



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105705177 B

(45)授权公告日 2019.10.22

(21)申请号 201480061036.9

(22)申请日 2014.11.06

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105705177 A

(43)申请公布日 2016.06.22

(30)优先权数据
61/902,070 2013.11.08 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2016.05.06

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2014/064419 2014.11.06

(87)PCT国际申请的公布数据
W02015/069942 EN 2015.05.14

(73)专利权人 艾克塞拉医疗公司
地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 R·S·沃德 K·R·麦克雷

(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所
11247

代理人 黄革生 林柏楠

(51)Int.Cl.

A61M 1/36(2006.01)

(56)对比文件

W0 97/18844 A1,1997.05.29,
US 2004/0146500 A1,2004.07.29,
W0 2012/099721 A2,2012.07.26,
CN 102740859 A,2012.10.17,

Robert Ward et al..《Specificity of Adsorption in a Prototype Whole Blood Affinity Therapy Device for Removal of Staphylococcus aureus》.《Society for Biomaterials 2013 Annual Meeting and Exposition》.2013,第273页.

Robert Ward et al..《Specificity of Adsorption in a Prototype Whole Blood Affinity Therapy Device for Removal of Staphylococcus aureus》.《Society for Biomaterials 2013 Annual Meeting and Exposition》.2013,第273页.

审查员 胡楠

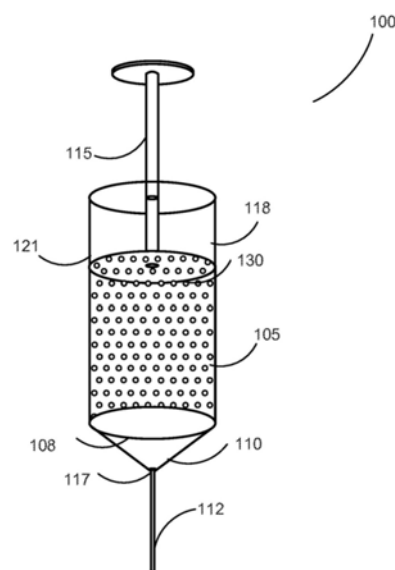
权利要求书3页 说明书16页 附图1页

(54)发明名称

使用吸附介质诊断感染性疾病的方法

(57)摘要

本发明提供用于浓缩生物样品中发现的感染性病原体的体外方法,上述生物样品获自怀疑被病原体感染的个体。本文还提供用于减少或消除获自怀疑被感染性病原体感染的个体的样品的血细胞的体外方法。本发明还提供用于诊断疟疾的方法,和用于确定个体是否被病原体感染的方法。本文还提供用于这些方法的浓缩器和试剂盒。



1. 用于浓缩生物样品中存在的感染性病原体的体外方法,所述生物样品获自怀疑被所述病原体感染的对象,所述方法包括:

(a) 在形成包括吸附介质和所述病原体的粘附复合物的条件下,使获自对象的生物样品与吸附介质接触,其中所述吸附介质是其表面上具有选自以下的成员的固体基质:肝素、硫酸乙酰肝素、甘露糖、硫酸葡聚糖、透明质酸、壳聚糖、聚乙烯亚胺(PEI)及其组合;

(b) 在保持复合物的同时将粘附复合物与样品中没有包括在复合物中的组分分离;

(c) 用洗涤缓冲液洗涤粘附复合物;和

(d) 通过将洗脱缓冲液应用于复合物,收集粘附复合物的病原体,从而浓缩感染性病原体在洗脱液中。

2. 根据权利要求1的方法,其中洗涤缓冲液是盐水溶液。

3. 根据权利要求1的方法,其中洗脱缓冲液是高离子强度或高渗盐水溶液。

4. 根据权利要求1的方法,其中生物样品选自全血、血清、血浆、尿、粪便、痰、泪液、唾液、支气管灌洗液及其组合。

5. 根据权利要求1的方法,其中通过端点附着将所述成员附着于固体基质的表面。

6. 根据权利要求1的方法,其中所述固体基质包括多个刚性聚合物珠。

7. 根据权利要求6的方法,其中所述多个刚性聚合物珠是刚性聚乙烯珠。

8. 根据权利要求1的方法,其中甘露糖是D-甘露糖或D-甘露糖聚合物。

9. 根据权利要求1的方法,其中所述成员是肝素和甘露糖。

10. 根据权利要求1的方法,其中所述病原体选自恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)、间日疟原虫(*Plasmodium vivax*)、卵形疟原虫(*Plasmodium ovale*)、三日疟原虫(*Plasmodium malariae*)、埃博拉病毒(EBOV)、线状病毒(filovirus)、黄病毒科(Flaviviridae)、金黄色葡萄球菌(*Streptococcus aureus*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、万古霉素抗性肠球菌(enterococci)(VRE)细菌、鲍氏不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)、肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)、产酸克雷伯菌(*Klebsiella oxytoca*)、粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)、屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)、白色念珠菌(*Candida albicans*)、巨细胞病毒(CMV)、腺病毒、单纯性疱疹病毒1(HSV1)、单纯性疱疹病毒2(HSV2)及其任意组合。

11. 根据权利要求1的方法,其中所述病原体为产生ESBL的病原体。

12. 根据权利要求1的方法,其中所述病原体为万古霉素抗性肠球菌(VRE)细菌。

13. 用于根据权利要求1的方法的浓缩器,其包括装有吸附介质的筒、活塞和针。

14. 试剂盒,其包括根据权利要求13的浓缩器、洗涤缓冲液和洗脱缓冲液。

15. 用于减少来自生物样品的血细胞的体外方法,所述生物样品获自怀疑被感染性病原体感染的对象,所述方法包括:

(a) 在形成包括吸附介质和样品中存在的病原体的粘附复合物的条件下,使获自对象的生物样品与吸附介质接触,其中所述吸附介质是其表面上具有选自以下的成员的固体基质:肝素、硫酸乙酰肝素、甘露糖、硫酸葡聚糖、透明质酸、壳聚糖、聚乙烯亚胺(PEI)及其组合;和

(b) 在保持粘附复合物的同时将样品的血细胞和粘附复合物分离,从而减少样品的血细胞。

16. 根据权利要求15的方法, 其中步骤(b)还包括用盐水溶液洗涤粘附复合物。
17. 根据权利要求15或16的方法, 还包括:
 - (c) 将洗脱缓冲液应用于粘附复合物;
 - (d) 收集粘附复合物的病原体。
18. 根据权利要求17的方法, 其中洗脱缓冲液包括高离子强度或高渗盐水溶液。
19. 根据权利要求15的方法, 其中生物样品选自全血、血清、血浆、尿、粪便、痰、泪液、唾液、支气管灌洗液及其组合。
20. 根据权利要求15的方法, 其中通过端点附着将所述成员附着至固体基质的表面。
21. 根据权利要求15的方法, 其中所述固体基质包括多数个刚性聚合物珠。
22. 根据权利要求21的方法, 其中所述多数个刚性聚合物珠是刚性聚乙烯珠。
23. 根据权利要求15的方法, 其中甘露糖是D-甘露糖或D-甘露糖聚合物。
24. 根据权利要求15的方法, 其中所述成员是肝素和甘露糖。
25. 根据权利要求15的方法, 其中感染性病原体选自恶性疟原虫、间日疟原虫、卵形疟原虫、三日疟原虫、埃博拉病毒(EBOV)、线状病毒、黄病毒科、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、碳青霉烯抗性肠杆菌科(CRE)细菌、鲍氏不动杆菌、肺炎克雷伯菌、产酸克雷伯菌、粪肠球菌、屎肠球菌、白色念珠菌、巨细胞病毒(CMV)、腺病毒、单纯性疱疹病毒1(HSV1)、单纯性疱疹病毒2(HSV2)及其任意组合。
26. 根据权利要求15的方法, 其中所述病原体为产生ESBL的病原体。
27. 根据权利要求15的方法, 其中所述病原体为万古霉素抗性肠球菌(VRE)细菌。
28. 在体外方法中使用的工具在制备用于在怀疑被疟原虫属感染的对象中诊断疟疾的试剂盒中的用途, 其中所述体外方法包括:
 - (a) 在形成包括吸附介质和被疟原虫属感染的样品中存在的细胞的粘附复合物的条件下, 使获自所述对象的样品与吸附介质接触, 其中所述吸附介质是其表面上具有选自以下的成员的固体基质: 肝素、硫酸乙酰肝素、甘露糖、硫酸葡聚糖、透明质酸、壳聚糖、聚乙烯亚胺(PEI)及其组合;
 - (b) 通过检测吸附介质的物理变化, 确定粘附复合物的存在; 和
 - (c) 基于吸附介质相比较于已经与对照样品接触的参考吸附介质的物理变化, 预测对象具有疟疾。
29. 根据权利要求28的用途, 其中样品选自全血、血清、血浆、尿、粪便、痰、泪液、唾液、支气管灌洗液及其组合。
30. 根据权利要求25的用途, 其中样品是全血。
31. 根据权利要求28的用途, 其中对照样品是来自健康对象的样品。
32. 根据权利要求28的用途, 其中对照样品是来自具有疟疾的对象的样品。
33. 根据权利要求28的用途, 其中物理变化是吸附介质的颜色。
34. 根据权利要求28的用途, 还包括生成已经与对照样品接触的参考吸附介质的物理变化的标准曲线。
35. 根据权利要求28的用途, 其中通过端点附着将所述成员附着于固体基质的表面。
36. 根据权利要求28的用途, 其中所述固体基质包括多数个刚性聚合物珠。
37. 根据权利要求36的用途, 其中所述多数个刚性聚合物珠是刚性聚乙烯珠。

38. 根据权利要求28的用途,其中所述成员是肝素。

39. 在体外方法中使用的工具在制备用于确定对象被感染性病原体感染的试剂盒中的用途,所述方法包括:

(a) 使获自所述对象的全血样品与吸附介质接触以形成包括吸附介质和样品中存在的病原体的粘附复合物,其中所述吸附介质是其表面上具有选自以下的成员的固体基质:肝素、硫酸乙酰肝素、甘露糖、硫酸葡聚糖、透明质酸、壳聚糖、聚乙烯亚胺(PEI)及其组合;和

(b) 通过检测吸附介质的物理变化,确定粘附复合物的存在;和

(c) 基于吸附介质相比较于已经与对照样品接触的参考吸附介质的物理变化,预测对象被感染性病原体感染。

40. 根据权利要求39的用途,其中对照样品是来自健康对象的样品。

41. 根据权利要求39的用途,其中对照样品是来自被感染性病原体感染的对象的样品。

42. 根据权利要求39的用途,其中感染性病原体选自恶性疟原虫、间日疟原虫、卵形疟原虫、三日疟原虫、埃博拉病毒(EBOV)、线状病毒、黄病毒科、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、碳青霉烯抗性肠杆菌科(CRE)细菌、产生ESBL的病原体、万古霉素抗性肠球菌(VRE)细菌、鲍氏不动杆菌、肺炎克雷伯菌、产酸克雷伯菌、粪肠球菌、屎肠球菌、白色念珠菌、巨细胞病毒(CMV)、腺病毒、单纯性疱疹病毒1(HSV1)、单纯性疱疹病毒2(HSV2)及其任意组合。

43. 根据权利要求39的用途,其中所述病原体为产生ESBL的病原体。

44. 根据权利要求39的用途,其中所述病原体为万古霉素抗性肠球菌(VRE)细菌。

45. 根据权利要求39的用途,其中通过端点附着将所述成员附着至固体基质的表面。

46. 根据权利要求45的用途,其中所述固体基质包括多数个刚性聚合物珠。

47. 根据权利要求46的用途,其中所述多数个刚性聚合物珠是刚性聚乙烯珠。

48. 根据权利要求39的用途,其中甘露糖是D-甘露糖或D-甘露糖聚合物。

49. 根据权利要求39的用途,其中所述成员是肝素和甘露糖。

50. 权利要求39的用途,其中,检测物理变化包括比色测定、免疫测定、酶联免疫吸附测定(ELISA)、基于PCR的测定、病原体生长测定或其组合。

使用吸附介质诊断感染性疾病的方法

[0001] 发明背景

[0002] 本申请要求2013年11月8日提交的美国临时专利申请第61/902,070号的优先权，在此出于所有目的将其全部并入作为参考。

[0003] 感染性疾病的早期检测对于控制其传播、指导治疗和改善患者预后来说是必需的。例如，致命病原体爆发的早期准确鉴定可以防止全球大流行的发生。目前许多用于例如病毒（包括埃博拉和相关的线状病毒）或抗药细菌导致的血流感染的诊断方法要求进行至少24小时或更久。在本领域对于使检测个体样品中病原体的存在所需的时间最小化的方法存在需求。目标在于当病原体仍以很低的浓度存在时对其进行检测，如果可能，在临床症状明显之前。然后早期干预可以使感染的强度和持续时间最小化，从而降低发病率和死亡率。

[0004] 在一些情形中，样品中细胞例如血细胞（例如，红血细胞和白血细胞）的存在降低了测定方法的特异性和灵敏度。目前，不存在用于从生物样品快速分离和收集感染性病原体从而使得病原体可以在以很低的量存在时得以鉴定或分析的手段。此外，在本领域存在对于可以提高检测病原体的现有诊断方法的灵敏度的技术的需求。本发明满足这些及其他需求。

[0005] 发明概述

[0006] 一方面，本发明提供用于浓缩生物样品中存在的宽范围的感染性病原体和毒素的体外方法，上述生物样品获自怀疑被所述病原体感染的对象。该方法包括：(a) 在形成包括吸附介质和所述病原体的粘附复合物的条件下，使获自对象的生物样品与广谱吸附介质接触；(b) 在保持复合物的同时将粘附复合物与样品中没有包括在复合物中的组分分离，例如，通过将粘附复合物用缓冲溶液洗涤；和(d) 通过将洗脱缓冲液应用于复合物收集粘附复合物的病原体，从而浓缩洗脱液中的感染性病原体。在一些实施方式中，该方法还包括检测分离的感染性病原体。在一些情形中，检测分离的感染性病原体包括比色测定、免疫测定、酶联免疫吸附测定(ELISA)、基于PCR的测定、任选染色的病原体生长测定或其组合。

[0007] 在一些实施方式中，洗涤缓冲液是普通盐水溶液。在一些实施方式中，洗脱缓冲液是高离子强度或高渗盐水溶液。

[0008] 在一些实施方式中，生物样品选自全血、血清、血浆、尿、排泄物、痰、泪、唾液、支气管灌洗液、其他体液及其组合。

[0009] 在一些实施方式中，吸附介质是其表面上具有至少一种多糖分子吸附剂的高表面积固体基质。在一些实施方式中，通过端点附着(end-point attachment)将至少一种多糖吸附剂附着于固体基质的表面。在一些实施方式中，至少一种多糖吸附剂是选自肝素、硫酸乙酰肝素、甘露糖、硫酸葡聚糖、透明质酸、水杨酸、壳聚糖及其组合的成员。在一些实施方式中，甘露糖是D-甘露糖或D-甘露糖聚合物。在一些实施方式中，至少一种多糖吸附剂是肝素和甘露糖。

[0010] 在一些实施方式中，固体基质包括大量刚性聚合物珠。大量刚性聚合物珠可以是刚性聚乙烯珠。

[0011] 在一些实施方式中，病原体选自恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)、间日疟原

虫 (*Plasmodium vivax*)、卵形疟原虫 (*Plasmodium ovale*)、三日疟原虫 (*Plasmodium malariae*)、埃博拉病毒 (EBOV)、非EBOV线状病毒 (filovirus)、黄病毒科 (Flaviviridae)、金黄色葡萄球菌 (*Streptococcus aureus*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、碳青霉烯 (carbapenem) 抗性肠杆菌科 (enterobacteriaceae) (CRE) 细菌、产生ESBL的病原体、万古霉素抗性肠球菌 (enterococci) (VRE) 细菌、鲍氏不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii*)、肺炎克雷伯菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、产酸克雷伯菌 (*Klebsiella oxytoca*)、粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*)、屎肠球菌 (*Enterococcus faecium*)、白色念珠菌 (*Candida albicans*)、巨细胞病毒 (CMV)、腺病毒、单纯性疱疹病毒1 (HSV1)、单纯性疱疹病毒2 (HSV2) 及其任意组合。

[0012] 在第二方面,本发明提供用于减少或消除来自生物样品的血细胞的体外方法,上述生物样品获自怀疑被病原体感染的对象。该方法包括:(a) 在形成包括吸附介质和样品中存在的病原体的粘附复合物的条件下,使获自对象的生物样品与任选地广谱的吸附介质接触;和(b) 在保持粘附复合物的同时将样品的血细胞和粘附复合物分离,从而减少或消除来自样品的血细胞。在一些实施方式中,步骤(b) 还包括将粘附复合物用盐水溶液洗涤。在一些实施方式中,该方法还包括:(c) 将洗脱缓冲液应用于粘附复合物;和(d) 收集粘附复合物的病原体。在一些实施方式中,该方法还包括检测分离的感染性病原体。在一些情形中,检测分离的感染性病原体包括比色测定、免疫测定、酶联免疫吸附测定 (ELISA)、基于PCR的测定、病原体生长测定或其组合。

[0013] 在一些实施方式中,洗涤缓冲液是盐水溶液。在一些实施方式中,洗脱缓冲液是高离子强度或高渗盐水溶液。

[0014] 在一些实施方式中,生物样品选自全血、血清、血浆、尿、排泄物、痰、泪液、唾液、支气管灌洗液、其他体液及其组合。

[0015] 在一些实施方式中,吸附介质是其表面上具有至少一种多糖吸附剂的高表面积 of 固体基质。在一些实施方式中,通过端点附着将至少一种多糖吸附剂附着于固体基质的表面。在一些实施方式中,至少一种多糖吸附剂是选自肝素、硫酸乙酰肝素、甘露糖、硫酸葡聚糖、透明质酸、水杨酸、壳聚糖及其组合的成员。在一些情形中,甘露糖是D-甘露糖或D-甘露糖聚合物。在一些情形中,至少一种多糖吸附剂是肝素和甘露糖。

[0016] 在一些实施方式中,固体基质包括大量刚性聚合物珠。大量刚性聚合物珠可以是刚性聚乙烯珠。

[0017] 在一些实施方式中,病原体选自恶性疟原虫、间日疟原虫、卵形疟原虫、三日疟原虫、埃博拉病毒 (EBOV)、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、碳青霉烯抗性肠杆菌科 (CRE) 细菌、产生ESBL的病原体、万古霉素抗性肠球菌 (VRE) 细菌、鲍氏不动杆菌、肺炎克雷伯菌、产酸克雷伯菌、粪肠球菌、屎肠球菌、白色念珠菌、巨细胞病毒 (CMV)、单纯性疱疹病毒1 (HSV1)、单纯性疱疹病毒2 (HSV2) 及其任意组合。

[0018] 在第三方面,本发明提供用于在怀疑被疟原虫感染的对象中诊断疟疾的体外方法。该方法包括:(a) 在形成包括吸附介质和被疟原虫感染的样品中存在的细胞的粘附复合物的条件下,使获自所述对象的样品与吸附介质接触;(b) 通过检测吸附介质的物理变化,确定粘附复合物的存在;和(c) 基于吸附介质相比较于已经与对照样品接触的参考吸附介质的物理变化,预测对象具有疟疾。在一些实施方式中,该方法还包括生成已经与对照样品

接触的参考介质的物理变化的标准曲线。

[0019] 在一些实施方式中,生物样品选自全血、血清、血浆、尿、排泄物、痰、泪液、唾液、支气管灌洗液、其他体液及其组合。在一些情形中,样品是全血。

[0020] 在一些实施方式中,对照样品是来自健康对象的样品。在一些实施方式中,对照样品是来自具有疟疾的对象的样品。

[0021] 在一些实施方式中,物理变化是吸附介质的颜色。

[0022] 在一些实施方式中,吸附介质是其表面上具有至少一种多糖吸附剂的高表面积的固体基质。在一些实施方式中,通过端点附着将至少一种多糖吸附剂附着于固体基质的表面。在一些实施方式中,至少一种多糖吸附剂是选自肝素、硫酸乙酰肝素、甘露糖、硫酸葡聚糖、透明质酸、水杨酸、壳聚糖及其组合的成员。在一些情形中,甘露糖是D-甘露糖或D-甘露糖聚合物。在一些情形中,至少一种多糖吸附剂是肝素和甘露糖。

[0023] 在一些实施方式中,固体基质包括大量刚性聚合物珠。大量刚性聚合物珠可以是刚性聚乙烯珠。

[0024] 在第三方面,本发明提供用于确定对象被感染性病原体感染的方法。该方法包括:(a)使获自所述对象的全血样品与吸附介质接触以形成包括吸附介质和样品中存在的病原体的粘附复合物;(b)通过检测吸附介质的物理变化,确定粘附复合物的存在;和(c)基于吸附介质相比较于已经与对照样品接触的参考吸附介质的物理变化,预测对象被感染性病原体感染。在一些实施方式中,该方法还包括生成已经与对照样品接触的参考介质的物理变化的标准曲线。

[0025] 在一些实施方式中,生物样品选自全血、血清、血浆、尿、排泄物、痰、泪液、唾液、支气管灌洗液、其他体液及其组合。在一些情形中,样品是全血。

[0026] 在一些实施方式中,对照样品是来自健康对象的样品。在一些实施方式中,对照样品是来自被感染性病原体感染的对象的样品。

[0027] 在一些实施方式中,物理变化是吸附介质的颜色。

[0028] 在一些实施方式中,吸附介质是其表面上具有至少一种多糖吸附剂的高表面积的固体基质。在一些实施方式中,通过端点附着将至少一种多糖吸附剂附着于固体基质的表面。在一些实施方式中,至少一种多糖吸附剂是选自肝素、硫酸乙酰肝素、甘露糖、透明质酸、水杨酸、壳聚糖及其组合的成员。在一些情形中,甘露糖是D-甘露糖或D-甘露糖聚合物。在一些情形中,至少一种多糖吸附剂是肝素和甘露糖。

[0029] 在一些实施方式中,固体基质包括大量刚性聚合物珠。大量刚性聚合物珠可以是刚性聚乙烯珠。

[0030] 在一些实施方式中,病原体选自恶性疟原虫、间日疟原虫、卵形疟原虫、三日疟原虫、埃博拉病毒(EBOV)、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、碳青霉烯抗性肠杆菌科(CRE)细菌、产生ESBL的病原体、万古霉素抗性肠球菌(VRE)细菌、鲍氏不动杆菌、肺炎克雷伯菌、产酸克雷伯菌、粪肠球菌、屎肠球菌、白色念珠菌、巨细胞病毒(CMV)、腺病毒、单纯性疱疹病毒1(HSV1)、单纯性疱疹病毒2(HSV2)及其任意组合。

[0031] 当阅读以下详述时,这些和其他方面、目标和实施方式将会更加显而易见。

[0032] 附图简述

[0033] 图1显示了本发明的浓缩器的实施方式。

[0034] 发明详述

[0035] 本发明提供了用于传染病检测和诊断的方法。有利地,本发明可以用于从患者样品中分离细菌、病毒、细胞因子和其他病原体(例如,寄生虫),其可以用于感染的早期检测。在本发明另一方面,使用本文所述的吸附介质,可以从样品中除去可以干扰分析物检测测定的细胞和其他非分析物。

[0036] 本文还提供了用从取自人对象的样品检测循环pRBC和疟原虫属的简单发色测定方法。该方法也可以用于在抗疟疾治疗的开始和/或完成过程中监测疟疾进展。

[0037] 已经出人意料地发现,通过使感染的血液与已共价结合至吸附介质的多糖(例如,肝素,或硫酸乙酰肝素)接触,可以检测pRBC中的寄生虫血症。寄生虫和pRBC变得结合到吸附介质上,并转而改变介质的颜色。因此,可见地颜色变化指示对象具有疟疾感染。

[0038] I. 定义

[0039] 如本文所用,除非另外指出,以下术语具有对其所述的定义。

[0040] 术语“疟疾感染”是指由疟原虫属(*Plasmodium*)的寄生原生动物导致的感染,其例如,但不限于,恶性疟原虫(*P. falciparum*)、间日疟原虫(*P. vivax*)、卵形疟原虫(*P. ovale*)、三日疟原虫(*P. malariae*)和诺氏疟原虫(*P. knowlesi*)。

[0041] 术语“吸附介质”是指其表面可以附着细胞、多肽、多核苷酸、化学分子、生物分子的材料。

[0042] 术语“吸附复合物”是指至少两种分子的复合物,其中第一分子附着(例如,连接、偶联或结合)至基质的表面,并且第二分子附着至第一分子。

[0043] 术语“颜色变化”是指从第一颜色变化为第二颜色。如果在第一颜色和第二颜色之间没有可检测的差异,则不指示颜色变化。

[0044] 术语“可见光谱”是指电磁光谱可以通过人眼检测的部分,例如,大约390–7000nm。近红外、中波长红外和远波长光谱中的光人眼不可见。

[0045] 术语“健康对照”是指没有感染的个体。术语“阳性对照”是指具有由目标病原体导致的感染的个体。

[0046] 术语“高表面积”是指具有大的比表面积对体积比率的特性。

[0047] 术语“吸附剂”是指其上附着(例如,连接、偶联或结合)化学化合物、生物分子或材料的固体基质。在某些情形中,吸附剂是固体基质本身。在一个实施方式中,吸附剂是结合有多糖的聚合物树脂。

[0048] 术语“刚性聚合物珠”是指由聚合物树脂制成的珠、颗粒、丸粒、球体、粒子、微囊、球体、微球体、纳米球体、微珠、纳米珠、微粒、纳米颗粒等。

[0049] 术语“碳水化合物”是指含有碳、氢和氧原子并且通常具有经验式 $C_x(H_2O)_y$ 的分子,其中 x 和 y 是不同的数字。碳水化合物的例子包括单糖、二糖、寡糖和多糖。

[0050] 术语“多糖”是指包含许多通过糖苷键连接在一起的单糖单元,并且具有 $C_x(H_2O)_y$ 的经验式的分子,其中 x 为200至大约3000之间。

[0051] 术语“抗疟疾疗法”是指意在缓解或治疗疟疾感染的治疗,例如药学有效的活性剂。

[0052] II. 实施方式详述

[0053] A. 吸附介质

[0054] 本发明的吸附介质提供多糖吸附剂可以与分析物/病原体和pRBC结合的表面。在一些实施方式中,吸附介质包括其表面上具有至少一种多糖吸附剂的具有高表面积 of 的固体基质。固体基质可以由以下制成:例如,但不限于,聚乙烯、聚苯乙烯、聚丙烯、聚砜、聚丙烯腈、聚碳酸酯、聚氨酯、二氧化硅、乳胶、玻璃、纤维素、纤维素乙酸酯、交联的葡聚糖、交联的琼脂糖、几丁质、壳聚糖、交联的葡聚糖、交联的海藻酸、硅树脂、**Teflon[®]**、含氟聚合物和其他合成聚合物。具有高表面积 of 的固体基质可以是许多种吸附剂单层、滤器、膜、固体纤维、中空纤维、颗粒或珠。任选地,固体基质可以提供足以结合可检测量的分析物的大表面积的其他形式或形状或构造的制品存在。

[0055] 用于生成介质的可用的基质可以包括,但不限于,无孔刚性珠、颗粒或填充物、网纹泡沫、刚性整体床(例如,由烧结的珠或颗粒形成)、填有织造或非织造纤维的柱子、填有纱线或固体或中空致密(非微孔)单丝纤维的柱子、平面薄膜或隔膜、由平面薄膜或致密膜形成的卷式筒(spiral wound cartridge)或者例如混合珠/织物芯的介质的组合。

[0056] 在某些情形中,合适的基质是最初为微孔、但在产生吸附位点之前、过程中或之后,例如经由端点附着一种或多种多糖吸附剂处理表面时变成基本上无孔的基质。在一个实施方式中,基质是固体珠或颗粒的形式。

[0057] 在某些情形中,固体基质是大量刚性聚合物珠,例如聚乙烯、聚苯乙烯、聚丙烯、聚砜、聚丙烯腈、聚碳酸酯、聚氨酯、二氧化硅、乳胶、玻璃、纤维素、交联琼脂糖、几丁质、壳聚糖、交联的葡聚糖、交联的海藻酸、硅树脂、含氟聚合物和合成聚合物珠。优选地,刚性聚合物珠是聚乙烯珠。

[0058] 固体基质的大小可以根据测定中使用的测试样品的体积或其他参数选择。在一些实施方式中,大量刚性聚合物珠的平均外直径为大约1 μ m至大约1mm,例如,1 μ m、2 μ m、3 μ m、4 μ m、5 μ m、6 μ m、7 μ m、8 μ m、9 μ m、10 μ m、15 μ m、20 μ m、25 μ m、30 μ m、35 μ m、45 μ m、55 μ m、60 μ m、65 μ m、70 μ m、75 μ m、80 μ m、85 μ m、90 μ m、95 μ m、100 μ m、200 μ m、300 μ m、400 μ m、500 μ m、600 μ m、700 μ m、800 μ m、900 μ m和1mm。在其他实施方式中,大量刚性聚合物珠的平均直径为大约10 μ m至大约200 μ m,例如,10 μ m、15 μ m、20 μ m、25 μ m、30 μ m、35 μ m、45 μ m、55 μ m、60 μ m、65 μ m、70 μ m、75 μ m、80 μ m、85 μ m、90 μ m、95 μ m、100 μ m、105 μ m、110 μ m、115 μ m、120 μ m、125 μ m、130 μ m、135 μ m、140 μ m、145 μ m、150 μ m、155 μ m、160 μ m、165 μ m、170 μ m、175 μ m、180 μ m、185 μ m、190 μ m、195 μ m和200 μ m。可用的珠的直径大小范围在大约100至大约500微米,例如100、200、300、400或500微米。珠的平均大小可以是从小150至450微米。参见,例如,WO 2011/068897,在此将其全文并入作为参考。

[0059] 固体基质的表面可以进行官能化,以允许本文所述的多糖吸附剂的共价附着。在一些实施方式中,固体基质的表面具有至少一种化学基团,例如胺基。

[0060] 吸附介质可以容纳在外壳中,例如注射器、柱子、筒、管子、离心管等或任何容器。在一些实施方式中,容器是特定的形状和大小,使得可以移除没有捕获到多糖结合的吸附介质上的RBC而不干扰附着于介质的被寄生的RBC。

[0061] 包括吸附介质的外壳可以含有多于一种类型的吸附介质。在一些实施方式中,不同的介质在外壳内以冻糕(parfait)型排列分层,使得样品例如全血,接触串联的或并流的不同介质。不同介质在筒内的一种排列是将第一吸附介质置于筒的入口和/或出口处,而含有第二吸附介质的任选地混合的区域插入入口和出口区域之间。在介质是纤维形式的情形中,可以通过纺织品工业公知的方法制备混合织造、针织或非织造结构以从混合纤维形成

织物。可选地,纱线可以由更细的多丝纱线制备或由两种或更多种具有不同表面化学的纤维制成的单丝制备,只要一种纤维类型含有在接触时积极防止血液凝结的表面即可。然后可以使用混合纤维纱线制备用于接触血液的织物。

[0062] B. 多糖吸附剂

[0063] 在一些实施方式中,多糖吸附剂是肝素、硫酸乙酰肝素、甘露糖、硫酸葡聚糖、透明质酸、唾液酸、壳聚糖及其组合。在一些情形中,将一种或更多种不同的多糖吸附剂,例如1、2、3、4、5或更多种不同的多糖吸附剂附着在吸附介质的固体基质上。在一些实施方式中,吸附剂是肝素。在一些实施方式中,吸附剂是硫酸乙酰肝素。在其他实施方式中,吸附剂是甘露糖。在另一实施方式中,吸附剂是硫酸葡聚糖。在一些情形中,多糖吸附剂是肝素和甘露糖。在一些情形中,多糖吸附剂是硫酸乙酰肝素和甘露糖。在其他情形中,多糖吸附剂是肝素和硫酸葡聚糖。在再其他的情形中,多糖吸附剂是甘露糖和硫酸葡聚糖。

[0064] 在一些实施方式中,多于一种的吸附剂,例如,2种吸附剂附着于单一固体基质上。在一些情形中,两种吸附剂(A和B)的比例范围为1:99至99:1。在其他实施方式中,基质涂敷有大约1-50%的吸附剂A和大约1-50%的吸附剂B。

[0065] 在一些实施方式中,用作吸附剂的甘露糖是还原糖或非还原糖(例如,甘露糖苷)。合适的甘露糖包括,但不限于,D-甘露糖、L-甘露糖、对氨基苯基- α -D-吡喃甘露糖苷、含有多糖的甘露糖,和甘露聚糖。术语“甘露糖”还包括甘露糖的聚合物,例如甘露聚糖。甘露聚糖是指是糖甘露糖的线性聚合物的植物多糖。植物甘露聚糖具有 β (1-4)链接。甘露聚糖也可以指酵母中发现的细胞壁多糖。这种类型的甘露聚糖具有 α (1-6)连接的骨架和 α (1-2)和 α (1-3)连接的分支。

[0066] 在一个实施方式中,通过端点附着将甘露糖结合于固体基质。在另一实施方式中,通过多点附着将甘露糖附着于基质。

[0067] 在其他情形中,甘露糖是甘露糖的聚合物,例如甘露聚糖。甘露聚糖是指是糖甘露糖的线性聚合物的植物多糖。植物甘露聚糖具有 β (1-4)链接。甘露聚糖也可以指酵母中发现的细胞壁多糖。这种类型的甘露聚糖具有 α (1-6)连接的骨架和 α (1-2)和 α (1-3)连接的分支。

[0068] 恶性疟原虫感染的红血细胞表达红细胞膜蛋白1(PfEMP1),其可以与内皮细胞和其他RBC表面上存在的特异性结合分子结合。本文提供的方法部分地基于被寄生的红血细胞选择性与结合分子例如多糖结合的能力。此外,当这些结合分子结合在吸附介质的表面时,介质可以用于将pRBC与患者样品分离,这转而改变吸附介质的颜色。因此,通过使患者样品与吸附介质上结合的结合分子接触,可以确定疟疾感染的存在。

[0069] 可以结合pRBC并且特别地PfEMP1的分子包括,但不限于,多糖,例如糖胺聚糖,如肝素、硫酸乙酰肝素和硫酸软骨素A(CSA)、唾液酸、补体受体1(CR1)、ABO血型抗原A和B、ICAM-1、CD36、血小板反应蛋白(TSP)、内皮细胞蛋白C受体(EPCR)、E-选择素、血管细胞粘附分子1(VCAM-1)、血小板内皮细胞粘附分子1(PECAM-1)、内皮白细胞粘附分子1(ELAM-1)、血清蛋白IgG/IgM,和纤维蛋白原,具有甘露糖基团的碳水化合物、凝集素和壳聚糖。其他的pRBC结合分子包括透明质酸盐、肽聚糖、糖蛋白、糖脂、聚糖、糖基磷脂酰肌醇(GPI)聚糖,和透明质酸,和其他神经氨酸。

[0070] 上文提供的结合分子可以用于将pRBC吸附到表面上。在一些实施方式中,将至少

一种多糖吸附剂附着于高表面积上的固体基质,以形成吸附介质。在一些实施方式中,多糖吸附剂是肝素、硫酸乙酰肝素、透明质酸、唾液酸、具有甘露糖序列的碳水化合物,和壳聚糖。在一实施方式中,多糖吸附剂是肝素。

[0071] 除混合的碳水化合物以外,还可以包括其他的对分析物有特异性的结合部分。这些包括蛋白质、肽、抗体、affibodies、核酸和其他特异性结合部分(参见,美国专利公开2003/0044769,在此将其并入作为参考)。

[0072] C.将多糖吸附剂附着于吸附介质表面

[0073] 可以通过单一的共价键端点附着(例如,通过肝素分子末端残基的共价连接)将多糖连接到吸附介质表面上。与非共价附着或多点附着相比较,在要附着的分子的末端基团处的单一共价连接在使其表面密度最大化的同时有利地提供固定化分子取向的更好的控制。特别地,这些长链碳水化合物的端点附着提供刷子型分子表面结构,其导致可用于分析物/病原体结合的碳水化合物寡聚物的可接近位置的浓度更高。在一些情形中,pRBC与全长肝素(例如,平均分子量大于10kDa的肝素)涂覆的表面的附着比现有技术通常使用的涂有肝素片段的常规表面有效率得多。

[0074] 与非共价附着相比较,碳水化合物(例如多糖)与固体基质的共价附着提供了对例如固定化分子的表面密度和取向的参数的控制。已经显示,这些参数提供吸附物与固定化的碳水化合物分子的结合。在某些实施方式中,固体基质上碳水化合物的表面浓度在0.01至大约0.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 的范围中,例如0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1、0.11、0.12、0.13、0.14、0.15、0.16、0.17、0.18、0.19或0.2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。在其他实施方式中,固体基质上(一种或多种)吸附剂的表面浓度在0.001–2.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 的范围中。在另一实施方式中,固体基质上(一种或多种)吸附剂的表面浓度在0.005–0.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 的范围中。

[0075] 在一些实施方式中,固体基质上吸附剂的表面浓度在1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 至20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 的范围中,例如,1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、7 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、9 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、11 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、12 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、13 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、14 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、15 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、16 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、17 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、18 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、19 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 和20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。在其他实施方式中,固体基质上吸附剂的表面浓度在5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 至15 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 的范围中,例如,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、7 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、9 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、11 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、12 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、13 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、14 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 和15 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。

[0076] 在一些实施方式中,通过还原胺化,将甘露糖、甘露糖衍生物和甘露糖的寡聚物还原性偶联至胺化基质例如胺化珠上的伯胺。还原性甘露糖的开放醛形式与珠的偶联导致稳定的仲胺。具有反应性胺的非还原性甘露糖可以用具有醛官能性的中间体与珠偶联。例如,通过以下方法将甘露糖附着至含胺的基质:(a)使胺化的基质与含有甘露糖的水溶液接触,形成席夫碱中间体;和(b)使席夫碱与还原剂接触,以附着甘露糖。在一些实施方式中,如果甘露糖是非还原性甘露糖,先于非还原性甘露糖将中间体醛(例如戊二醛)附着至胺基质。

[0077] 甘露糖可以溶解在水溶液例如酸性水溶液中。使甘露糖水溶液与胺化基质例如胺化珠接触。产生席夫碱。之后将席夫碱用还原剂还原。还原剂可以是,例如,氰基硼氢化钠或硼氢化钠。在某些实施方式中,固体基质还可以与具有反应性醛官能性的肝素反应。

[0078] 对于肝素附着,通过部分亚硝酸降解,可以实现还原性末端残基中反应性更高的醛官能。这缩短反应时间,但固定化的肝素分子量较低。通过还原性胺化(氰基硼氢化物)在水溶液中进行偶联。

[0079] 通过肝素分子的醛基与吸附介质表面上存在的伯胺基团的反应,可以实现全长肝素分子与表面的共价附着。所有碳水化合物固有的特性在于它们在其还原性末端具有半缩醛。该缩醛与醛形式平衡并可以与伯胺形成席夫碱。然后将这些席夫碱还原成稳定的仲胺。在一些实施方式中,通过共价缀合将全长肝素表面固定化到固体基质上。在其他实施方式中,经由稳定的仲胺基将全长肝素共价附着于所述吸附介质。

[0080] 在一些实施方式中,固定化的全长肝素分子的平均分子量大于10kDa。在其他实施方式中,固定化的肝素分子的平均分子量大于15kDa。在另一实施方式中,固定化的肝素分子的平均分子量大于21kDa。在再另一实施方式中,固定化的肝素分子的平均分子量大于30kDa。优选地,固定化的肝素分子的平均分子量在15-25kDa的范围内。平均分子量也可以更高,例如在25-35kDa的范围中。

[0081] 在某些情形中,多种制造吸附剂的方法和吸附剂本身公开于美国专利第8,663,148号和第8,758,286号;和美国专利公开第2009/0136586号、第2012/0305482号和US 2014/231357中,在此出于所有目的将其全文并入作为参考。

[0082] D. 与吸附介质上结合的吸附剂结合的分析物/病原体

[0083] 附着至吸附介质的吸附剂可以用于与样品中目标分析物/病原体结合。在一些实施方式中,样品选自全血、血清、血浆、尿、排泄物、痰、泪液、唾液、支气管灌洗液、其他体液及其组合。在一些情形中,样品是来自对象例如人对象的全血。

[0084] 分析物/病原体可以包括,但不限于,恶性疟原虫 (*Plasmodium falciparum*)、间日疟原虫 (*Plasmodium vivax*)、卵形疟原虫 (*Plasmodium ovale*)、三日疟原虫 (*Plasmodium malariae*)、埃博拉病毒 (EBOV)、金黄色葡萄球菌 (*Streptococcus aureus*)、酿脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*)、肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)、脑膜炎奈瑟氏菌 (*Neisseria meningitidis*)、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、碳青霉烯抗性肠杆菌科 (*enterobacteriaceae*) (CRE) 细菌 (例如,碳青霉烯抗性大肠杆菌和碳青霉烯抗性肺炎克雷伯菌)、产生ESBL的病原体 (例如,产生ESBL的大肠杆菌、产生ESBL的肺炎克雷伯菌和产生ESBL的产酸克雷伯菌)、万古霉素抗性肠球菌 (*enterococci*) (VRE) 细菌 (例如,万古霉素抗性粪肠球菌和万古霉素抗性屎肠球菌)、鲍氏不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii*)、肺炎克雷伯菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、产酸克雷伯菌 (*Klebsiella oxytoca*)、粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*)、屎肠球菌 (*Enterococcus faecium*)、白色念珠菌 (*Candida albicans*)、巨细胞病毒 (CMV)、单纯性疱疹病毒1 (HSV1)、单纯性疱疹病毒2 (HSV2) 及其任意组合。

[0085] 在某些其他情形中,目标分析物/病原体包括,但不限于,甲肝病毒 (HAV)、乙肝病毒 (HBV)、丙肝病毒 (HCV)、丁型肝炎病毒 (HDV)、庚型肝炎病毒/GB-C病毒 (HGV/GBV-C)、1型和2型人免疫缺陷病毒 (HIV-1/2)、I型和II型人嗜T-细胞病毒 (HTLV-I/II)、巨细胞病毒 (CMV)、Epstein-Barr病毒 (EBV)、TT病毒 (TTV)、6型人疱疹病毒 (HHV-6)、SEN病毒 (SEN-V) 和人细小病毒 (HPV-B19)。

[0086] 其他的目标病毒包括,但不限于,人7型疱疹病毒 (HHV-7)、人8型疱疹病毒 (HHV-8)、甲型流感病毒,包括H1N1和H5N1亚型,严重急性呼吸综合征 (SARS) 冠状病毒,和导致出血热的RNA病毒,例如沙粒病毒科 (*Arenaviridae*) (例如,沙拉热病毒 (LFV))、丝状病毒科 (*Filoviridae*) (例如,埃博拉病毒 (EBOV) 和马尔堡病毒 (MBGV)); 布尼亚病毒科

(Bunyaviridae) (例如,裂谷热病毒(RVSV)和克里米亚-刚果出血热病毒(CCHFV));和黄病毒科(Flaviviridae) (西尼罗河病毒(WNV)、登革热病毒(DENV)、黄热病病毒(YFV)和之前称作庚型肝炎病毒(HGV)的GB病毒C(GBV-C))。

[0087] 在某些情形中,细菌包括,但不限于,苍白密螺旋体(*Treponema Pallidum*) (TP,梅毒媒介)、小肠结肠炎耶尔森氏菌(*Yersinia Enterocolitica*)和葡萄球菌属(*Staphylococcus*)和链球菌属(*Streptococcus*)物种(常见的细菌污染媒介),和寄生虫,例如疟原虫属物种(疟疾媒介)、克氏锥虫(*Trypanosoma Cruzi*) (查加斯病媒介),和微小巴贝虫(*Babesia Microti*) (巴贝斯虫病媒介)。其他的细菌包括,但不限于,表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)、蜡样芽胞杆菌(*Bacillus cereus*)、嗜蚀艾肯菌(*Eikenella corrodens*)、单核细胞增多性李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)、无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)、流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)、脑膜炎奈瑟氏菌、淋病奈瑟氏菌(*Neisseria gonorrhoeae*)、脆弱拟杆菌(*Bacteroides fragilis*)、炭疽杆菌(*Bacillus anthracis*)、鼠疫耶尔森氏菌(*Yersinia pestis*)、小肠结肠炎耶尔森氏菌、土拉弗朗西斯菌(*Francisella tularensis*)、流产布鲁氏菌(*Brucella abortus*)、粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)、*Serratia liquefaciens*、荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)和耐辐射奇球菌(*Deinococcus radiodurans*)。

[0088] 此外,可以检测新兴的血源性病原体,例如,念珠菌属物种(*Candida* sp.),包括白色念珠菌,曲霉属物种(*Aspergillus* sp.),包括烟曲霉属(*Aspergillus fumigatus*),戊型肝炎病毒(HEV),8型人疱疹病毒(HHV-8),博氏疏螺旋体(*Borrelia Burgdorferi*) (莱姆症媒介)和克雅氏症(CJD)的未知媒介。

[0089] 本文所述的方法中可以使用已知与肝素/硫酸乙酰肝素结合的病原体。这些病原体的非限定性例子包括细菌,例如,炭疽杆菌、蜡样芽胞杆菌、博氏疏螺旋体、百日咳博氏杆菌(*Bordetella pertussis*)、肺炎衣原体(*Chlamydia pneumoniae*)、沙眼衣原体(*Chlamydia trachomatis*)、非典型流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae* nontypable)、幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)、单核细胞增多性李斯特菌、结核杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)、奈瑟淋球菌(*Neisseria gonorrhoeae*)、脑膜炎奈瑟氏菌、恙虫病东方体(*Orientia tsutsugamushi*)、牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、金黄色酿脓葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、无乳链球菌、酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、小肠结肠炎耶尔森氏菌(*Yersinia enterocolitica*);病毒,例如,2型腺相关病毒、腺病毒、冠状病毒、柯萨奇病毒、巨细胞病毒、登革病毒、FMDV、HSV1、HSV2、乙肝病毒、丙肝病毒、HHV8、HIV1、HPV、HTLV1、日本脑炎病毒、伪狂犬病毒、呼吸道合胞体病毒、鼻病毒、辛德毕斯病毒、牛痘病毒、西尼罗河病毒、黄热病病毒;寄生虫,例如,兰伯氏鞭毛虫(*Giardia lamblia*)、利什曼原虫属物种(*Leishmania* spp.)、脑胞内原虫属物种(*Encephalitozoon* spp.)、犬新孢子虫(*Neospora caninum*)、疟原虫属物种、刚地弓形虫(*Toxoplasma gondii*)、克氏锥虫和朊病毒。参见,例如,Barlett和Park,“Chapter 2Heparan Sulfate Proteoglycans in Infection”,M.S.G.Pavao编著,Glycans in Diseases and Therapeutics,Biology of Extracellular Matrix,Heidelberg:Spring-Verlag,2011。

[0090] E. 分析物/病原体检测方法

[0091] 本文提供用于减少生物样品中的血细胞的方法,上述生物样品来自被所述分析物/病原体感染或怀疑被其感染的个体。该方法可以用来除去可以干扰用于检测所关注分析物/病原体的技术的灵敏度的血细胞。该方法可以包括,在形成包括分析物/病原体和吸附介质的粘附复合物的条件下,将包括血细胞的样品暴露于本文所述的吸附介质。样品的血细胞可以通过例如重力或其他保持粘附复合物的方式与粘附复合物分离。在一些情形中,可以将盐水溶液例如普通盐水溶液,如大约0.90%w/v NaCl、大约300mOsm/L的溶液、0.01N盐水溶液或类似溶液应用于包括吸附介质的粘附复合物,以洗去残余血细胞。

[0092] 本文还提供浓缩样品中的分析物/感染性病原体的方法,上述样品获自被所述分析物/病原体感染或怀疑被其感染的个体。样品可以在形成包括吸附介质和分析物/病原体的粘附复合物的条件下暴露于本文所述的吸附介质。样品中不是粘附复合物一部分的组分可以通过例如重力分离,而不干扰粘附复合物。包括吸附介质的粘附复合物可以用洗涤缓冲液洗涤,例如,普通盐水溶液或保留(保存)复合物的溶液。在一些情形中,普通盐水溶液是大约0.90%w/v NaCl、大约300mOsm/L的溶液、0.01N盐水溶液或类似溶液。复合物可以加以破坏,通过将洗脱缓冲液例如高离子盐水溶液应用于复合物将分析物/病原体与吸附介质分离。在一些情形中,高离子盐水溶液是2N盐水溶液。在其他情形中,洗脱缓冲液是可以破坏多糖吸附剂和分析物/病原体的结合的缓冲液。在一些实施方式中,通过使用对于特定目标分析物/病原体选择的多种洗脱缓冲液,可以将不同的分析物/病原体在不同的级分中与吸附介质分离。与色谱柱类似,特定的分析物/病原体可以在不同的时间在不同的混合物中洗脱。目标分析物/病原体可以在一个或多个级分中洗脱。

[0093] 该方法对分析物/病原体进行浓缩,然后可以使用本领域已知的标准方法对其加以鉴定和分析。例如,细菌、病毒、真菌、原生动物、寄生虫和微生物病原体可以使用例如以下的测定来检测:比色测定、免疫测定(例如,夹心式测定或浸棒测定)、酶联免疫吸附测定(ELISA)、基于PCR的测定(例如,RT-PCR、qPCR、**TaqMan**[®]测定)、病原体生长测定或其组合(耐药性或抗生素抗性测定)及其变体。例如,HCV RNA使用利用标准试剂盒的RT-PCR检测,例如,**COBAS**[®] **AmpliPrep/COBAS**[®] **TaqMan**[®] HCV 测试(Roche Diagnostics, Indianapolis, IN)和实时HCV Genotype II(Abbott Molecular, Abbott Park, IL)。埃博拉病毒可以使用,例如,BioFire Diagnostics的FilmArray和CDC的埃博拉病毒VP40实时RT-PCR测定来检测。

[0094] 耐药性病原体可以通过将病原体在药物的存在下培养来检测。例如,怀疑为碳青霉烯抗性的克雷伯菌或大肠杆菌的病原体可以用于接种含有厄他培南(ertapenem)或美罗培南(meropenem)的培养基。在适当的培养之后,孵育的肉汤培养物可以在MacConkey琼脂平板上亚培养。次日,可以检查琼脂平板的乳糖发酵(粉色-红色)群落。此外,可以使用产生碳青霉烯酶的表型测试筛选分离的群落,例如改良的Hodge测试(MHT)。

[0095] 在某些情形中,可以使用典型的实验室技术检测和/或鉴定目标分析物,例如,酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)和亲和色谱。例如,在某些情形中,可以使用或很容易地开发市售的ELISA试剂盒。在ELISA中,特异性抗体被动吸收在板上。非特异性位点用在特定测定的特异性免疫化学反应中没有活性部分的蛋白质溶液阻断。特异性分析

物/病原体被表面上的抗体捕获,并然后由具有酶标签的另一抗体检测。酶标签与特定试剂反应,并检测并鉴定分析物的存在。

[0096] 在某些其他情形中,可以使用石英晶体微天平(QCM)检测吸附在表面上的分析物。石英晶体微天平是灵敏度很高、便宜的检测器/传感器,其在分子与其表面相互作用时在石英晶体中产生频移。QCM通过测量石英晶体共振器的频率变化检测例如每单位面积的质量的物理变化。在液体中,QCM在测定分子与用识别位点官能化的表面的亲和力方面高度有效。还可以识别例如病毒和微生物的较大的实体。例如,QCM可以与抗体偶联,使得可以选择性感应抗体缀合物。在某些情形中,洗脱液含有目标分析物或病原体。QCM在其上缀合有对分析物有特异性的抗体。通过使QCM与含有分析物/病原体的洗脱液接触,分析物与QCM的表面结合,QCM感应结合、存在及其身份。其他的亲和分子也可以结合在表面上,例如核酸、碳水化合物、肽、蛋白质等。

[0097] 在再其他的情形中,可以使用表面等离子体共振(SPR)技术检测分析物/病原体的存在或身份。表面等离子体是在金属和电介质之间的界面上传播的电荷密度波的量子名称,正如光子是光波的量子名称一样。表面等离子体在被进入金属材料 and 电介质材料界面的电磁辐射激发时共振。表面等离子体响应于紧密靠近界面的环境中的变化。这一事实使得表面等离子体共振可用于检测生物分子相互作用。与QCM类似,其可以用抗体或结合部分例如所关注分析物/病原体的抗原对SPR表面进行标记。

[0098] 用于从血液例如全血或血清浓缩分析物/病原体或者用于降低来自血液的血细胞的方法可以包括,使血液与基本上无微孔的固体基质接触,上述基质已经用对于要除去的分析物/病原体(吸附物)具有结合亲和力的多糖吸附剂加以表面处理。所述介质内的间隙通道的大小与介质表面积的和介质上结合位点的表面浓度平衡,以提供适当的吸附能力,同时使得血液通过吸附介质有相对高的流速。结果在于,吸附物到介质上结合位点的传输主要通过强制传递而不是通过缓慢扩散发生。通过(强制)传递是指,例如,通过压力梯度产生的流动,所述压力梯度通过泵,或者通过对柔性容器施加外部压力(或者为对刚性容器施加内部压力)的注射器,通过重力落差/升高差异,或者通过用体外装置治疗的患者中动脉压力和静脉压力的差异生成。

[0099] F. 疟疾感染的诊断方法

[0100] 本文提供了使用包括肝素固定化的固体基质的吸附介质确定疟疾感染存在的方法。使用本文所述的方法,可以测试取自怀疑具有疟疾的个体的样品的被感染的红血细胞(RBC)或被寄生的RBC。该方法基于以下观察即位于被寄生的RBC的细胞表面上的硫酸乙酰肝素结合蛋白质可以附着于固体表面上结合的肝素、硫酸乙酰肝素或其他多糖。此外,该方法可以用于确定个体是否应当给予抗疟疾疗法。而且,该方法可以用于监测接受所述疗法的个体中疟疾的进展。

[0101] 样品可以获自怀疑具有疟疾感染的对象(例如,人个体)。在一些实施方式中,样品是选自全血、血清、血浆、尿、痰、支气管灌洗液、泪液、乳头抽吸液、淋巴、唾液、脑脊液、组织及其组合的成员。优选地,样品是全血。

[0102] 然后,在允许固体基质表面上的多糖吸附剂与如果样品中存在的被寄生的红血细胞结合的条件下,使样品与吸附介质接触,以形成粘附复合物。

[0103] 在一些情形中,形成粘附复合物之后,将样品和吸附介质分离,而不破坏复合物或

将其与介质分离。

[0104] 通过在可见光谱内(例如,波长大约400nm至大约700nm)检查吸附介质的颜色,检测粘附复合物的存在。在一些情形中,可检测的颜色在大约625nm至740nm的波长范围内,或者范围对应于红色颜色或其变异。吸附介质的颜色可以通过使用可见光的光学检测器或人眼测定。

[0105] 在某些情形中,可以浓缩介质上的分析物(例如,病毒、病原体、细菌、细胞因子或吸附复合物),并通过介质的颜色变化检测分析物。在可选的实施方式中,可以通过将分析物从柱子上洗脱、浓缩分析物并测量介质的颜色变化来浓缩要检测的分析物。也可以采取其他的检测形式。

[0106] 在一些实施方式中,将测试吸附介质的颜色与对照吸附介质进行比较。在一些实施方式中,对照介质(例如,感染的阴性对照)是已经暴露于取自健康对照例如没有疟疾感染的对象的样品的吸附介质。在其他实施方式中,对照介质(例如,阳性对照)是已经暴露于取自具有疟疾感染(例如,无并发症的或严重的疟疾感染)的对象的样品的吸附介质。

[0107] 如果来自测试对象的吸附介质与健康对照的颜色类似,则测定说明,不存在粘附复合物。然而,如果来自测试对象的吸附介质颜色与阳性对照类似,则测试说明,存在吸附复合物,因此具有疟疾感染。

[0108] 如果检测到吸附复合物的存在,则可以对对象施用抗疟疾疗法。抗疟疾疗法的非限定性例子包括氯喹(Aralen)、硫酸奎宁(Quinacrine)、羟化氯喹(Plaquenil)、阿托伐醌-氯胍(Malarone)、蒿甲醚-苯芴醇(Coartem)、甲氟喹(Lariam)、伯氨喹、阿莫地喹、奎宁、奎尼丁、强力霉素、克林霉素、磺酰胺例如磺胺多辛和磺胺甲氧唑、乙嘧啶、卤泛曲林(halofantrine)、青蒿素、青蒿素其衍生物及其组合。青蒿素衍生物包括蒿甲醚、青蒿琥酯、二氢青蒿素、青蒿醇、蒿乙醚(artemotil)和蒿乙醚(arteether)。其他合适的抗疟疾药物的青蒿素衍生物见于,例如,美国专利第8,722,910;8,481,757;8,304,440;7,851,512;7,776,911;7,084,132;6,586,464;6,362,219;和6,306,896号;和美国专利申请公开第2012/0258945、2013/0072513、2013/071474、2014/011829、2014/011830和2014/256761号。

[0109] G. 被感染的RBC可以附着于吸附介质表面上的RBC结合分子

[0110] 被感染的红血细胞可以保留在结合多糖的吸附介质的表面上,上述多糖例如,但不限于,硫酸乙酰肝素、肝素、硫酸软骨素及其衍生物。可以与硫酸乙酰肝素、肝素及其类似物结合的感染媒介,例如病毒和病原体(例如,细菌和寄生虫)的非限定性的例子包括细菌,例如,炭疽杆菌、蜡样芽胞杆菌、博氏疏螺旋体、百日咳博氏杆菌、肺炎衣原体、沙眼衣原体、流感嗜血杆菌、幽门螺杆菌、单核细胞增多性李斯特菌、结核杆菌、奈瑟淋球菌、脑膜炎奈瑟氏菌、恙虫病东方体、牙龈卟啉单胞菌、铜绿假单胞菌、金黄色酿脓葡萄球菌、无乳链球菌、酿脓链球菌、肺炎链球菌和小肠结肠炎耶尔森氏菌,牛痘病毒(vaccinia viruses),例如,牛痘病毒(cowpox virus)、兔痘病毒,粘液瘤病毒和休普氏纤维瘤(Shope fibroma)病毒、HIV-1、HPV、HTLV1、丙肝病毒、乙肝病毒、腺相关病毒(AAV)、腺病毒、冠状病毒、柯萨奇病毒、巨细胞病毒、疱疹病毒,例如,Murid疱疹病毒-4(MuHv-4)、Kaposi氏肉瘤相关疱疹病毒(KSHV)、Ebstein-Barr病毒(EBV)、FMDV、单纯性疱疹病毒,例如HSV-1和HSV-2,伪狂犬病病毒(PrV)、伪狂犬病病毒、呼吸道合胞体病毒、鼻病毒、辛德毕斯病毒、黄病毒,例如,登革病毒(登革1,3,4)、日本脑炎病毒、库京病毒(kunjin virus)、墨垒谷脑炎病毒、powassan病

毒、圣路易斯脑炎病毒、ti-borne脑炎病毒、西尼罗河病毒、黄热病病毒、瘟病毒,例如,导致边界病、牛病毒性腹泻、经典猪瘟的病毒,出血热病毒,例如,埃博拉病毒、马尔堡病毒、拉沙热病毒、裂谷热病毒,其他沙粒病毒科病毒、其他布尼亚病毒科病毒和其他丝状病毒科病毒,和寄生虫,例如,兰伯氏鞭毛虫、利什曼原虫属物种、脑胞内原虫属物种、犬新孢子虫、疟原虫属物种、刚地弓形虫和克氏锥虫。

[0111] H. 浓缩器和试剂盒

[0112] 在某些实施方式中,本发明提供类似于皮下注射器形式的浓缩器。图1是本发明的浓缩器的一种实施方式。浓缩器100具有装有吸附介质105的筒118。在某些情形中,筒是其中包含有吸附剂105的中空圆柱形筒部118,一端终止于直径小于圆柱形筒部118的直径的出口管117中。在一些情形中,中空的皮下针112与筒部118的出口管117连通。在一些情形中,一种或多种不同的多糖吸附剂,例如1、2、3、4、5或更多种不同的多糖吸附剂附着于吸附介质。浓缩器100具有带有轴115的活塞130,其允许使用者使用附着于浓缩器100的针112从对象取样。针可以具有对于取自对象的样品典型的多种规格。在某些方面,浓缩器100具有装有流体例如盐水、水或缓冲液的任选的储器110。在操作时,将针插入对象以移取样品例如血液。当活塞130使用轴115从筒118缩回时,储器110和介质105之间的易碎屏障108被缩回的活塞的作用破碎,允许流体通过介质抽出以润湿或填装介质。流体(例如盐水)通过介质105抽出并终于区域121。在某些情形中,任选的储器110包括易碎密封或屏障108例如箔、粘合剂或塑料,其置于出口管和吸附物105之间。

[0113] 当样品(例如血液)通过介质抽出时,其中含有的分析物或病原体吸附至介质。在某些情形中,抽出的活塞115可以由使用者朝浓缩器的筒推动。在某些情形中,样品例如移出的血液可以注射回并返回对象。这种活塞的相互操作可以重复数次以便将分析物/病原体浓缩在介质上。将活塞相互移动的操作可以重复1、2、3、4、5、6次或更多次。

[0114] 分析物/病原体可以使用本文教导的方法从介质除去。例如,在某些情形中,可以使用普通盐水除去任何粘附的细胞和碎片。然后,可以使用2N盐水除去分析物或病原体。在某些其他情形中,使用缓冲液或盐水除去全部粘附的样品组分。

[0115] 在再其他的方面,使用可以附着至浓缩器100外部的灭菌滤器。例如,可以除去针,并附着滤器,或者针具有滤器接头。滤器使得浓缩器可适用于野外使用。例如,在野外,可能无法获得无菌水或流体。在某些情形中,不纯的水或流体通过滤器抽出并且,现在通过介质105灭菌。在某些情形中,任选地除去储器110,并且通过灭菌滤器抽出的灭菌水或灭菌流体填装或润湿介质。

[0116] 在一个实施方式中,本发明提供包括浓缩器的试剂盒。在某些方面,试剂盒包括可以用于在使用前和后容纳浓缩器的包装。浓缩器可以如上文所讨论使用,并之后送出用于进一步分析。试剂盒任选地包括使用说明书。

[0117] 一方面,浓缩器包括:

[0118] (a) 其中包含有吸附物105的中空圆柱形筒部118,一端终止于直径小于圆柱形筒部118直径的出口管117中;

[0119] (b) 与所述筒部118的出口管117连通的中空皮下针112;

[0120] (c) 包括安置在其中并适于在所述圆柱形筒118内相互移动的弹性体材料的活塞130;

[0121] (d) 轴工具115,其附着至所述活塞130并向所述筒部118的端部之外出口管117对面延伸,并运转使得所述活塞130朝向和远离所述筒部118的出口管相互运动;和

[0122] (f) 置于出口管和吸附物之间的具有易碎密封108的任选的储器110。

实施例

[0123] 提供以下实施例进行说明,但其不对要求保护的发明加以限定。

[0124] 实施例1:使用肝素缀合的吸附介质诊断个体中的疟疾

[0125] 该实施例说明了使用肝素缀合的吸附介质检测来自怀疑具有疟疾感染的个体的血液样品中被寄生的红血细胞(pRBC)。

[0126] 全血样品通过标准方法并遵循临床导则取自个体。在使得测试样品中的任何被寄生的红血细胞附着至固定化的肝素的条件下,使血液样品(测试样品)与吸附介质的表面上固定化的肝素接触。接下来,在不干扰测试吸附介质上的pRBC和肝素形成的粘附复合物的情况下,除去未结合的样品。然后肉眼观察测试介质,以检测相比较于不含被寄生的红血细胞的全血的吸附介质的任何颜色变化。如果检测到颜色变化(例如,测试介质显得更红),这表明个体有可能具有疟疾感染。

[0127] 测试介质的颜色与暴露于来自健康对照(例如没有疟疾感染的个体)的血液样品的吸附介质的颜色进行比较。如果测试样品介质和健康对照介质的颜色类似,诊断个体没有疟疾感染。测试介质的颜色与暴露于来自阳性对照(例如具有无并发症的疟疾或严重疟疾的患者)的血液样品的吸附介质的颜色进行比较。如果测试吸附介质和阳性对照介质具有类似的颜色,诊断个体具有疟疾感染。

[0128] 实施例2:用于诊断病毒感染和体外治疗感染的系统

[0129] 该实施例说明了本发明的系统。

[0130] 该系统包括至少两个筒(cartridge),其中第一筒是较小的诊断筒,第二筒是较大的治疗筒。第一或诊断筒含有3-6ml之间的短柱,其装有肝素化珠。第一筒用于检测怀疑含有丙肝病毒(HCV)的血液样品。

[0131] 2ml血液样品取自对象。将血液样品装入诊断柱,并形成包括吸附介质和HCV的粘附复合物。之后,将柱子用0.01N盐水缓冲液洗涤。之后,通过应用2N盐水洗脱缓冲液洗涤柱子,以浓缩感染性病原体。

[0132] 使用标准试剂盒,例如**COBAS[®] AmpliPrep/COBAS[®] TaqMan[®]** HCV测试(Roche Diagnostics,Indianapolis,IN)和实时HCV Genotype II (Abbott Molecular, Abbott Park,IL),使用RT-PCR检测HCV RNA。

[0133] 第二较大的治疗筒用肝素化涂敷的珠建立。将300ml吸附柱固定在竖直支架上。然后将300ml珠加入到筒中并密封。

[0134] 患者使用治疗柱使用HCV的体外去除。发生丙肝病毒与肝素的结合。肝素有效地鉴定并除去感染媒介。

[0135] 实施例3.在检测病毒之前,处理来自怀疑被埃博拉病毒感染的个体的样品

[0136] 该实施例说明了本发明的示例性实施方式用于从来自感染埃博拉病毒的对象生物样品分离埃博拉病毒颗粒的用途。

[0137] 使感染埃博拉病毒的全血样品在填有肝素化珠的柱子上循环。在多个时间点,收

集来自柱子的流过物(flow-through),并测试埃博拉病毒的存在。用0.01N盐水溶液轻轻洗涤肝素化珠而不干扰珠基质。收集来自洗涤步骤的流过物,并测试埃博拉病毒。流过物含有可以干扰商业病毒检测测试灵敏度的细胞例如血细胞。将含有2N盐水溶液的洗脱缓冲液应用于柱子,并收集洗脱液。洗脱液使用CDC的方案“埃博拉病毒VP40实时RT-PCR测定”测试埃博拉病毒的存在。该方法使用**TaqMan[®]**测定来检测埃博拉病毒的病毒蛋白质40。

[0138] 实施例4:使用多糖吸附剂修饰的珠处理和浓缩来自血液样品的病原体

[0139] 该实施例说明了使用本发明的示例性实施方式用于从生物样品中除去和浓缩14种不同的病原体。

[0140] 将大约0.6克吸附介质,例如单独的肝素介质、单独的甘露糖介质、聚乙烯亚胺PEI介质、肝素和甘露糖介质的复合物,或肝素和甘露糖介质的复合物和裸珠装入具有100 μ m终板的2.5ml过滤注射器(Mobicol)中。通过将病原体(例如,铜绿假单胞菌、MRSA、产生ESBL的肺炎克雷伯氏杆菌、碳青霉烯抗性肺炎克雷伯氏杆菌、肺炎克雷伯氏杆菌、碳青霉烯抗性大肠杆菌、大肠杆菌、肺炎链球菌、粪肠球菌、万古霉素抗性粪肠球菌、屎肠球菌、鲍氏不动杆菌、白色念珠菌和CMV)培养过夜,并稀释至合适的浓度,制备2ml血液中的病原体悬浮液(表1)。将包装的过滤注射器用3ml PBS润洗,然后使病原体悬浮液在注射器上通过三次。使1.0ml洗脱缓冲液(2N盐水溶液)在注射器上通过,并收集流过物(洗脱液)。使用标准稀释和铺平板技术对洗脱液的病原体进行计数。对于分析的每种介质和病原体组合,测试重复两次或三次。结果显示于表1和表2中。

[0141] 表1.经过修饰的吸附介质之后的病原体浓度

[0142]

病原体计数(CFU/ml 或 PFU/ml)						
		终浓度				
细菌	起始浓度	肝素	甘露糖	PEI	Hep/Man (0.6 g)	Hep/Man/PEI (0.6 g)
铜绿假单胞菌	4.02E+05	5.27E+05	3.79E+05	4.73E+05	4.67E+05	2.75E+05
MRSA	1.21E+05	1.02E+04	1.22E+05	1.48E+04	2.03E+04	3.07E+03
肺炎克雷伯氏杆菌(ESBL)	2.82E+05	1.72E+05	1.98E+05	1.80E+05		
肺炎克雷伯氏杆菌(CRE)	1.40E+05	7.83E+01	1.70E+02	2.07E+02	2.07E+02	1.88E+02
肺炎克雷伯氏杆菌	4.02E+05	2.55E+05	2.66E+05	1.64E+05		
大肠杆菌(CRE)	2.57E+05	1.90E+02	2.25E+02	1.83E+02	2.00E+02	2.27E+02

[0143]

大肠杆菌	6.15E+05	1.54E+03	8.92E+02	1.01E+03		
肺炎链球菌	9.80E+04	4.60E+04	5.80E+04	7.48E+04		
粪肠球菌	6.43E+05	6.17E+03	5.83E+03	3.34E+03		
粪肠球菌(VRE)	6.17E+05	5.40E+04	5.42E+04	4.80E+04		
屎肠球菌	9.17E+05	4.00E+05	5.67E+05	5.33E+05		
鲍氏不动杆菌	1.83E+05	3.82E+04	1.82E+04	8.50E+04		
白色念珠菌	3.35E+05	2.15E+05				
CMV	7.59E+04	1.35E+04				

[0144] 表2.从血液样品中除去的病原体的量

[0145]

每克介质除去的 CFU 或 PFU					
	肝素	甘露糖	PEI	Hep/Man	Hep/Man/PEI
铜绿假单胞菌	0.00E+00	7.67E+04	0.00E+00	0.00E+00	4.23E+05
MRSA	3.69E+05	-3.33E+03	3.54E+05	3.36E+05	3.93E+05
肺炎克雷伯氏杆菌(ESBL)	3.67E+05	2.80E+05	3.40E+05		
肺炎克雷伯氏杆菌(CRE)	4.66E+05	4.66E+05	4.66E+05	4.66E+05	4.66E+05
肺炎克雷伯氏杆菌	4.90E+05	4.53E+05	7.93E+05		
大肠杆菌(CRE)	8.56E+05	8.56E+05	8.56E+05	8.56E+05	8.56E+05
大肠杆菌	2.04E+06	2.05E+06	2.05E+06		
肺炎链球菌	1.73E+05	1.33E+05	7.73E+04		
粪肠球菌	2.12E+06	2.12E+06	2.13E+06		
粪肠球菌(VRE)	1.88E+06	1.88E+06	1.90E+06		
屎肠球菌	1.72E+06	1.17E+06	1.28E+06		
鲍氏不动杆菌	4.83E+05	5.49E+05	3.27E+05		
白色念珠菌	4.00E+05	1.12E+06			
CMV	2.08E+05				

[0146] 上表说明了使用本文所述的方法除去并浓缩14种不同的病原体。例如,如图1所示,MRSA样品的起始浓度为 1.21×10^5 CFU/ml。表1显示了本发明的吸附物的多种效率。在具有肝素、甘露糖、裸珠(PEI)、肝素/甘露糖的混合物、或肝素/甘露糖和PEI的混合物的柱子上通过或重复通过之后,测量、记录每个样品的终浓度并制成表格。

[0147] 样品以迭代的方式在柱子上反复通过。样品可以数次通过,每次降低样品中的细菌浓度并将细菌或病原体浓缩在介质上。

[0148] 使用吸附介质从样品中分离出显著量的病原体。表2是报道使用多种介质除去病原体的总结表。病原体在介质柱上浓缩之后,其可以柱子上释放,并测定其存在和身份。通过应用体积小于起始样品体积的洗脱缓冲液,可以对病原体进行浓缩。而且,该方法可以用于从血液样品中除去细胞和碎片,所述细胞和碎片可以干扰标准病原体检测方法,例如比色测定、免疫测定、ELISA、基于PCR的测定等。

[0149] 尽管已出于清楚理解的目的通过说明和实例的方式对前述发明加以详细说明,本领域技术人员将会认识到,可以在所附权利要求的范围内实施一些变化和改良。此外,本文提供的各参考文献在此全文并入作为参考,其程度如同每个参考文献均单独并入作为参考。

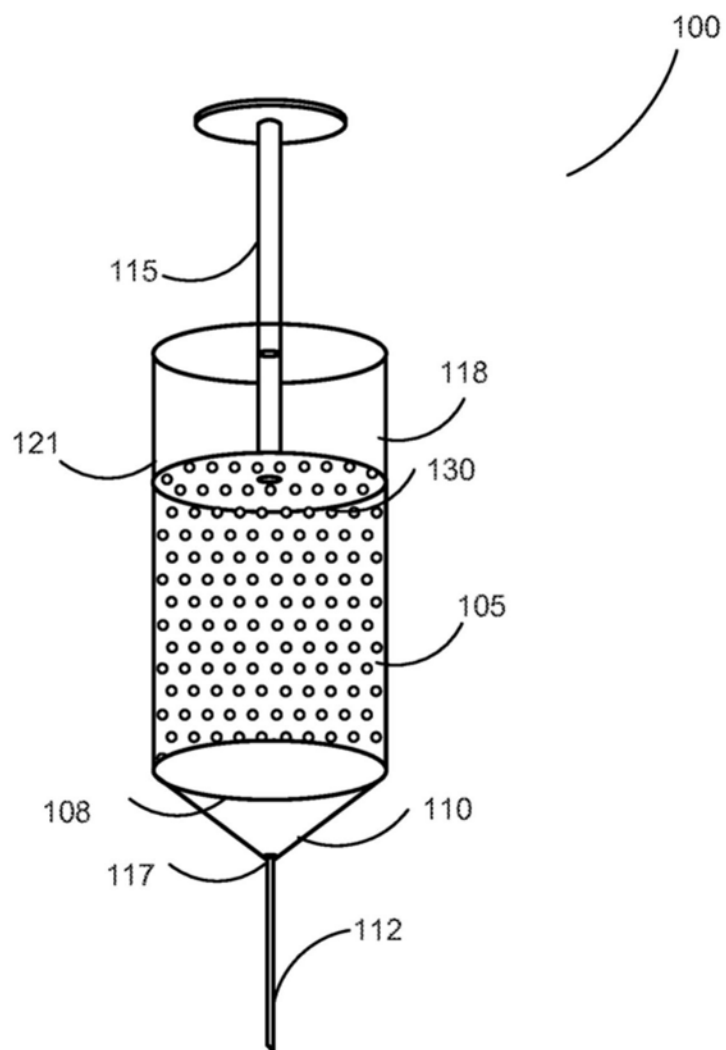


图1