或多个白细胞表面标志物, 和

[0050] 至少部分基于至少一次LAFA的一个或多个结果和对一个或多个白细胞表面标志物的检测,确定与炎症免疫反应相关的白细胞亚群。

[0051] 在一个实施例中,该方法包括检测多个白细胞表面标志物和/或检测多个白细胞亚群。

[0052] 在一个实施例中,受试者有炎症状态或感染性疾病。

- [0053] 在一个实施例中,受试者患有或被怀疑患有SIRS。
- [0054] 在一个实施例中,受试者患有败血症。
- [0055] 在一些实施例中,提供了一种确定受试者炎症病因的方法,该方法包括对受试者的血液样本进行至少一次白细胞功能测定(LAFA),其中LAFA评估白细胞募集、粘附和/或迁移(向至少一种内皮细胞分子);以及
- [0056] 至少部分地基于至少一次LAFA的一个或多个结果,确定受试者炎症的病因。
- [0057] 在一个实施例中,该方法还包括检测一个或多个白细胞细胞表面标志物。
- [0058] 在一个实施例中,从CD4、CD8、CD14、CD15、CD16、CD19和CD25中选择一个或多个白细胞标志物。
- [0059] 在一个实施例中,该方法包括检测多个白细胞表面标志物和/或检测多个白细胞亚群。
- [0060] 在一个实施例中,受试者炎症病因被确定为感染性的。
- [0061] 在一个实施例中,炎症的感染原因是细菌、病毒或寄生虫感染。
- [0062] 在一个特定实施例中,从肠道细菌、沙雷菌属、假单胞菌属、大肠杆菌和金黄色葡萄球菌中的一种或多种引起的感染中选择细菌感染。
- [0063] 在一个实施例中,受试者炎症病因被确定为非感染性的。
- [0064] 在一个实施例中,炎症的非感染性原因选择自心肌梗死、哮喘、出血、动脉瘤和/或肺炎。
- [0065] 在一些实施例中,提供了用于基于本文所述方法执行至少一次LAFA的系统
- [0066] 在一些实施例中,提供了用于基于本文所述方法执行至少一次LAFA的装置
- [0067] 在一些实施例中,提供了提供了一种区分受试者的感染性和非感染性炎症免疫反应的方法,该方法包括对受试者的血液样本进行至少一次白细胞功能测定(LAFA),其中LAFA捕捉白细胞募集、粘附和/或迁移(向至少一种内皮细胞分子)的视频数据;以及
- [0068] 将机器学习应用于视频数据,以确定受试者是否有感染性炎症免疫反应或非感染性炎症免疫反应。
- [0069] 在一个实施例中,所述视频数据包括多个图像,且将机器学习应用于所述视频数据,包括:
- [0070] 将多幅图像组合成一幅图像;并将机器学习应用于多个图像。
- [0071] 在一个实施例中,组合多个图像包括执行最大强度投影,以将多个图像组合为单个图像。
- [0072] 在一个实施例中,应用机器学习包括将卷积神经网络应用于单个图像。
- [0073] 在一个实施例中,将卷积神经网络应用于单一图像包括使用单一训练图像对具有感染性和非感染性炎症免疫反应的多个训练样本中的每个样本进行卷积神经网络训练,以及将训练好的卷积神经网络应用到被检查受试者的单一图像上。
- [0074] 在一个实施例中,所述方法进一步包括:
- [0075] 执行细胞追踪,确定细胞追踪参数值;以及
- [0076] 将机器学习应用于细胞追踪参数值。
- [0077] 在一个实施例中,所述方法包括将机器学习应用于所述细胞追踪参数值,包括将随机森林应用于所述细胞追踪参数。

[0078] 在一个实施例中,细胞追踪参数由在随机森林中的树节点表示。

[0079] 在一个实施例中,将随机森林应用于单一图像包括对具有感染性和非感染性炎症免疫反应的多个训练样本中的每一个应用单一训练图像训练随机森林,以及将训练后的随机森林应用于被检查受试者的单一图像上。

[0080] 在一些实施例中,提供了一种确定受试者炎症原因的方法,

[0081] 该方法包括:

[0082] 对受试者的血液样本进行至少一次白细胞功能测定 (LAFA), 其中LAFA捕捉白细胞募集、粘附和/或迁移(向至少一种内皮细胞分子) 的视频数据; 并将机器学习应用到视频数据中, 以确定受试者炎症的原因。

[0083] 在一些实施例中,提供了一种对受试者感染进行症状前检测的方法, 该方法包括:

[0084] 对受试者的血液样本进行至少一次白细胞功能测定 (LAFA), 其中LAFA评估白细胞募集、粘附和/或迁移(向至少一种内皮细胞分子); 和

[0085] 至少部分地基于至少一次LAFA的一个或多个结果, 确定受试者是否有感染。

[0086] 在一些实施例中,感染是病毒感染。例如,在一个实施例中,感染可能是流感感染。

[0087] 在一些实施例中,提供了一种SIRS症状前检测的方法, 该方法包括:

[0088] 对受试者的血液样本进行至少一次白细胞功能测定 (LAFA), 其中LAFA评估白细胞募集、粘附和/或迁移(向至少一种内皮细胞分子); 和

[0089] 至少部分地基于至少一次LAFA的一个或多个结果, 确定受试者是否有患有SIRS。

[0090] 在一些实施例中, SIRS是感染性SIRS。

[0091] 在一些实施例中, SIRS是非感染性SIRS。

[0092] 在一些实施例中,从速度、扩散系数和/或直线度中选择一个或多个参数的减少是感染、感染性SIRS和/或非感染性SIRS的指征。

[0093] 在本说明书中,“组成”一词,及其变体,如“包含”或“包括”,将被理解包含一个所述元素、整数或步骤、或一组元素、整数或步骤,但不排除任何其他元素、整数或步骤,或一组元素、整数或步骤。

附图说明

[0094] 下列附图是本说明书的一部分,其目地是为了进一步说明本公开的某些方面。通过参考其中一个或多个附图,并结合本文所述具体实施例的详细说明,可更好地理解本公开。

[0095] 图1:用于白细胞粘附功能测定 (LAFA) 的微流控系统示例。粘附底物(例如人VCAM-1蛋白)被涂覆在微流体通道的底部。人全血通过该通道灌注,从而允许底物与人白细胞相互作用,并通过荧光显微镜进行检测。使用可与特异性细胞膜标志物(如CD4-Alexa488、CD8-PE和CD15-25APC、CD19-BV510)形成对比的不同荧光团结合抗体对不同的人白细胞进行标记,从而允许同时检测多个白细胞亚群。

[0096] 图2: (A) 常规图像和数据分析的示例流程图。根据某些示例性实施例,使用来自Fiji图像分析软件的TrackMate对在白细胞粘附功能测定 (LAFA) 中捕获的图像进行处理和分析。用R程序对TrackMate的输出进行进一步分析,生成描述性统计数据。还对图像分析过程中涉及的5个脚本的使用进行了说明。(B) 说明了基于原始图像的机器学习分析的示例流

程图。随着时间的推移,原始图像被转换成标准偏差投影,用于训练算法区分‘基础状态5’‘异常状态5。通常仅第一次需培训,接下来,可忽略步骤2b。(C)说明了基于追踪结果的机器学习分析的示例流程图。使用在步骤4a中获得的TrackMate结果来训练算法,从而区分“基础状态”和“异常状态”。通常仅第一次需培训,接下来,可忽略步骤2c。

[0097] 图3:Mn²⁺处理对VCAM-1底物上的 $\alpha 4\beta 1$ 整合素粘附功能(由LAFA测定)的影响。采集健康志愿者的血液样本,并在用于LAFA之前,用5mM MnCl₂处理或不处理。测定CD14、CD15+CD16+、CD4、CD8、CD19和CD4+CD25细胞的细胞密度(A)、速度(B)、扩散系数(C)、直线度(D)、停留时间(E)和轨迹长度(F)。数据表示每组独立受试者(n=7-13)的平均值±标准误。*,p<0.05;** ,p<0.01

[0098] 图4:Mn²⁺处理对MAdCAM-1底物上的 $\alpha 4\beta 7$ 整合素粘附功能(由LAFA测定)的影响。采集健康志愿者的血液样本,并在用于LAFA之前,用5mM MnCl₂处理或不处理。测定CD4、CD8和CD15+CD16+细胞的细胞密度(A)、速度(B)、扩散系数(C)、直线度(D)、停留时间(E)和轨迹长度(F)。数据表示每组独立受试者(n=12)的平均值±标准误。*,p<0.05;** ,p<0.01

[0099] 图5:健康对照组和SIRS患者的全血细胞计数。血液样本采集自健康志愿者和SIRS患者。使用迈瑞BC5000血液分析仪,根据制造商的说明(A)进行全血细胞计数。然后确定每个白细胞亚群的百分比(B)*,p<0.05;** ,p<0.01。

[0100] 图6:使用LAFA评估健康对照组和SIRS患者的白细胞粘附功能,使用VCAM-1作为底物。采集健康志愿者和SIRS患者的血样,然后在VCAM-1底物上用LAFA进行分析。测定相互作用的CD14、CD15+CD16+、CD4、CD8、CD19、CD4+CD25+细胞的细胞密度(A)。细胞密度也通过适当的细胞计数标准化(B)。在相互作用的细胞范围内,确定了C组特异性细胞亚群的百分比。R因子定义为(细胞类型%)/(循环血液中细胞类型%),并计算了R因子(D)。同时也测定了细胞亚群的细胞速度(E)、扩散系数(F)、直线度(G)、停留时间(H)和轨迹长度(I)。数据表示每组独立受试者(n=13(健康的),14例(SIRS))的平均值±标准误。*,p<0.05;** ,p<0.01

[0101] 图7:使用LAFA(VCMA-1)区分非感染性SIRS患者组和感染性SIRS患者组。根据临床记录,将14例SIRS患者分为三组:1)非感染性SIRS(n=6),2)感染性SIRS(n=5),3)未知(n=3)。采集健康志愿者(n=13)和SIRS患者的血样然后在VCAM-1底物上用LAFA进行分析。使用迈瑞BC5000血液分析仪(A),进行全血细胞计数。然后使用VCAM-1作为底物,用LAFA对血液样本进行分析。在相互作用的细胞中,确定了B组特异性细胞亚群的百分比。R因子定义为(细胞类型%)/(循环中细胞类型%),并计算了R因子(C)。测定D组CD14、CD15+CD16+、CD4、CD8、CD19和CD4+CD25+细胞的细胞密度,并通过适当的细胞计数使细胞密度标准化(E)。并对健康组和三个SIRS组细胞速度(F)、扩散系数(G)、直线度(H)和停留时间(I)进行了评价。*,p<0.05;** ,p<0.01与健康对照组相比。#,p<0.05与非感染性组相比。

[0102] 图8:A-D阐释了使用在VCAM-1底物上由LAFA生成的单细胞速度图谱来评估个体SIRS患者的特异性免疫应答。采集SIRS患者的血样,然后在VCAM-1底物上用LAFA进行分析。然后测定每个相互作用的CD15+CD16+(A)、CD4(B)、CD8(C)、CD19(D)细胞的速度。根据标准微生物试验和临床记录,确定了每个SIRS(共14例)的全身炎症反应原因(表3)。同时也纳入3名健康受试者作为参考。图上的每个实点表示一单个细胞。数据表示平均值±95%置信区间。

[0103] 图9:利用在VCAM-1底物上由LAFA产生的单细胞扩散系数图谱来评估个体SIRS患

者的特异性免疫应答。采集SIRS患者血样,并在VCAM-1底物上用LAFA进行分析。然后测定每个相互作用的CD15+CD16+ (A)、CD4 (B)、CD8 (C)、CD19 (D) 细胞的扩散系数。基于标准微生物试验(血液培养试验)和临床记录,确定了每个SIRS患者(共14例)的全身炎症反应原因(表3)。同时也纳入3名健康受试者作为参考。图上的每个实点表示一单个细胞。数据表示平均值 $\pm$ 95%置信区间内。

[0104] 图10:利用在VCAM-1底物上由LAFA生成的单细胞直线度图谱来评估个体SIRS患者的特异性免疫应答。采集SIRS患者的血样,然后在VCAM-1底物上用LAFA进行分析。然后测定每个相互作用CD15+CD16+ (A)、CD4 (B)、CD8 (C)、CD19 (D) 细胞的直线度。根据标准微生物试验和临床记录,确定了每个SIRS患者(共14例)的全身炎症反应原因(表3)。同时也纳入3名健康受试者作为参考。图上的每个实点表示一单个细胞。数据表示平均值 $\pm$ 95%置信区间。

[0105] 图11:A-I阐释了使用LAFA评估健康对照组和SIRS患者的白细胞粘附功能,使用VCAM-1和IL-8作为底物。采集健康志愿者和SIRS患者的血样,然后在VCAM-1及IL-8底物上用LAFA进行分析。测定相互作用的CD14、CD15+CD16+、CD4、CD8、CD19、CD4+CD25+细胞的细胞密度(A)。细胞密度也通过适当的细胞计数(B)标准化。在相互作用的细胞范围内,确定了C组特异性细胞亚群的百分比。R因子定义为(细胞类型%)/(循环中细胞类型%),并计算了R因子(D)。同时也测定了细胞亚群的细胞速度(E)、扩散系数(F)、直线度(G)、停留时间(H)和轨迹长度(I)。数据表示每组独立受试者(n=13(健康的)和14例(SIRS))的平均值 $\pm$ 标准误差。*, $p<0.05$;**, $p<0.01$ 。

[0106] 图12:A-F阐释了在VCAM-1和IL-8底物上使用LAFA来区分非感染性SIRS患者组和感染性SIRS患者组。根据临床记录,将14例SIRS患者分为三组:1)非感染性SIRS(n=6),2)感染性SIRS(n=5),3)未知(n=3)。采集健康志愿者(n=13)和SIRS患者的血样,然后在VCAM-1及IL-8底物上用LAFA进行分析。测定相互作用的CD14、CD15+CD16+、CD4、CD8、CD19、CD4+CD25+细胞的细胞密度(A)。细胞密度也通过适当的细胞计数标准化(B)。并对健康组和三个SIRS组的细胞速度(C)、扩散系数(D)、直线度(E)和停留时间(I)进行评价。数据表示平均值 $\pm$ 标准误差。*, $p<0.05$;**, $p<0.01$ 与健康对照组相比。

[0107] 图13:A-I阐释了使用LAFA评估健康对照组和SIRS患者的白细胞粘附功能,VCAM-1和SDF-1 α 作为底物。采集健康志愿者和SIRS患者的血样,然后在VCAM-1及SDF-1 α 底物上用LAFA进行分析。测定相互作用的CD14、CD15+CD16+、CD4、CD8、CD19、CD4+CD25+细胞的细胞密度(A)。细胞密度也通过适当的细胞计数(B)标准化。在相互作用的细胞范围内,确定了C组特异性细胞亚群的百分比。R因子定义为(细胞类型%)/(循环中细胞类型%),并计算了R因子(D)。同时也测定了细胞亚群的细胞速度(E)、扩散系数(F)、直线度(G)、停留时间(H)和轨迹长度(I)。数据表示每组独立受试者(n=13(健康的)和14(SIRS))的平均值 $\pm$ 标准误差。*, $p<0.05$;**, $p<0.01$ 。

[0108] 图14:A-F阐释了在VCMA-1和SDF-1 α 底物上使用LAFA来区分非感染性SIRS患者组和感染性SIRS患者组。根据临床记录,将14例SIRS患者其分为三组:1)非感染性SIRS(n=6),2)感染性SIRS(n=5),3)未知(n=3)。采集健康志愿者(n=13)和SIRS患者的血样,然后在VCAM-1及SDF-1 α 底物上用LAFA进行分析。测定相互作用的CD14、CD15+CD16+、CD4、CD8、CD19、CD4+CD25+细胞的细胞密度(A)。细胞密度也通过适当的细胞计数标准化(B)。并对健康组和三个SIRS组的细胞速度(C)、扩散系数(D)、直线度(E)和停留时间(I)进行评价。数据

表示平均值±标准误。*, $p<0.05$;**, $p<0.01$ 与健康对照组相比。#, $p<0.05$;##, $p<0.01$ 与非感染性组相比。

[0109] 图15:A-I阐释了使用白细胞黏附功能测定(LAFA)评估 Mn^{2+} 对SIRS患者VCAM-1底物上白细胞粘附功能的影响。采集健康志愿者和SIRS患者的血液样本,在室温下用5mM Mn 处理5分钟,然后在VCAM-1底物上用LAFA进行分析。测定相互作用的CD14、CD15+CD16+、CD4、CD8、CD19、CD4+CD25+细胞的细胞密度(A)。细胞密度也通过适当的细胞计数标准化(B)。在相互作用的细胞范围内,确定了C组特异性细胞亚群的百分比15。R因子定义为(细胞类型%)/(循环中细胞类型%),并计算了R因子(D)。计算出速度活化潜力比(SAPR)、扩散系数活化潜力比(DCAPR)、直线度活化潜力比(STAPR)、停留时间活化潜力比(DTAPR)和轨迹长度活化潜力比(TLAPR),如例11所示。数据表示每组独立受试者($n=13$ (健康受试者)和14例(SIRS患者))的平均值±标准误。*, $p<0.05$;**, $p<0.01$ 。

[0110] 图16:16A-F阐释了在 Mn^{2+} 存在的情况下,利用LAFA在VCMA-1底物上来区分非感染性SIRS患者组和感染性SIRS患者组。根据临床记录,将14例SIRS患者分为三组:1)非感染性SIRS($n=6$),2)感染性SIRS($n=5$),3)未知($n=3$)。采集健康志愿者($n=13$)和SIRS患者的血样,然后在VCAM-1底物上用LAFA进行分析。测定相互作用的CD14、CD15+CD16+、CD4、CD8、CD19、CD4+CD25+细胞的细胞密度(A)。细胞密度也通过适当的细胞计数标准化(B)。计算出速度活化潜力比(SAPR)、扩散系数活化潜力比(DCAPR)、直线度活化潜力比(STAPR)、停留时间活化潜力比(DTAPR)(C-F)。数据表示平均值±标准误。*, $p<0.05$;**, $p<0.01$ 与健康对照组相比。#, $p<0.05$;##, $p<0.01$ 与非感染性组相比。

[0111] 图17:A-I阐释了使用LAFA评估健康对照组和SIRS患者的白细胞粘附功能(使用P-选择素和E-选择素作为底物)。采集健康志愿者和SIRS患者的血样,在P-选择素和E-选择素底物上用LAFA进行分析。测定相互作用的CD14、CD15+CD16+、CD4、CD8、CD19、CD4+CD25+细胞的细胞密度(A)。细胞密度也通过适当的细胞计数标准化(B)。在相互作用的细胞范围内,确定了C组特异性细胞亚群的百分比。R因子定义为(细胞类型%)/(循环中细胞类型%),并计算了R因子(D)。同时也测定了细胞亚群的细胞速度(E)、扩散系数(F)、直线度(G)、停留时间(H)和轨迹长度(I)。数据表示每组独立受试者($n=13$ (健康的)和14例(SIRS))的平均值±标准误。*, $p<0.05$;**, $p<0.01$ 。

[0112] 图18:阐释利用LAFA在P-选择素和E-选择素底物上区分非感染性SIRS患者组和感染性SIRS患者组。根据临床记录,将14例SIRS患者分为三组:1)非感染性SIRS($n=6$),2)感染性SIRS($n=5$),3)未知($n=3$)。采集健康志愿者($n=13$)和SIRS患者的血样,然后在P-选择素和E-选择素底物上用LAFA进行分析。测定CD14、CD15+CD16+、CD4、CD8、CD19和CD4+CD25+细胞的细胞密度(A)。细胞密度也通过适当的细胞计数标准化(B)。并对健康组和三个SIRS组的细胞速度(C)、扩散系数(D)、直线度(E)和停留时间(I)进行评价。数据表示平均值±标准误。*, $p<0.05$;**, $p<0.01$ 与健康对照组相比。#, $p<0.05$ 与非感染性组相比。

[0113] 图19:A-D阐释了利用LAFA生成的单细胞速度图谱(以P-选择素和E-选择素为底物)来评估SIRS患者的特异性PSGL-1粘附功能。采集SIRS患者的血样,然后在P-选择素和E-选择素底物上用LAFA进行分析。然后测定每个相互作用CD15+CD16+(A)、CD4(B)、CD8(C)、CD19(D)细胞的速度。根据标准微生物试验和临床记录,确定了每个SIRS(共14例)的全身炎症反应原因(表3)。同时也纳入3名健康受试者作为参考。图上的每个实点表示一单个细胞。

数据表示平均值±95%置信区间。

[0114] 图20:A-D阐释了使用LAFA产生的单细胞扩散系数图谱(以P-选择素和E-选择素为底物),来评估个体SIRS患者的特异性PSGL-1粘附功能。采集SIRS患者的血样,然后在P-选择素和E-选择素底物上用LAFA进行分析。然后测定每个相互作用的CD15+CD16+ (A)、CD4 (B)、CD8 (C)、CD19 (D) 细胞的扩散系数。根据标准微生物试验和临床记录,确定了每个SIRS (共14例)的全身炎症反应原因(表3)。同时也纳入3名健康受试者作为参考。图上的每个实点表示单个细胞。数据表示平均值±95%置信区间。

[0115] 图21:A-D阐释了使用LAFA产生的直线度图谱(以P-选择素和E-选择素为底物),来评估个体SIRS患者的特异性PSGL-1粘附功能。采集SIRS患者的血样,然后在P-选择素和E-选择素底物上用LAFA进行分析。然后,确定每个相互作用的CD15+CD16+ (A)、CD4 (B)、CD8 (C)、CD19 (D) 细胞的直线度。根据标准微生物试验和临床记录,确定了每个SIRS (共14例)的全身炎症反应原因(表3)。同时也纳入3名健康受试者作为参考。图上的每个实点表示单个细胞。数据表示平均值±95%置信区间。

[0116] 图22:A-C阐释了在VCAM-1底物上用LAFA确定那他珠单抗对SIRS患者白细胞募集的影响。从健康受试者和SIRS患者中采集血样,在室温下使用或不使用30μg/ml的那他珠单抗处理5分钟,然后在VCAM-1底物上利用LAFA进行分析。然后测定CD15+CD16+ (A)、CD4 (B)、CD8 (D) 细胞的细胞密度。根据临床记录,将14例SIRS患者分为三组:1) 非感染性SIRS (n=6), 2) 感染性SIRS (n=5), 3) 未知 (n=3)。数据表示平均值±标准误。NC=未处理对照组, NAT=那他珠单抗处理组。*, p<0.05; **, p<0.01。

[0117] 图23:A-B阐释了使用血清C-反应蛋白(CRP)来区分非感染性SIRS患者组和感染性SIRS患者组。根据临床记录,将14例SIRS患者分为三组:1) 非感染性SIRS (n=6), 2) 感染性SIRS (n=5), 3) 未知 (n=3)。采集健康志愿者 (n=13) 和SIRS患者的血样,采用ELISA法测定血清CRP (A) 水平。

[0118] 图24:A-F阐释了使用LAFA评估健康对照组和SIRS患者的白细胞粘附功能, MAdCAM-1作为底物。采集健康志愿者和SIRS患者的血样,然后在MAdCAM-1底物上用LAFA进行分析。测定相互作用的CD4、CD8、CD15+CD16+细胞的细胞密度(A)。细胞密度也通过适当的细胞计数标准化(B)。也测定细胞亚群的细胞速度(C)、扩散系数(D)、直线度(E)和停留时间(F)。数据表示每组独立受试者 (n=13 (健康的) 和14例 (SIRS)) 的平均值±标准误。*, p<0.05; **, p<0.01。

[0119] 图25:A-I阐释了使用LAFA (MAdCAM-1) 来区分非感染性SIRS患者组和感染性SIRS患者组。根据临床记录,将14例SIRS患者分为三组:1) 非感染性SIRS (n=6), 2) 感染性SIRS (n=5), 3) 未知 (n=3)。采集健康志愿者 (n=13) 和SIRS患者的血样,然后在MAdCAM-1底物上用LAFA进行分析。测定CD4、CD8、CD15+CD16+细胞的细胞密度(A)。细胞密度也通过适当的细胞计数标准化(B)。并对健康组和三个SIRS组的细胞速度(C)、扩散系数(D)、直线度(E)和停留时间(I)进行评价。数据表示平均值±标准误。*, p<0.05; **, p<0.01与健康对照组相比。#, p<0.05; ##, p<0.01与非感染性组相比。

[0120] 图26:A-I阐释了使用白细胞粘附功能测试 (LAFA) 评估Mn²⁺对SIRS患者MAdCAM-1底物上白细胞粘附功能的影响。采集健康志愿者和SIRS患者的血液样本,并在室温下用5mM Mn²⁺处理5分钟,然后在MAdCAM-1底物上用LAFA进行分析。测定相互作用的CD4、CD8、CD15+

CD16⁺细胞的细胞密度(A)。细胞密度也通过适当的细胞计数标准化(B)。也测定细胞亚群的细胞速度(C)、扩散系数(D)、直线度(E)和停留时间(F)。数据表示每组独立受试者(n=13(健康的)和14例(SIRS))的平均值±标准误。*,p<0.05。

[0121] 图27:A-F阐释了在Mn²⁺存在的情况下在MAdCAM-1底物上利用LAFA来区分非感染性SIRS患者组和感染性SIRS患者组。根据临床记录,将14例SIRS患者分为三组:1)非感染性SIRS(n=6),2)感染性SIRS(n=5),3)未知(n=3)。采集健康志愿者(n=13)和SIRS患者的血液样本,并在室温下用5mM Mn处理5分钟,然后在MAdCAM-1底物上用LAFA进行分析。测定CD4、CD8、CD15+CD16⁺细胞的细胞密度(A)。细胞密度也通过适当的细胞计数标准化(B)。并对健康组和三个SIRS组的细胞速度(C)、扩散系数(D)、直线度(E)和停留时间(I)进行评价。数据表示平均值±标准误。*,p<0.05;**,p<0.01与健康对照组相比。#,p<0.05;##,p<0.01与非感染性组相比。

[0122] 图28:利用LAFA测定疑似病毒感染对白细胞粘附功能的影响,P+E选择素作为底物。在感染的三个不同阶段采集血液样本:“-”、健康、“+”、无流感症状的潜伏期和“++”、有严重流感症状的流感期。然后使用P+E选择素作为底物,用LAFA对血液样本进行分析。该数据表示从LAFA测定追踪到的个体细胞中检测到的参数,包括速度(A)、扩散系数(B)、直线度(C)、停留时间(D)、轨迹长度(E)和位移(F)。每个点表示一个细胞。*,p<0.05;**,p<0.01。

[0123] 图29:利用LAFA测定疑似病毒感染对白细胞粘附功能的影响,VCAM-1作为底物。在感染的三个不同阶段采集血液样本:“-”、健康、“+”、无流感症状的潜伏期和“++”、有严重流感症状的流感期。然后使用VCAM-1作为底物,用LAFA对血液样本进行分析。该数据表示从LAFA测定中追踪到的个体细胞中检测到的参数,包括速度(A)、扩散系数(B)、直线度(C)、停留时间(D)、轨迹长度(E)和位移(F)。每个点表示一个细胞。*,p<0.05;**,p<0.01。

[0124] 图30:使用LAFA评估健康对照组和SIRS患者的白细胞粘附功能,P+E选择素作为底物。采集健康志愿者(n=14)和28例SIRS患者(包括最初的14例和另外14例患者)的血样,然后在P+E选择素底物上用LAFA进行分析。根据患者的临床记录和血液培养结果,将SIRS患者分为非感染性SIRS组(n=11)、感染性SIRS组(n=10)和未知组(n=8)。测定相互作用的CD14、CD15+CD16⁺、CD4、CD8、CD19、CD4+CD25⁺细胞的细胞密度(A)。细胞密度也通过适当的细胞计数标准化(B)。测定各细胞亚群的细胞速度(C)、扩散系数(D)、直线度(E)、停留时间(F)、轨迹长度(G)和位移(H)。也显示了I组血液样本的全白细胞计数。数据表示平均值±标准误。*,p<0.05;**,p<0.01与健康对照组相比。#,p<0.05与非感染性组相比。FEB代表全血检查。

[0125] 图31:利用LAFA生成的单细胞图谱来评估个体SIRS患者的特异性免疫反应,P+E选择素作为底物。采集健康受试者(n=6)和SIRS患者(n=28)的血液样本,然后在选择素底物上用LAFA分析。然后测定每个相互作用的CD4(A)和CD15+CD16⁺(B)细胞的直线度。根据标准微生物试验和临床记录,确定了每例SIRS患者的全身炎症反应原因(表3和表5)。图上的每个实点表示单个细胞。数据表示平均值±95%置信区间。

[0126] 图32.使用LAFA评估健康对照组和SIRS患者的白细胞粘附功能,VCAM-1作为底物。采集健康志愿者(n=14)和28例SIRS患者(包括14例老患者和14例新患者)的血样,然后在VCAM-1底物上用LAFA进行分析。根据患者的临床记录和血液培养结果,将SIRS患者分为非感染性SIRS(n=11)组、感染性SIRS(n=10)组和未知组(n=8)。测定相互作用的CD14、CD15

+CD16⁺、CD4、CD8、CD19、CD4+CD25⁺细胞的细胞密度(A)。细胞密度也通过适当的细胞计数标准化(B)。测定各细胞亚群的细胞速度(C)、扩散系数(D)、直线度(E)、停留时间(F)、轨迹长度(G)和位移(H)。数据表示平均值±标准误。*, $p<0.05$;**, $p<0.01$ 与健康对照组相比。#, $p<0.05$ 与非感染性组相比。

[0127] 图33:利用LAFA(以VCAM-1为底物)生成的单细胞图谱来评估个体SIRS患者的特异性免疫反应。采集健康受试者($n=6$)和SIRS患者($n=28$)的血样,在VCAM-1底物上用LAFA进行分析。然后测定血样中各相互作用CD19细胞(A)的速度和各相互作用CD15+CD16⁺(B)细胞的直线度。至少部分地根据标准微生物试验和临床记录,确定了每例SIRS患者的全身炎症反应原因(表3和表5)。图上的每个实点表示单个细胞。数据表示平均值±95%置信区间。

[0128] 图34:使用LAFA评估健康对照组和SIRS患者的白细胞粘附功能,VCAM-1和IL-8作为底物。采集健康志愿者($n=14$)和全部SIRS患者(包括14例老患者和14例新患者)的血样,然后在VCAM-1和IL-8底物上用LAFA进行分析。根据患者的5临床记录和血液培养结果,将SIRS患者分为非感染性SIRS组($n=11$)、感染性SIRS组($n=10$)和未知组($n=8$)。测定相互作用的CD15+CD16⁺、CD4、CD8细胞的细胞密度(A)。细胞密度也通过适当的细胞计数标准化(B)。测定各细胞亚群的细胞速度(C)、扩散系数(D)、直线度(E)、停留时间(F)、轨迹长度(G)和位移(H)。数据表示平均值±标准误。*, $p<0.05$;**, $p<0.01$ 与健康组相比。#, $p<0.05$ 与非感染性组相比。

[0129] 图35:使用LAFA评估健康对照组和SIRS患者的白细胞粘附功能,VCAM-1和SDF-1 α 作为底物。采集健康志愿者($n=14$)和全部SIRS患者(包括14例老患者和14例新患者)的血样,然后在VCAM-1和SDF-1 α 底物上用LAFA进行分析。根据患者的临床记录和血液培养结果,将SIRS患者分为非感染性SIRS($n=11$)组、感染性SIRS($n=10$)组和未知组($n=8$)。测定相互作用的CD15+CD16⁺、CD4、CD8细胞的细胞密度(A)。细胞密度也通过适当的细胞计数标准化(B)。测定各细胞亚群的细胞速度(C)、扩散系数(D)、直线度(E)、停留时间(F)、轨迹长度(G)和位移(H)。数据表示平均值±标准误。*, $p<0.05$;**, $p<0.01$ 与健康组相比。#, $p<0.05$ 与非感染性组相比。

[0130] 详细说明

[0131] 参考一个或多个实施例对本公开进行了进一步详细描述,其中一些示例在附图中进行了说明。所述示例和实施例是通过解释的方式提供的,且不限于本公开的范围。此外,作为一个实施例一部分的所示或所述特征可单独用于提供其他实施例,且作为一个实施例一部分的所示所述特征可与一个或多个其他实施例一起使用,以提供更多的实施例。本公开涵盖了这些变体和实施例以及其他变体和/或修改。

[0132] 一般技术和定义

[0133] 除非另有特别说明,本协议中使用的技术和科学术语应被视为与所属领域(例如,免疫学、免疫组织化学、蛋白质化学、细胞生物学、生物化学和化学)的技术人员通常理解的含义相同。

[0134] 除非另有说明,本公开中使用的重组蛋白、细胞培养和免疫技术均为本领域技术人员所知的标准程序,如J.Perbal《分子克隆实用指南》、John Wiley 20and Sons(1984)、J.Sambrook等人《分子克隆》中所述:《实验室手册》,第三版,冷泉港实验室出版社(2001),T.A.Brown(编辑),《基础分子生物学》:《实用方法》,第1、2卷,IRL出版社(1991),

D.M.Glover和B.D.Hames (编辑),《DNA克隆》:《实用方法》,第1-4卷,IRL出版社(1995和1996年),和F.M.Ausubel等人(编辑),《分子生物学实验指南》,Greene Pub.Associates and 25Wiley-Interscience出版社(1988年,包括迄今为止的所有更新版本),Ed Harlow和David Lane (编辑)《抗体》:《实验室手册》,冷泉港实验室(1988年),以及J.E.Coligan等人(编辑)《免疫学实验室指南》,John Wiley&Sons (包括迄今为止的所有更新版本)。

[0135] 《传染病和宿主免疫反应》

[0136] 传染病是一种可能由外来病原体的入侵和宿主免疫系统对入侵的反应引起的疾病。感染性病原体包括细菌、病毒、真菌、线虫、节肢动物和其他大寄生物。2010年,估计有1500万人死于传染病,其中大多数是由一小群已知的微生物物种造成的。

[0137] 在成功进入宿主体内后,感染性病原体生长并产生有毒试剂,从而导致细胞和组织损伤。受损或受影响的宿主细胞还可能导致细胞因子和信号分子的异常产生,其中一些被释放到循环系统中,导致全身反应。在这一阶段,如果宿主免疫系统不能恢复体内稳态,则可能会使宿主的全身免疫反应加剧,其后果可能比单独由病原体直接造成的损伤更具破坏性。

[0138] 感染源的确定和表征对于治疗传染病患者是很有用的。随后,一系列的抗菌、抗病毒、抗真菌和抗寄生虫剂可用于帮助患者的免疫系统清除入侵的病原体。然而,由于感染可能引发宿主不受控制的炎症反应,因此准确监测患者的免疫反应状态也很重要,以便采取适当的治疗措施,避免免疫系统对宿主组织造成不必要的伤害。

[0139] 白细胞募集

[0140] 在白细胞募集过程中,循环中的白细胞通过白细胞表达的PSGL-1 (P-选择素糖蛋白配体-1) 与其内皮配体P-选择素和E-选择素相互作用而在内皮表面栓系并滚动。由于趋化因子诱导细胞活化,滚动的白细胞随后降低了其滚动速度。这使得白细胞B2和 $\alpha 4$ 整合素与其内皮配体(包括细胞间粘附分子-1 (ICAM-1) 和血管细胞粘附分子-1 (VCAM-1)) 相互作用,导致白细胞在内皮表面牢固粘附。例如,粘附性白细胞可使用 αL 整合素 (Cd11a) 和 αM 整合素 (Cd11b) 与内皮分子ICAM-1相互作用,从而使白细胞在发现白细胞渗出部位之前能够在内皮表面蠕动。

[0141] 因此,评估循环白细胞与内皮细胞相互作用的能力提供了有用的工具,可确定这些白细胞的活性,反映宿主免疫应答的状态。一般来说,尽管白细胞粘附功能在疾病发病过程中起起始和直接作用,但现有的商业测试无法评估其粘附功能。

[0142] 白细胞粘附功能测定

[0143] 本公开提供了一种白细胞黏附功能测定 (LAFA) 方法。例如,这种测定方法可在分子水平上对白细胞黏附功能进行准确和定量的评估。

[0144] LAFA采用了独立的微流体/荧光图像捕捉和分析系统,该系统可在体外模拟人体血液微循环。为了研究特定的白细胞粘附分子的粘附功能,可将其对应的内皮配体(在此也称为“内皮细胞分子”,或与载体或底物结合时称为“粘附底物”) 预涂于微流体通道的内表面。在全血中,与特异性白细胞标志物形成对比的荧光结合抗体可标记不同的白细胞亚群,因此,通过荧光显微镜可以同时多个白细胞亚群进行可视化。然后,可通过微流体通道以确定的流速灌注血液,并记录白细胞与预涂层内皮分子的相互作用。因此,例如,在通过微流体通道以确定的流速进行血液灌注期间,该测定可实时评估白细胞粘附功能。随后,可用

算法对记录的图像进行分析。之后,大量的细胞动力学参数可用于定量表征特异性白细胞亚群的粘附功能。例如,通过简单地替代预涂覆的底物,其他表达粘附分子的白细胞的粘附功能也可通过类似的方式进行评估。

[0145] 在本公开中,LAFA被用于识别新的标志物,以评估有炎症免疫反应的受试者(例如SIRS患者)的宿主免疫应答。LAFA产生了一系列新的标志物,这些标志物可用来确定个体患者的不同炎症免疫反应。本文公开的结果表明,LAFA可作为一种有用的工具,根据特定的炎症原因来区分患者,从而促进个人最佳疗法的发展。

[0146] 白细胞粘附功能测定可能有多种适合的类型。该方法可包括进行一次以上的白细胞粘附功能测定,以获得一个或多个结果。白细胞粘附功能测定可能包括一个或多个特定的试验,以获得集体结果。

[0147] 在某些示例性实施例中,白细胞粘附功能测定结果可能是半定量和/或定量的。

[0148] 白细胞粘附功能测定可实现以下一项或多项:表征白细胞募集;表征白细胞追踪;以及表征白细胞迁移行为——以半定量或定量的方式。

[0149] 在一些实施例中,白细胞粘附功能测定可能需要定量地确定白细胞的迁移。这可能包括检测、测量或观察以下一种或多种情况:白细胞栓系、滚动、缓慢滚动、牢固粘附、蠕动和跨内皮迁移。在某些实施例中,白细胞粘附功能测定可能需要检测、测量或观察下列一项或多项:白细胞平均速度、位移、加速度、减速度、方向、停留时间和直线度。

[0150] 相互作用的白细胞可通过速度分布来表征。例如,相互作用的白细胞按细胞平均速度(S_{mean})可分为5种相互作用类型:静态细胞($S_{\text{mean}} < 5\mu\text{m}/\text{min}$)、蠕动细胞($S_{\text{mean}} = 5\text{--}20\mu\text{m}/\text{min}$)、慢滚动细胞($S_{\text{mean}} = 20\text{--}300\mu\text{m}/\text{min}$)和滚动细胞($S_{\text{mean}} = 300\text{--}6000\mu\text{m}/\text{min}$)。此外,可使用直方图来显示细胞速度的分布。

[0151] 在某些实施例中,白细胞粘附功能测定法需要检测、测量和/或观察白细胞在现实生理条件下的迁移。

[0152] 在一些实施例中,该测定法允许同时检测不同的白细胞亚群。

[0153] 在某些实施例中,白细胞粘附功能测定涉及流动测定。作为白细胞粘附功能测定的一部分,血液样本可与一种或多种细胞染色剂、一种或多种化学物质(如锰,可诱导 $\alpha 4$ 整合素活化)一种或多种药物(具有或不具有可检测部分)、一种或多种抗体和/或一种或多种可检测部分或其他试剂或药剂进行预混、预处理或孵育。

[0154] 在一些实施例中,该方法可能包括用一种或多种药物、试剂或药剂在体外处理受试者(人或动物)血液,然后进行白细胞粘附功能测定。

[0155] 在一些实施例中,白细胞黏附功能测定可能会评估白细胞在现实生理条件下的迁移情况。

[0156] 在一些实施例中,白细胞粘附功能测定可能使用标记有与荧光团结合的抗体或其他可检测部分的白细胞。在一些实施例中,该测定可能需要检测带有结合到不同荧光团的亚群特异性抗体的白细胞不同亚群。例如,血液样本中可添加有一种抗体或抗体混合物和/或染色剂。例如,与特异性白细胞膜标志物形成对比的荧光标记抗体可在进行流动测定前添加到血液样本中。

[0157] 白细胞粘附功能测定法或流动测定法可使用一种合适类型的设备来检测、测量或观察白细胞迁移等,包括在现实生理条件下检测、测量或观察白细胞迁移等。以下文件描述

了适用的微流体测定和/或装置的例子:US 8,940,494;US 8,380,443;US 7,326,563;WO 92/21746;Vaidyanathan (2014)——这些参考文献的全部内容通过完整引用的方式纳入本文中。

[0158] 微流体装置可用于进行流量测定。在某些实施例中,流量测定需要使用具有一个、两个、三个、四个、五个、六个或更多微流体通道的微流控装置,例如,用于检测不同的白细胞亚群和/或粘附分子。

[0159] 在一些实施例中,可在微流控装置中测定血液样本,以模拟体内的血液流动。

[0160] 在一些实施例中,流量测定需要将血液样本拉或推到一个或多个微流体通道中,例如使用注射泵,以大约0.5至300dyne/cm²的剪切应力将血液样本拉或推到一个或多个微流体通道中,包括0.2、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50、60、70、80、100、150、200、300dyne/cm²。

[0161] 白细胞粘附功能测定可进行视觉分析,以表征白细胞的迁移行为、表征白细胞的追踪、或表征内皮粘附分子对白细胞的募集。可用合适的方法进行视觉分析。例如,可使用显微镜和图像记录器(例如视频或延时摄影)来实现可视化。可通过计算机分析图像记录器捕获的图像,对白细胞迁移行为、追踪、募集等进行分析。可确定粘附和/或非粘附白细胞的种类和数量,并记录和定量分析其个体的速度/行为。

[0162] 在一些实施例中,白细胞粘附功能测定需要在足以捕获白细胞细胞相互作用的一段时间内以高帧率获取图像。例如,该测定可能需要以每秒2帧的速度获取图像,并持续5分钟,以捕捉细胞相互作用的类型。在一些实施例中,白细胞粘附功能测定可能需要捕获白细胞的详细3D运动。在一些实施例中,白细胞粘附功能测定需要记录荧光显微镜时间序列。

[0163] 白细胞细胞动力学参数的推导方法如下:记录的图像时间序列提供了被检测到的相互作用白细胞,或被检测到的很大一部分相互作用白细胞的x、y、z(位置)和t(时间)坐标。通过使用数学算法如“最近邻法”在几个帧之间连接相同的白细胞的定位,可随着时间的推移追踪细胞,并获得各种参数来表征细胞的运动(如下列一项或多项:轨迹方向、长度、位移、持续时间、直线度、平均速度、加/减速度、定向和/或受限和/或随机运动类型)。这些参数可用来区分不同的白细胞亚群的运动性行为或药物治疗后运动性的变化。

[0164] 另外,还可使用其他检测白细胞的方法,如下所述:孙楠等人。(2012),其中的全部内容以完整引用的方式纳入本文。

[0165] 例如,内皮细胞分子可以以与载体或底物结合的重组蛋白的形式出现。在某些实施例中,本测定涉及使用固定在载体或底物上的多个内皮分子(可能包括脂质双层),而在其他实施例中,本测定可能涉及使用表达此类内皮细胞分子的实际细胞。关于固定到支架或底物上的内皮细胞分子,参考了许多技术,例如,Kim and Herr (2013),并在此以完整引用的方式纳入本文。此外,这些分子在以下文件中也有描述,其中全部内容以引用的方式纳入本文:US 8,940,494;US 8,380,443;US 7,326,563;以及WO 92/21746。

[0166] 在白细胞粘附功能测定中,可作为粘附底物(即与载体或底物结合)的内皮细胞分子包括但不限于以下一种或多种:

[0167] 1. 本文中已描述的粘附分子;

[0168] 2. 本文中提到的趋化因子;和

[0169] 3. 纯化抗原和人工抗原提呈细胞系统:

[0170] a. 纯化抗原: i) α 、 β 和 ϵ 毒素和 ii) 抗原CFA/I

[0171] b. 人工抗原提呈细胞系统, 如1) Thomas等人(2002)以及2) Turtle等人(2010)所公开的, 其中每一项在此通过引用完整地纳入本文;

[0172] 4. 其他可调节细胞间相互作用的分子(包括蛋白质); 和

[0173] 5. 本文中公开的趋化因子受体。

[0174] 在一些实施例中, 白细胞粘附功能测定可能需要检测、测量或观察白细胞表达的PSGL-1 (P-选择素糖蛋白配体-1) 及其内皮分子P-选择素和/或E-选择素之间的相互作用。

[0175] 在一些实施例中, 白细胞粘附功能测定可能需要定量评估 α 4整合素的粘附功能。

[0176] 在一些实施例中, 白细胞粘附功能测定可能需要检测、测量或观察白细胞 α 4整合素的表达和活性的增加。

[0177] 在一些实施例中, 白细胞粘附功能测定可能需要测量、检测和/或观察白细胞 α 4整合素和内皮VCAM-1之间的相互作用。

[0178] 在一些实施例中, 白细胞粘附功能测定可能需要检测、测量和/或观察CD11a (α L整合素) 和ICAM-1之间的相互作用。

[0179] 在一些实施例中, 白细胞粘附功能测定可能需要检测、测量或观察CD11b (α M整合素) 和ICAM-1之间的相互作用。

[0180] 在一些实施例中, 白细胞粘附功能测定需要检测、测量和/或观察 α 4 β 7整合素和MAdCAM-1之间的相互作用。

[0181] 在一些实施例中, 白细胞黏附功能测定可能需要检测、测量和/或观察细胞间粘附分子-1 (ICAM-1) 和/或血管细胞粘附分子-1 (VCAM-1) 及其白细胞粘附分子之间的相互作用。

[0182] 在一些实施例中, 白细胞粘附功能测定需要检测、测量和/或观察白细胞32整合素和其内皮分子之间的相互作用。

[0183] 白细胞粘附功能测定可能需要测量一种或多种特异性白细胞亚群, 如CD4、CD8和CD15细胞。

[0184] 在一些实施例中, 白细胞粘附功能测定法需要检测、测量或观察白细胞在细胞因子或趋化因子(如TNF α 和IL-4)活化的原代内皮细胞(如HUVEC)或固定内皮细胞系(如人微循环内皮细胞(HMEC))上的迁移行为。

[0185] 在一些实施例中, 白细胞粘附功能测定可能需要同时通过用特异性膜标志物标记亚群来检测、测量和/或观察不同的白细胞亚群。这些标志物可以是结合至不同荧光团的抗体。

[0186] 白细胞粘附功能测定可能包括一个或多个对照。所采用的对照的性质可能取决于测定的性质和采用测定的方法的性质。例如, 可从无疾病或不适(例如炎症或感染性疾病)的健康个体获得血液样本作为对照。例如, 可从未接受药物治疗(如抗炎症药物)的个体获得血液样本作为对照。例如, 对照可以给药前、接受药物治疗前、接受给药方案前或实施给药方案过程中获得的受试者血液样本。对照可以是血液样本, 包括来自不同个体(队列)的混合血液样本。

[0187] 在一些实施例中, 该方法/白细胞粘附功能测定可能需要执行以下步骤: 1. 用内皮分子预涂流动通道; 或如果处于内皮细胞模型, 在流动通道中种植和培养细胞, 并通过试剂

或炎症细胞因子或趋化因子(如TNF α)处理细胞来激活内皮粘附分子的表达;2.在不使用或使用不同剂量的药物(如小分子、抗体等)孵育流动通道的情况下,可改变内皮粘附分子的功能;3.从受试者身上采集血液;以及4.在药物治疗后的不同时间点进行白细胞粘附功能测定,以确定药物的效果(通过与无药物对照组进行比较)。

[0188] 白细胞和粘附分子

[0189] 白细胞包括但不限于下列一种或多种细胞:中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、CD4 T淋巴细胞、CD8 T淋巴细胞、调节性T细胞、B淋巴细胞、树突细胞、单核细胞和自然杀手细胞。

[0190] 白细胞粘附分子或其他白细胞结合分子包括以下一种或多种:选择素、整合素、趋化因子、趋化因子受体和其他类型的分子。因此,白细胞粘附分子包括但不限于下列一种或多种:PSGL-1、L-选择素、 α 1整合素、 α 2整合素、 α 3整合素、 α 4整合素、 α 5整合素、 α 6整合素、 α 7整合素、 α 8整合素、 α 9整合素、 α 10整合素、所有整合素、 α D整合素、 α E整合素、 α V整合素、 α X整合素、CD11a(α L整合素)、CD11b(α M整合素)、 β 1整合素、 β 2整合素、 β 4整合素、 β 5整合素、 β 6整合素、 β 7整合素、 β 8整合素、CD44、ESL-1、CD43、CD66、CD15s和ALCAM。

[0191] 内皮细胞分子

[0192] 内皮细胞分子包括以下一种或多种:选择素、细胞粘附分子(CAM)、趋化因子、趋化因子受体和其他类型的分子。因此,内皮分子包括以下一种或多种:E-选择素、P-选择素、VCAM-1、ICAM-1、ICAM-2、MadCAM-1、PECAM、GlyCAM-1、JAM-A、JAM-B、JAM-C、JAM-4、JAM-L、CD34、CD99、VAP-1、L-VAP-2、ESAM、E-LAM、钙粘蛋白和透明质酸。

[0193] 血液样本

[0194] 在一些实施例中,白细胞粘附功能测定需要约5-1000 μ l的全血,如5、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、100、120、150、200、300、400、500、750和1000 μ l。该方法可包括对从受试者获得的多个血液样本进行一次白细胞粘附功能测定或多次白细胞粘附功能测定。

[0195] 该方法可包括从受试者身上分离血液样本的步骤。这可通过各种合适的方式实现。例如,可通过刺破手指收集血液滴或静脉穿刺来获得血液。在某些实施例中,该方法可能会使用一滴血。在某些实施例中,可能需要少于100 μ L的血液来进行白细胞粘附功能测定,如5、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90或100 μ L。在某些实施例中,白血球粘附功能测定可能需要少于100 μ L的血液,例如少于5、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90或100 μ L。

[0196] 在某些实施例中,血液样本可以是全血,无论是否经过处理。在其他一些实施例中,血液样本是经过处理的样本,其中全血的一个或多个成分已经彼此分离。也就是说,在某些实施例中,血液样本可以是全血,而在其他实施例中,血液样本可包括(经处理/已处理)全血的一个或多个白细胞成分。在一个实施例中,血液样本是血浆。

[0197] 在某些实施例中,血液成分未与全血样本分离,以模拟体内血液。在某些实施例中,可使用分离的血细胞、培养的血细胞和/或血细胞系。

[0198] 可用于收集和存储血液样本的抗凝剂可能包括但不限于肝素、EDTA、ACD、柠檬酸盐、水蛭素、聚茴香脑磺酸钠和草酸钾/氟化钠。

[0199] 受试者

[0200] 受试者可以是哺乳动物或其他合适类型的动物。哺乳动物包括人类、灵长类动物、牲畜和农场动物(如马、羊和猪)、伴侣动物(如狗和猫)和实验室试验动物(如大鼠、小鼠和

兔子)。在某些实施例中,受试者为人。

[0201] 治疗受试者

[0202] 受试者可用一种对此特殊疾病已知的传统方法来治疗。此外,该受试者可以用非传统的方式来治疗。例如,根据LAFA分析的结果,可预测一种药物适合治疗患有某一特定疾病的受试者,尽管这种药物通常并不用于这种特定疾病。

[0203] 在一个实施例中,该方法包括至少部分基于至少一次LAFA,确定所述受试者具有非感染性炎症免疫反应,并针对所述非感染性炎症免疫反应对所述受试者进行治疗。治疗可包括对受试者施用抗炎组合物。抗炎组合物例子包括非甾体抗炎药物,包括塞来昔布、依托昔布、布洛芬、酮洛芬、萘普生、舒林酸和/或其组合,以及皮质类固醇。根据公认的医疗实践,该抗炎组合物可通过多种途径施用。首选的方式包括静脉注射、肌肉注射、皮下给药和经皮给药,使用在本领域中已知的技术。可设想其他的给药途径。在局部急性炎症治疗的情况下,非全身性给药可能是首选,在这种情况下,在急性炎症的部位或周围施用治疗组合物。

[0204] 在一个实施例中,该方法包括至少部分基于至少一次LAFA,确定所述受试者有感染性炎症免疫反应,并针对所述感染性炎症免疫反应对所述受试者进行治疗。对受试者进行感染性炎症免疫反应的治疗可包括使用适当的抗感染剂(如抗菌药物或抗病毒药物)对受试者进行治疗。治疗细菌感染的抗生素在本领域内是众所周知的,包括青霉素、头孢菌素、多粘菌素、

[0205] 利福霉素、闰年霉素、喹诺酮类、磺胺类、大环内酯类、林可酰胺类、四环素类和氨基糖苷类。

[0206] 在一个实施例中,该方法包括确定受试者患有败血症(即SIRS患者存在感染),并使用抗生素、血管加压素和皮质类固醇中的一种或多种对受试者进行治疗。合适的类固醇包括,但不限于,

[0207] 布地奈德、可的松、地塞米松、甲基强的松龙、强的松龙、泼尼松和/或其组合。

[0208] 确定炎症的原因

[0209] 由于外来病原体的入侵,感染性疾病患者的免疫系统高度激活,导致炎症加剧,白细胞粘附功能增强。

[0210] 在一个实施例中,本文描述的方法包括对来自受试者的血液样本进行至少一次白细胞粘附功能测定(LAFA),并且至少部分基于至少一次LAFA的结果,确定受试者炎症的原因。炎症的原因可通过分析LAFA测定中的细胞动力学参数来确定。在一些实施例中,LAFA测定包括通过检测白细胞标志物来分析白细胞亚群。

[0211] 在一个实施例中,该方法包括确定炎症的感染原因或非感染原因。在一些实施例中,该方法包括确定炎症的感染原因是细菌、病毒或寄生虫感染。在一个实施例中,该方法包括确定细菌、病毒或寄生虫的科、属或种。

[0212] 感染性疾病,包括但不限于:ICAM-1介导的感染,如鼻病毒感染、阿米巴脑膜脑炎、急性风湿热、炭疽、非典型分枝杆菌病、禽流感、巴贝斯虫病、细菌性阴道病、龟头炎、巴玛森林病毒感染、囊胚感染、肉毒杆菌中毒、布鲁氏杆菌感染、弯曲杆菌感染、水痘和带状疱疹、基孔肯雅病毒、唇疱疹(1型单纯疱疹)、普通感冒、结膜炎、隐孢子虫感染、巨细胞病毒(CMV)感染、登革热、贾第虫病、腺热、淋病、b型流感嗜血杆菌(Hib)、肝炎、手足口病、亨德拉病毒

感染、包虫病、人乳头瘤病毒 (HPV)、生殖器疣和相关的癌症、日本脑炎、昆津/西尼罗河病毒感染、麻风病、嗜肺性军团菌感染、钩端螺旋体病、李斯特菌感染、莱姆病、麻疹、脑膜炎球菌感染、接触传染性软疣、腮腺炎、生殖支原体感染、支原体肺炎支原体感染、中东呼吸综合征 (MERS)、非特异性尿道炎 (NSU)、诺如病毒感染、细小病毒B19感染、瘟疫、肺炎球菌感染、脊髓灰质炎病毒感染、鹦鹉热、寇热、狂犬病毒和澳大利亚蝙蝠狂犬病毒、呼吸道合胞病毒 (RSV) 感染、立克次体感染、玫瑰疹、罗斯河病毒感染、轮状病毒感染、风疹、沙门氏菌感染、脓疱疮、严重急性呼吸系统综合症、产志贺毒素大肠杆菌 (STEC)、溶血性尿毒综合征 (HUS)、志贺氏菌感染、天花、金黄色葡萄球菌, 包括耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (MRSA)、链球菌性喉咙痛、梅毒、破伤风、鹅口疮、中毒性休克综合征、弓形虫感染、滴虫感染、肺结核、土拉菌病、伤寒和副伤寒、尿路感染、副溶血性弧菌感染、病毒性肠胃炎、病毒性出血热、病毒性脑膜炎、病毒性呼吸道感染、疣、百日咳、蠕虫、黄热病、耶尔森氏菌感染、寨卡病毒感染或其组合。

[0213] 在一个特定实施例中, 从肠道细菌、沙雷菌属、假单胞菌属、大肠杆菌和金黄色葡萄球菌中的一种或多种引起的感染中选择细菌感染。

[0214] 在另一个实施例中, 该方法包括确定炎症的非感染性原因是心血管疾病、哮喘、出血、动脉瘤或肺炎。其他疾病和不良炎症反应的临床相关因素, 包括溶血性贫血、血液透析、输血、血液恶性肿瘤、肺炎、缺血后心肌炎症和坏死、气压损伤 (减压病)、溃疡性结肠炎、炎症性肠病、动脉粥样硬化、细胞因子诱导的毒性、坏死性小肠结肠炎、粒细胞输注相关综合症、雷诺氏综合征、继发于败血症或外伤的多器官损害综合征、急性化脓性脑膜炎、其他中枢神经系统炎症性疾病或其组合等相关状况。

[0215] 机器学习

[0216] 如上所述, LAFA可提供被检查细胞的视频数据, 机器学习 (ML) 可应用于视频数据。该视频数据可以是2048x2048像素, 帧率为50f/s, 也可以是682x682像素, 帧率相同或不同。但是, 需要注意的是, 其他分辨率, 包括矩形设置, 具有不同的帧率也适用。每一帧的分辨率可通过对相邻像素进行缩减采样和/或求和 (例如3x3块) 来降低, 从而在降低计算复杂度的同时增加强度和灵敏度。

[0217] 最大强度投影可应用于3D数据, 其中3D数据包含多个2D层, 如o CT或MRI扫描的切片图像。通过为每个2D像素位置选择在2D层上的最大强度, 将3D数据投影到2D空间上。在本文所述方法中, 从视频的每幅图像构成一个二维层意义上说, 第三维是时间维。换句话说, 视频的帧被叠加以创建一个单一的图像, 而跨其他帧的最大强度被选择为输出图像的像素的强度。因此, 如果一个细胞因为被激活而不移动, 那么单个图像就会在一个恒定的细胞位置处显示一个亮点。相反地, 如果细胞因为没有被激活而移动, 那么单个图像将沿着移动路径显示一条线。当然, 如果移动是非线性的, 这可能是一条曲线。

[0218] 如果细胞相对于视频的帧率移动缓慢, 那么线将是实线, 因为代表各时刻细胞的点会重叠。另一方面, 如果细胞相对于视频的帧率移动得很快, 这条线将被点化, 因为当细胞在帧之间移动超过一个细胞直径时, 代表各时刻细胞的点会彼此间隔开。

[0219] 当与卷积神经网络 (CNN) 结合使用时, 这种在单一二维图像上的投影特别有用, 因为卷积神经网络可以利用图像中的结构特征。特别地, CNN在图像的各层上工作, 其中第一层可能具有整体亮度。对于活化细胞, 随着更多的细胞附着在底物上, 亮度会更高。因此, ML

可使用亮度作为细胞活化的指标。在第二层中,CNN可考虑线的特征,如果细胞的移动形成了一条线,ML可将其视为细胞未活化的标志。

[0220] 虽然这是有关单一图像结构特征的相对具体的描述,值得注意的是,对执行该方法而言,并不需要知道这一点。在对已合并成单个图像的样本进行训练时,会自动使CNN适应这些特征,并将这些特征作为区分感染性和非感染性炎症免疫反应的最佳参数。

[0221] 在另一个例子中,例如,通过使用TrackMate,LAFA视频数据被用来执行细胞追踪。每个细胞追踪输出参数,如细胞密度(即点数)、速度、扩散系数、直线度、停留时间(即持续时间)、轨迹长度(即位移)等,都可以用作机器学习特征。在机器学习过程中可能结合不同的特征,比如随机森林法。随机森林包括多棵树,这些树是具有节点和边的图结构。每个节点代表一个特征(即细胞追踪参数),通过边连接来定义一个决策路径。在训练阶段通过特征选择来创建树。在评估阶段,将每棵树的输出与其他树的输出相结合,以形成最终的分类器。

[0222] 尽管我们注意到,活化细胞和非活化细胞可以根据单一参数(如速度)进行分类,但这可能不适用于其他应用,如其他疾病。需要分类/区分的疾病越多,或疾病特征值越相似,可能使用的参数/维度就越多。这就是随机森林法的力量变得重要的地方,因为其可以包括大量的参数,但没有过度拟合的问题。

[0223] 在一个示例中,根据后续图像中细胞的位置计算瞬时速度。速度值可用于计算汇总值,如平均值、中位值、最大值、最小值、高速(如中位值以上)、更高速(如70%以上)、波动、总波动和正波动。仅当轨迹长于预定义的阈值,才计算这些值,如帧。还可计算速度的对数,例如以10为底(或其他底)的对数,对于速度小于1的速度,会将速度值转换为负数,对于速度大于1的速度,将会将速度值转换为正数。以10为底的对数的速度从正变化到负的次数除以被记录的细胞(检测到时的帧数)的记录时间,然后用作波动特征。

[0224] 综上所述,有13个可用特征:平均值、中位值、最大值、最小值、高速、更高速、波动、总波动、积极波动、点数、持续时间、位移和初始均值。对于每一个短轨迹(10-20帧)、中轨迹(21-50帧)和长轨迹(>50帧),都可确定这些特征。这形成了39个特征。再加上所有轨迹的平均值、最大值、最小值以及轨迹数,总共有43个特征。这种分析现在可针对不同的细胞类型重复,如CD4、CD8和CD19,结果形成了每个患者 $43 \times 3 = 129$ 个特征。

[0225] 通过对患者的诊断以及相应特征的标注,可生成训练数据。然后可使用此训练数据随机选择种子样本来创建随机森林。随机森林中的每棵树都有特征变量,这取决于该树的种子。然后可使用整个训练集来训练随机森林。即,使用训练数据的不同亚群选择各随机森林中的特征,然后使用整个训练集进行实际训练。

[0226] 现有的随机森林实现可用于优化特征选择、种植和训练,比如来自scikit-learn(cikit-learn.org)的sklearn.ensemble.RandomForestClassifier或Java实现

[0227] <http://weka.sourceforge.net/doc.dev/weka/classifiers/trees/RandomForest.html>。

[0228] 示例

[0229] 示例1方法及材料

[0230] 白细胞粘附功能测定(LAFA)方案

[0231] 白细胞粘附功能测定(LAFA)可定量评估在流动条件下白细胞与其他蛋白和/或分

子(如粘附分子、趋化因子和/或相关肽,在测定中称为粘附底物)相互作用的能力。相互作用的白细胞通常通过与白细胞膜上特异性标志物形成对比的荧光结合抗体标记可视化,因此细胞可通过荧光显微镜进行检测(图1)。用于检测特异性白细胞亚群的抗体的例子详见表1。这些抗体可联合使用,也可单独使用。在一些实验中,与其他膜蛋白形成对比的荧光结合抗体也可用于评估这些细胞表面蛋白的表达水平。

[0232] 为了在体外模拟血液微循环,采用了微流控系统,该系统由微流体泵和微流控芯片/通道组成。在微流体通道的底部预涂粘附底物,然后由微流体泵将白细胞拉入通道,已让白细胞与预涂粘附底物发生相互作用(图1)。荧光显微镜记录这些相互作用,并使用图像分析软件对图像进行分析。因此,细胞的相互作用行为可用一系列的细胞动力学参数来描述,据此可定量评估白细胞与特定粘附底物相互作用的能力。此外,为了评估白细胞膜蛋白的表达,

[0233] 表1用于鉴别特异性白细胞亚群的膜标志物示例。

[0234]

标志物	白细胞亚群
CD4	CD4+细胞
CD8	CD8+细胞
CD15、CD16	中性粒细胞 (CD15+CD16+)
CD15、CD16	嗜酸性粒细胞 (CD15+CD16-)
CD14、CD16	CD14+CD16-经典型单核细胞
CD14、CD16	CD14+CD16+非经典型单核细胞
CD19	CD19+B细胞
CD4、CD25	CD4+CD25+淋巴细胞
CD8、CD25	CD8+CD25+淋巴细胞

[0235] 可在同一荧光显微镜下评估相互作用的白细胞上相对于这些蛋白的抗体的荧光强度。

[0236] 试剂和粘附底物

[0237] a) 用作LAFA粘附底物的蛋白详见表2。这些底物可联合使用,也可单独使用。库存货物储存在-80℃,若已过储存时间,则按照制造商的建议丢弃。禁止反复冷冻-解冻

[0238] 表2用于LAFA的粘附底物。显示了涂覆浓度和储备浓度。

[0239]

蛋白	涂覆 浓度	制造商	目录号	储备 浓度
Hu VCAM-1	10 μ g/ml	R&D	ADP5	1mg/ml
Hu MAdCAM-1	14 μ g/ml	Origene	TP319060	多种
Hu IL-8	1 μ g/ml	R&D	208-IL	0.1mg/ml
Hu SDF-1 α	1 μ g/ml	R&D	350-NS	0.1mg/ml
Hu E-选择素	0.5 μ g/ml	R&D	ADP1	1mg/ml
Hu P-选择素	10 μ g/ml	R&D	ADP3	1mg/ml
Hu ICAM-1	10 μ g/ml	PeporTech	150-05-50	1mg/ml

[0240] a) Hanks5平衡盐溶液 (HBSS) (Sigma, 目录号:H1387) 将一包HBSS粉末复溶到1升水中,并在4℃冰箱中保存。

[0241] b) 微流控芯片:(微流控芯片店,目录号:01-0178-0152-01)、PMMA、盖子厚度(175 μ m)、直通道芯片(16个平行通道)、迷你鲁尔接口、宽度(1000 μ m)/深度(200 μ m)/长度(18mm)。

[0242] c) 芯片入口:

[0243] i. 迷你鲁尔至鲁尔适配器:可容纳70 μ l

[0244] ii. 迷你鲁尔至鲁尔500 μ l罐;可容纳达500 μ l

[0245] d) MnCl₂, (Sigma, 目录号:450995)

[0246] 制作0.5M储备液,用全血1:100稀释(5mM为最终浓度)。

[0247] e) 荧光结合抗体检测特异性白细胞亚群

[0248] i. 抗-CD4-Alexa488 (BD, 目录号:557695)

[0249] ii. 抗-CD8-PE (BD, 目录号:555635)

[0250] iii. 抗-CD15-APC (BD, 目录号:551376)

[0251] iv. 抗-CD19-BV510 (BD, 目录号:562947)

[0252] v. 抗-D16-BV510 (BD, 目录号:360723)

[0253] vi. 抗-CD25-APC (BD, 目录号:560987)

[0254] 微流控芯片的制备

[0255] a. 根据需从-80℃冰箱中解冻蛋白质储备液,然后用HBSS稀释至涂覆浓度,如表2所示。

[0256] b. 用15 μ l的稀释溶液预涂每个微流体通道,在4℃下放置一夜。

[0257] c. 芯片上的第一个通道留空,用于自动聚焦InCell。

[0258] d. 第二天,在用于LAFA之前,用HBSS清洗所述通道一次。

[0259] 血液采集

[0260] a. 通过静脉穿刺收集7-10ml全血,收集2ml于EDTA管中(用于全血细胞计数),收集

2ml于肝素锂管中(用于LAFA)。

[0261] b.如果使用蝴蝶针采血,血液采集在EDTA管和肝素管中,例如,2ml的血液采集在EDTA管中,5ml的血液采集在肝素管中。

[0262] c.采血后置于室温($\sim 20^{\circ}\text{C}$)下保存,并于采血后8小时内使用。

[0263] d.避免剧烈摇动血管,因为可能会活化血细胞。

[0264] 血液预处理和标记

[0265] a.对于每次测定,都需要130 μl 肝素化血液。

[0266] b.在一些实验中,血液需要在室温(RT)下被5mM Mn活化5分钟后才能用于测定

[0267] c.以下标志物可单独或以下列一种或多种组合的形式添加到全血中,室温条件下孵育5分钟:

[0268] -抗CD4-Alexa488 (2 μl /100 μl 全血)

[0269] -抗CD8-PE (1.5 μl /100 μl 全血)

[0270] -抗CD15-APC (3 μl /100 μl 全血)

[0271] -抗CD19-BV510 (2 μl /100 μl 全血)

[0272] -抗CD16-BV510 (0.2 μl /100 μl 全血)

[0273] -抗CD25-APC (0.15 μl /100 μl 全血)

[0274] d.如测试药物效果,需要在测定前将药物添加到血液中并孵育。根据药物的性质,孵育所需的时间和温度可能有所不同。在Mn实验中,需要在Mn处理后至少5分钟添加药物。

[0275] LAFA测定

[0276] a.将芯片放入InCell 2200的载玻片托架中。将顶部和底部的加热器都打开至39 $^{\circ}\text{C}$ (使载玻片温度达到35.5 $^{\circ}\text{C}$)。

[0277] c.将血液样本装入芯片的入口

[0278] d.将芯片出口连接到微流体泵上

[0279] e.在InCell软件中打开方案

[0280] f.找到焦点

[0281] g.以0.6ml/小时的速度启动泵/血液灌注,使用带有16计量注射针的10ml注射器,提供1.5dyn/cm²的剪切应力。

[0282] h.开始记录

[0283] 视频分析

[0284] a.打开Fiji开源图像分析软件。如以前未使用过Fiji,请在开始分析之前,下载并安装适合所使用的操作系统的版本

[0285] (<https://imagej.net/Fiji/Downloads>)。

[0286] b.在追踪分析之前,将“TrackMate_3.6.1-SNAPSHOT-sources.jar”,“TrackMate_3.6.1-SNAPSHOT-tests.jar”以及“TrackMate_3.6.1-SNAPSHOT.jar”添加到Fiji>插件文件夹中。

[0287] c.通过拖放到Fiji中来打开宏观化“Pre-process—Flow+ijm”。

[0288] d.设置通道数量,并根据文件名顺序指定通道。

[0289] e.单击“运行”,选择文件夹目录。

[0290] f.当出现提示时,调整ROI以包括通道中心并排除通道边缘。按“OK”按钮。

- [0291] g. 当宏观化完成时, 可从每个实验的单个通道生成一组“TIF”文件。
- [0292] h. 对于需要使用包含或排除标准进行分析的实验, 运行创建新通道宏观化。
- [0293] -CD15+CD16+、CD15+CD16-、运行宏观化
- [0294] -Create_CD15+CD15+—CD15+CD16—Channel.ijm’
- [0295] -CD4+CD25+, 运行宏观化 ‘Create—CD4-25—Channel.ijm’
- [0296] i. 要追踪细胞, 请拖动“TrackMate_Batch.py”文件至Fiji中。
- [0297] j. 在第33行指定追踪模板文件“Expt1_anti-flow.xml”的目录, 图像文件夹在第69行。
- [0298] k. 当运行完成时通过转到Fiji>插件>追踪>加载TrackMate文件, 来检查追踪信息。然后选择追踪文件以确保宏观化正确完成。
- [0299] l. 然后可在R中分析TrackMate.csv文件。
- [0300] 次级数据分析
- [0301] a. 打开R
- [0302] b. 打开“FlowAnalysis_GUI_v9.R”。
- [0303] c. 转至“流分析”窗口
- [0304] d. 从“分析类型”菜单中选择“批处理”
- [0305] e. 点击“浏览工作目录”, 选择要分析的文件所在的文件夹。
- [0306] f. 单击包含从前面步骤获得的追踪数据的文件夹, 然后按“OK”
- [0307] g. 按“批处理”按钮。
- [0308] 参数可在汇总表中生成, 每个参数的个体细胞数据可在单独的电子表格中生成。
- [0309] 示例2用于白细胞粘附功能测定 (LAFA) 的微流控系统
- [0310] 本例是针对用于白细胞粘附功能测定的微流控系统。LAFA是一个独立的微流体/荧光图像捕捉和分析系统, 可在体外模拟人体血液微循环。
- [0311] 如图1所示, 微流体通道被预涂上了粘附底物, 如内皮粘附分子和趋化因子。使用与特异性白细胞膜标志物 (如CD4、CD8和CD15) 形成对比的不同荧光团结合抗体对白细胞进行标记, 从而可以同时检测这些白细胞亚群。然后, 白细胞以确定的流速通过微流体通道灌注, 使白细胞与预涂覆的粘附底物能够发生相互作用, 荧光视频显微镜将其数字化地记录下来。相互作用的细胞的行为可通过使用软件进行分析, 该软件包含细胞动力学参数和定量表征白细胞/配体的相互作用动力学
- [0312] 示例3执行LAFA图像和数据分析的工作流程
- [0313] 本例旨在提供一个示例流程图, 用于进行白细胞粘附功能测定 (LAFA) 的图像和数据分析。用荧光显微镜记录图像, 然后按照步骤进行进一步分析 (图2)。
- [0314] 根据所需的输出和速度, 可以使用不同的分析管道。
- [0315] a) 常规分析管道 (图2A)
- [0316] Fiji图像分析软件和R-studio软件用于处理和分析在白细胞粘附功能测定 (LAFA) 过程中生成的图像, 这样可确定一系列的细胞动力学参数, 并用于表征细胞迁移行为。
- [0317] 例如, 图像和数据分析过程可能包括以下步骤:
- [0318] 1. 用显微镜捕获的原始TIF图像在Fiji图像分析软件中打开, 并重新组织成延时

序列。

[0319] 2.应用了正确的缩放信息。通过裁剪从图像中去除流动通道边缘。采用图像扁平化算法去除不均匀的背景荧光。

[0320] 3.图像序列被分割成单独的通道进行分析。

[0321] 4.来自Fiji软件的TrackMate插件用于追踪个体细胞与每个通道的细胞大小和强度阈值。

[0322] 5.通过R统计软件包对TrackMate的输出进行进一步分析,将数据转换为一系列细胞动力学参数(包括但不限于细胞数量、速度、直线度、停留时间、扩散系数)所需的测量单位。

[0323] 6.生成描述性统计图(如动力学参数的盒须图、速度分布直方图、直线度分布直方图、持续时间直方图、停留时间分布直方图、运动曲线、共源图、外观图)。

[0324] 此外,还可以使用其他图像软件对图像进行分析并生成结果。批处理脚本准备就绪,可采用一劳永逸的方法自动化图像分析;当图像被处理和分析后,按下按钮开始分析,然后收集分析结果。

[0325] b)就图像进行机器学习训练(图2B)

[0326] 使用Python中的TensorFlow开发并训练了一种基于原始图像

[0327] 延时序标准差投影的机器学习算法。

[0328] 例如,图像和数据分析过程可能包括以下步骤:

[0329] 1.对于每个实验,显微镜捕获的原始TIF图像被转换为标准差投影。

[0330] 2.根据已知疾病状态(“基础”或“异常”)数据的标准差投影进行算法训练。重要的是,该步骤仅第一次需要。算法训练完成后,可忽略步骤2,立即得到结果(步骤3)。

[0331] 3.算法预测未知数据集的“基础”或“异常”状态。

[0332] c)就追踪结果进行机器学习训练(图2C)

[0333] 利用R软件中的RandomForest包开发并训练一种基于TrackMate追踪结果的机器学习算法。

[0334] 例如,图像和数据分析过程可能包括以下步骤:

[0335] 1.利用常规分析管道(a)对捕获的原始TIF图像进行分析。

[0336] 2.就已知疾病状态(“基础”或“异常”)数据的追踪结果(在步骤4a中获得)训练算法。重要的是,该步骤仅第一次需要。算法训练完成后,可忽略步骤2,立即得到结果(步骤3)

[0337] 算法可预测未知数据集的“基础”或“异常”状态。

[0338] 示例4Mn²⁺活化 α 4 β 1整合素在VCAM-1底物上的粘附功能

[0339] 本例旨在测试白细胞粘附功能测定法(LAFA)定量评估Mn²⁺诱导活化白细胞 α 4 β 1整合素的能力。在使用VCAM-1作为粘附底物用于LAFA之前,健康志愿者全血中的白细胞用5mM MnCl₂(泛整合素活化剂)进行处理或不用5mM MnCl₂进行处理。除非另有说明,所使用的方案在方法和材料章节中均有规定。。

[0340] 以下标准用于定义健康受试者:

[0341] 1.由包括病史在内的医学评估确定的显著健康

[0342] 2.未处于怀孕或正在哺乳期的妇女

[0343] 3.未被诊断有自身免疫、炎症、血液和血管疾病

[0344] 4. 目前未服用处方药物, 避孕药具除外

[0345] 5. 目前未服用可能影响血细胞功能的非处方药物, 包括抗组胺药、阿司匹林等。维生素补充剂对本研究来说是可接受的。

[0346] 6. 目前无上呼吸道感染(即普通感冒)、发烧或已知过敏反应

[0347] 7. 近期(最近5年)无吸烟史

[0348] Mn^{2+} 是一种泛整合素活化剂, 可活化白细胞膜上的 $\alpha 4\beta 1$ 整合素, 从而导致 $\alpha 4\beta 1$ 整合素与内皮配体VCAM-1的结合活性增加。为了测试该系统检测 Mn^{2+} 诱导 $\alpha 4$ 整合素活化的能力, 健康志愿者的肝素化全血在室温(20℃)下用或不用 Mn^{2+} 处理约5分钟, 然后在VCAM-1底物上进行LAFA。为了同时检测多种特异性白细胞亚群, 将与特异性白细胞膜标志物形成对比的彩色荧光标记抗体添加到人全血中, 并在室温下孵育约5分钟, 然后进行流动测定。在荧光显微镜下观察白细胞, 例如根据特异性荧光波长的不同来区分不同的白细胞亚群。

[0349] 如图3A所示, 与未处理的对照组相比, Mn^{2+} 并没有显著改变白细胞亚群中相互作用的细胞的数量(CD8细胞有小幅下降($p < 0.05$)除外), 这表明仅靠细胞密度可能不足以准确评估 Mn^{2+} 对白细胞粘附功能的影响。另一方面, 与未处理对照组相比, Mn^{2+} 处理组CD4($p < 0.01$)、CD8($p < 0.01$)和CD19($p < 0.01$)的细胞速度显著降低。这些结果表明, Mn^{2+} 增强了 $\alpha 4\beta 1$ 整合素配体结合能力和细胞-VCAM-1相互作用, 导致细胞迁移速度降低。

[0350] 扩散系数是一种细胞的动力学参数, 可度量细胞在随机游走过程中从起始点移动有多快, 并描述细胞的运动是随机的(低扩散系数值)还是直接的(高扩散系数值)(Kucik, 1996; Beltman, 2009)。如图3C所示, 与对照组相比, Mn^{2+} 处理显著降低了CD4、CD8、CD19和CD4+CD25+细胞的扩散系数值, 这表明 Mn^{2+} 对细胞迁移有抑制作用。同样地, 在 Mn^{2+} 的作用下, 除CD14和CD4+CD25+细胞外, 其他白细胞亚群的细胞直线度(定义为细胞位移与细胞轨迹长度之比)均显著降低(图3D)。这些结果表明, Mn^{2+} 处理活化了 $\alpha 4\beta 1$ 整合素粘附功能, 导致细胞与VCAM-1的相互作用增强。

[0351] 此外, Mn^{2+} 增加了CD15+CD16+、CD4、CD8和CD4+CD25+细胞的停留时间(图3E), 支持这一观点: Mn^{2+} 可活化白细胞 $\alpha 4\beta 1$ 整合素, 使细胞与VCAM-1底物结合更强, 进而抑制细胞运动。与之一致的是, 相比未处理的对照组(图3F), CD4、CD8和CD19细胞的轨迹长度在 Mn^{2+} 作用下减少, 表明细胞活动性受到抑制。在细胞动力学参数方面, 未检测到 Mn^{2+} 处理对CD14细胞的影响(图3A-F), 这表明 $\alpha 1\beta 7$ 整合素在调控CD14细胞募集方面发挥了独特作用。

[0352] 总之, 这些结果表明, 例如, LAFA能够定量评估一系列白细胞亚群的 Mn 诱导 $\alpha 4\beta 1$ 整合素活化。LAFA检测 Mn^{2+} 对不同白细胞亚群特定细胞动力学参数的特异性影响的能力表明, LAFA具有良好的灵敏度和特异性。在例6到11中, LAFA(VCAM-1)可用于评估 $\alpha 4\beta 1$ 整合素的粘附功能。

[0353] 示例5 Mn^{2+} 活化 $\alpha 4\beta 7$ 整合素在MAdCAM-1底物上的粘附功能

[0354] 本例旨在测试白细胞粘附功能测定法(LAFA)定量评估 Mn^{2+} 诱导激活白细胞 $\alpha 4\beta 1$ 整合素的能力。在使用MAdCAM-1作为粘附底物用于LAFA之前, 健康志愿者全血中的白细胞用5mM $MnCl_2$ (泛整合素活化剂)进行处理或不用5mM $MnCl_2$ 进行处理。除非另有说明, 使用的方案如方法和材料部分所述。

[0355] 为了表征 Mn^{2+} 对 $\alpha 4\beta 7$ 整合素粘附功能的影响, 我们使用了一系列细胞动力学参数来确定细胞在MAdCAM-1底物上的迁移行为。如图4A所示, 与未处理的对照组相比, Mn^{2+} 处理

显著增加了CD4和CD8细胞的数量。这些结果表明, Mn^{2+} 活化了CD4和CD8细胞上 $\alpha 4\beta 7$ 整合素, 导致细胞与MAdCAM-1底物的结合能力增加, 这与已知的 Mn^{2+} 对 $\alpha 4\beta 7$ 整合素的作用是一致的。

[0356] 相似地, 与对照组相比, 由于 Mn^{2+} 的处理作用, CD4和CD8细胞的细胞速度和扩散系数均显著降低, 而停留时间显著增加(图4B、4C和4E)。这些结果支持这一观点: Mn^{2+} 增强 $\alpha 1\beta 7$ 整合素粘附功能以及细胞-MAdCAM-1之间的结合, 从而抑制细胞运动。值得注意的是, Mn^{2+} 处理后, 仅CD8细胞(不包括CD4细胞)的直线度和轨迹长度下降, 这说明 $\alpha 1\beta 7$ 整合素在调节CD4细胞和CD8细胞迁移方面的作用可能有所不同(图4D和4F)。我们没有检测到 Mn^{2+} 对CD15+CD16+细胞(中性粒细胞)迁移行为有什么影响(图4A-4F), 这表明与CD4和CD8细胞相比, $\alpha 4\beta 7$ 整合素在中性粒细胞募集调控方面的作用有所不同。总之, 这些结果表明, 例如, LAFA能够定量评估 $\alpha 4\beta 7$ 整合素在几个不同白细胞亚群中的活化(由Mn诱导)。然后用LAFA (VCAM-1) 评估 $\alpha 4\beta 1$ 整合素的粘附功能, 如下面的一些例子所述。

[0357] 示例6以VCAM-1为底物通过LAFA评估SIRS患者白细胞粘附功能

[0358] 本例旨在测试白细胞粘附功能测定法(LAFA)检测全身炎症反应综合征(SIRS)患者免疫反应是否升高的能力。采集健康志愿者和SIRS患者的血样, 在VCAM-1底物上用LAFA进行分析。除非另有说明, 所使用的方案在方法和材料章节中均有规定。。

[0359] 通过筛选新入住重症监护病房(ICU)的患者, 共招募14例SIRS患者参与本研究。无论炎症的病因是什么, 只要符合以下四个标准中的两个以上, 患者就符合本研究的条件:

[0360] 1. 体温 $>38^{\circ}\text{C}$ 或 $<36^{\circ}\text{C}$

[0361] 2. 心率 $>$ 每分钟90

[0362] 3. 每分钟呼吸率 >20 次或 $\text{PaCO}_2 < 32$ 毫米汞柱。

[0363] 4. 白细胞计数 $>12000/\text{mm}^3$ 或 $<4000/\text{mm}^3$ 或 $>10\%$ 杆状核细胞。

[0364] 在首次发现全身炎症反应后48小时采集血样。

[0365] 根据制造商的说明, 使用迈瑞BC500 0血液分析仪对血液样本进行全血细胞计数。如图5A所示, 与健康对照组相比, SIRS患者的总白细胞计数升高, 主要是由于中性粒细胞计数升高所致。同样地, SIRS患者的中性粒细胞百分比也高于健康对照组(图5B)。此外, 与健康对照组相比, SIRS患者的淋巴细胞计数和百分比显著降低(图5A和5B)。另一方面, 检测到SIRS患者的单核细胞计数显著升高(图5A), 而未观察到SIRS患者和健康对照组的单核细胞百分比有差异(图5B)。

[0366] 然后使用VCAM-1作为底物, 用LAFA对血液样本进行分析。如图6A所示, 与健康对照组相比, SIRS患者的CD15+CD16+中性粒细胞的细胞密度明显升高, 而相互作用CD8细胞略有下降。然而, 当使用适当的白细胞计数使细胞密度标准化时, 未检测到对照组和SIRS患者之间有细胞类型的差异(图6B)。

[0367] 特异性白细胞在总相互作用细胞中的百分比也被测定。我们发现, 与健康对照相比, SIRS患者的相互作用的中性粒细胞比例明显较高, 而CD4细胞的比例较低(图6C)。此外, 募集因子(R因子)是一个特定白细胞群体募集倾向的指标, 并按(细胞类型%)/(循环中细胞类型%)计算R因子(Ibbotson, 2001)。从图6D可看出, 与健康对照组相比, SIRS患者的中性粒细胞(CD15+CD16+)和淋巴细胞(CD4、CD8、CD19细胞之和)的R因子值均明显更高。例如, 这些发现表明, SIRS患者的中性粒细胞 $\alpha 4\beta 1$ 整合素粘附功能增强, 从而导致中性粒细胞与VCAM-1底物相互作用能力增强。

[0368] 接下来,使用一系列的细胞动力学参数来确定SIRS患者细胞粘附功能升高。如图6E所示,与健康对照组相比,SIRS患者的CD15+CD16+细胞(中性粒细胞)的速度明显更低,表明SIRS中性粒细胞上 $\alpha 4\beta 1$ 整合素活性增强。SIRS患者中性粒细胞的扩散系数和直线度下降(图6F和6G)进一步支持了这一观点,表明细胞活动性受到抑制。这些结果提示SIRS患者CD15+CD16+细胞上 $\alpha 4\beta 1$ 整合素粘附功能异常升高,可作为确定SIRS患者免疫反应是否升高的标志物。

[0369] 另一方面,与健康对照组相比,SIRS患者的CD4、CD8和CD4+CD25+细胞速度较高,这表明SIRS患者 $\alpha 4\beta 1$ 整合素粘附功能降低(图6E)。同样的,与健康对照组相比,SIRS患者的CD4和CD8细胞的扩散系数和直线度更高,而停留时间更短,这表明在SIRS患者 $\alpha 4\beta 1$ 整合素活性较低(图6F、6G和6H)。上述结果表明CD4细胞和CD8细胞上的 $\alpha 4\beta 1$ 整合素在调控SIRS患者炎症反应增强方面可能发挥了不同的作用。

[0370] 总之,这些结果证明了LAFA有产生一系列细胞动力学标志物的能力,所述标志物可用于鉴定SIRS患者 $\alpha 4\beta 1$ 整合素的活化。

[0371] 示例7利用VCAM-1作为底物,通过LAFA来区分非感染性SIRS和感染性SIRS

[0372] 本例旨在测试白细胞粘附功能测定(LAFA)区分非感染性SIRS和感染性SIRS和/或健康受试者的能力(以VCAM-1作为底物)。根据其临床记录(详见例8),对14例SIRS患者(与例6相同的队列)中的每例患者进行回顾性评估,以确定其是否属于:

[0373] 1. “非感染性”组:不太可能感染或

[0374] 2. “感染性”组:已证实感染(如微生物阳性结果)或

[0375] 3. “未知”组:可能感染,但未证实。

[0376] 因此,通过在VCAM-1底物上用LAFA确定所述3组不同的 $\alpha 4\beta 1$ 整合素活性。

[0377] 如图7A所示,三组SIRS患者的总白细胞计数均明显高于健康对照组,主要原因是中性粒细胞计数升高。与健康对照组相比,感染组和未知组淋巴细胞计数更低,而非感染组和健康组之间没有差异(图7A)。另一方面,非感染组和感染组的单核细胞计数高于健康对照组,但未知组的单核细胞计数不高于健康对照组(图7A)。

[0378] 经过LAFA分析,确定了多个白细胞亚群的相互作用细胞的总数。如图7B所示,感染组和未知组相互作用的中性粒细胞百分比明显高于健康对照组,而非感染组则并非如此,这表明感染性SIRS患者的嗜中性粒细胞 $\alpha 4\beta 1$ 整合素被特异性活化。上述结果与之前的发现一致,即对于败血症患者来说,VCAM-1对中性粒细胞的募集异常增强(Ibbotson, 2001),这表明中性粒细胞上 $\alpha 4\beta 1$ 整合素活化可作为区分感染SIRS和非感染SIRS的标志物。

[0379] 我们还注意到,与健康对照组相比,三个SIRS组的相互作用淋巴细胞的百分比显著下降(图7B)。感染组的淋巴细胞百分比也明显低于非感染组,这也可作为区分感染SIRS和非感染SIRS的标志物。相似地,感染性SIRS组CD4细胞的细胞密度,无论是否通过淋巴细胞计数标准化,都低于健康对照组(图7D和7E)。

[0380] 此外,感染组相互作用的单核细胞百分比低于健康组和非感染组(图7B)。相似地,与健康对照组相比,感染组标准化的CD14细胞密度也较低(图7E)。这些发现表明,VCAM-1诱导的单核细胞募集减少也可作为标志物来区分非感染性SIRS和感染性SIRS。

[0381] 也采用多种细胞动力学参数来确定三个SIRS组的不同 $\alpha 4\beta 1$ 整合素的粘附功能。如图7F所示,非感染性SIRS患者的CD14、CD4、CD8、CD4+CD25+细胞的细胞速度明显高于健康对

照组,但感染性SIRS组未见明显增高。

[0382] 感染性SIRS组CD4和CD4+CD25+细胞的速度也明显低于非感染性SIRS组(图7F)。

[0383] 同样,感染性SIRS组的CD14、CD4、CD8和CD4+CD25+细胞的扩散系数均高于健康对照组,但非感染性SIRS组低于健康对照组(图7G)。与非感染性SIRS组相比,感染性SIRS组CD4、CD19和CD4+CD25+细胞的扩散系数明显降低

[0384] (图7G)。相似地,非感染性SIRS组的CD4、CD8和CD4+CD25+细胞直线度明显高于健康对照组,而感染性SIRS组与健康对照组之间无此差异(图7H)。

[0385] 此外,感染性SIRS组CD19细胞的速度低于非感染性SIRS组(图7F)。相似地,感染性SIRS组CD19细胞的扩散系数和停留时间低于健康对照组,而非感染性SIRS组与健康对照组之间无此差异(图7G和7I)。

[0386] 总之,这些结果证明了LAFA能产生一系列新的标志物来评估三个SIRS组的 $\alpha 4\beta 1$ 整合素粘附。LAFA已鉴定了许多有用的细胞动力学标志物,可用于区分非感染性SIRS患者和感染性SIRS患者。

[0387] 示例8在VCAM-1底物上通过LAFA使用单细胞图谱来区分个体SIRS病人特异性细胞粘附功能

[0388] 本例旨在使用由白细胞粘附功能测定(LAFA)产生的单细胞图谱来确定个体SIRS患者的特异性细胞粘附功能。采集健康志愿者和SIRS患者的血样,然后在VCAM-1底物上用LAFA进行分析。除非另有说明,所使用的方案在方法和材料章节中均有规定。。

[0389] 对于采集的每一份SIRS患者血样都进行了标准的微生物检测,以确定潜在的感染阳性结果。结合临床记录,由两位经验丰富的ICU专家独立确定个体SIRS患者的潜在炎症原因。作为结果,每个SIRS患者发生全身免疫反应的潜在原因列在表3中。相应地将14例SIRS患者分为三组:1)非感染性组,2)感染性组,3)未知组,如例7详述。

[0390] 表3个体SIRS患者全身炎症反应的原因。采集每位SIRS患者的血样,并进行标准微生物试验以确定潜在的感染。结合临床记录,确定了个体SIRS患者的炎症原因。

[0391]

组	代码	炎症原因
健康组	H-01	健康 #01
	H-02	健康 #02
	H-03	健康 #03
非感染性 SIRS 组	SIRS-01	心脏骤停 #01
	SIRS-02	心脏骤停 #02
	SIRS-03	哮喘
	SIRS-04	术后
	SIRS-05	蛛网膜下腔出血
	SIRS-06	肝动脉瘤
感染性 SIRS 组	SIRS-07	肠道细菌和假单胞菌
	SIRS-08	大肠杆菌
	SIRS-09	金黄色葡萄球菌
	SIRS-10	沙雷菌、肠球菌、假单胞菌
	SIRS-11	G 群链球菌
未知	SIRS-12	BEAM 后自体移植
	SIRS-13	可能的哮喘
	SIRS-14	吸入性肺炎

[0392] 在VCAM-1底物上用LAFA对每种血液样本进行分析,然后确定每个相互作用细胞的几种细胞动力学参数。如图8A所示,除SIRS-11患者炎症由G群链球菌感染引起外,所有SIRS患者的CD15+CD16+细胞数量均高于3名健康受试者。此外,非感染性SIRS患者CD4细胞的细胞速度和扩散系数较高(图8B和9B),而3名健康受试者CD4则较低,这与图6E和6F数据一致。

[0393] 我们还注意到,对于SIRS-04患者(术后),只检测到少量CD19相互作用的细胞(图8D),而CD4细胞密度非常高(图8B)。此外,与其他受试者相比,该患者大部分CD4细胞的速度和扩散系数都很高(图8B和9B),这表明该患者存在一种独特的细胞免疫活化。

[0394] 有趣的是,与其他非感染性SIRS患者或健康受试者相比,两名心脏骤停的SIRS患者(SIRS-01和SIRS-02)的CD19细胞密度持续升高,这表明这两名SIRS患者具有特异性CD19反应(图8D)。相似地,两例心脏骤停患者的CD15+CD16+细胞直线度较低,而与其他非感染性SIRS患者相比,这些患者5的CD19细胞直线度较高,表明心脏骤停患者细胞免疫状态相似(图10A和10D),可用于区分心脏骤停诱导的SIRS与其他原因SIRS。

[0395] 总之,这些结果表明单细胞图谱生成有用标志物的能力,可评估个体患者的细胞粘附功能。本文披露的结果表明,单细胞图谱也可用于区分个体SIRS患者炎症的的具体原

因。

[0396] 示例9以VCAM-1+IL-8为底物,通过LAFA评估SIRS患者的白细胞粘附功能

[0397] 本例旨在测试白细胞粘附功能测定法 (LAFA) (以VCAM-1+IL-8作为底物) 检测全身炎症反应综合征 (SIRS) 患者免疫反应升高的能力。还测定了LAFA (VCAM-1+IL-8) 区分非感染性SIRS和感染性SIRS的能力。采集健康志愿者和SIRS患者的血样,在VCAM-1及IL-8底物上用LAFA进行分析。除非另有说明所使用的方案在方法和材料章节中均有规定。。

[0398] IL-8是一种趋化因子,可通过形成浓度梯度来引导白细胞迁移,且IL-8主要诱导中性粒细胞的趋化性。IL-8的受体CXCR1可能在白细胞膜上表达,起到调节白细胞功能和迁移行为的作用。在本例中,结合VCAM-1,IL-8被用作粘附底物,这样CXCR1在调节SIRS患者白细胞粘附功能方面的作用可通过一系列细胞动力学参数来评估。

[0399] 如图11A所示,与健康对照组相比,SIRS患者的相互作用CD14、CD15+CD16+和CD4+CD25+细胞数量增加。然而,用

[0400] 适当的白细胞计数标准化后,仅观察到SIRS患者的CD4+CD25+细胞密度增加(图11B)。

[0401] SIRS患者相互作用CD4+CD25+调节性细胞的百分比明显高于健康对照组(图11C),而仅以VCAM-1为底物时未见此现象(图6C),这表明CXCR1在调节CD4+CD25+细胞粘附功能方面发挥了功能性作用。

[0402] 如前例6中的图6所示,SIRS患者CD15+CD16+中性粒细胞的粘附功能增强,表现为细胞速度、扩散系数和直线度下降。然而,在VCAM-1+IL-8底物上,健康人与SIRS患者之间的细胞速度和扩散系数无此差异(图11E和11F)。这些结果表明中性粒细胞CXCR1可能接收到IL-8底物的信号,而这可能对健康细胞和SIRS细胞的细胞活动性有直接的抑制作用。因此,在IL-8的存在下,无法显示出健康受试者与SIRS受试者的中性粒细胞活动性差异。

[0403] 此外,SIRS患者CD8相互作用细胞的速度、扩散系数、停留时间和径迹长度均明显高于健康对照组(图11E、11F、11H和11I)。这些结果表明健康细胞和SIRS CD8细胞有不同的迁移行为,可用于评估SIRS患者的异常免疫反应。

[0404] 如例7所述,根据临床记录,将14例SIRS患者分为三组:1) 非感染性组,2) 感染性组和3) 未知组。因此,我们检测了LAFA (VCAM-1+IL-8) 区分非感染性SIRS和感染性SIRS的能力。

[0405] 如图12A所示,感染性SIRS组的相互作用CD4和CD8细胞数量明显低于健康对照组,而非感染性SIRS组未见上述减少。另外,与健康对照组相比,

[0406] 感染性SIRS组CD15+CD16+中性粒细胞的停留时间较短,而非感染性SIRS组则并非如此。上述结果表明,这些新的标志物可用于区分非感染性SIRS和感染性SIRS。

[0407] 总之,所述结果表明CXCR1在调节健康和SIRS白细胞的粘附功能方面的功能性作用。使用VCAM-1+IL-8底物,LAFA产生了一系列新标志物,这可用于确定健康和SIRS白细胞上的不同白细胞CXCR1活性。此外,本文所公开的发明表明,许多新的LAFA标志物可用于区分非感染性SIRS和感染性SIRS。

[0408] 示例10以VCAM-1+SDF-1 α 为底物,通过LAFA评估SIRS患者的白细胞粘附功能

[0409] 本例旨在测试白细胞粘附功能测定法 (LAFA) (以VCAM-1+SDF-1 α 作为底物) 检测全身炎症反应综合征 (SIRS) 患者免疫反应升高的能力。还测定了LAFA (VCAM-1+SDF-1 α) 区分

非感染性SIRS和感染性SIRS的能力。采集健康志愿者和SIRS患者的血样,然后在VCAM-1及SDF-1 α 底物上用LAFA进行分析。除非另有说明,所使用的方案在方法和材料章节中均有规定。

[0410] SDF-1 α , 又称CXCL12, 是一种趋化因子, 可通过形成浓度梯度来引导白细胞的迁移。SDF-1 α 主要诱导淋巴细胞的趋化性。SDF-1 α 的受体CXCR4可能在白细胞膜上表达, 起到调节白细胞功能和迁移行为的作用。在本例中, 结合VCAM-1, 使用SDF-1 α 作为粘附底物, 这样CXCR4在调节SIRS患者白细胞粘附功能方面的作用可通过一系列细胞动力学参数来评估。

[0411] 如图13A和13D所示, SIRS患者CD14单核细胞的细胞密度和R因子明显高于健康受试者。此外, 与健康受试者相比, SIRS患者CD14细胞的直线度明显降低(图13D), 而在没有SDF-1 α 的情况下则没有观察到这种差异(图G), 这表明SIRS CD14细胞上CXCR4活性高于健康细胞上的CXCR4活性。

[0412] 我们还注意到, SIRS患者总相互作用细胞中>50%是中粒细胞, 而健康受试者最主要的亚群是CD4细胞(>30%), 这表明SIRS中性粒细胞中CXCR4活性增强(图13C)。同样, SIRS中性粒细胞的细胞速度明显高于健康受试者(图13E), 而SIRS中性粒细胞的直线度和停留时间低于健康受试者(图13G和13H), 这表明SIRS中性粒细胞对SDF-1 α 的反应性升高, 从而导致细胞的趋化性增强。

[0413] 如例7详述, 根据临床记录, 将14例SIRS患者分成三组: 1) 非感染性组, 2) 感染性组和3) 未知组。因此, 我们检测了LAFA (VCAM-1+SDF-1 α) 区分非感染性SIRS和感染性SIRS的能力。

[0414] 如图14A和14B所示, 感染性SIRS组CD14细胞的细胞密度(无论是否标准化)明显低于非感染性SIRS组。另一方面, 感染性SIRS组CD14细胞的细胞速度、扩散系数和直线度均明显低于非感染性SIRS组(图14C、14D、14E)。这些结果表明, 尽管感染性SIRS患者的细胞募集较低, 但其相互作用CD14细胞的活动性低于非感染SIRS患者, 这表明这些标志物可用于区分非感染SIRS患者和感染SIRS患者。

[0415] 相似地, 感染SIRS组的CD4细胞密度也低于非感染SIRS组(图14A)。还注意到, 与非感染性SIRS患者相比, 感染性SIRS患者CD4细胞的速度、扩散系数和直线度较低(图14C、14D、14E)。

[0416] 总之, 这些结果表明, 通过以VCAM-1+SDF-1 α 为底物, LAFA产生了一系列新的标志物, 这些标志物可用于确定SIRS患者CXCR4活性的升高。此外, 本文所公开的结果表明, 许多新的LAFA标记可用于区分非感染性SIRS和感染性SIRS。

[0417] 示例11在VCAM-1底物上利用LAFA评估Mn²⁺对SIRS患者白细胞粘附功能的影响

[0418] 本例旨在使用白细胞粘附功能测定(LAFA)在VCAM-1底物上评估Mn²⁺对SIRS患者白细胞粘附功能的影响。本例还确定了在Mn²⁺存在的情况下, LAFA区分非感染性SIRS和感染性SIRS的能力。采集健康志愿者和SIRS患者的血液样本, 在室温下用5mM的MnCl₂处理5分钟, 然后在VCAM-1底物上用LAFA进行分析。除非另有说明, 所使用的方案在方法和材料章节中均有规定。

[0419] Mn²⁺是一种整合素活化剂, 可活化白细胞膜上的 α 4 β 1整合素, 从而增加 α 4 β 1整合素与内皮配体VCAM-1的结合活性。如图15A和15C所示, SIRS患者相互作用CD8细胞的密度和百

分比都低于健康对照组,这表明在 Mn^{2+} 存在的情况下,健康受试者和SIRS受试者CD8细胞上 $\alpha 4\beta 1$ 整合素活性存在差异。

[0420] 为了进一步表征 $\alpha 4\beta 1$ 整合素状态,我们利用 Mn^{2+} 存在和不存在时白细胞与VCAM-1结合能力的差异来形成 $\alpha 4\beta 1$ 整合素“活化潜力”,这表明了 Mn^{2+} 诱导 $\alpha 4\beta 1$ 整合素活性的程度。如果细胞 $\alpha 4\beta 1$ 整合素高度活化,则 $\alpha 4\beta 1$ 整合素活化比例可能较高,这可能表明 Mn^{2+} 活化潜力较低。反之,细胞 $\alpha 4\beta 1$ 整合素活性低可能表明 Mn^{2+} 活化潜力较高。

[0421] 为了评估 Mn^{2+} 活化潜力,我们引入了一系列细胞动力学参数的活化潜力比(APR)。例如,当 Mn^{2+} 存在和不存在时,细胞的平均速度分别为SpeedNc和SpeedMn($\mu m/min$),则速度活化潜力比(SAPR)的值为SpeedMn/SpeedNc。在这种情况下,SAPR值越高,活化潜力越小,意味着 $\alpha 4\beta 1$ 整合素在静止细胞上处于活化状态的比例越高。

[0422] 扩散系数活化潜力比(DCAPR)可定义为扩散系数Mn与扩散系数Nc之间的比值(扩散系数Mn/扩散系数Nc)。DCAPR值越高,活化潜力越低。确定直线度活化潜力比(STAPR)可采用同样的公式(直线度Mn/直线度Nc)。DCAPR值越高,活化潜力越低。同理,轨迹长度活化潜力比(TLAPR)是轨迹长度Mn/轨迹长度Nc的比值,TLAPR值越高,活化潜力越小。

[0423] 另外,停留时间活化潜力比(DTAPR)可定义为停留时间Mn/停留时间Nc的比值。另一方面,在这种情况下,DTAPR值越高,活化潜力就越高。

[0424] 因此,SAPR、DCAPR、STAPR、TLAPR和DTAPR可用于确定特异性白细胞群体上活化的 $\alpha 4\beta 1$ 和/或 $\alpha 4\beta 7$ 整合素的比例,为评估白细胞 $\alpha 4\beta 1$ 和/或 $\alpha 4\beta 7$ 整合素的活性状态提供了半定量工具。其次,SAPR、DCAPR、STAPR、TLAPR和DTAPR可用于评估健康受试者和SIRS受试者 $\alpha 4\beta 1$ 整合素的状态。

[0425] 如图15H所示,与健康对照组相比,SIRS患者CD15+CD16+中性粒细胞DTAPR值明显降低,表明SIRS中性粒细胞 Mn^{2+} 活化潜力降低。另一方面,SIRS CD8细胞的DTAPR高于健康受试者,表明SIRS CD8细胞具有更大的活化潜力。

[0426] 如例7详述,根据临床记录,将14例SIRS患者分成三组:1)非感染性组,2)感染性组和3)未知组。因此,我们检测了SAPR、DCAPR、STAPR、TLAPR和DTAPR区分非感染性SIRS和感染性SIRS的能力。

[0427] 如图16A所示,与健康受试者相比,感染性SIRS患者的CD4、CD8、CD19细胞的细胞密度明显降低,而非感染性SIRS患者的CD4、CD8、CD19细胞的细胞密度未见类似降低。与健康对照组相比,非感染性组CD8细胞的DTAPR值显著更高(感染组并非如此)(图16F),这表明非感染性CD8细胞 Mn^{2+} 的活化潜力更高。

[0428] 此外,感染性SIRS组CD4+CD25+细胞的细胞密度明显高于非感染性SIRS组(图16B)。非感染性SIRS患者CD4+CD25+细胞的DCAPR值明显低于健康对照组,而感染性SIRS患者和健康对照组之间无此差异。(图16D)。这些结果表明,这些标志物可用于区分非感染性SIRS和感染性SIRS。

[0429] 总之,这些结果证明了LAFA能检测健康受试者和SIRS受试者 $\alpha 4\beta 1$ 整合素的不同活性状态。本文公开的结果还表明,SAPR、DCAPR、STAPR、TLAPR和DTAPR可作为标志物来区分非感染性SIRS和感染性SIRS。

[0430] 示例12以P-选择素和E-选择素为底物,用LAFA评估SIRS患者白细胞粘附功能

[0431] 本例旨在测试白细胞粘附功能测定法(LAFA)(以P-选择素和E-选择素为底物)检

测全身炎症反应综合征 (SIRS) 患者免疫反应升高的能力。采集健康受试者和SIRS受试者的血样,在P-选择素和E-选择素底物(表达PSGL-1的白细胞配体)上用LAFA进行分析。分别用10 μ g/ml和0.5 μ g/ml浓度的人P-选择素蛋白和人E-选择素蛋白对微流体通道进行预涂覆。除非另有说明,所使用的方案在方法和材料章节中均有规定。

[0432] 如图17A所示,SIRS患者CD15+CD16+中性粒细胞的细胞密度明显高于健康对照组,这表明SIRS中性粒细胞上PSGL-1粘附功能增强。由于观察到SIRS患者的CD15+CD16+细胞直线度和轨迹长度低于健康对照组,这一观点得以证实(图17G和17I)。

[0433] 与健康对照组相比,在SIRS患者中观察到更高的淋巴细胞R因子,这表明SIRS淋巴细胞中PSGL-1活性增强(图17D)。同样,与健康对照组相比,SIRS患者的CD4、CD8和CD19淋巴细胞的速度、直线度和轨迹长度均显著降低(图17E、17G和17I),这表明SIRS淋巴细胞中细胞选择素的相互作用更强,细胞活动性受到抑制。

[0434] 如例7详述,根据临床记录,将14例SIRS患者分成三组:1) 非感染性组,2) 感染性组和3) 未知组。因此,我们测试了LAFA(以P-选择素和E-选择素为底物)区分非感染性SIRS和感染性SIRS的能力。

[0435] 如图18A所示,与健康对照组相比,非感染性SIRS组CD15+CD16+中性粒细胞的细胞密度增加,而感染性SIRS组则没有。同样,与非感染性SIRS组相比,感染性SIRS组中性粒细胞密度显著降低(图18A)。相似地,与非感染性细胞相比,感染性SIRS中性粒细胞的停留时间也更短(图18F)。此外,与非感染性SIRS CD14细胞相比,感染性SIRS CD14细胞的停留时间明显变短,这说明非感染性SIRS患者和感染性SIRS患者CD14细胞的粘附功能不同(图18F)。

[0436] 总之,这些结果表明,LAFA(以P-选择素和E-选择素为底物)生成了一系列新的标志物,这些标志物可用于确定SIRS患者PSGL-1活性的升高。此外,本文所公开的结果表明,许多新的LAFA标志物可用于区分非感染性SIRS和感染性SIRS。

[0437] 示例13使用单细胞图谱,通过LAFA(在P-选择素和E-选择素为底物上)来区分个体SIRS患者不同的白细胞PSGL-1粘附功能

[0438] 本例旨在使用由白细胞粘附功能测定(LAFA)生成的单细胞图谱来确定个体SIRS患者白细胞PSGL-1粘附功能。采集健康志愿者和SIRS患者的血样,然后在P-选择素和E-选择素底物上用LAFA进行分析。除非另有说明,所使用的方案在方法和材料章节中均有规定。

[0439] 对于采集的每一份SIRS患者血样都进行了标准的微生物检测,以确定潜在的感染阳性情况。结合临床记录,由两位经验丰富的ICU专家独立确定个体SIRS患者的潜在炎症原因。作为结果,每个SIRS患者发生全身免疫反应的潜在原因列在表3中。相应地,将14例SIRS患者分为三组:1) 非感染性组,2) 感染性组,3) 未知组,如例7详述。

[0440] 在P-选择素和E-选择素底物上用LAFA对每个血样进行分析,然后确定每个相互作用的单个细胞的几种细胞动力学参数。如图19D所示,检测到SIRS-03患者(哮喘)高密度的CD19细胞。另一方面,在VCAM-1底物上只观察到同一患者的少量CD19细胞(图8D)。这些结果表明PSGL-1在患者CD19细胞上高度活化,而 α 4 β 1整合素在CD19细胞上的活性未明显增强,表明该患者特异性粘附分子的活化有所不同。我们还注意到,患者SIRS-03的CD4和D8相互作用细胞的数量较低(图19B和19C)。另一方面,可看到患者SIRS-07有大量的CD4和CD8细胞(肠道细菌和假单胞菌),而CD19细胞密度很低。这些发现还表明,个体SIRS患者特异性细胞

亚群具有不同的活性状态。

[0441] 有趣的是,与另外两名健康受试者相比,其中一名健康受试者(H-02)的CD4细胞扩散系数不寻常的高(图20B)。此外,同一受试者的CD15+CD16+细胞扩散系数在健康受试者中最低(图20A)。这些发现表明,不同类型细胞的粘附功能在健康个体之间可能存在显著差异,这可通过LAFA检测到。

[0442] 如图21A所示,H-02和H-03受试者的CD15+CD16+中性粒细胞直线度大部分在0.5-1之间,而非感染性SIRS患者的中性粒细胞直线度几乎均匀分布在0-1之间。此外,患者SIRS-07、SIRS-08和SIRS-11(感染性SIRS患者)的中性粒细胞直线度大部分在0-0.5之间(图21A),这表明具有较高的细胞粘附功能。相似地,检测到患者SIRS-12的CD8细胞直线度大部分在0.9以下,而在其他健康受试者和SIRS受试者中未见此现象(图21C)。这些结果显示了不同的细胞直线度分布模式,这可用来确定个体受试者的特异性细胞活性。

[0443] 如图21A所示,H-02和H-03受试者的CD15+CD16+中性粒细胞直线度的大部分在0.5-1之间,而非感染性SIRS患者的中性粒细胞直线度几乎均匀分布在0-1之间。此外,患者SIRS-07、SIRS-08和SIRS-11(感染性SIRS患者)的中性粒细胞直线度大部分在0-0.5之间(图21A),这表明具有较高的细胞粘附功能。相似地,检测到患者SIRS-12的CD8细胞直线度大部分在0.9以下,而在其他健康受试者和SIRS受试者中未见此现象(图21C)。这些结果显示了不同的细胞直线度分布模式,这可用来确定个体受试者的特异性细胞活性。

[0444] 示例14利用机器学习算法确定白细胞粘附功能的活化

[0445] 本例旨在使用机器学习(ML)算法来确定白细胞粘附功能的活化。采集健康志愿者的血液标本在室温下用 Mn^{2+} (活化)或不用 Mn^{2+} (对照)处理5分钟,然后以VCAM-1为底物进行白细胞粘附功能测定(LAFA)。

[0446] 利用对照和活化样本的数据,训练机器学习算法,然后确定经过训练的算法区分盲对照和活化数据的能力。

[0447] ML是一个由人工智能和模式识别发展而来的计算机科学领域。ML算法使计算机能够在没有人工输入的情况下从数据中学习并做出预测。ML的主要应用之一是计算机视觉,在该领域中,人们针对数字图像或视频对计算机进行训练,以自动完成人类视觉系统的任务。

[0448] 基于现有的LAFA图像以及健康志愿者和各种疾病患者的数据分析结果,建立数据库。该数据库可通过将新LAFA数据整合到现有数据库中来不断扩展,以持续优化ML算法。

[0449] 首先,开发了一种基于卷积神经网络(CNN)方法的图像分类机器学习算法。会针对 Mn 活化样本和健康献血者对照血液样本的LAFA图像对算法进行训练。CNN由输入和输出层组成,中间包含有自定义数量的隐藏层。通过权重矩阵定义各层之间的数学关系,使每层

[0450] 其他层建立数学关联。为了训练此CNN,原始图像被处理成标准偏差强度投影,并针对不同亚群加颜色编码。目前,该CNN算法区分盲对照和 Mn -活化样品的准确度为~80%。随着数据库的增加,准确度可能增加至>99.9%。

[0451] 其次,开发了一种基于随机森林集成学习方法的机器学习算法。会针对 Mn 活化和健康献血者对照血液样本的单个细胞追踪结果(如细胞密度、速度、扩散系数、直线度、停留时间、轨迹长度等)对该算法进行训练。随机森林构建了大量的决策树,并针对训练数据集的不同子集对每棵树进行训练。通过对多个独立决策树进行平均化,随机森林降低了过度

拟合的风险,从而提高了最终模型的性能。目前,该随机森林算法区分对照样本和Mn-活化样本的准确度为>80%。随着数据库的增加,准确度可增加至>99.9%。

[0452] 比较两种算法后发现,目前的算法准确度相似。随机森林算法可能比CNN更准确,因其学习的数据范围更广(追踪参数,也可能包括图像),但是由于可能需要事先进行追踪分析,所以训练和分类的时间更长。在训练和分类方面,CNN可能会更快,因为需要的数据预处理很少。准确度可能低于随机森林算法的准确度,但是需要更大的数据库来确定每个算法的局限性。

[0453] 示例15在VCAM-1底物上利用LAFA评估那他珠单抗对SIRS患者VCAM-1依赖性白细胞募集的影响

[0454] 本例旨在在VCAM-1底物上使用白细胞粘附功能测定(LAFA)来评估那他珠单抗(Biogen,MA)对SIRS患者白细胞募集的影响。采集健康志愿者和SIRS患者的血液样本,在室温下用那他珠单抗(30 μ g/ml)处理5分钟,然后在VCAM-1底物上用LAFA进行分析。除非另有说明,所使用的方案在方法和材料章节中均有规定。

[0455] 那他珠单抗是一种中和单克隆抗人 α 4 β 1整合素抗体,由Biogen销售,商品名是Tysabri,是最有效的多发性硬化症(MS)治疗方法之一。那他珠单抗最初开发用于阻断MS患者 α 4 β 1整合素功能和抑制白细胞粘附功能,从而使得白细胞跨血脑屏障浸润减少。如图6和例6所示,检测到SIRS患者 α 4 β 1整合素活化增强。因此,我们研究了那他珠单抗对SIRS患者 α 4 β 1功能和VCAM-1依赖性白细胞募集的影响。

[0456] 如图22A所示,与未处理的对照组相比,那他珠单抗显著减少了健康受试者和非感染SIRS患者相互作用的CD15+CD16+中性粒细胞的数量,表明那他珠单抗能抑制这些细胞中 α 4 β 1整合素的功能。然而,那他珠单抗处理在感染性SIRS患者中并没有起到上述抑制作用(图22A)。此外,那他珠单抗显著抑制健康组和三个SIRS组的CD4和CD8细胞募集,这与那他珠单抗已知的作用一致(图22B和22C)。

[0457] 总之,这些结果表明那他珠单抗可能抑制多个细胞亚群的白细胞 α 4 β 1整合素的功能,从而抑制白细胞募集。这些结果也证明了LAFA能够在体外测试药物对白细胞粘附功能的影响。根据LAFA的结果,可预测个体受试者对特定药物/疗法的潜在反应,从而促进开发针对个体患者的优化疗法。

[0458] 示例16:评估SIRS患者的血清C-反应性蛋白

[0459] 本例旨在测量SIRS患者的血清C-反应性蛋白(CRP)水平,并可确定血清CRP水平区分非感染性SIRS和感染性SIRS的能力。血液样本采集自健康志愿者和SIRS患者。每样血液标本的血清在4 $^{\circ}$ C条件下以2000g离心10分钟,收集血清(上清液)。根据制造商的说明(ThermoFisher Scientific),使用商用ELISA试剂盒测定CRP的浓度。

[0460] 对于采集的每一份SIRS患者血样都进行了标准的微生物检测,以确定潜在的感染阳性情况。结合临床记录,由两位经验丰富的ICU专家独立确定个体SIRS患者的潜在炎症原因。作为结果,每个SIRS患者发生全身免疫反应的潜在原因列在表3中。相应地,将14例SIRS患者分为三组:1)非感染性组,2)感染性组,3)未知组,详见例7。

[0461] 如图23A所示,健康受试者的CRP水平低于ELISA试剂盒的检测限。检查到三组SIRS患者的CRP水平无差异(图23A),说明CRP不是区分非感染性SIRS患者和感染性SIRS患者的合适标志物。

[0462] 示例17:用MAdCAM-1为底物,用LAFA评估SIRS患者白细胞粘附功能

[0463] 本例旨在测试白细胞粘附功能测定法 (LAFA) (以MAdCAM-1为底物) 检测全身炎症反应综合征 (SIRS) 患者免疫反应增强的能力。采集健康受试者和SIRS患者的血样,在MAdCAM-1底物上用LAFA进行分析。微流体通道用14 μ g/ml浓度的人MAdCAM-1蛋白预涂覆。除非另有说明,所使用的方案在方法和材料章节中均有规定。

[0464] 如图24A和24B所示,无论是否通过适当的细胞计数标准化,检测到的CD4、CD8和CD15+CD16+相互作用细胞的细胞密度无差异。另一方面,与健康受试者相比,SIRS患者的CD15+CD16+中性粒细胞直线度明显降低(图24E),表明与健康人群相比, α 4 β 7整合素活性增强。此外,SIRS患者的CD8细胞停留时间明显高于健康受试者(图25F)。

[0465] 如例7详述,根据临床记录,将14例SIRS患者分成三组:1) 非感染性组,2) 感染性组和3) 未知组。因此,我们检测了LAFA (MAdCAM-1) 区分非感染性SIRS和感染性SIRS的能力。

[0466] 与健康受试者相比,感染性SIRS患者的标准化CD15+CD16+中性粒细胞密度显著降低(图25B),这表明感染性SIRS患者 α 4 β 7整合素粘附功能降低。由于研究结果显示,与健康对照者和非感染性SIRS患者相比,感染性SIRS患者的停留时间明显较低,所以这一观点得以证实(图25F)。此外,感染性SIRS患者的CD8细胞停留时间明显低于非感染性SIRS患者(图25F)。这表明,有可能使用这些新标志物来区分非感染性SIRS和感染性SIRS。

[0467] Mn^{2+} 是一种泛整合素活化剂,可活化白细胞膜上的 α 4 β 7整合素,从而增加 α 4 β 7整合素与内皮配体MAdCAM-1的结合活性。为了确定 Mn^{2+} 对健康受试者和SIRS受试者 α 4 β 7整合素活化的不同影响,我们在室温下用5mM $MnCl_2$ 来处理血液标本5分钟,然后在MAdCAM-1底物上进行LAFA。

[0468] 在 Mn^{2+} 存在的情况下,检测到的SIRS患者CD15+CD16+中性粒细胞的标准化细胞密度低于健康受试者(图26B)。将其分为三组后,发现感染性SIRS患者的中性粒细胞的细胞密度明显低于非感染性SIRS患者(图27A)。此外,感染性SIRS的CD4细胞直线度明显低于非感染性SIRS(图27E)。

[0469] 总之,这些结果表明,例如,在健康组和三个SIRS组中,在MAdCAM-1底物上LAFA能够产生一系列新的标志物来确定 α 4 β 7整合素对 Mn^{2+} 的不同反应。LAFA已鉴定了许多有用的细胞动力学标志物,可用于区分非感染性SIRS患者和感染性SIRS患者。

[0470] 示例18流感感染的症状前检测

[0471] 为了提供健康的对照样本,我们招募了一名健康的成人受试者(CIN-001) 参与到研究中。在星期四(第0天)采集第一份血液样本时,该受试者报告健康,没有病毒感染症状。当天晚上,在采集了最初的血液样本后,受试者出现喉咙痛(咽炎)症状。第二天(第1天),受试者开始出现典型的流感感染症状,包括咳嗽和呼吸困难。第5天(星期二)采集了第二份血液样本并用于LAFA测定,此时流感症状更严重。在同一天(第5天),该受试者被一位全科医生(GP)诊断为疑似病毒流感。流感症状持续了大约两周。此后,该受试者已完全康复并保持健康。在第二份血液样本采集11周后的一个星期二,采集了第三份血液样本并利用LAFA进行分析。因此,第三份血液样本被用作健康基线样本。

[0472] 如表4所示,检测到总白细胞计数(WBC)增加,当流感症状严重时,第三份血液样本的WBC达到最高。除淋巴细胞外,在许多白细胞亚群中也可见类似的增加。在潜伏期(第二份血液样本)检测到淋巴细胞计数最高,第一份和第三份血液样本的淋巴细胞计数相当。

[0473] 表4三种血液样本的总白细胞计数、基线、潜伏期和病毒诱导流感。采集血样并进行全血细胞计数。Neu:中性粒细胞,Lym:淋巴细胞,Mono:单核细胞,Eos:嗜酸性粒细胞。

[0474]	细胞计数(百万细胞/毫升)	总计	Neu	Lym	Mono	Eos
	健康基线	6.26	3.91	1.53	0.46	0.33
	潜伏期	7.41	4.03	2.19	0.65	0.52
	病毒性流感	8.05	5.09	1.31	0.75	0.89

[0475] 当用LAFA在P+E选择素基质上对血液样本进行分析时,与基线健康血细胞相比,第二份和第三份血液样本中CD4和CD8相互作用细胞的速度和扩散系数(图28A和28B)均降低,这表明这些适应性免疫细胞中存在病毒诱导的选择素P配体(PSGL-1)活化。对于第二和第三份血样,也检测到CD14和CD15+CD16+细胞上PSGL-1的类似激活,并检测到细胞速度、扩散系数、直线度、轨迹长度和位移的降低(图28)。上述结果表明,在潜伏期和流感症状期,先天免疫细胞和适应性免疫细胞活化。

[0476] 与基线细胞相比,CD15+CD16+中性粒细胞的细胞直线度在潜伏期(第二份血液样本)明显降低,在流感症状严重时(第三份血液样本)未检测到此现象(图28C)。这些数据表明,CD15+CD16+直线度可作为一种独特的LAFA标志物,用于识别已感染但尚未出现明显流感症状患者的潜在病毒感染。

[0477] 以VCAM-1为底物,用LAFA对血液样本进行分析时,与基线细胞相比,在第二份血液样本(潜伏期)中检测到CD4和CD8相互作用细胞的速度、扩散系数、直线度和位移降低(图29),这表明病毒感染导致了 $\alpha 4\beta 1$ 整合素活化。在流感症状严重的第三份血液样本中,相互作用CD4和CD8细胞的数量降至几乎为零,尽管第一份和第三份血液样本淋巴细胞计数相当(图29)。上述结果表明,第三份血液样本中的CD4和CD8细胞几乎完全丧失了 $\alpha 4\beta 1$ 整合素功能,可能是由于免疫系统诱导了抗炎反应,目的是减弱病毒诱导的免疫活化。 $\alpha 4\beta 1$ 整合素功能在潜伏期未丧失的事实表明,

[0478] 在无流感症状的潜伏期和观察到流感症状的时期,免疫系统的状态有显著差异。

[0479] 总之,这些数据证明了LAFA不仅可检测病毒感染对免疫系统的影响,还能够检测在感染的不同阶段免疫系统对病原体的不同反应。因此,LAFA生物标志物可用于检测潜伏期的早期感染迹象,而这通常无法通过其他常规血液测试检测到。此外,同一个体对不同病原体的反应可能不同,而其他个体对同一外来病原体的反应也可能不同。LAFA是检测上述差异的理想选择,能够早期发现感染,并促进基于个体患者不同的免疫状态开发出最佳治疗方法。

[0480] 示例19通过在P+E选择素粘附底物上用LAFA测量白细胞粘附功能,来评估全身炎症反应综合征(SIRS)

[0481] 在P+E选择素粘附底物上用LAFA测定白细胞粘附功能,评估患者是否患有SIRS。此外,还评估了LAFA区分感染性SIRS和非感染性SIRS的能力。在例12中,在P+E选择素底物上用LAFA对14例SIRS患者的血样进行了分析。在本例中,我们分析了另外14例SIRS患者的样本,并将其纳入数据分析中。本例中的数据包括28例SIRS患者。根据患者的临床记录(表5),对14例新SIRS患者中的每例患者进行回顾性评估,以确定其是否属于:

[0482] 1. “非感染性”组:不太可能感染或

[0483] 2. “感染性”组:已证实感染(如微生物阳性结果)或

[0484] 3. “未知”组：可能感染，但未证实。

[0485] 如图30I所示，SIRS患者的总白细胞计数明显高于健康受试者 (n=14)，这主要是由于中性粒细胞计数增加所致。与健康受试者和非感染性患者相比，感染性SIRS患者的淋巴细胞计数明显较低。非感染性患者的单核细胞计数高于健康受试者。

[0486] 表5另外14例SIRS患者的全身炎症反应的原因。采集每位SIRS患者的血样，并进行标准微生物试验以确定潜在的感染。结合临床记录，按照上述方法确定了个体SIRS患者的炎症原因。

[0487]

组	代码	炎症原因
健康组	H-04	健康 #04
	H-05	健康 #05
	H-06	健康 #06
非感染性 SIRS 组	SIRS-15	外伤
	SIRS-16	癌症
	SIRS-17	手术
	SIRS-18	手术
感染性 SIRS 组	SIRS-19	心内膜炎
	SIRS-20	组织感染
	SIRS-21	革兰氏阴性
	SIRS-22	胸部感染
	SIRS-23	腹膜中的大肠杆菌
未知组	SIRS-24	未知
	SIRS-25	可能的感染
	SIRS-26	可能的手术
	SIRS-27	可能的手术
	SIRS-28	可能的外伤

[0488] 与健康受试者和非感染患者相比，感染性SIRS患者的相互作用CD4和CD8细胞的数量显著减少 (图30A)，可能是由于淋巴细胞计数减少所致 (图30I)。感染性SIRS患者CD4相互作用细胞的直线度和位移明显低于健康受试者和非感染性患者，这表明感染性患者PSGL-1活化。同样地，

[0489] 与健康受试者和非感染患者相比，感染CD4细胞停留时间显著增加。这些结果表明，PSGL-1活化是感染性SIRS患者的独特标志物，可用于区分感染性SIRS患者和非感染性

SIRS患者。此外,与其他组相比,发现感染性患者的CD4+CD25+相互作用细胞明显更多,而所有组的细胞迁移行为相似。

[0490] 与健康受试者组相比,所有SIRS患者组(包括非感染性组、感染性组和未知组)的相互作用CD15+CD16+细胞(中性粒细胞)的直线度(图30E)、轨迹长度(图30G)和位移(图30H)均降低。这些结果表明,SIRS患者的PSGL-1活性升高,可作为检测全身炎症反应的标志物。

[0491] 对来自另外14例SIRS患者的所有血液样本进行了标准微生物检测,以确定潜在的感染阳性情况。结合临床记录,由两位经验丰富的ICU专家独立确定个体SIRS患者的潜在炎症原因。作为结果,每个SIRS患者发生全身免疫反应的潜在原因列在表5中。相应地,将14例SIRS患者分为三组:1)非感染性组,2)感染性组,3)未知组,如上所述。

[0492] 对于这些血液样本(包括6例新健康受试者和28例SIRS患者),我们确定了单个相互作用细胞的一些细胞动力学参数(如细胞密度、速度、扩散系数、直线度、停留时间、轨迹长度和位移),从而生成了特异性白细胞亚群的单个细胞图谱。如图31A所示,健康受试者和非感染性SIRS患者的CD4细胞直线度平均值较高(接近1),而大多数感染性患者的CD4细胞直线度值较低,这为区分感染性患者和非感染性患者提供了有用的LAFA标志物。对于患者SIRS-25,尽管没有发现感染性病原体的证据,两位ICU专家仍将该患者定为可能感染。鉴于患者SIRS-25CD4直线度较低(图31A),患者SIRS-25可能是感染性患者。出于同样的原因,患者SIRS-13也可能是感染性患者。

[0493] 另外,如图31B所示,健康血液样本中相互作用CD15+CD16+细胞的数量低于SIRS患者样本。健康受试者的CD15+CD16+细胞直线度平均值高于SIRS患者。这些结果表明,这些LAFA标志物可用于区分健康受试者和SIRS患者。

[0494] 综上所述,这些结果证明了在选择素底物上LAFA产生有用的LAFA标志物的能力,不仅可检测全身炎症反应,还可区分感染性SIRS患者和非感染SIRS患者。这些LAFA标记物组合可提高作为SIRS或败血症诊断测试的LAFA测定的准确度和灵敏度。通过LAFA准确评估免疫系统的活化,可提供有关个体免疫系统如何对炎症刺激作出反应的有用信息,从而促进开发优化的治疗方法。

[0495] 示例20通过在VCAM-1粘附底物上用LAFA测量白细胞粘附功能,来评估全身炎症反应综合征(SIRS)。

[0496] 在例6中,在VCAM-1底物(白细胞 $\alpha 4\beta 1$ 整合素配体)上用LAFA对14例SIRS患者的血样进行了分析。在本例中,招募了14例新SIRS患者,并纳入分析。此外,还评估了LAFA区分感染性SIRS和非感染性SIRS的能力。本例中的数据包括所有28例SIRS患者(14例初始患者和14例额外患者)。根据患者的5临床记录(表5),对14例额外SIRS患者进行回顾性评估,以确定SIRS的类别:1)非感染性,2)感染或3)未知。

[0497] 如图32A所示,感染性SIRS患者VCMA-1底物上相互作用CD4和CD8细胞的数量明显低于健康受试者和非感染SIRS患者。然而,在细胞密度通过相应的白细胞计数标准化后,未检测到该差异(图32B)。

[0498] 与健康受试者和非感染SIRS患者相比,感染性SIRS患者相互作用CD19细胞的速度(图32C)和扩散系数(图32D)显著降低,表明感染性患者CD19细胞上特异性 $\alpha 4\beta 1$ 整合素活化。与健康受试者相比,非感染性和感染性SIRS患者CD15+CD16+细胞的速度(图32C)和直线

度(图32D)均降低。健康受试者和感染性患者的CD15+CD16+细胞轨迹长度相当,而非感染性患者的CD15+CD16+细胞的轨迹长度明显长于健康受试者和感染性受试者(图32G)。相似地,与健康受试者和感染性患者相比,检测到的非感染性SIRS患者的CD14细胞轨迹长度明显更长(图32G)。上述结果表明,可联合使用这些LAFA标志物来识别SIRS患者,或者区分感染性SIRS和非感染性SIRS。其他LAFA标志物的组合也可能有助于识别SIRS患者,或区分感染性SIRS和非感染性SIRS。

[0499] 还产生了血液样本白细胞亚群的单个细胞图谱。如图33A所示,与健康组和非感染组相比,感染性SIRS患者大部分CD19细胞速度较低。另外,与SIRS患者相比,健康受试者的CD15+CD16+细胞直线度大多更高(更接近1)(图33B)。

[0500] 总之,这些结果证明了在VCAM-1底物上LAFA产生有用LAFA标志物的能力,不仅可检测全身炎症反应,还可区分感染性SIRS患者和非感染性SIRS患者。这些LAFA标志物组合可提高作为SIRS或败血症诊断测试的LAFA测定的准确度和灵敏度。通过LAFA准确评估免疫系统的活化,可提供有关个体免疫系统如何对炎症刺激作出反应的有用信息,从而促进开发优化的治疗方法。

[0501] 示例21使用VCAM-1+IL-8和VCAM-1+SDF-1 α 作为粘附底物,通过LAFA测量SIRS对白细胞粘附功能的影响。

[0502] 本例旨在在VCAM-1+IL-8或VCAM-1+SDF-1 α 底物上用LAFA检测SIRS对白细胞粘附功能的影响。在例9和例10中,分别在VCAM-1+IL-8和VCAM-1+SDF-1 α 上通过LAFA分析了14例SIRS患者的情况。在本例中,招募了14例额外的SIRS患者,并纳入分析。此外,还评估了LAFA区分感染性SIRS和非感染性SIRS的能力。本例中的数据包括28例SIRS患者(14例初始患者和14例额外患者)。

[0503] 在VCAM-1+IL-8底物上用LAFA分析血样时发现,SIRS患者CD15+CD16+相互作用细胞的直线度明显低于健康受试者(图34E),表明SIRS CD15+CD16+细胞CXCR1活化。同样,SIRS患者的CD15+CD16+细胞的停留时间明显低于健康受试者,而感染性SIRS患者的CD15+CD16+细胞的停留时间也明显低于非感染患者(图34F)。

[0504] 当在VCAM-1+SDF-1 α 底物上对血液样本进行LAFA分析时,感染患者相互作用CD4细胞的数量明显低于健康受试者和非感染患者(图35A)。感染性CD4细胞的停留时间明显低于健康受试者,(图F)表明感染性CD4细胞CXCR4的活性更高此外,感染性SIRS患者和非感染性SIRS患者的CD15+CD16+细胞的速度明显高于健康细胞,而感染性SIRS患者的CD15+CD16+细胞的直线度明显低于健康细胞和非感染性细胞(图E)。上述结果表明,感染性CD15+CD16+细胞上CXCR4的活性与健康细胞和非感染性细胞相比存在差异,从而导致细胞活动性降低。相似地,感染性CD15+CD16+细胞的停留时间和位移明显低于健康细胞和非感染性细胞(图35F和35H)。

[0505] 综上所述,上述结果表明,健康受试者、非感染性SIRS患者和感染性SIRS患的CXCR1和CXCR4的活性不同。因此,这些LAFA标志物不仅可用于识别SIRS患者的全身炎症,还可用于区分感染性SIRS患者和非感染性SIRS患者。这些LAFA标志物组合可提高作为SIRS或败血症诊断测试的LAFA测定的准确度和灵敏度。通过LAFA准确评估免疫系统的活化,可提供有关个体免疫系统如何对炎症刺激作出反应的关键重要信息,从而促进开发优化的治疗方法。

[0506] 示例22 LAFA标志物。

[0507] 本例提供了一个非独占LAFA标志物列表,该列表可由LAFA测定分析产生。

[0508] 由图像分析软件分析一幅或多幅图像,如示例3所述。然后由软件在一个或多个帧中确定细胞的位置(例3)。使用该细胞位置数据,计算LAFA标志物。

[0509] 在本例中,按粘合底物(如例1表2所述)、活化状态(如使用或不使用 Mn^{2+} ,例4和例5)以及测量类别(表6)对LAFA标志物进行分类。表7和表8列出了所有LAFA细胞标志物。可确定每个白细胞亚群的所有LAFA标志物(如例1中的表1所述)。

[0510] 表8中列出的标志物是由细胞的瞬时速度导出的。在某些实施例中,瞬时速度可定义为在特定细胞的一帧到下一帧之间所记录的每一次移动距离。例如,一个细胞有100帧参与了记录,将形成99个瞬时速度。除了细胞数和标准化的细胞数,可计算特异性白细胞群体所有细胞标志物的平均值(表7和表8中列出的所有参数)。

[0511] 表6测量类别列表。

[0512]

测量类别	说明
总细胞	指通道内检测到的所有细胞,而不考虑细胞持续时间
短停留细胞	指停留较短时间的细胞,例如3-30帧
中等停留细胞	指停留中等时间的细胞,例如31-150帧
长停留细胞	指停留较长时间的细胞,例如150-300帧

[0513] 表7测量(有关每个被记录细胞的整体行为)的LAFA标志物列表。

[0514]

标志物	说明
细胞数	检测到的有效相互作用的细胞数（例 3）
标准化细胞数	每 1 毫升血液中根据血细胞计数标准化的细胞数（例如 10^6 个淋巴细胞或嗜中性粒细胞或单核细胞）
一般速度	至少一个被记录细胞在一定时间内移动的距离
停留时间	至少一个被记录细胞的总持续时间
位移	至少一个被记录细胞的起始位置与结束位置之间的距离
轨迹长度	至少一个被记录细胞移动的总长度
直线度	至少一个被记录细胞的位移与轨迹长度之比
扩散系数	扩散系数的计算方法为至少一个被记录细胞的均方位移除以 4 倍细胞移动时间
粘度指数	范围在 0 到 100 之间的函数，100 指细胞最大粘度。函数的值取决于三个变量的相互作用：位移、持续时间和最大速度。相互作用是位移-持续时间和位移-最大速度。 $\text{指数} = 75 + 25 * \{ \text{持续时间} / (\text{位移} + \text{持续时间}) \} - 75 * \{ (\text{最大速度} + \text{位移}) / 550 \}$ 这说明粘度指数随时间的增加而增大，随位移和最大速度的增加而减小。

[0515]

高速	比所记录细胞的中位瞬时速度大的瞬时速度百分比。
更高速	比所记录细胞 75% 的观测瞬时速度值大的瞬时速度百分比。
高速 log10	在以 10 为底的对数标度中，所记录细胞的瞬时速度为正的百分比。
速度变化	以 10 为底的对数标度的瞬时速度的总和除以细胞被记录的时间（检测到的帧数）。
波动	以 10 为底的对数标度的速度从正变化到负的次数除以细胞被记录的时间（检测到的帧数）。

[0516] 示例23使用机器学习来区分感染性SIRS患者和非感染性SIRS患者。

[0517] 本例旨在使用机器学习 (ML) 来确定患者的全身炎症反应综合征 (SIRS) 是由感染

性还是非感染性原因引起的。采集感染性SIRS患者和非感染性SIRS患者的血样,并使用VCAM-1作为底物进行白细胞粘附功能测定(LAFA),如例7和例20所述。将来自感染性和非感染性血液样本的数据用于训练机器学习算法,然后确定经过训练的算法对未知样本的预测能力。

[0518] 表8源自瞬时速度的LAFA标志物。

[0519]	标志物	说明	说明
	个体平均速度	一个被记录细胞的瞬时速度的平	一个被记录细胞的瞬时速度的平均值。
	个体中位速度	一个被记录细胞的瞬时速度的中	一个被记录细胞的瞬时速度的中位值。
	个体最大速度	一个被记录细胞的最大瞬时速度。	一个被记录细胞的最大瞬时速度。
	个体最小速度	一个被记录细胞的最小瞬时速度。	一个被记录细胞的最小瞬时速度。

[0520] ML是一个由人工智能和模式识别发展而来的计算机科学领域。ML算法使计算机能够在没有人工输入的情况下从数据中学习并做出预测。

[0521] 本机器学习算法基于随机森林集成学习方法。使用来自感染性SIRS患者和非感染性SIRS患者血液样本的大量LAFA标志物(如例22所述)对该算法进行训练。随机森林构建了大量的决策树,并针对训练数据集的不同子集对每棵树进行训练。通过对多个独立决策树进行平均化,随机森林降低了过渡拟合的风险,从而提高了最终模型的性能。

[0522] 使用三份感染性SIRS血液样本和三份非感染性SIRS血液样本的数据对目前的随机森林算法进行训练,上述数据均由两名ICU专家根据患者的临床记录和血液培养结果确定(例7)。在此之后,测试了经过训练的算法区分感染性SIRS和非感染性SIRS的能力。

[0523] 将来自2个感染性SIRS患者和2个非感染性SIRS患者血液样本的LAFA数据作为“未知”样本来测试训练后的算法。所有用于检测的四份样本的病理原因(感染性或非感染性)均由ICU专家预先确定(例7)。该算法成功地预测了所有四份血液样本的病理原因,准确度为100%。随着用于训练的患者样本数量的增加,可识别出维持ML算法准确度所需的最具鉴别能力的LAFA标志物。因此,现有的ML算法可通过使用最有用的LAFA标志物进行优化和构建。

[0524] 在不背离本公开广泛的一般范围的情况下,可对上述实施例进行多种变化和/或修改,本领域的技术人员对此表示赞赏。因此,本文实施例在所有方面都被认为是说明性的,而非限制性。

[0525] 此处讨论和/或引用的所有出版物均被完整地纳入本文。

[0526] 本应用要求优先于AU 2018901305,其全部内容被完整地纳入本文中。

[0527] 本说明书中对所包含的文件、法令、材料、装置、物品等等的任何讨论,仅是为了说明本发明的背景。不应将上述任何或所有事项视为构成现有技术基础的一部分,或因为在本发明申请的每项权利要求的优先日期之前已存在,而将其视为与本发明相关领域的一般常识。

[0528] 参考文献

[0529] Beltman和de Boer(2009年)。《自然评论》。《免疫学》,9:789-798。

[0530] Ibbotson等人。(2001年)《自然医学》,7(4):465-470

[0531] Kim和Herr(2013)《生物微流体》,7:41501 5

[0532] Kucik等人。(1996年)《临床研究杂志》,97:2139-2144

- [0533] Sun等人。(2012年)《固态器件研究会议》(ESSDERC)
- [0534] DOI:10.1109/ESSDERC.2012.6343324
- [0535] Thomas等人。(2002年) 临床免疫学,105 (3) :259-272
- [0536] Turtle和Riddell (2010年)《癌症杂志》16:374-381 10
- [0537] Vaidyanatahn等人。(2014) 分析化学,86 (4) :2042-2049。

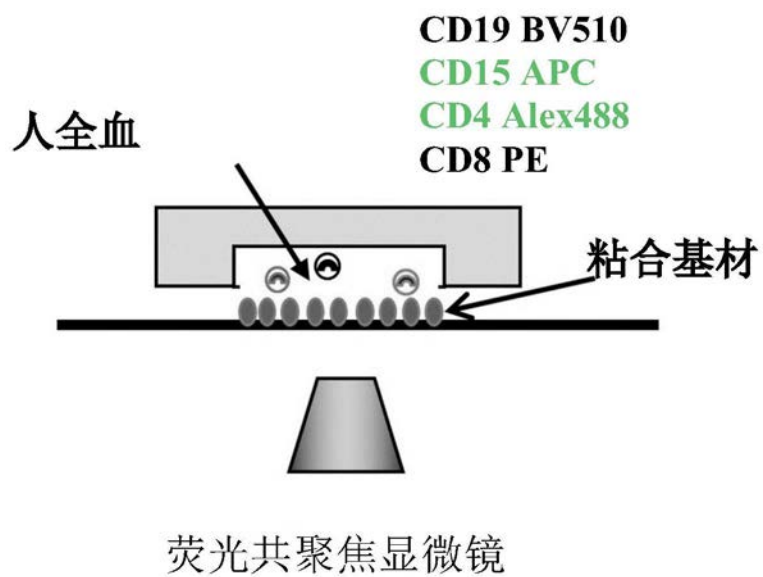


图1

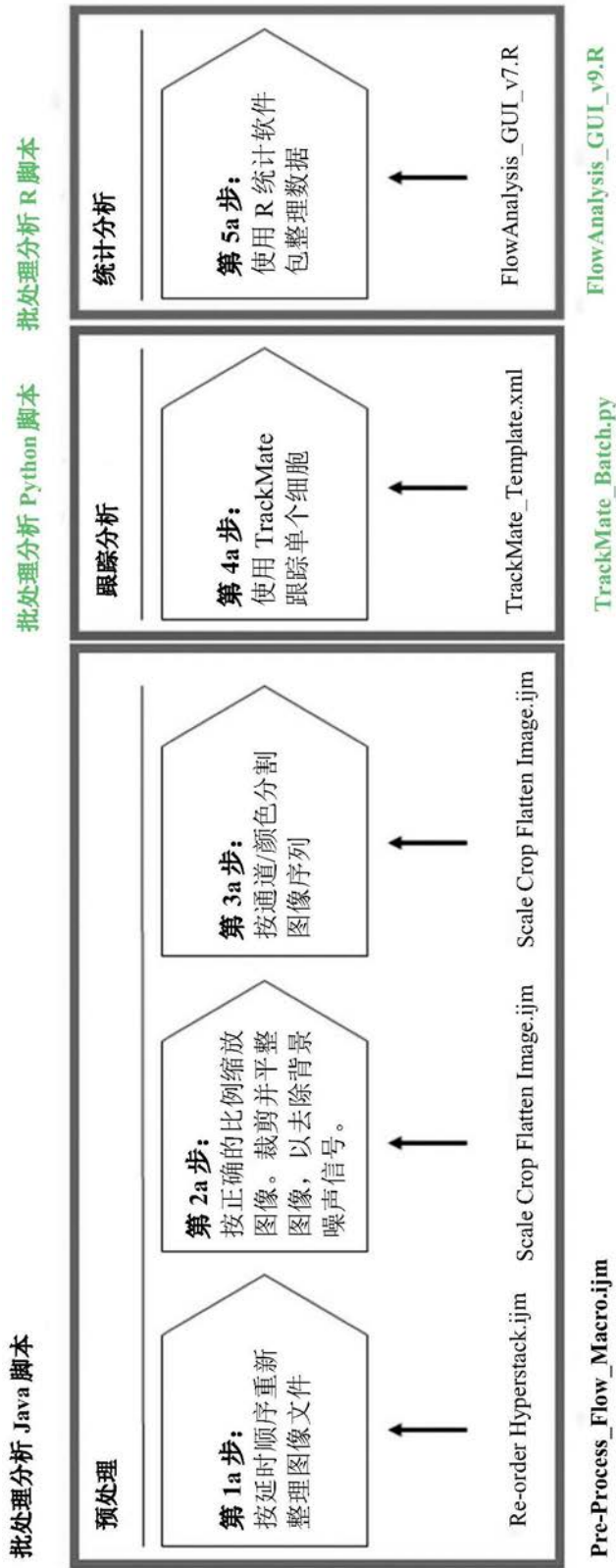


图2

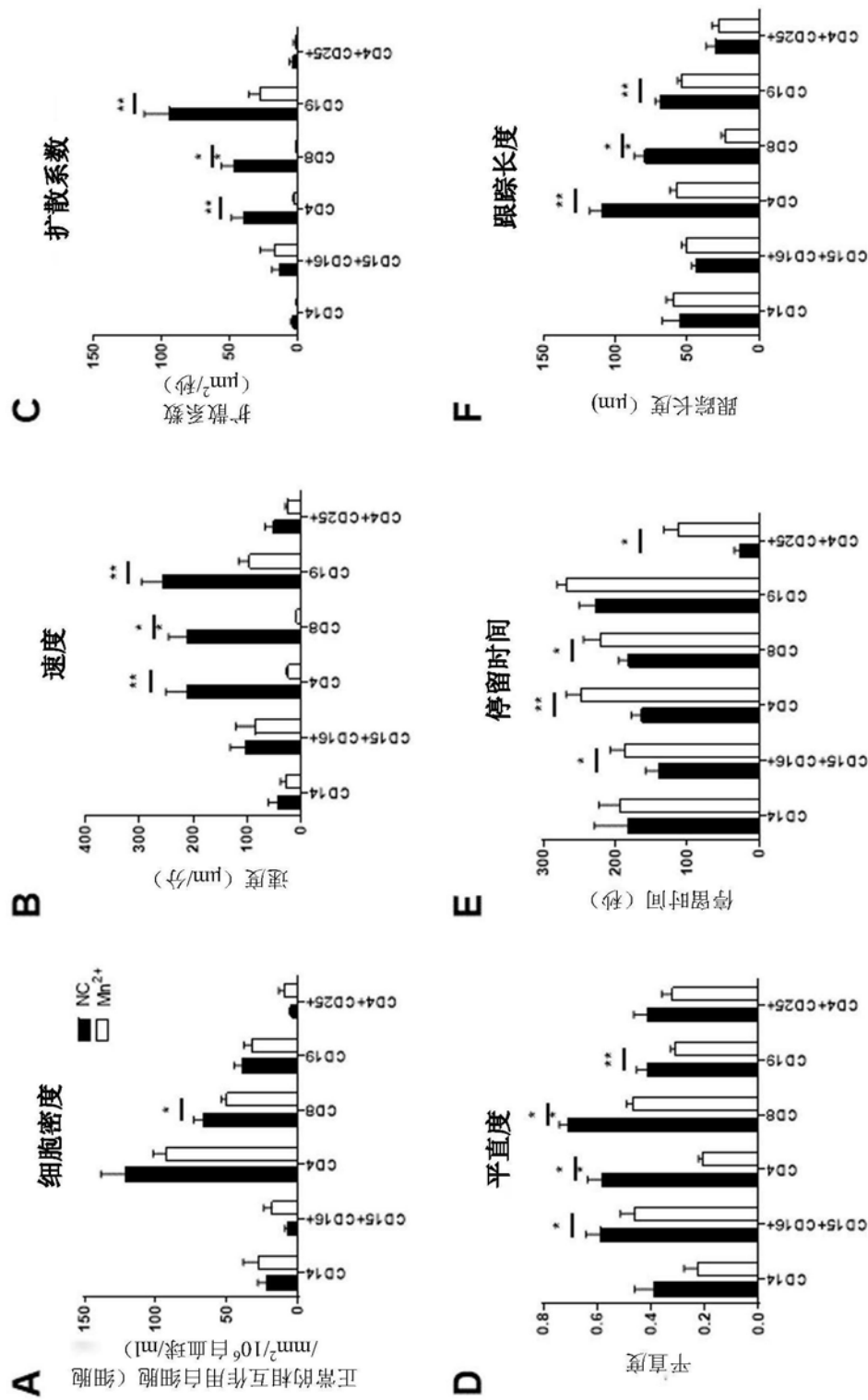


图3

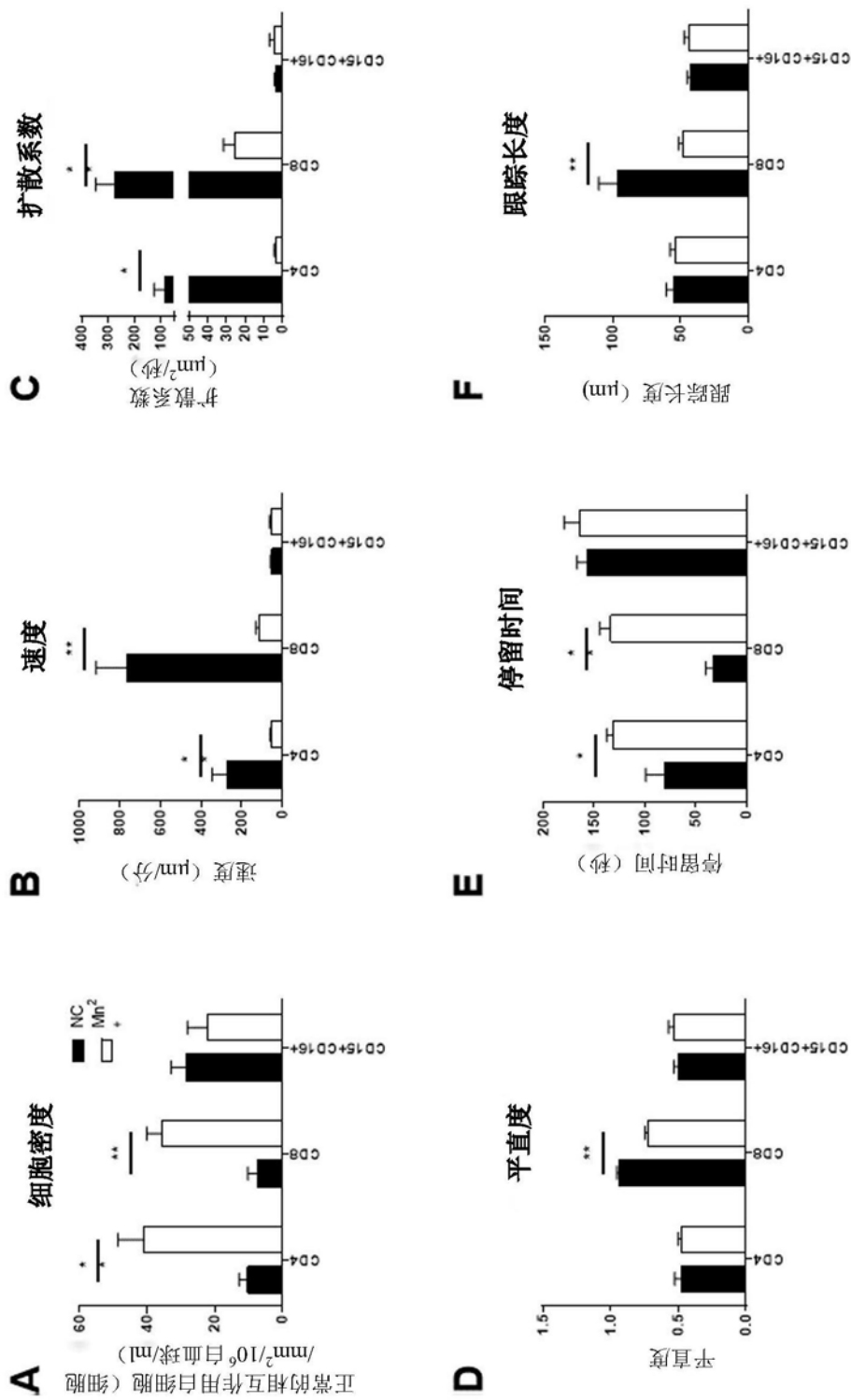


图4

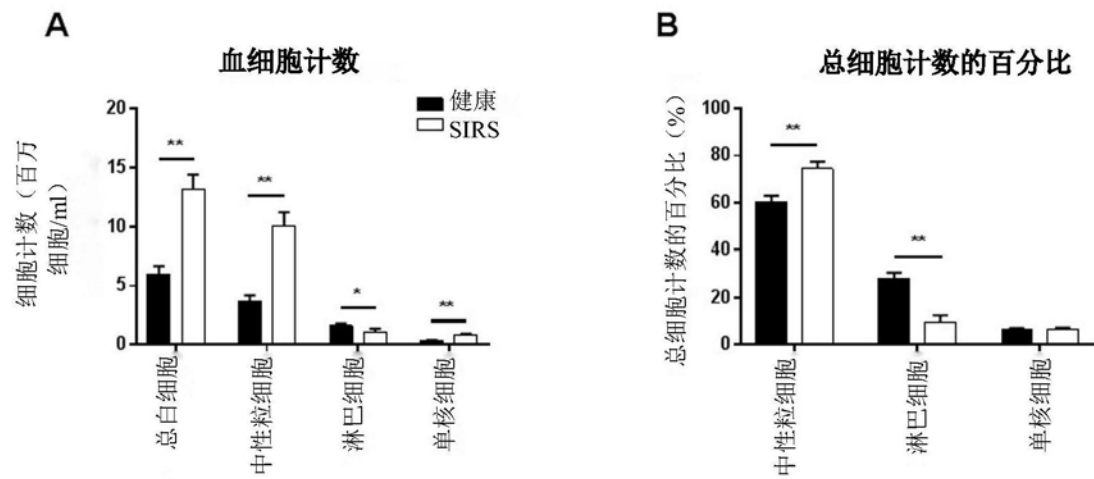


图5

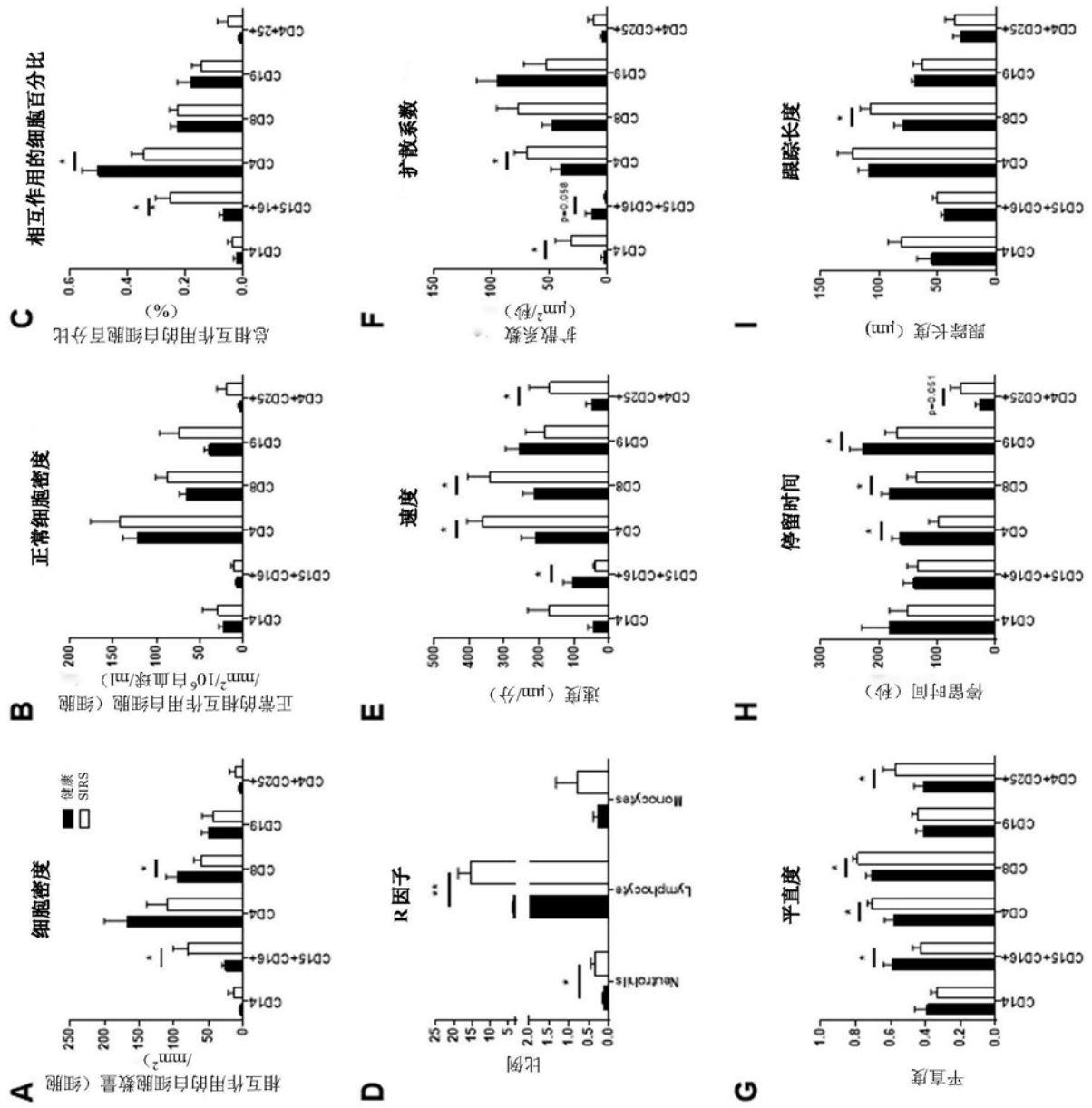


图6

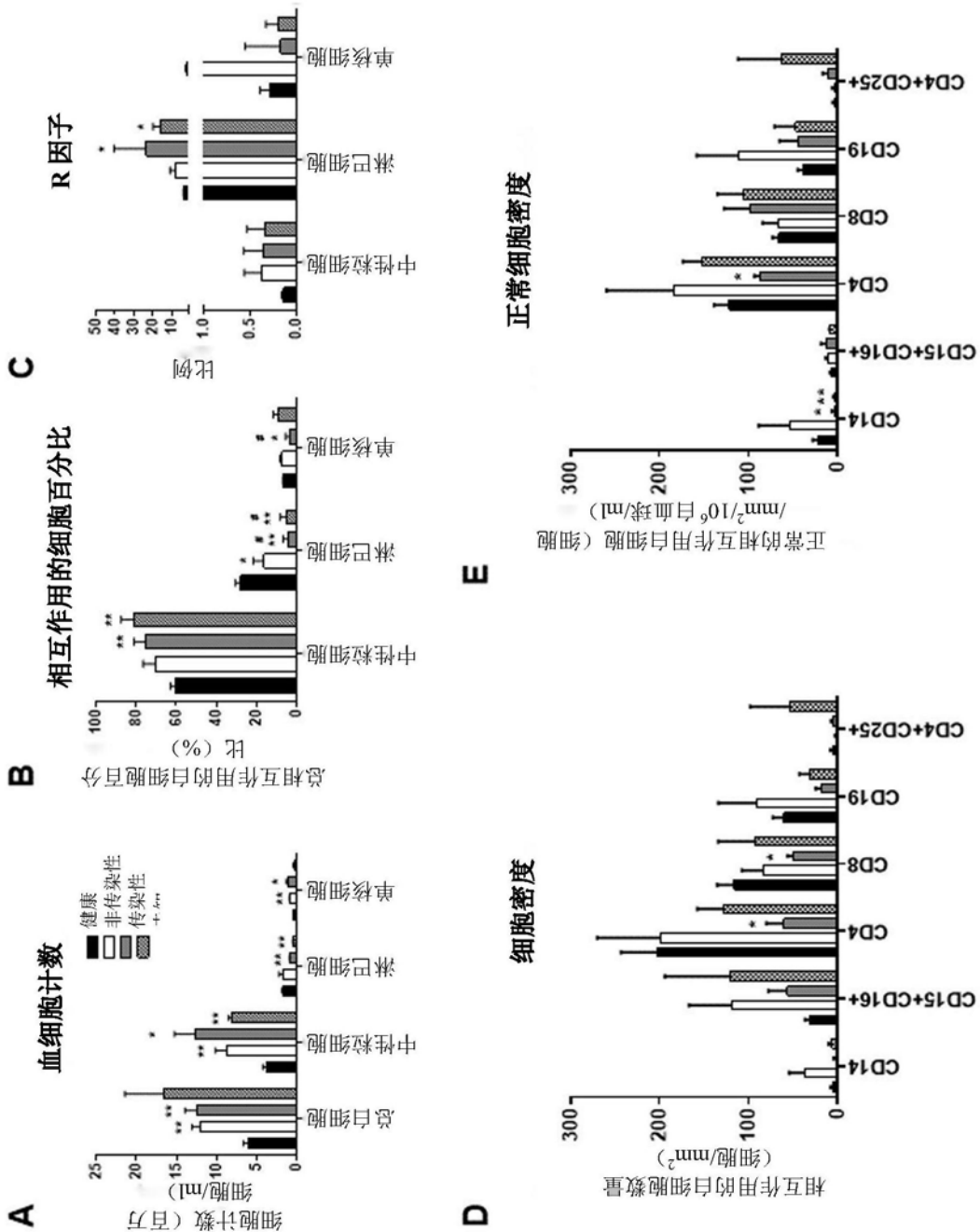


图7

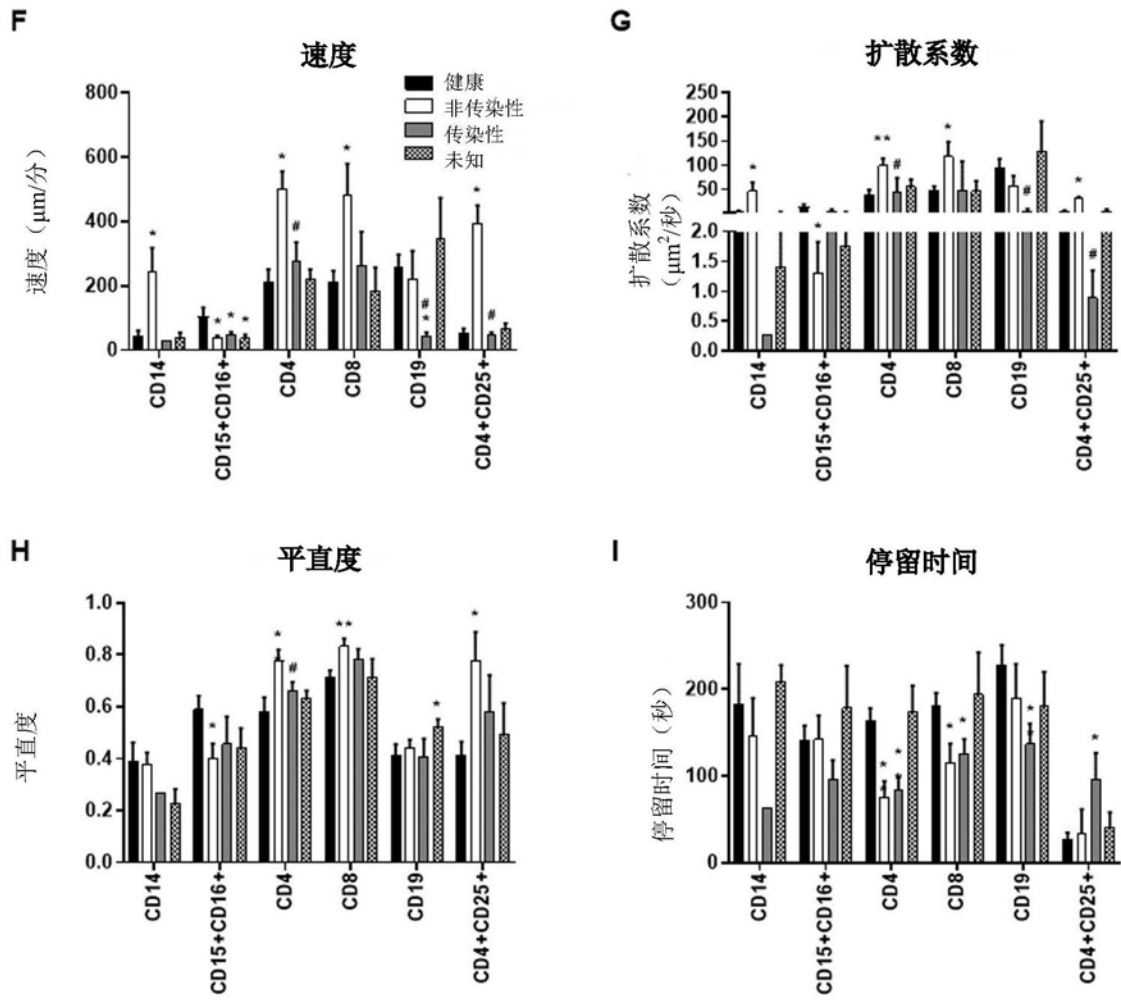


图7(续)

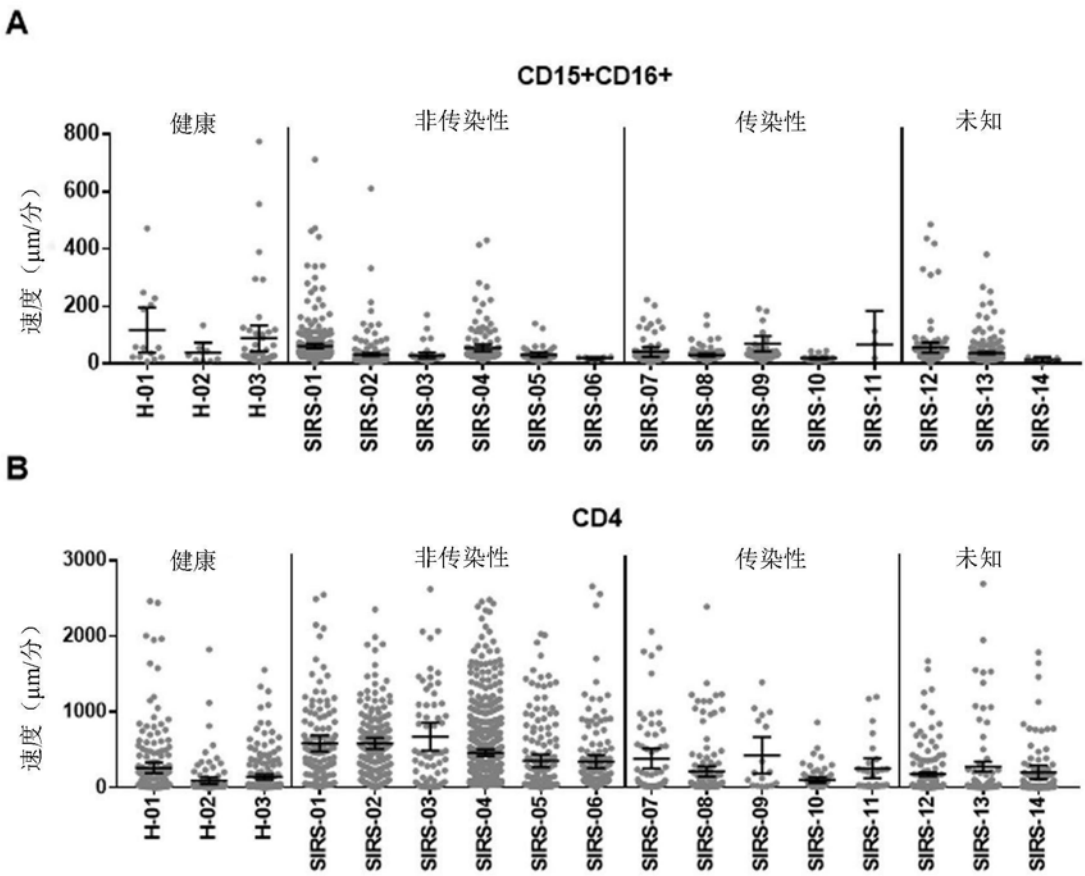


图8

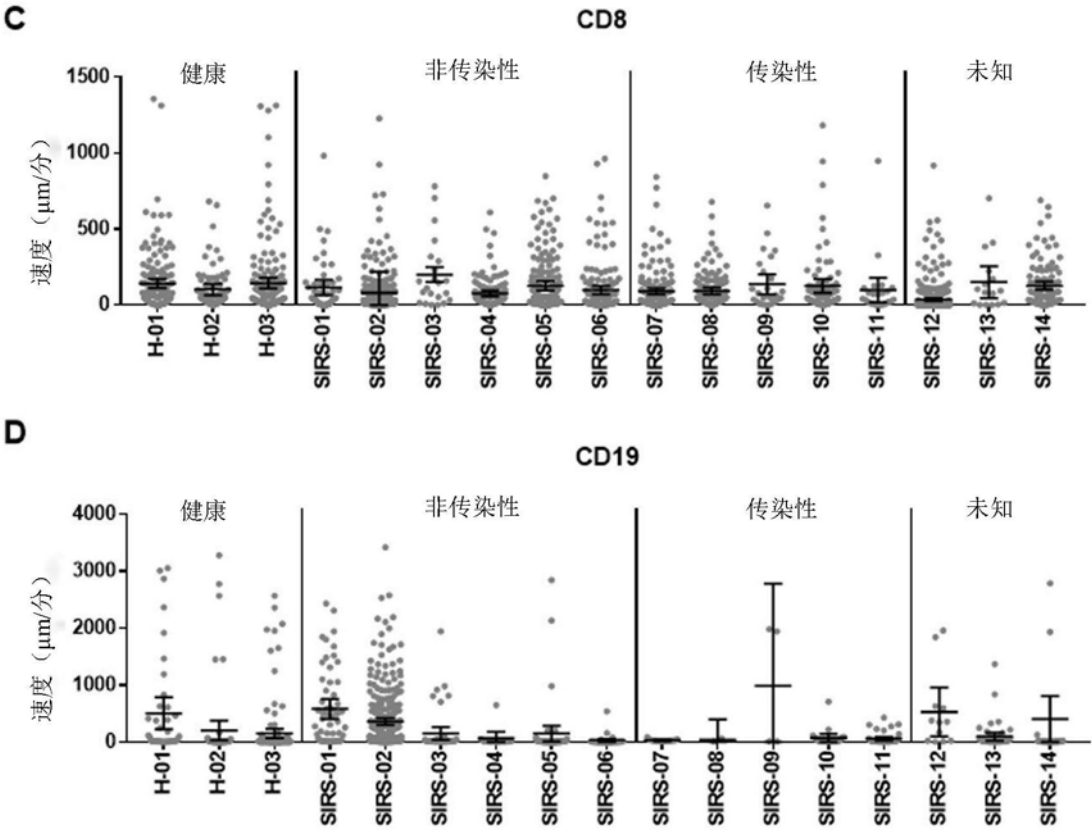


图8(续)

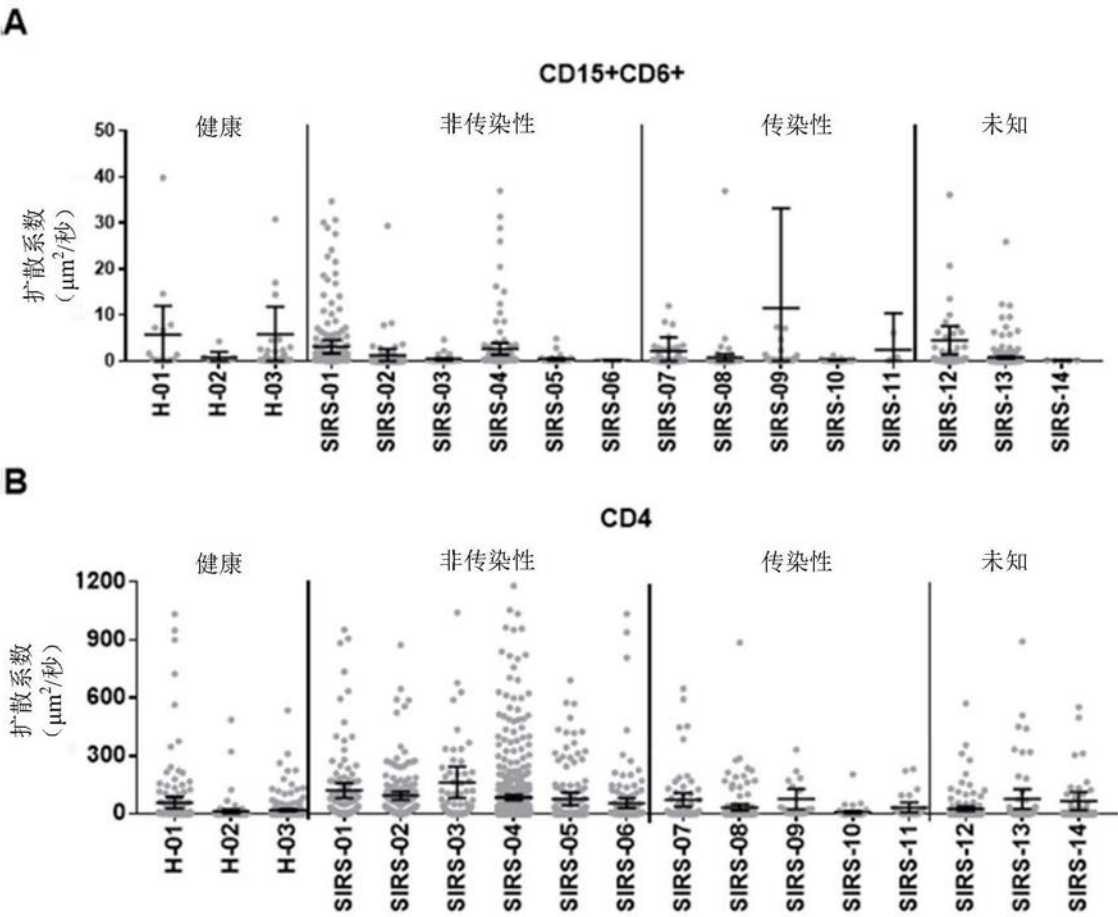


图9

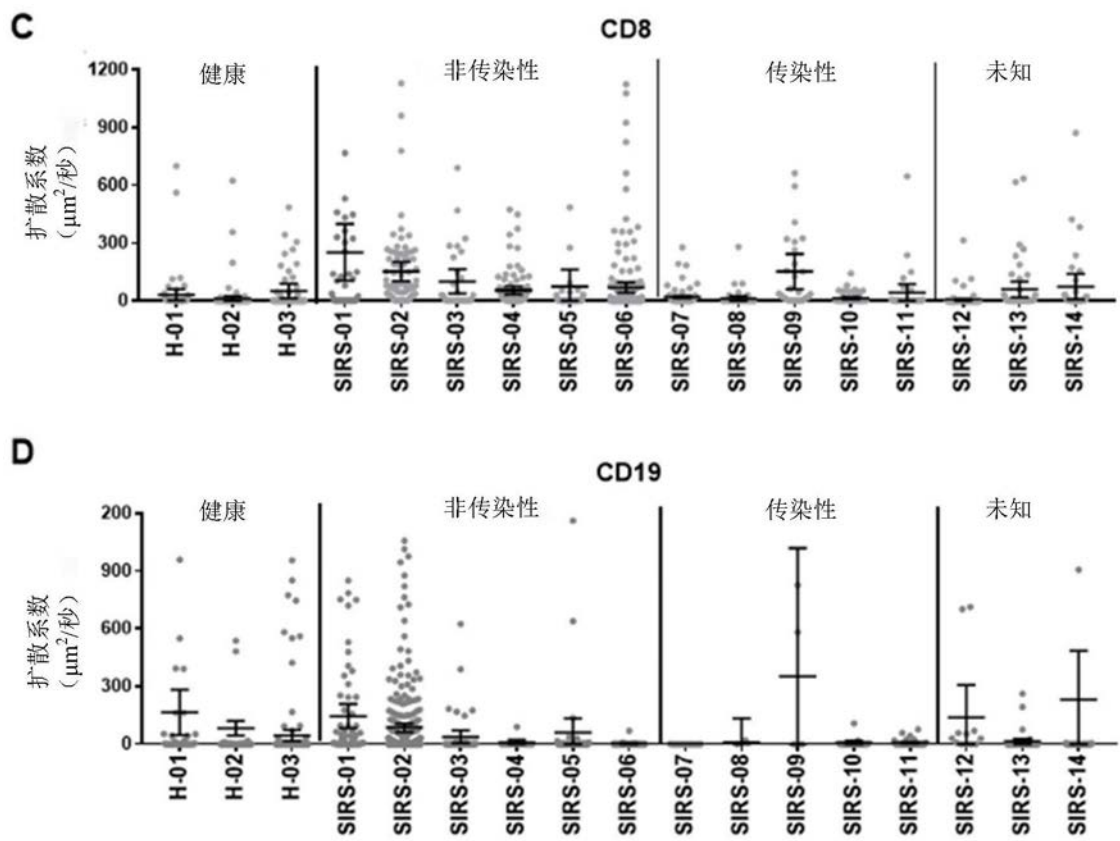


图9(续)

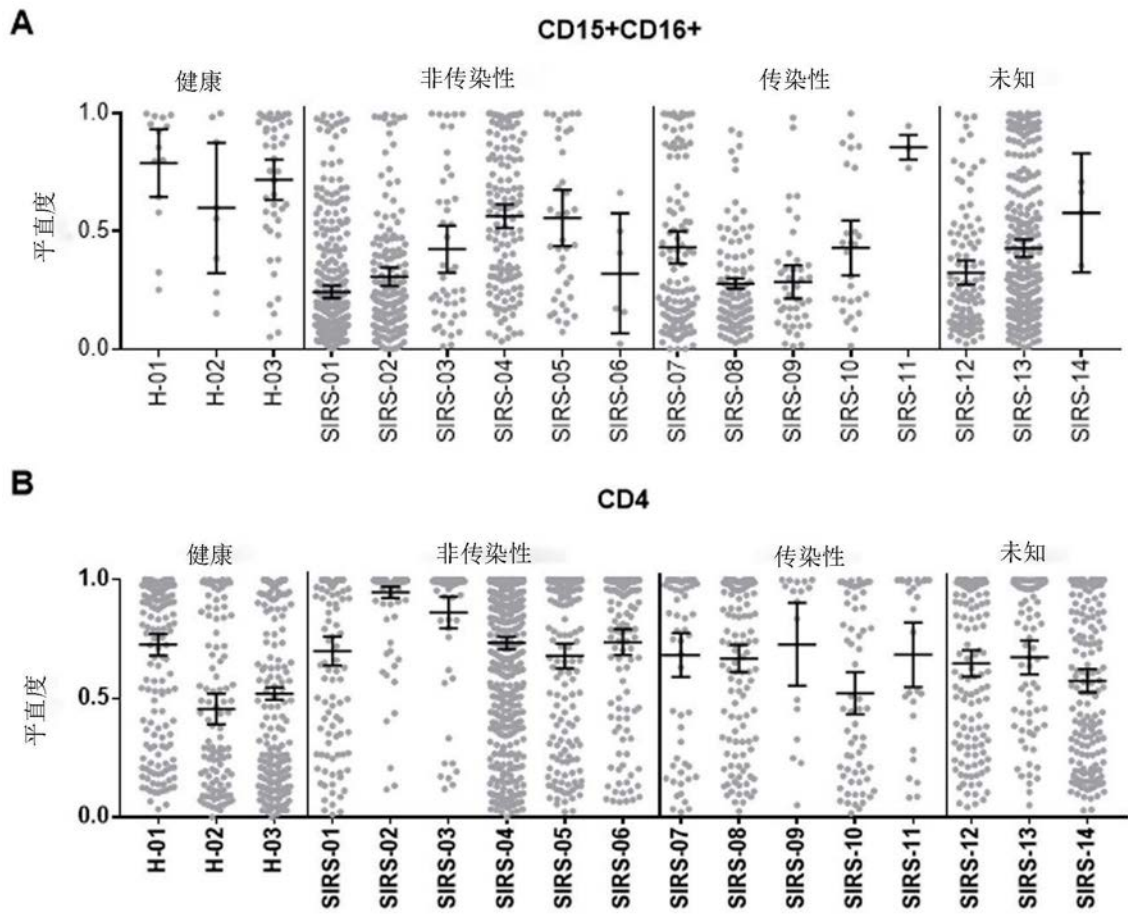


图10

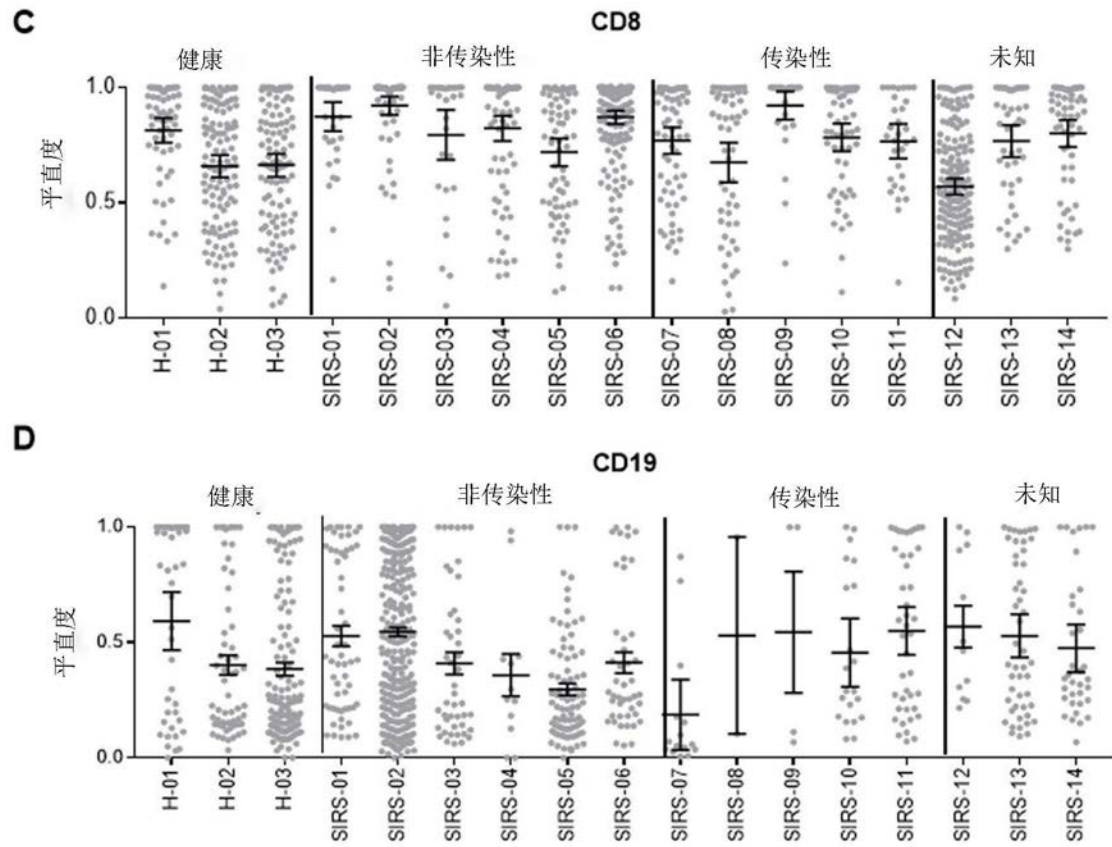


图10(续)

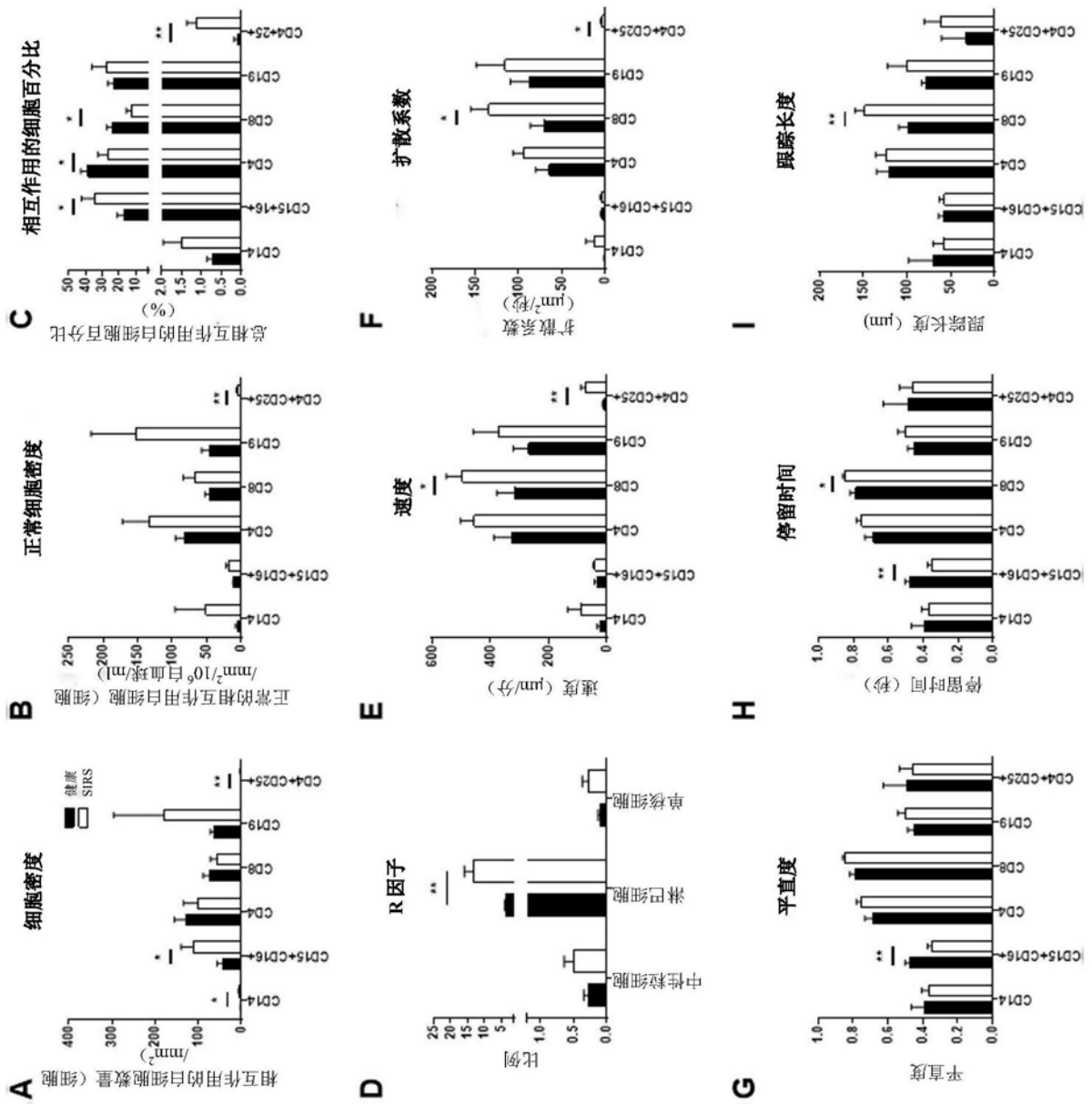


图11

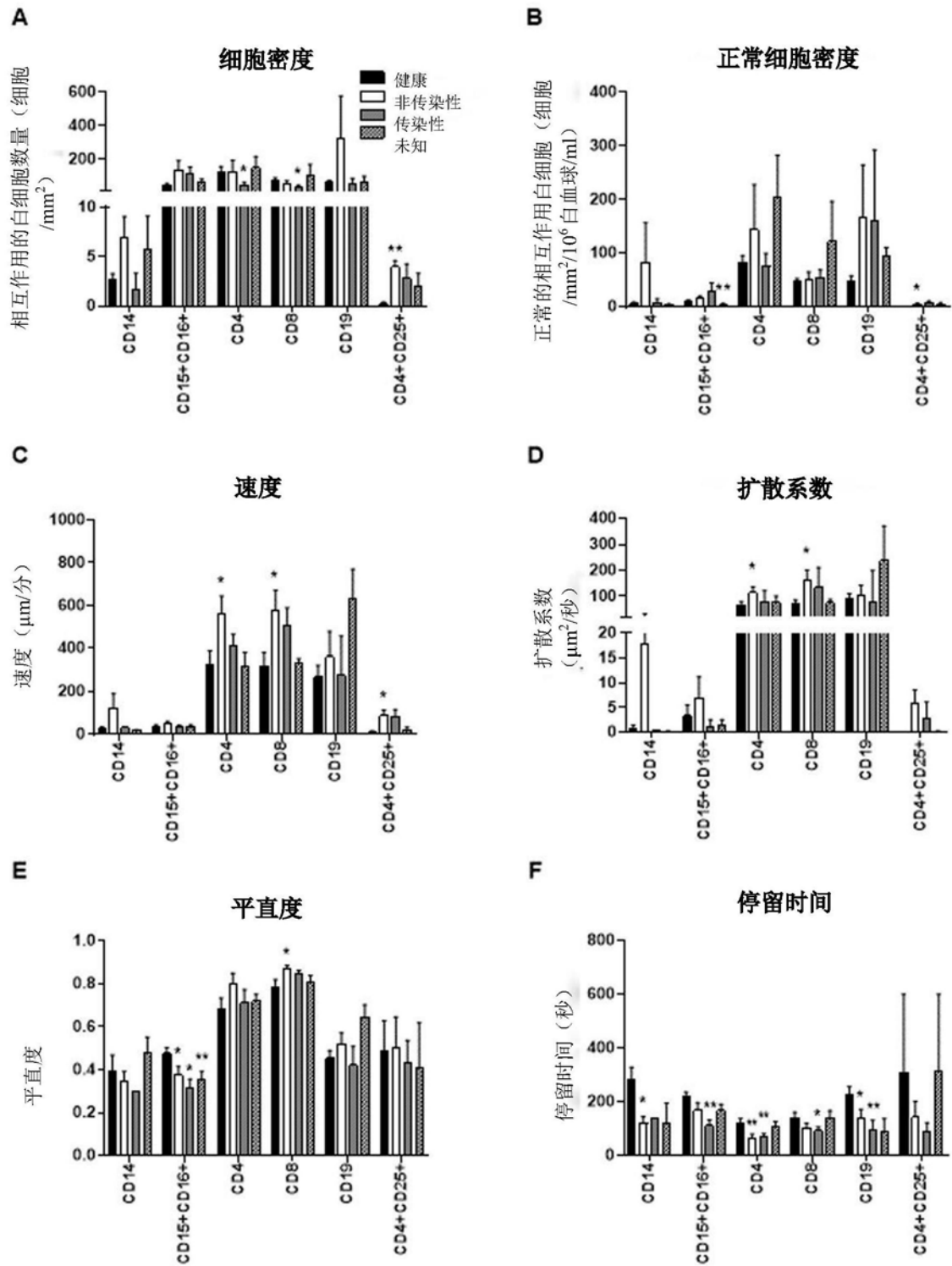


图12

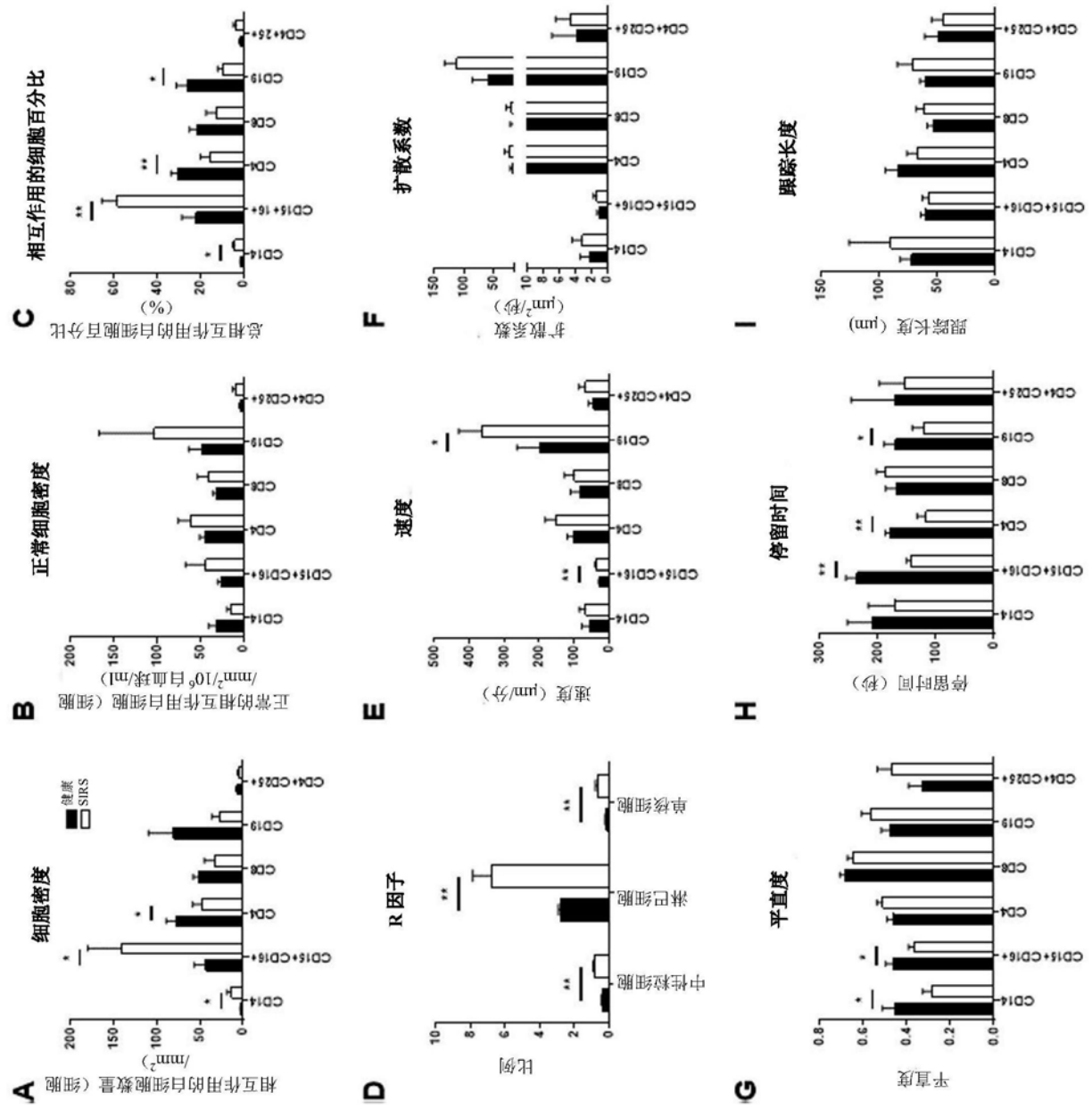


图13

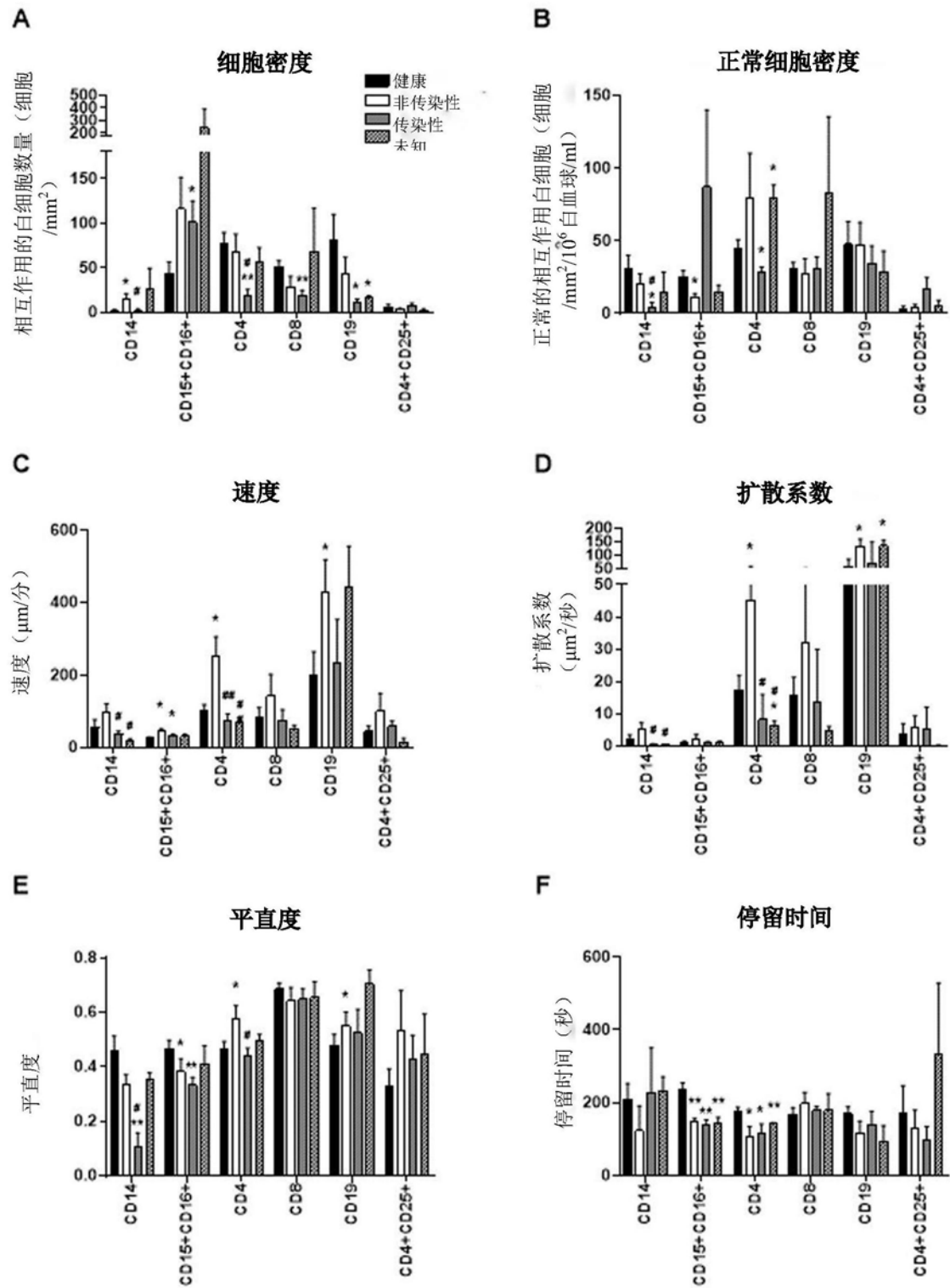


图14

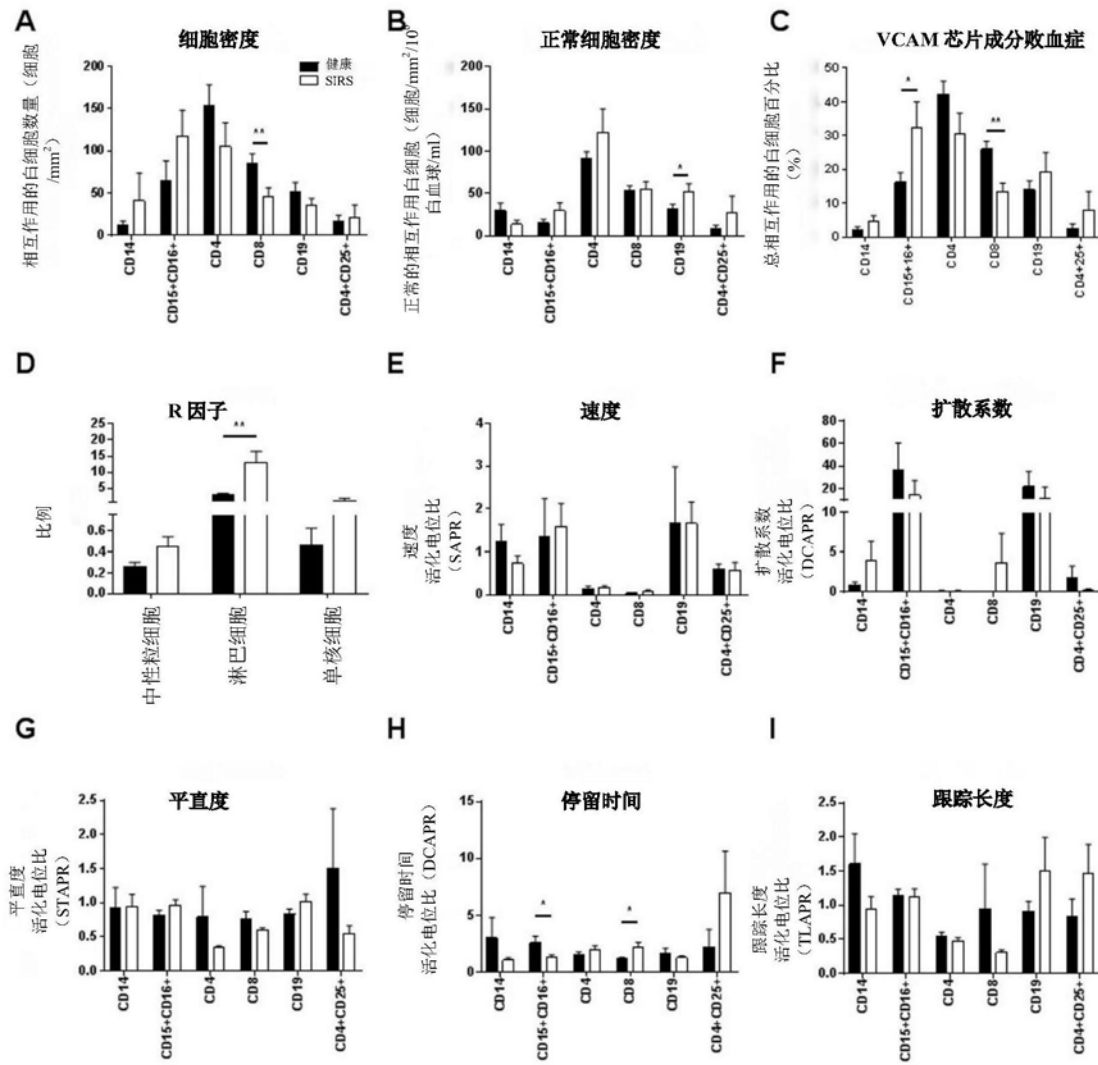


图15

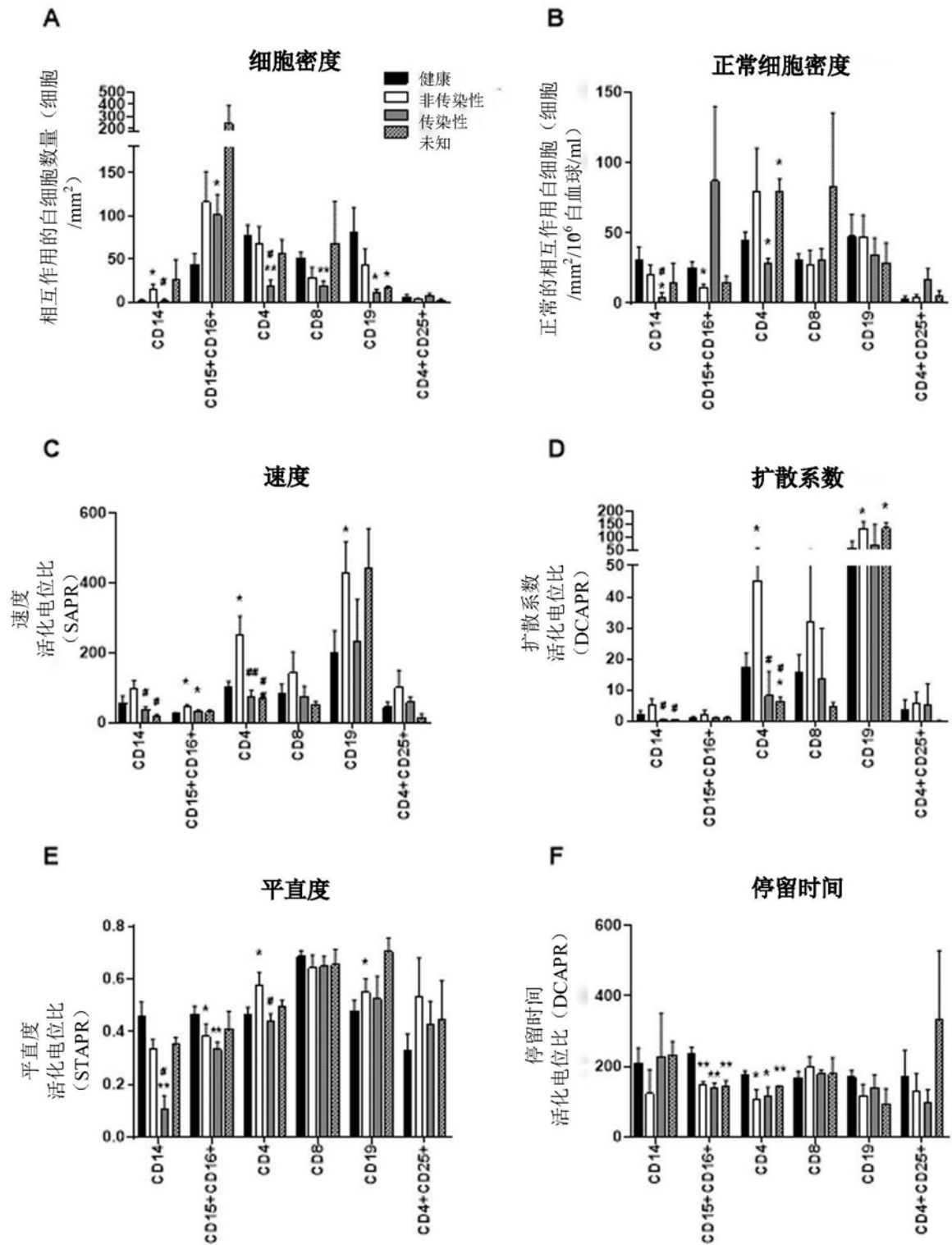


图16

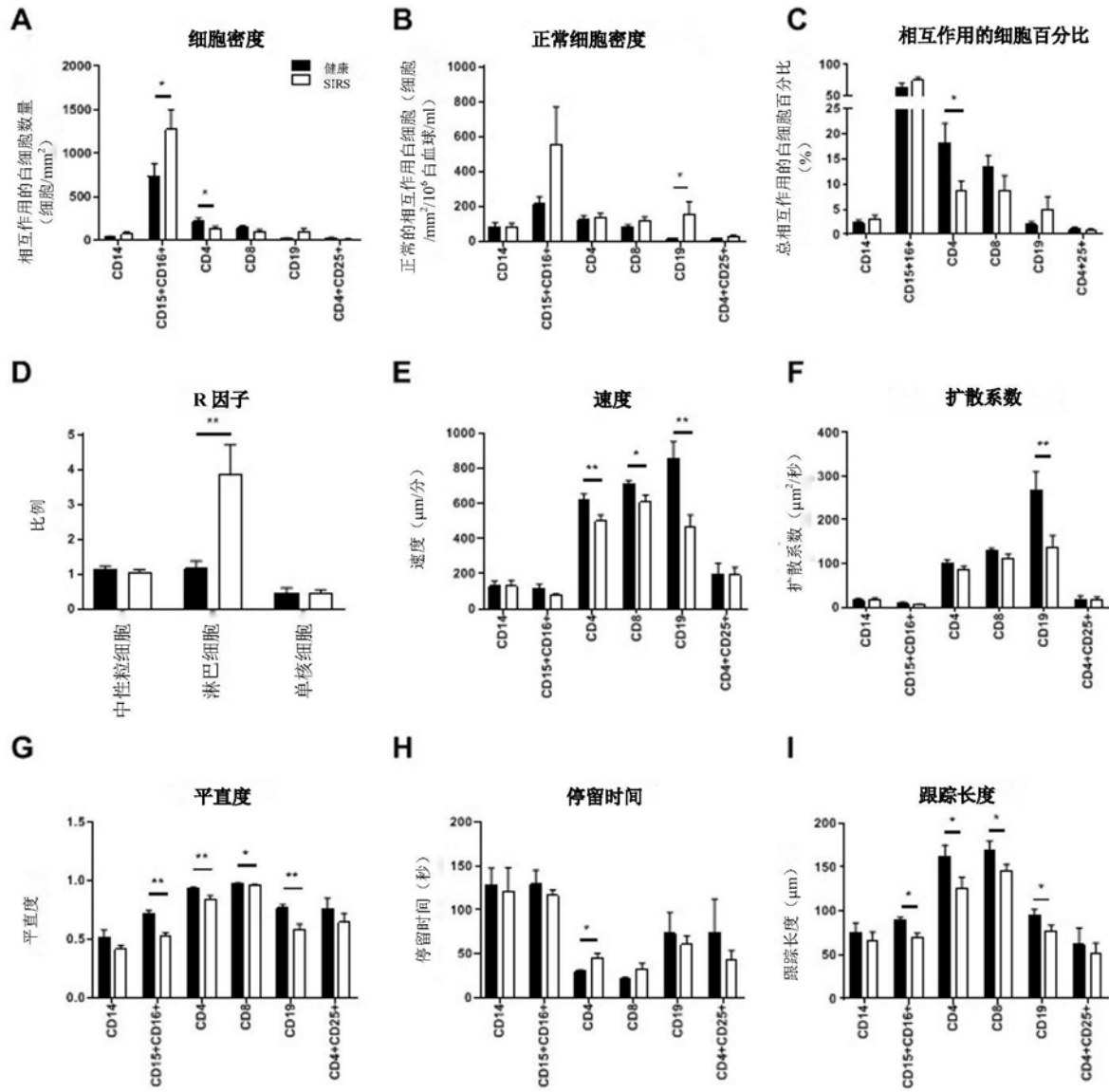


图17

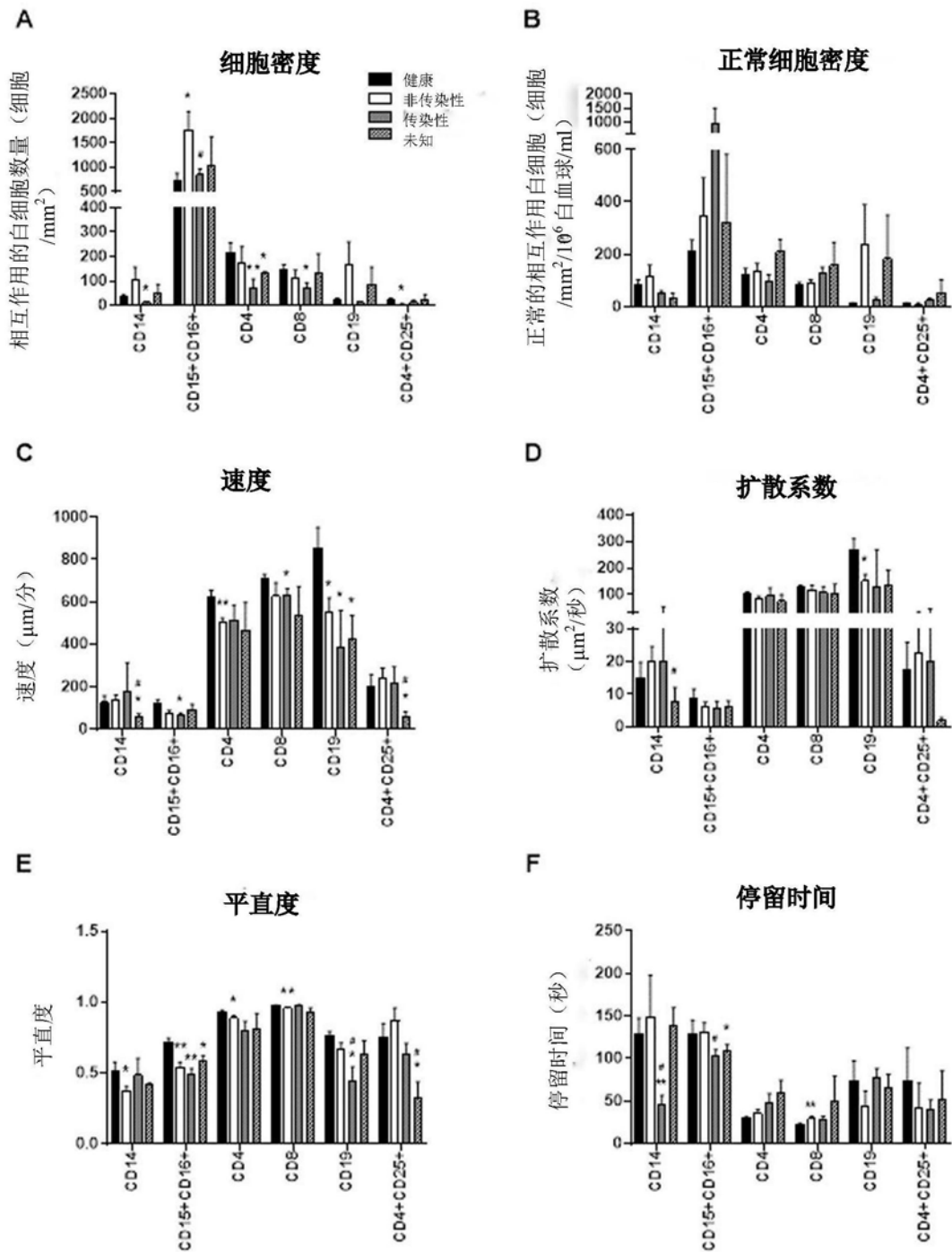


图18

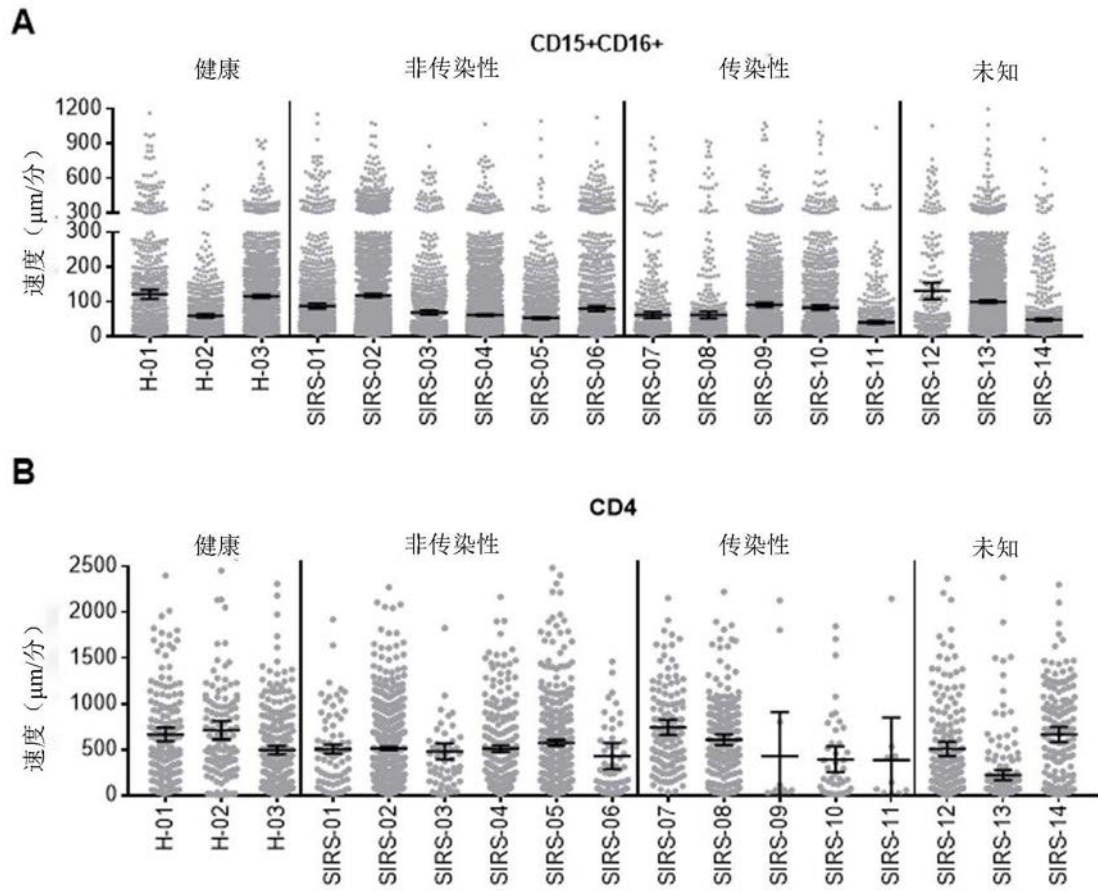


图19

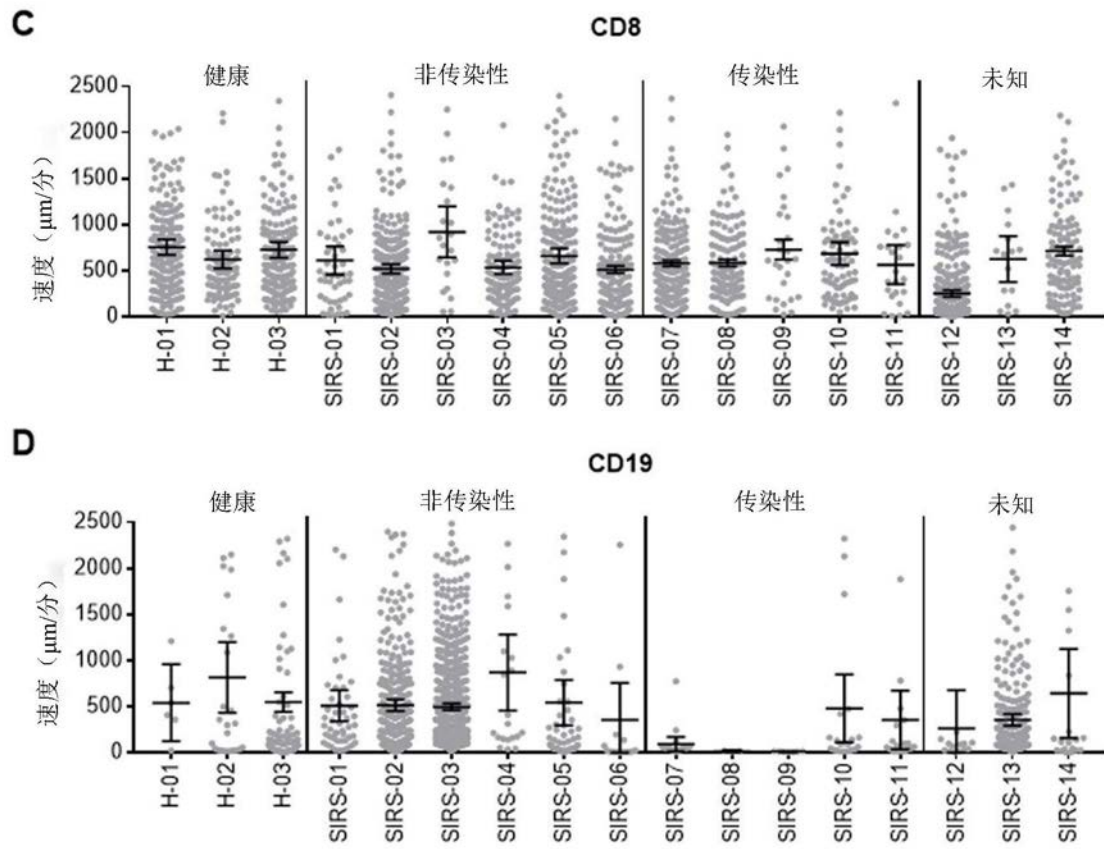


图19(续)

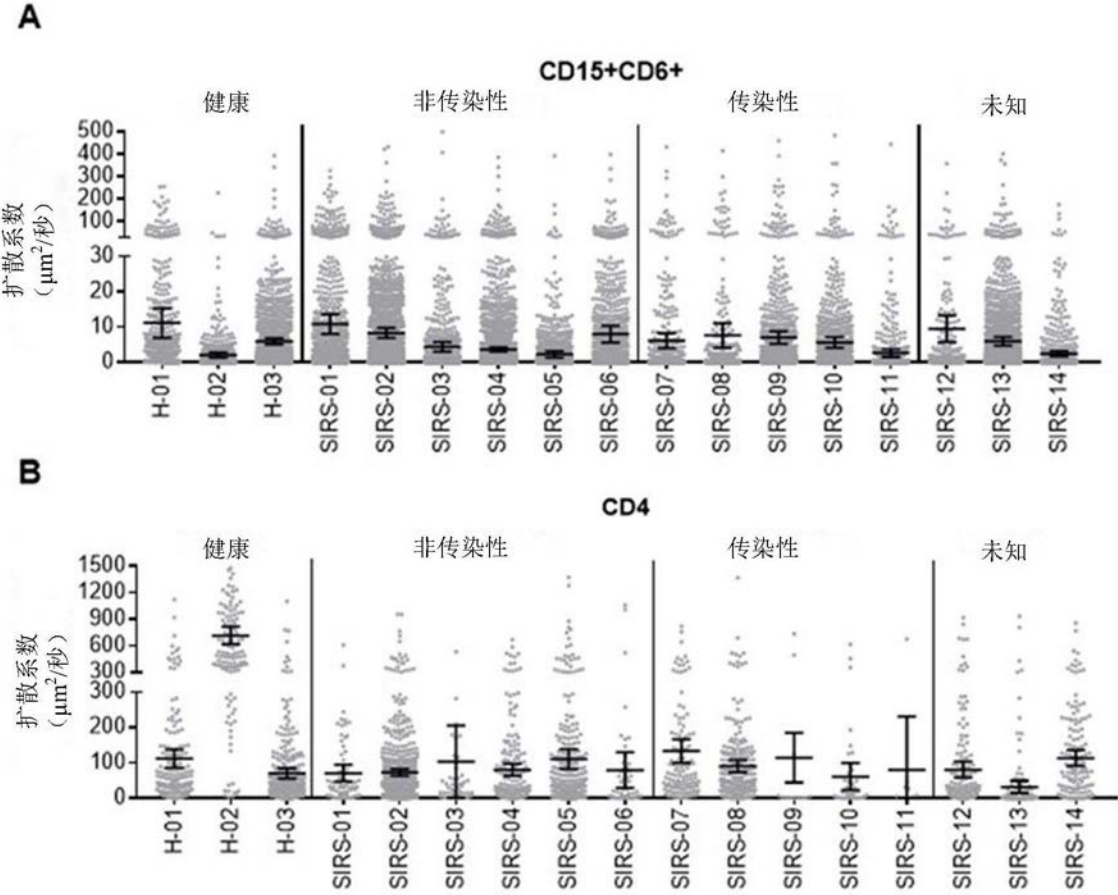


图20

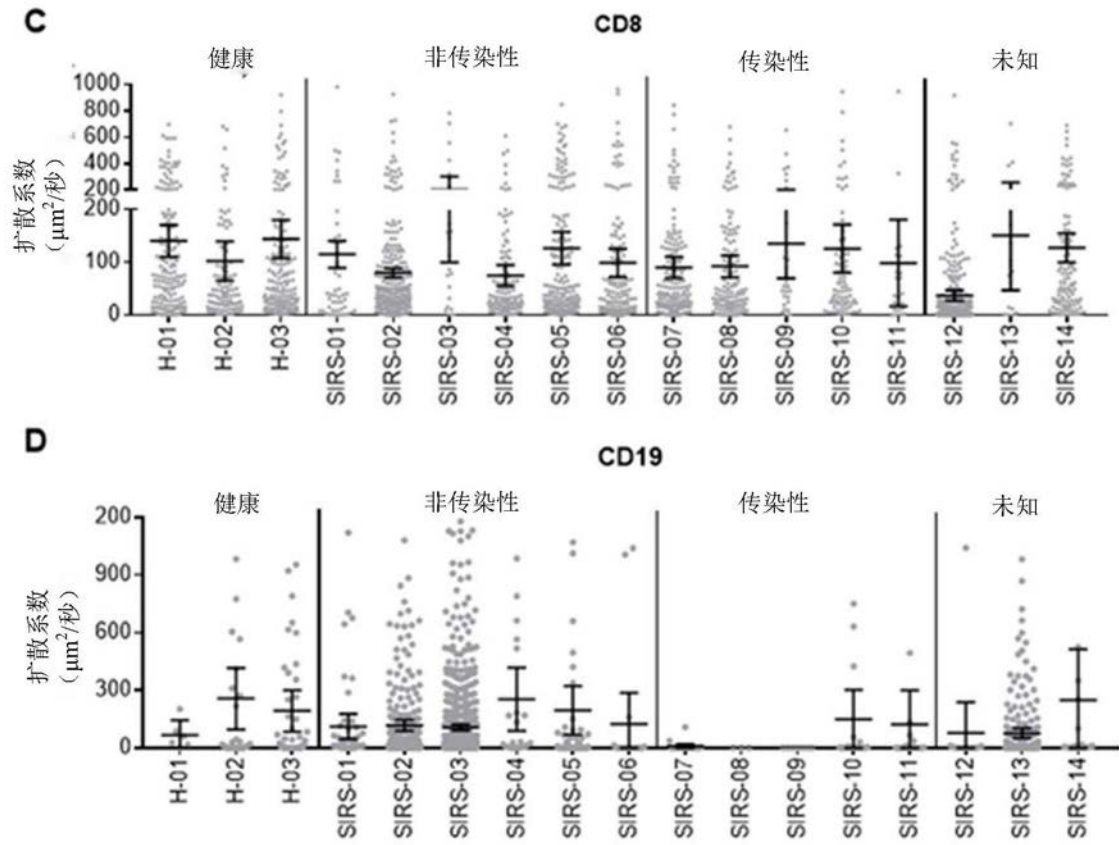


图20 (续)

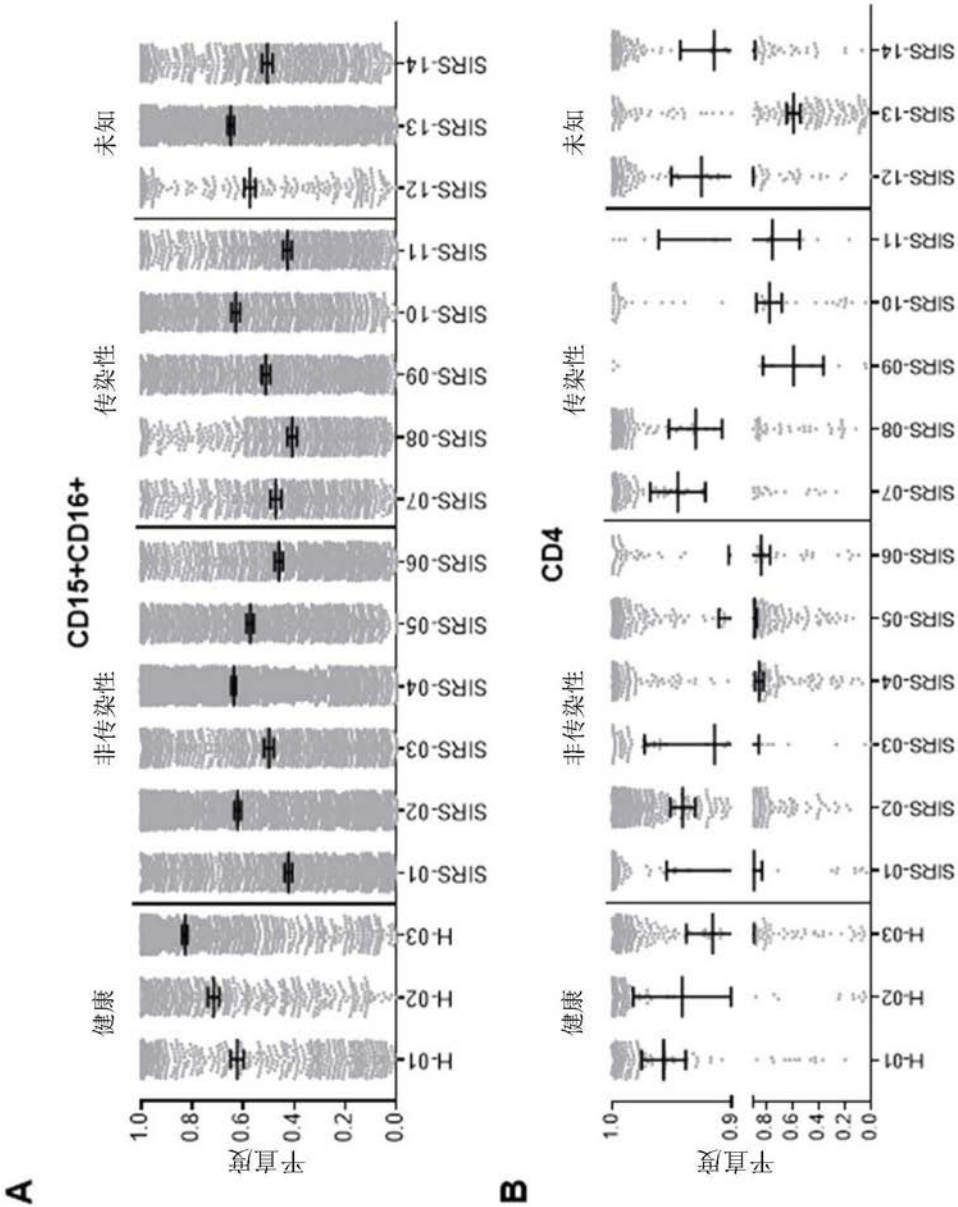


图21

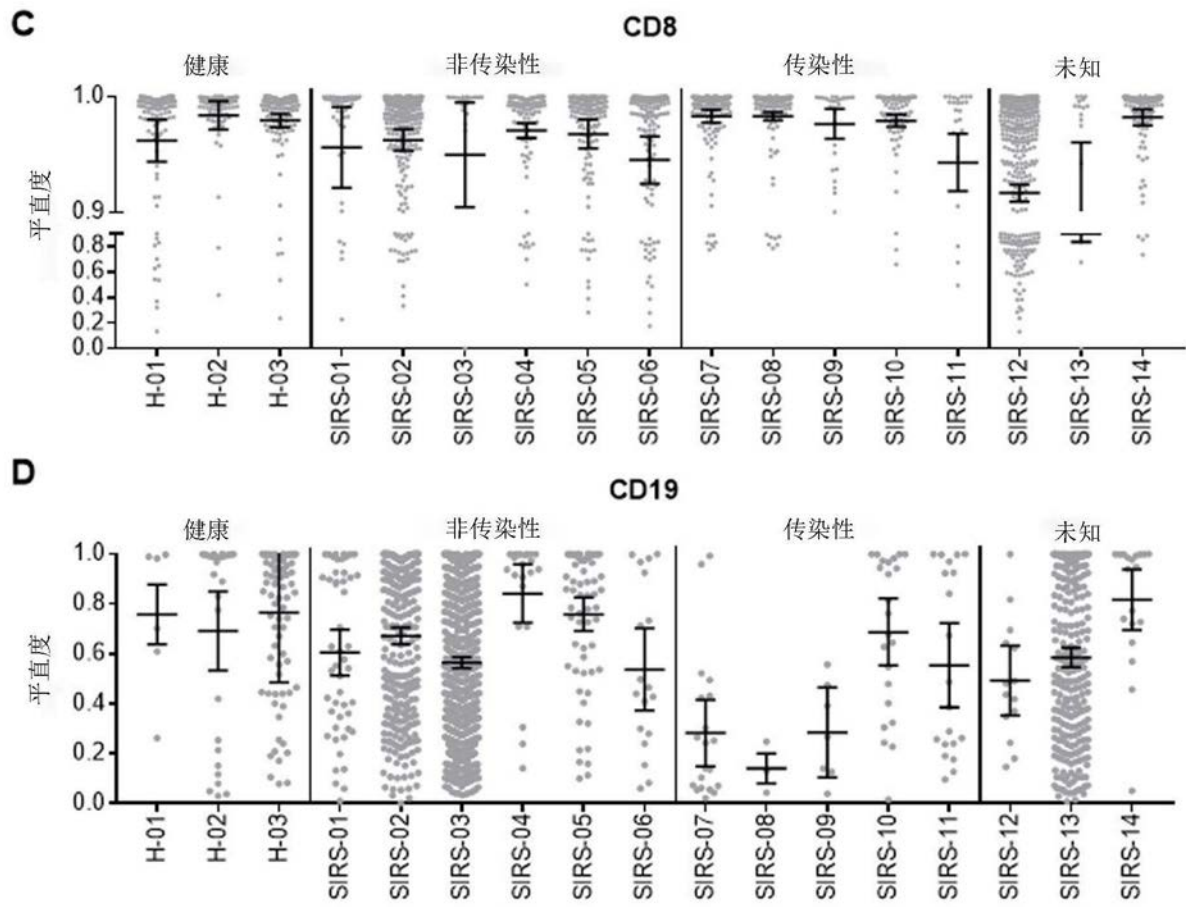


图21 (续)

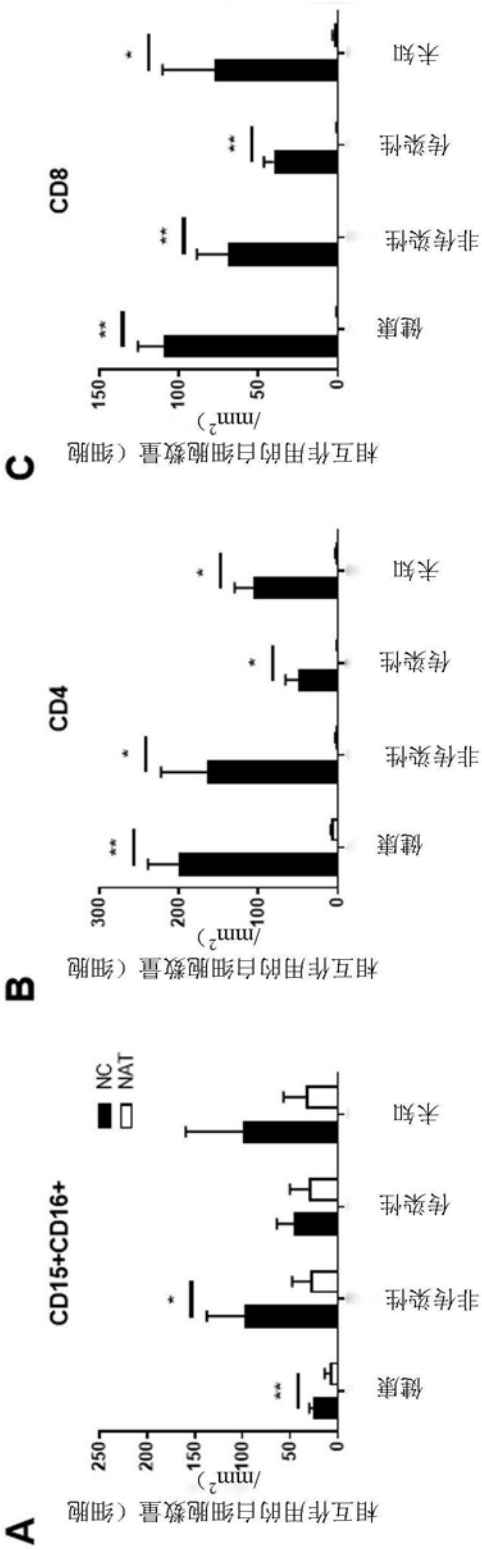


图22

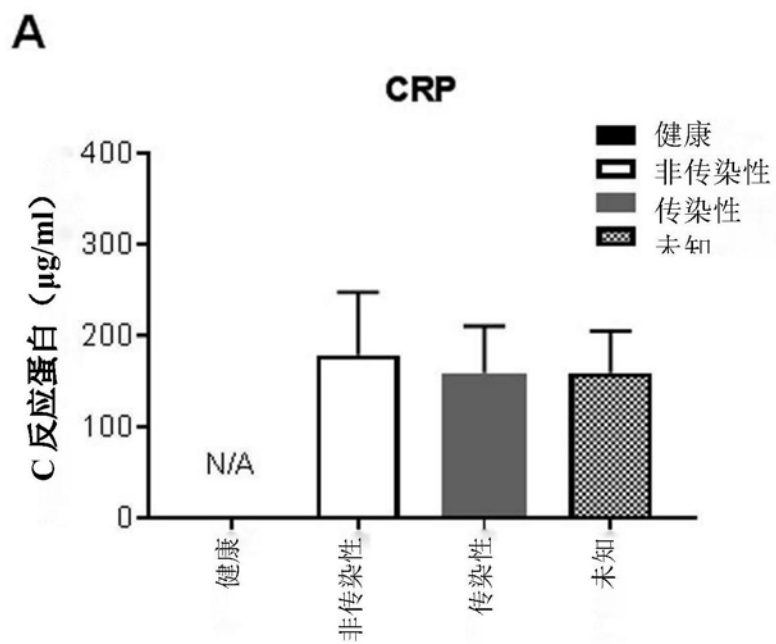


图23

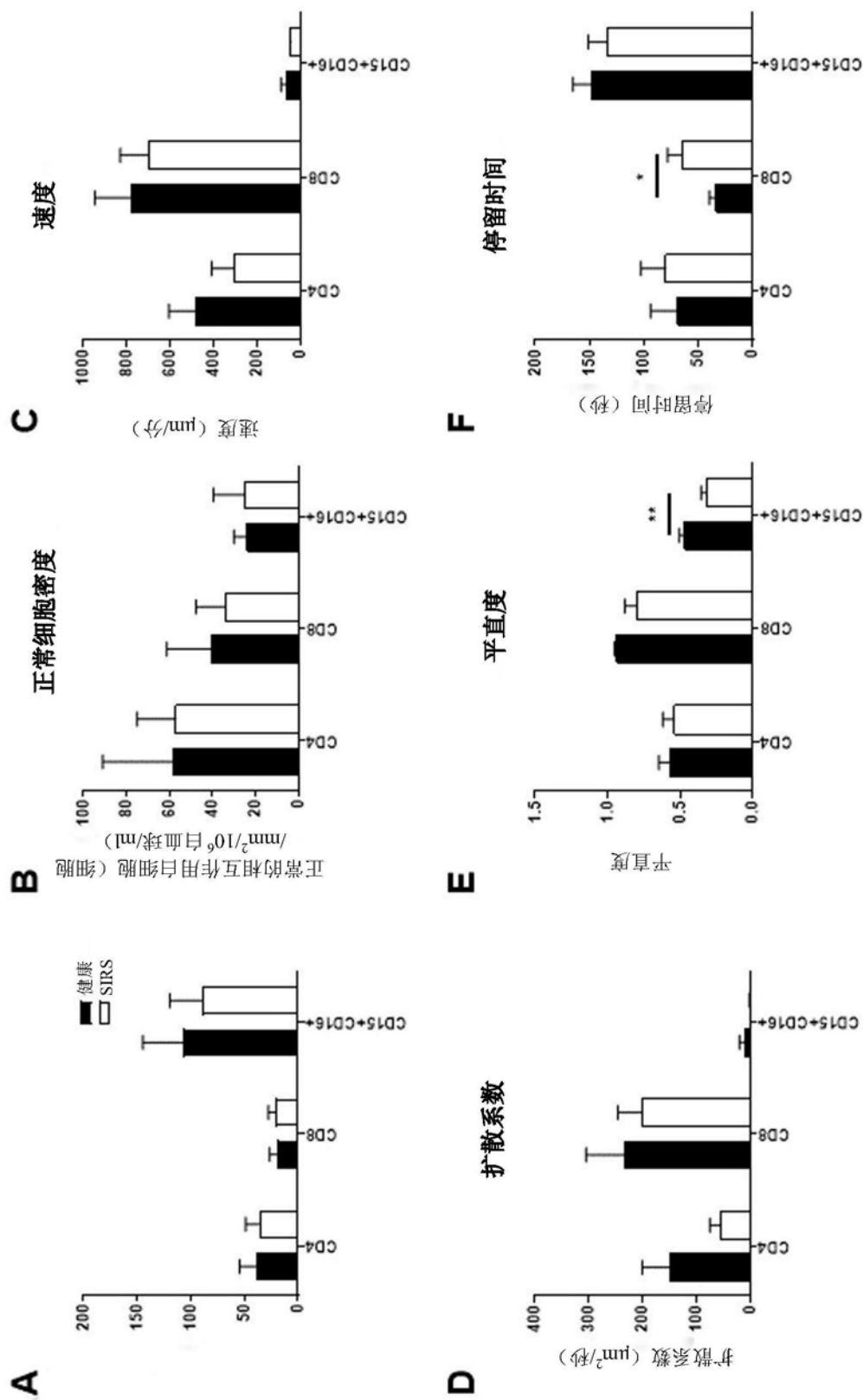


图24

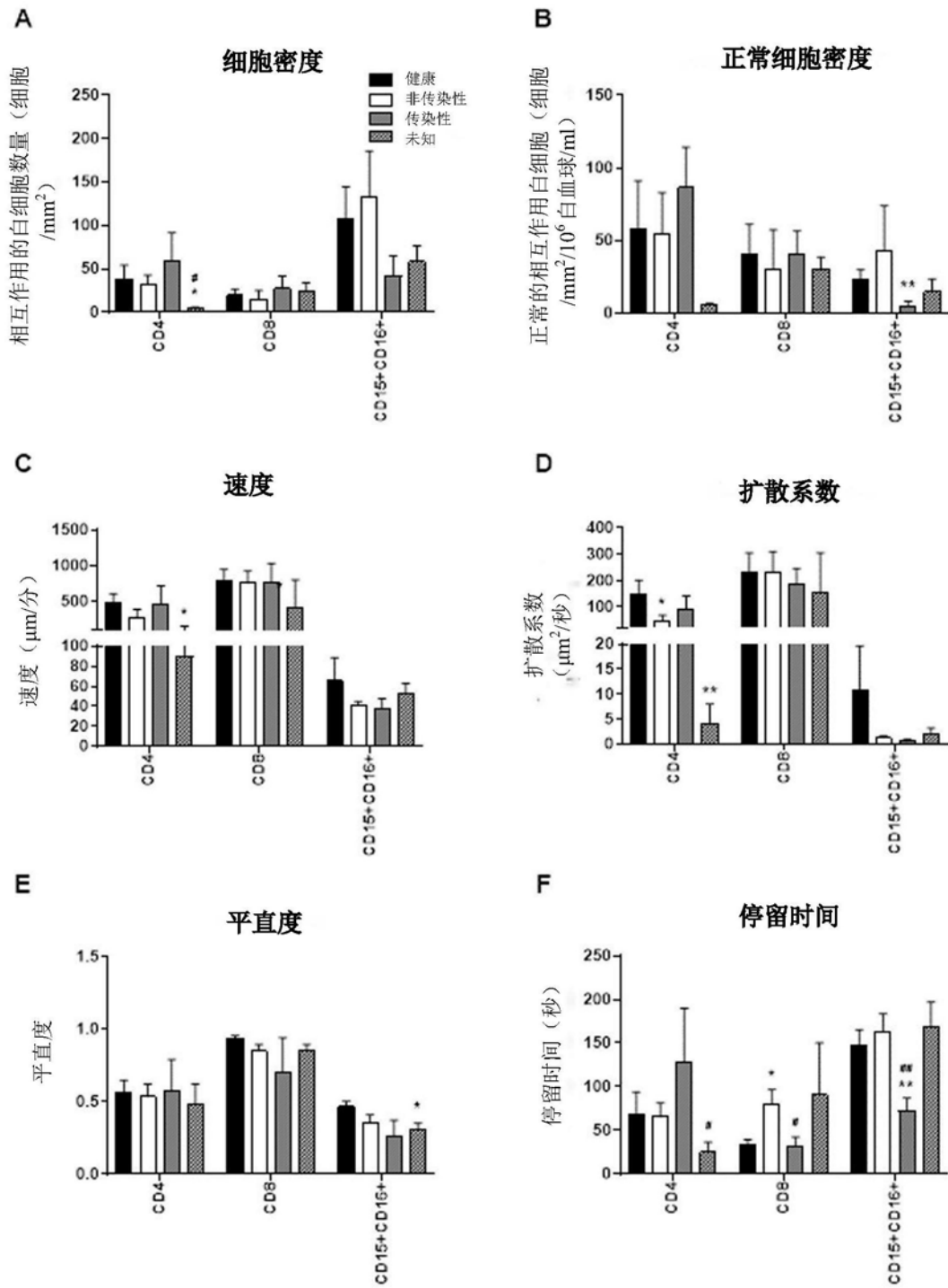


图25

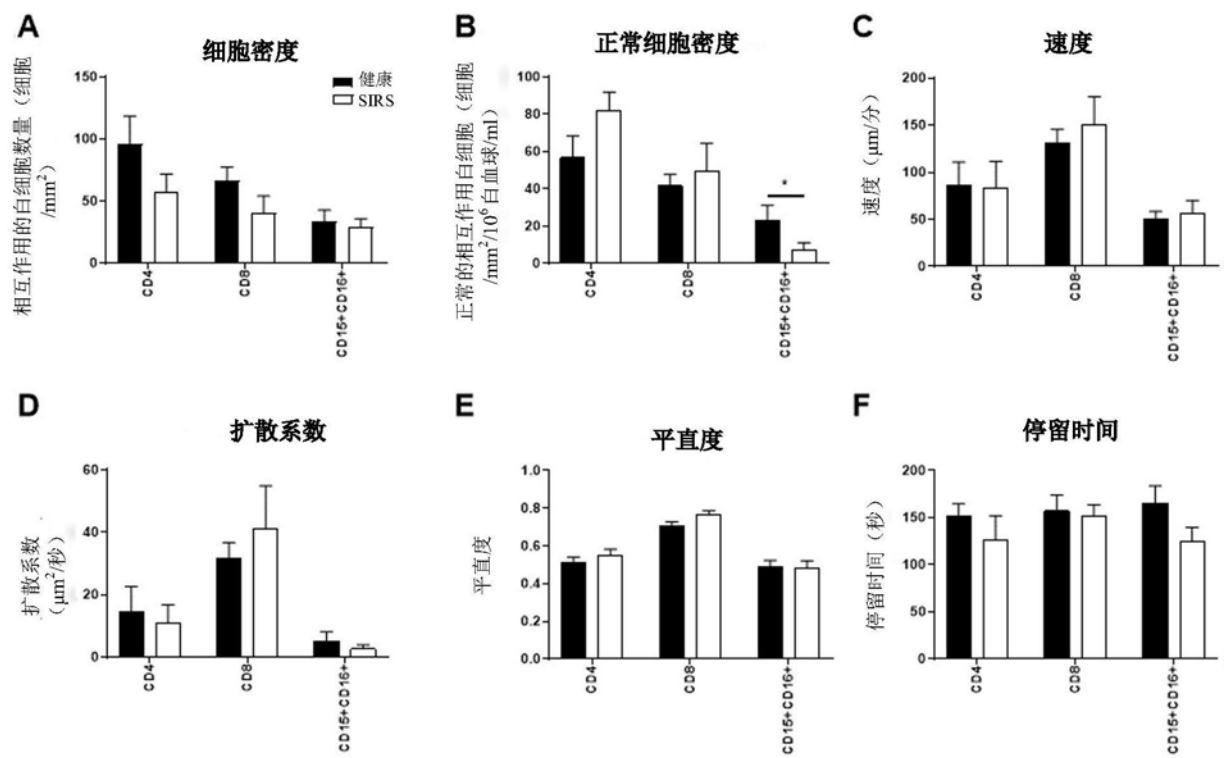


图26

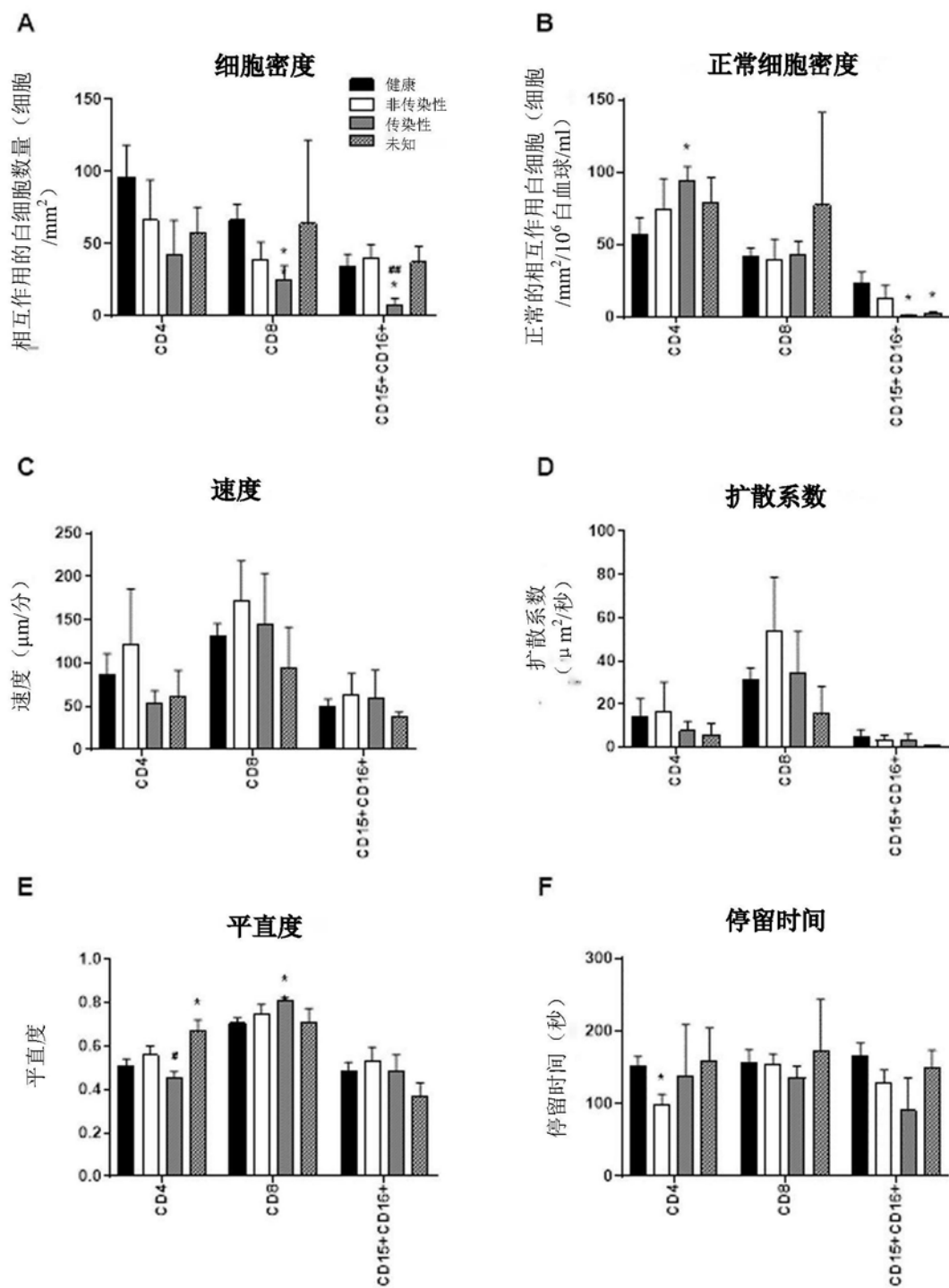


图27

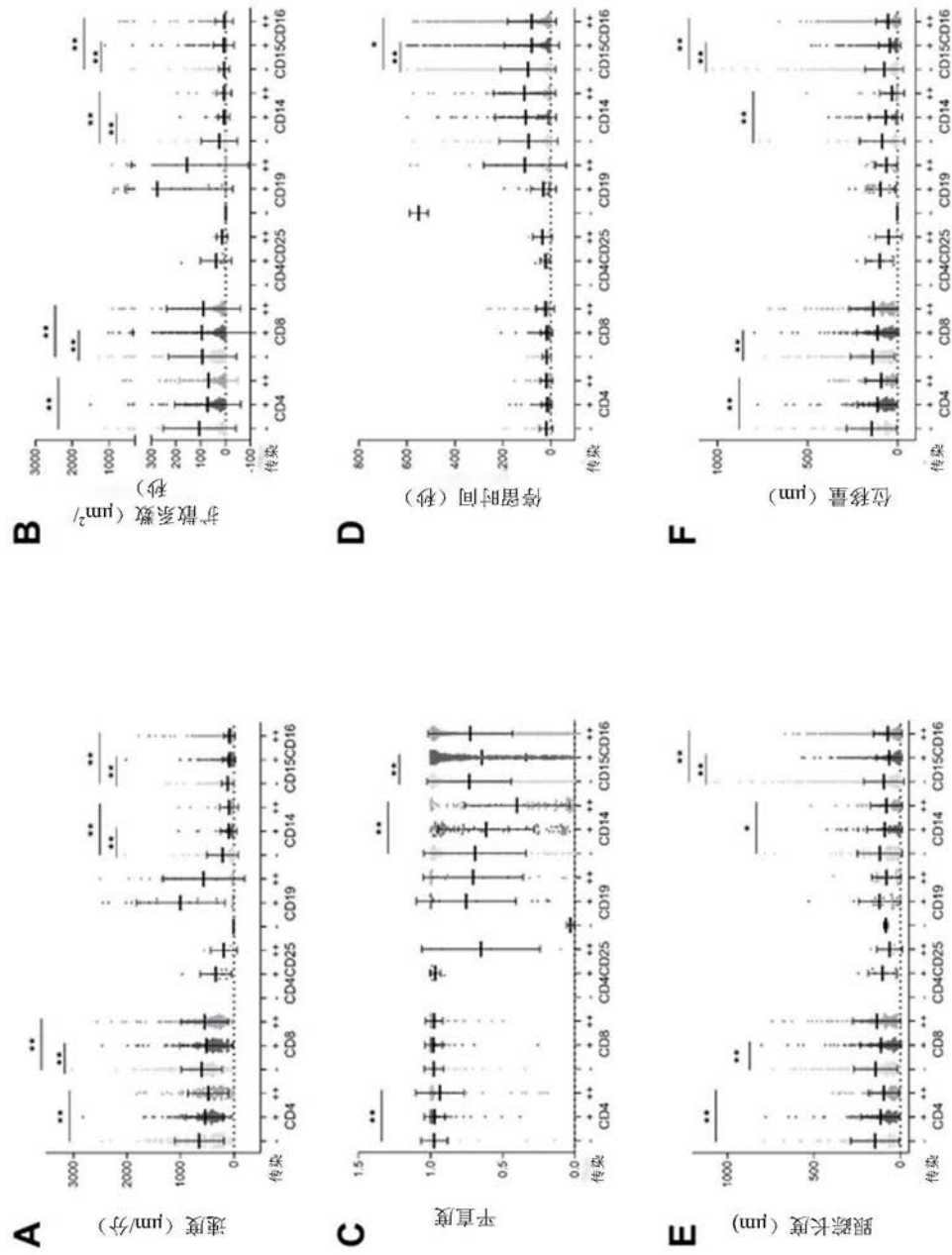


图28

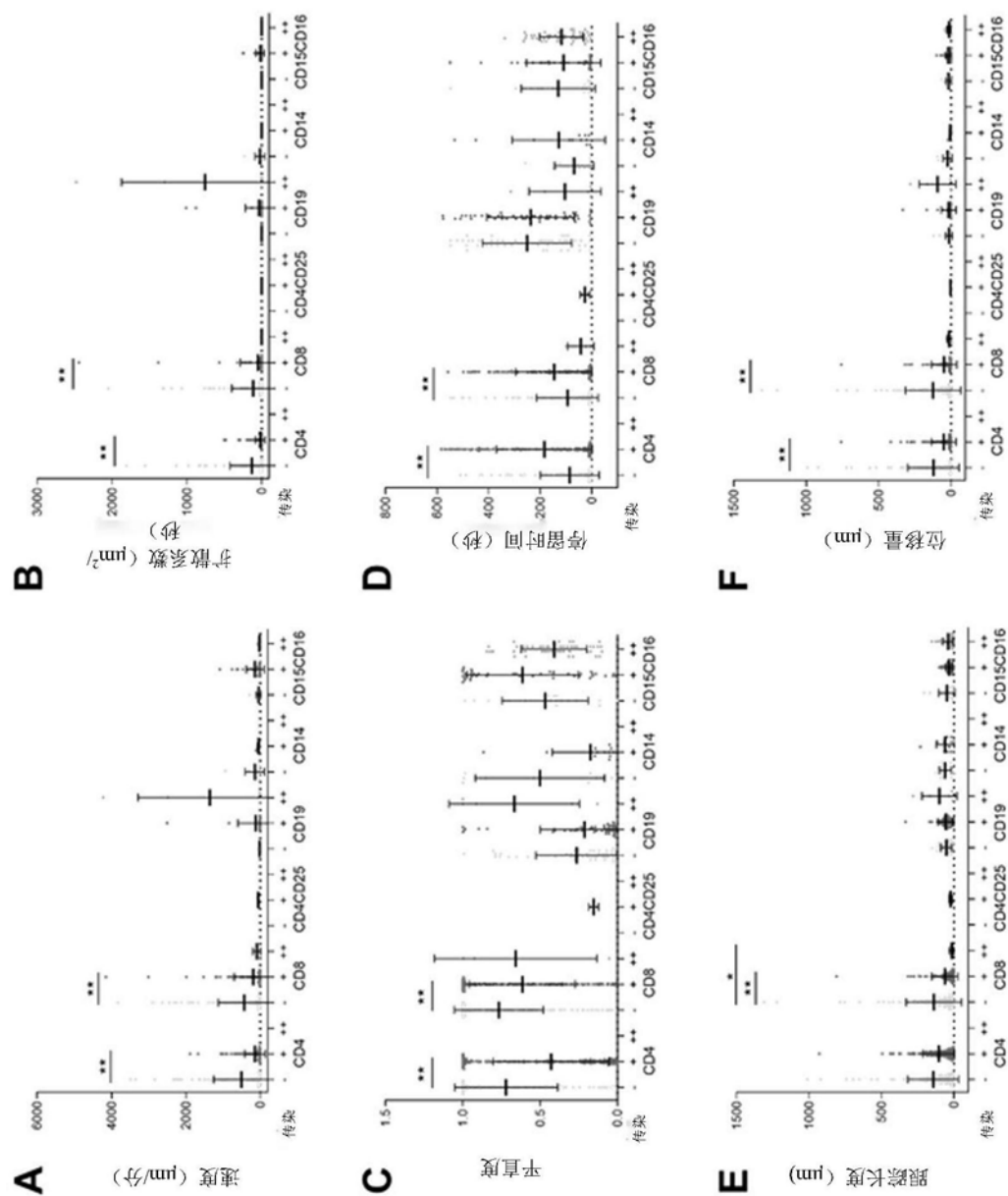


图29

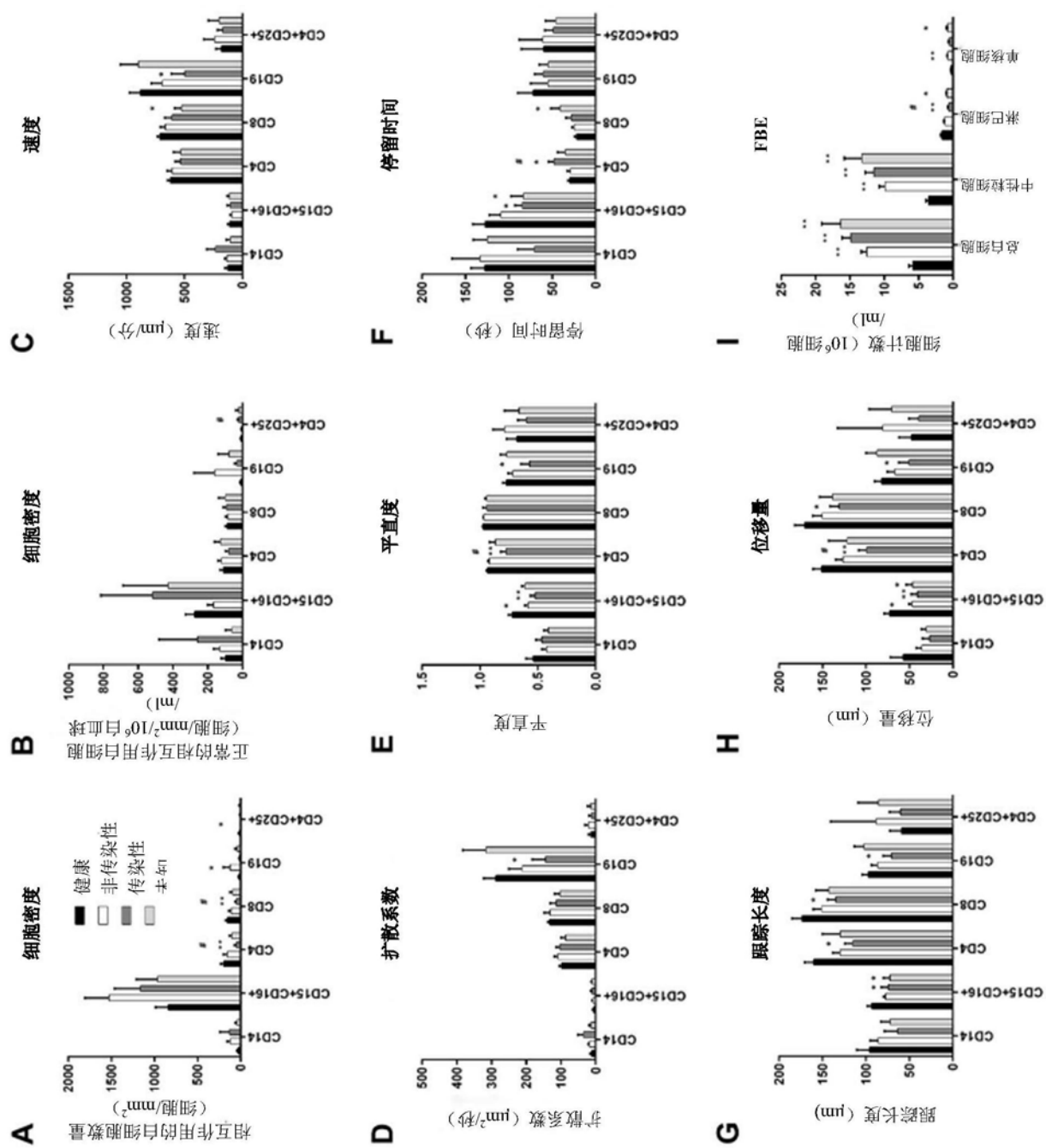


图30

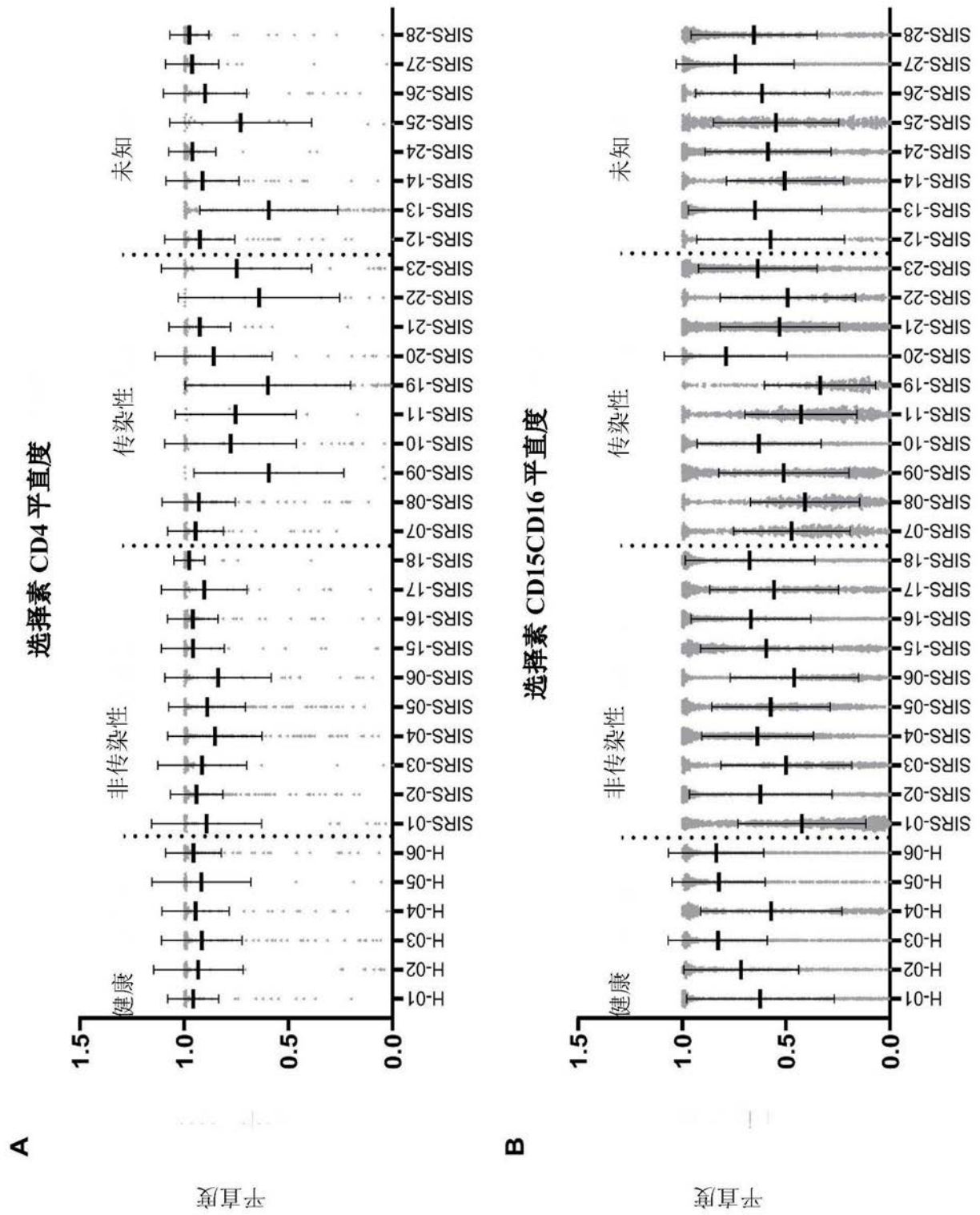


图31

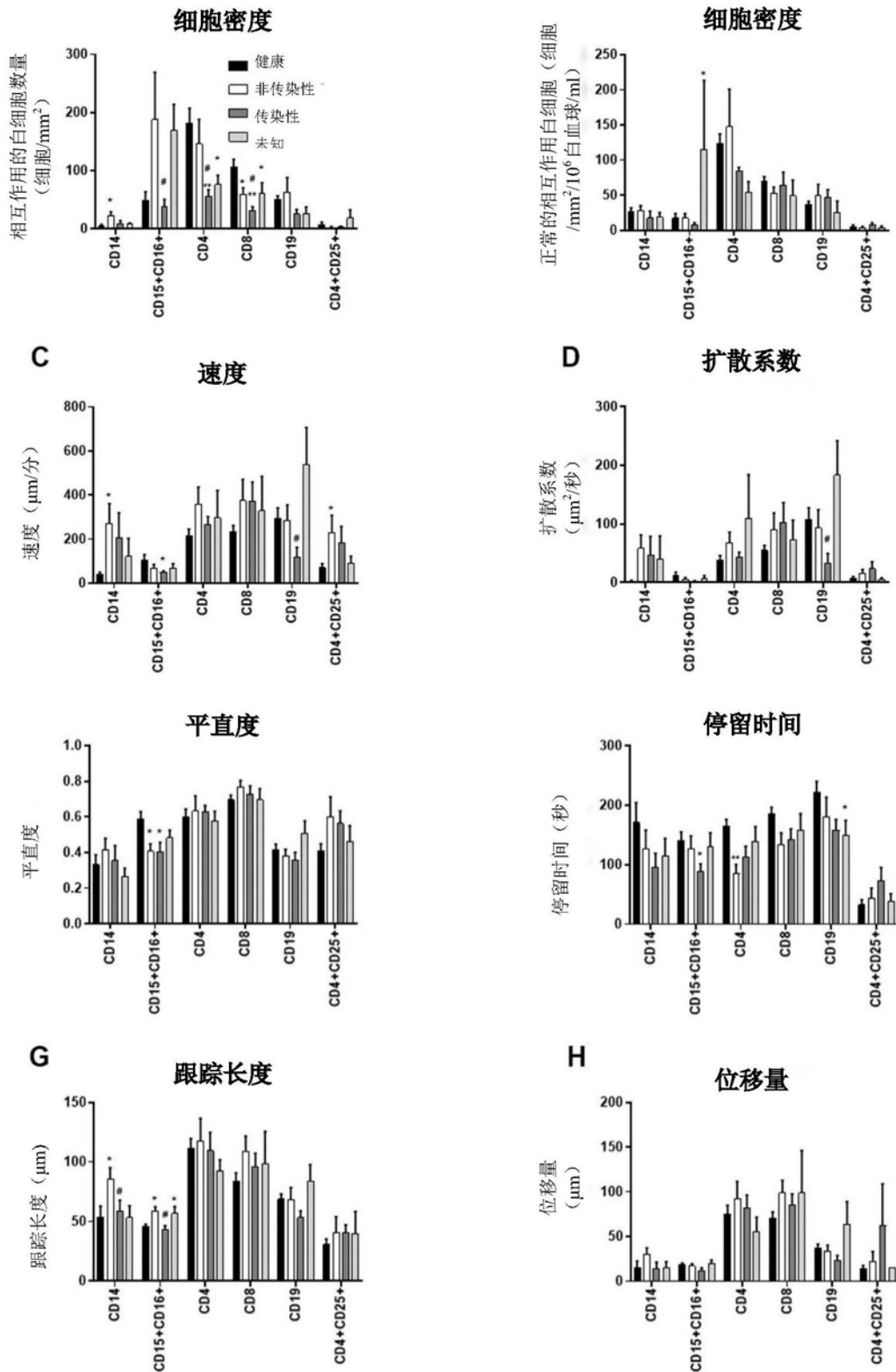


图32

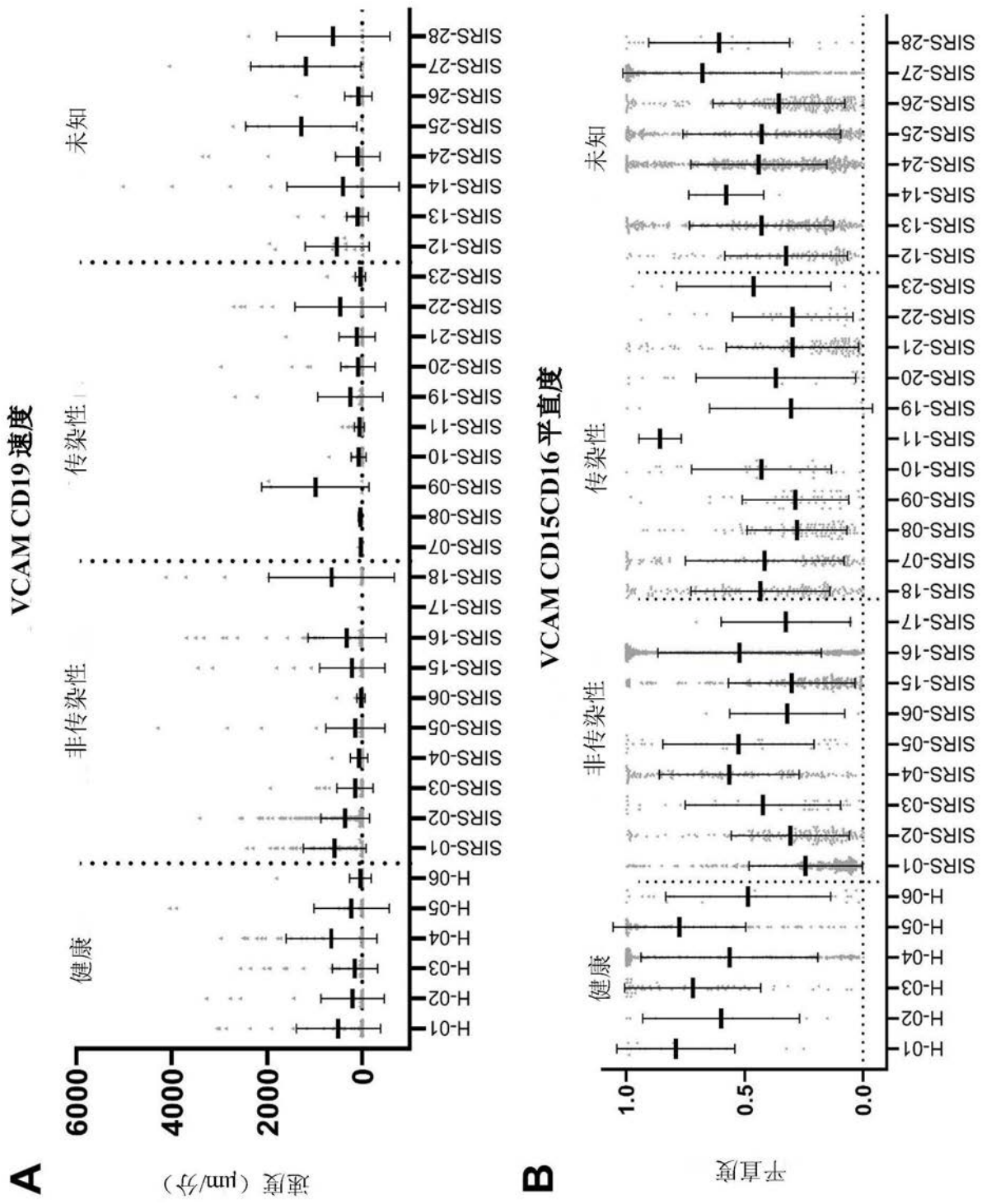


图33

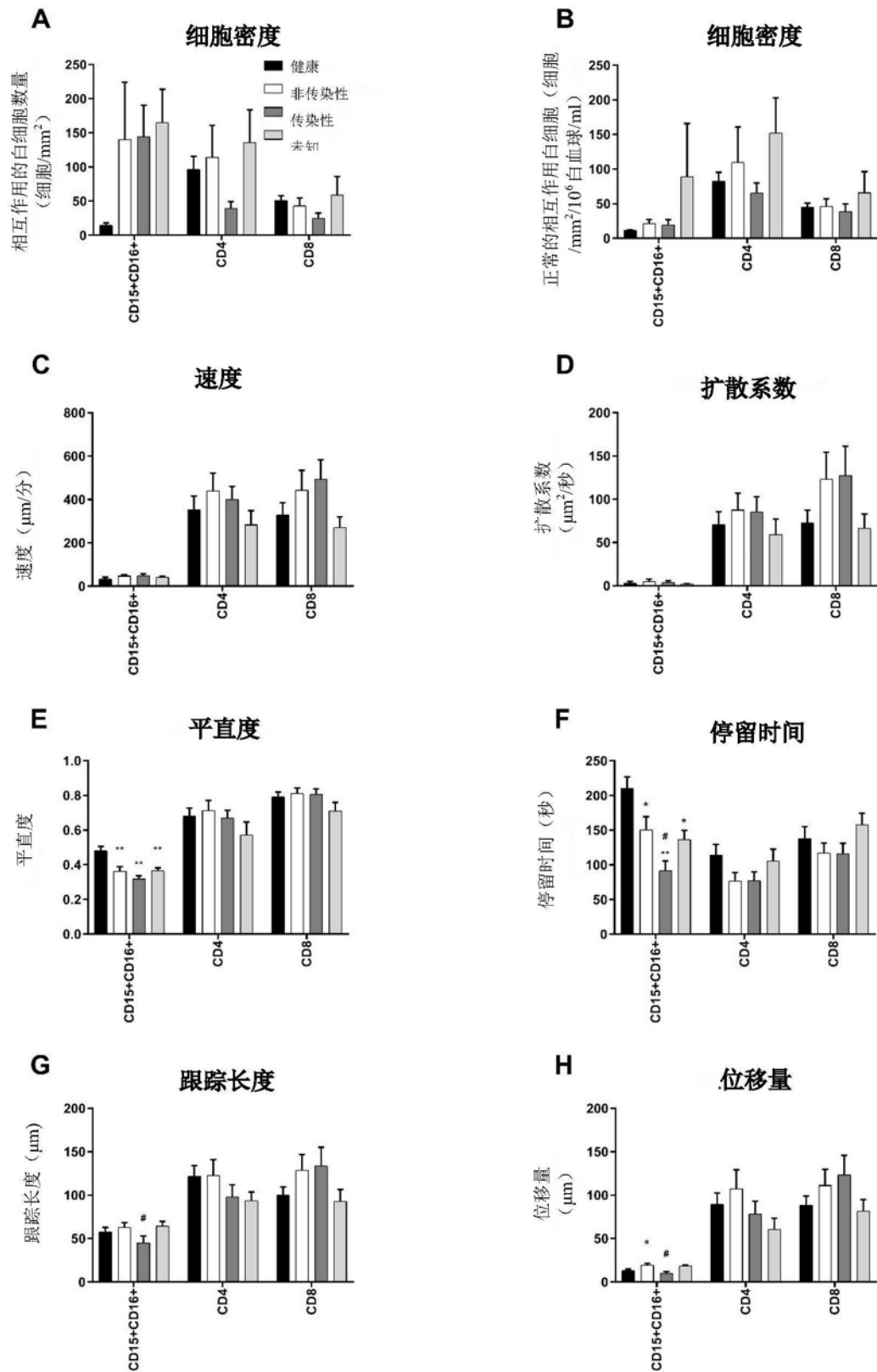


图34

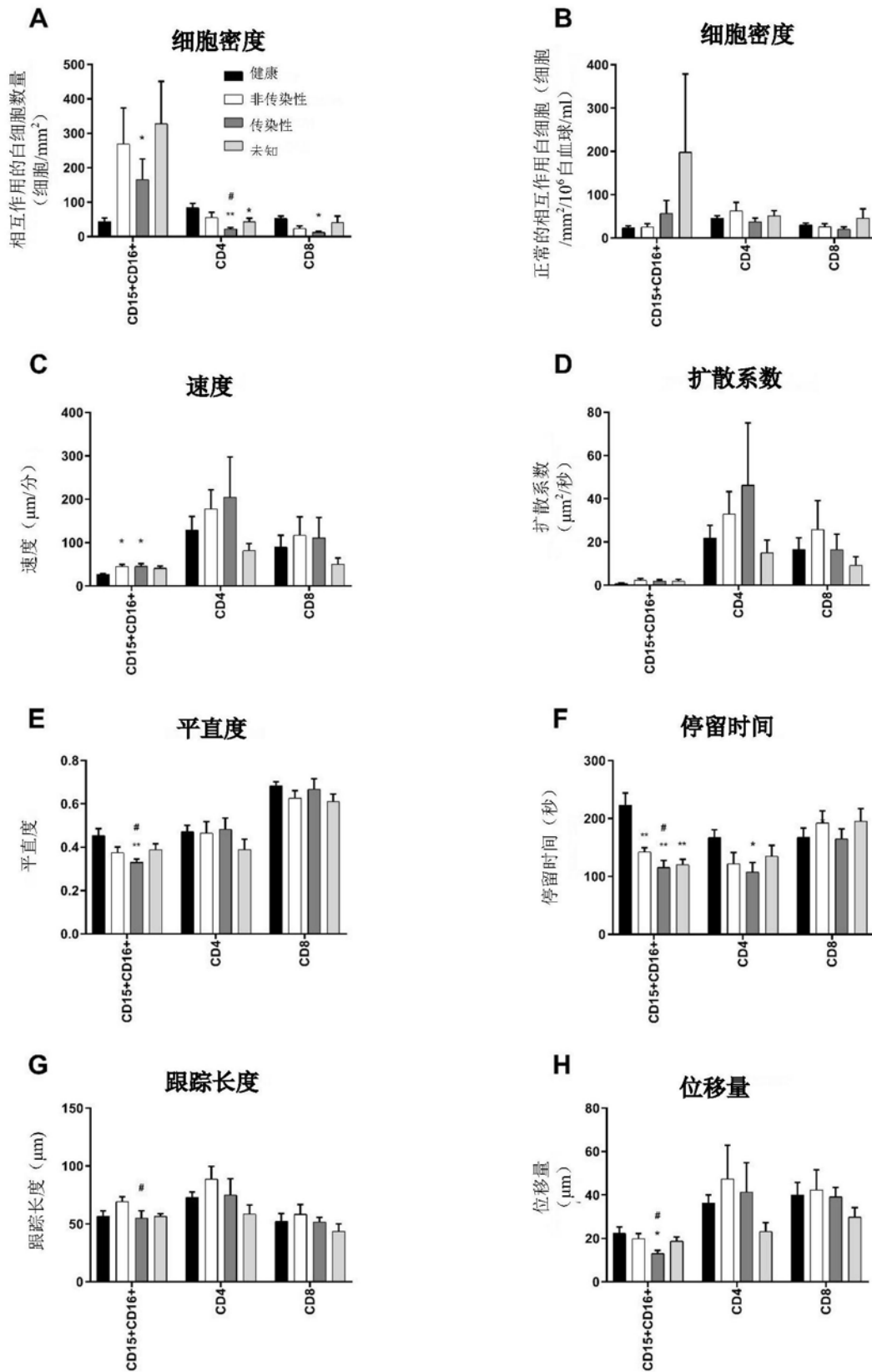


图35