



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101796418 B

(45) 授权公告日 2013. 05. 01

(21) 申请号 200880105855. 3

(22) 申请日 2008. 09. 02

(30) 优先权数据

07017539. 3 2007. 09. 07 EP

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 03. 05

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2008/007158 2008. 09. 02

(87) PCT申请的公布数据

W02009/030456 EN 2009. 03. 12

(73) 专利权人 苏黎世大学

地址 瑞士苏黎世

(72) 发明人 罗尔夫·格拉夫 丹尼尔·比姆勒

马里厄斯·基尔

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 张文辉

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006. 01)

(56) 对比文件

WO 98/00561 A1, 1998. 01. 08, 说明书第 6 页
第 2-13 行.

审查员 张小勇

权利要求书1页 说明书8页

序列表2页 附图6页

(54) 发明名称

检测分析人体脓毒症的方法

(57) 摘要

本发明涉及一种可靠的预测创伤后人体脓毒症的方法,其中在血清中确定胰石蛋白/再生蛋白(PSP/reg)的水平,并且高水平指示了在疾病早期脓毒症的发展情况。此外描述了一种在血清中确定PSP/reg水平的方法。

1. PSP/reg 的标准溶液在制备预测和 / 或诊断人体全身性感染的试剂盒中的用途,所述试剂盒用于一种预测和 / 或诊断人体全身性感染的方法中,其中在体液样品中确定胰石蛋白 / 再生蛋白 (PSP/reg) 的水平,并且高水平指示了脓毒症的发展。

2. 如权利要求 1 的用途,其中在血清中确定 PSP/reg 的水平。

3. 如权利要求 2 的用途,其中指示创伤后脓毒症发展的高水平为 60ng/ml。

4. 如权利要求 2 的用途,其中在创伤后第 3 天,第 4 天或第 5 天指示脓毒症发展的高水平为 80ng/ml。

5. 如权利要求 1 的用途,其中 PSP/reg 的水平通过 ELISA,RIA,EIA,质谱法或微阵列分析确定。

6. 如权利要求 1 的用途,其中 PSP/reg 的水平通过夹心 ELISA 方法确定,其中微孔板被针对抗 PSP/reg 的一类抗体包被,板随后被封闭,并加入样品或标准品,应用第二类抗 PSP/reg 的抗体,然后加入偶联有适当标签的检测特定类型的第二抗体的第三抗体,标签被用于定量 PSP/reg 的数量。

7. 如权利要求 6 的用途,其中夹心 ELISA 方法中的标签是一种显色反应检测的酶。

检测分析人体脓毒症的方法

发明领域

[0001] 本发明涉及一种预测和 / 或诊断人体全身性感染 (systemic infection) 的方法, 特别是预测脓毒症 (sepsis) 的发展, 该方法基于体液中的胰石蛋白 / 再生蛋白 (PSP/reg) 的水平, 本发明还涉及一种分析试剂盒。

背景技术

[0002] 严重创伤后的全身性反应包括大量影响先天免疫, 炎症反应和细胞活力的参数。严重外伤病人可能有良好的发展没有任何感染, 而另一些可能会遭受感染或脓毒症的痛苦。脓毒症与多器官功能衰竭有关, 且具有高死亡率。最常使用的诊断脓毒症的标志为白细胞计数, C 反应蛋白和原降钙素。后两种是两种在创伤后大量诱导产生的蛋白, 然而没有任何已知的功能。另外, 细胞因子类, 如 IL-6, IL-8 和 IL-18, 被用于监测患者。但是, 上述提到的标记没有一种可以充当包括脓毒症在内的感染的预测指示物, 因此治疗可能滞后于脓毒症的发生。

[0003] 在动物预实验中, 已经显示了胰蛋白由于处理压力诱导产生, 甚至在没有任何胰腺组织损伤的情况下 (R. Graf 等, J Surg Res 2002, 195 :136-144)。这种蛋白, 胰石蛋白 / 再生蛋白 (PSP/reg) 属于外源凝集素结合蛋白类家族。在剧烈或慢性胰腺炎的条件下, 其被高度的上调并且可能出现在血清中。因为该蛋白的调节并不是纯粹的像其他酶原一样只受限于饮食诱导分泌, 其可能在其他条件下出现提高情况, 如, 在胰腺炎中。迄今, 该蛋白主要在胰脏中被研究。其同样可以在小肠的 PANETH 细胞中和胃基底细胞中被合成。关于 PSP/reg 的功能仍然在激烈地辩论着, 但是普遍假定其在再生过程中涉及到促进细胞增殖 (Y. Kinoshita 等, J. Gastroenterol 2004, 39 :507-513)。

[0004] 已经做了一些努力来证实 PSP/reg 作为一种疾病标记物。到目前为止, 由于血清水平在各种不同的胃肠疾病中都会上升, 因此还不可能证实血清值同特殊疾病单元之间的相关性。(Y. Satomura 等, J Gastroenterol 1995, 30 :643-650)。

[0005] 发明概述

[0006] 本发明涉及一种预测和 / 或诊断人体全身性感染的方法, 特别是预测脓毒症的发展, 其中胰石蛋白 / 再生蛋白 (PSP/reg) 的水平在体液样品中被测定, 并且高水平指示了疾病早期的脓毒症的发展。另外, 本发明还涉及一种在体液中检测 PSP/reg 水平的方法, 以及用于该方法的整套试剂盒 (a kit of parts)。

[0007] 附图简述

[0008] 图 1 : 测定严重创伤后许可进入医院的病人的血清类物质中 C 反应蛋白 (CRP) 的值。

[0009] 对病人进行了回顾分类, 无感染 (空盒子, $n = 14$), 感染病人 (阴影线盒子, $n = 22$), 脓毒症病人 (黑盒子, $n = 27$)。三组的 CRP 值 ($\log_{10}\text{ng/mL}$) 都标记为盒形图, 使用平均值以及 95% 置信区间, $d =$ 创伤后的天数。使用多元统计分析进行统计分析; $p =$ 显著性, $*$ = 脓毒症 vs 无感染的 p 值。

[0010] 图 2 :测定严重创伤后许可进入医院的病人的血清类物质中 IL-6 的值。病人分类和 IL-6 值 ($\log_{10}\text{ng/mL}$) 的盒标记同图 1 中 CRP 值的标记一致。

[0011] 图 3 :测定严重创伤后许可进入医院的病人的血清类物质中 IL-6 原降钙素 (PCT) 的值。病人分类和 PCT 值 ($\log_{10}\text{ng/mL}$) 的盒标记同图 1 中 CRP 值的标记一致。

[0012] 图 4 :测定胰石蛋白 / 再生蛋白 (PSP)

[0013] 在第 0 天的创伤后的 PSP/reg 的即时分布。所有的值都是与时间点复合的。C (= 对照) 指示了健康受试者的值, d = 创伤后的天数。

[0014] 图 5 :测定严重创伤后许可进入医院的病人的血清类物质中 PSP/reg 的值。

[0015] 图 5A :病人分类及空白, 阴影和黑色盒子的含义与图 1 的 CRP 值标记的含义相同。三组的 PSP/reg 值 (ng/ml) 值标绘为平均值 $\pm$ SEM。d = 创伤后天数。

[0016] 图 5B :病人分类和盒形标绘中出现的 PSP/reg 值 (ng/ml) 与图 1 中 CRP 值的标记相同。p = 显著性, * = 脓毒症 vs 无感染的 p 值。

[0017] 发明详述

[0018] 本发明涉及一种预测和 / 或诊断人体全身性感染的方法, 特别是预测脓毒症的发展, 其中胰石蛋白 / 再生蛋白 (PSP/reg) 的水平在体液样品中, 如血清中被测定, 并且高的水平指示了疾病早期的脓毒症的发展。

[0019] 除血清外其他用于测定 PSP/reg 水平的体液为, 如, 全血, 尿, 唾液, 脑脊髓液, 泪, 汗, 乳汁, 或固体组织提取物或是粪便提取物。

[0020] 指示创伤后脓毒症发展的 PSP/reg 的水平依赖于选用的用于检测的体液。对于血清来说, 该水平在第 3 天, 第 4 天或第 5 天为 60 到 80ng/ml。因此, 更具体地说, 本发明涉及一种预测和 / 或诊断脓毒症发展的方法, 其中检测血清中胰石蛋白 / 再生蛋白 (PSP/reg) 的浓度, 并且在第 3 天、第 4 天或第 5 天达到 60ng/ml 或以上浓度, 特别是 80ng/ml 或以上浓度, 可以指示脓毒症的发展。

[0021] 任何一种已知的方法可能用来检测体液中 PSP/reg 的水平。可以考虑到的方法为, 如, ELISA, RIA, EIA, 质谱法, 或者微阵列分析。这些方法当用于诊断全身性感染时, 如, 脓毒症, 是本发明的另外一个目的。

[0022] 用于检测体液中, 如血清中的 PSP/reg 的一种优选的方法, 是 ELISA 方法。在本发明的一个具体实施方案中, PSP/reg ELISA 包括夹心排列: 常规的微孔板被一种抗体 (“第一” 抗体) 包被, 如, 豚鼠多克隆抗体, 定向抗 PSP/reg。板随后被封闭, 并且加入标准样品。在孵育之后, 应用另一种不同的抗 PSP/reg 的抗体 (“第二” 抗体), 如, 多克隆兔抗体。探测特殊类型 “第二” 抗体的第三抗体, 如, 一种抗 - 兔抗体, 连接一种适宜的标签, 例如, 可显色检测的酶, 随后被添加。最后使用标签的底物对板进行显色, 以用来探测标签的量, 作为 PSP/reg 存在和量的测量标准。如果该标签是一种显色检测的酶, 那么底物为结合酶的显色的底物。颜色反应随后使用酶标仪进行测量, 并与标准品进行比对。

[0023] 适宜的抗体对 (“第一” 抗体和 “第二” 抗体) 可以是任意组合的豚鼠, 大鼠, 小鼠, 兔子, 山羊, 鸡, 驴或马抗体。优选的是多克隆抗体, 但是也可能使用单克隆抗体或抗体片段。适宜的标签为显色标签, 即, 可以用于将一种底物转化为可检测的有颜色的或荧光化合物的酶类, 标签还可以是藉由分光镜的标签, 如, 荧光标记或显示可见颜色的标签, 还可以使用亲和力标签, 其可能通过进一步的该标签的特异性化合物显像, 并且允许简单的检测

和定量,或者任何其他在标准 ELISA 反应中的标签。

[0024] 其他优选的用于检测 PSP/reg 的方法有放射性免疫测定或使用单一抗体的竞争性免疫测定,以及在自动商业分析机器人上进行的化学发光测定。微粒增强荧光法,荧光偏振方法,或质谱法可能同样可以应用。检测装置,如,微阵列,是 PSP/reg 有效的读出系统部分。

[0025] 本发明还涉及包括其中部分用于检测 PSP/reg 以用来诊断/预测全身性感染的试剂盒,例如,包括器械,试剂以及 PSP/reg 标准溶液。可考虑的器械有,如 ELISA 反应的微孔板,预包被的 ELISA 板,以及板的盖子。试剂是那些显著的显像以及设计用于检测 PSP/reg 的试剂。优选的 PSP/reg 标准溶液包括按照下文所述的方法合成的 PSP/reg。试剂盒部分可能还包括其他硬件,如吸管,溶液如缓冲液,封闭液等等,滤纸,颜色表和使用说明。

[0026] PSP/reg 是一种在胰脏及肠内表达的蛋白。其可以从胰脏 mRNA 中克隆得到,然后亚克隆到酵母表达载体中。随后该蛋白可以在 ADH 的控制下进行表达。适宜的表达培养基可能包括甲醇来诱导及维持 PSP/reg 的分泌。优选使用 SP 琼脂糖纤维素凝胶在 pH 和盐梯度下纯化 PSP/reg。该纯化的 PSP/reg 用于制备与体液中 PSP/reg 水平进行比较的标准溶液。抗该蛋白的多克隆抗体可能从小鼠,大鼠,兔,山羊,鸡,驴,马及豚鼠或其他适宜的动物中使用标准方法获得。

[0027] 血清中的 PSP/reg 在脓毒症发展早期上升的原因还没有完全清楚。在大鼠预(pilot)实验中,观察到了胰脏未损伤时形成的 PSP/reg 上升的情况,并且有证据表明其他器官的严重的创伤导致了血液中 PSP/reg 浓度的上升。在进一步的研究中,选择了一组严重创伤但没有明显的胰脏损伤的病人(参见实施例)。血清中 PSP/reg 的出现将意味着改变了的通路,使蛋白从胰液转向血液中。其同样显示了外源凝集素结合家族的成员(如胰腺炎相关蛋白)也可被细胞因子诱导。在创伤后会出现细胞因子的强烈的及协同的作用。细胞因子应答的复杂性,以及多种被释放的不同的细胞因子,还没有被了解。因此,像是 PSP/reg 对在全身性紧张或创伤的条件下上升的细胞因子做出反应。相反,其他的胰酶,如淀粉酶和脂肪酶,显得并不受细胞因子调节,其在血液中出现仅仅是转移的结果。血液血清中 PSP/reg 的水平现在被证明是脓毒症的可靠指标。血液中 PSP/reg 的上升可能意味着特定的压力反应。

[0028] 显示了不像其他炎症的指示物,病人体内 PSP/reg 的水平在脓毒症期间或其临床征兆之前的上升是显然的。测定和定量血清中的 PSP/reg 可以通过如夹心酶联免疫反应完成,其检测限制为少于 100pg/ml。正常的血清值为 5 到 15ng/ml 之间。严重创伤的病人在导致创伤的意外之后的 7 天到 10 天间产生脓毒症。血清值与脓毒症的严重程度相关。其可能达到超过 200ng/ml。在脓毒症的临床征兆可见之前, PSP/reg 值在第 3 天到第 5 天开始上升,并且达到大于 60-80ng/ml 的值。这些值提供了预测病人是否将发展为脓毒症,并由此导致的包括昂贵的抗生素治疗的强力疗法的需求以及在加护病房的停留。与商业上可买到的诊断分析相比, PSP/reg 在监测假定的脓症患者方面具有显著的优势。

实施例

[0029] 分离及亚克隆 PSP/reg

[0030] 为了获得生产 PSP/reg 特异性抗体的 cDNA,通过使用本领域常规的实验方法从胰

脏 mRNA 中反转录获得 cDNA。运行使用编码 PSP/reg 的序列的特异性引物以及选择扩增的 PSP/reg 的 cDNA 的 PCR。随后 PCR 反应使用延长的引物进行重复来添加一段特异的序列,从而使其可以插入到巴斯德毕赤酵母转染载体中。引物被设计为融合了具有 KEX2 位点的 alpha 交配因子的信号肽的编码区以及成熟的人类 PSP/reg 的编码区。亚克隆至巴斯德毕赤酵母载体中的过程为两个步骤。首先,PCR 产物连接入 PCR2.1 载体 (Invitrogen, TAcloning) 并且序列无误。然后,使用 XhoI/NotI 限制性内切酶酶切 PCR 产物,并且连接到转移载体 pPIC9 (Invitrogen) 中。巴斯德毕赤酵母菌株 KM71 (Invitrogen) 是改造过的,并且大多数产生的克隆可以用来选择扩增和生产重组蛋白。

[0031] 用于 PCR 扩增和亚克隆的引物

[0032] 人 PSP/reg/reg1 alpha 正向引物

[0033] 5' GAAAAGACAAGAGGCCAGACAGAGTT 3' (SEQ ID NO :1)

[0034] 5' GTATCTCTCGAGAAAAGACAAGAGGCCAGACA 3' (延长的) (SEQ ID NO :2)

[0035] 反向

[0036] 5' CTAGTTTTTGAAGTTGCATAC 3' (SEQ ID NO :3)

[0037] 人 PSP/reg/reg1 beta

[0038] 正向引物

[0039] 5' GAAAAGACAGGAGTCCCAGACAGAGCTG 3' (SEQ ID NO :4)

[0040] 5' GTATCTCTCGAGAAAAGACAGGAGTCCCAGAC 31 (延长的) (SEQ ID NO :5)

[0041] 反向引物 5' ATCTGCAGTCTAGAATTCTGCAGGACCAGTTCTAGAC3' (SEQ ID NO :6)

[0042] 大规模蛋白表达

[0043] 使用单克隆,25ml 的 BMG (缓冲微量甘油,100mM 磷酸钾 (potassiumphosphate) PH6.0,1.34%酵母nitrogen base, 4×10^{-5} %生物素,1%甘油)接种到250ml的带有塞子的烧瓶中,并在29℃下摇床中(300rpm)培养过夜。培养物中的10ml用于接种到3升带塞子的烧瓶中的1LBMG培养基中,然后29℃(300rpm)培养过夜。在室温下1500-3000×g下离心5分钟收集细胞。通过重悬细胞在相同的带塞子的瓶子中用1/5体积(200ml)的BMM(缓冲的微量甲醇,BMG中的甘油被0.5%的甲醇替代)来诱导表达。每24小时添加100%甘油来获得0.5%(1ml)的浓度,直到预计的最佳诱导时间。在室温下1500-3000×g下离心5分钟收集细胞。收集培养基上清液并冷冻直到纯化蛋白。

[0044] 多肽从培养基上清液中纯化。使用蒸馏水将培养基上清液稀释到1:3。用盐酸将pH调整到pH3.5。随后将培养基上清液上样到SP琼脂糖凝胶柱并且使用盐和pH梯度(10mM LiCl,50mM MES,pH 5.3起始缓冲液,2M LiCl,50mM MES,pH 6.3终止缓冲液)进行洗脱。收集各部分并使用SDS凝胶电泳进行分析。混合具有最高和最纯的蛋白质组分的部分,用10mM HEPESpH 7.5进行透析。多肽序列通过N末端序列测序进行确认,然后用氨基酸分析评价其浓度。

[0045] PSP/reg ELISA

[0046] 为了测定总的PSP/reg,可能使用基于豚鼠产生的抗重组人PSP/reg的抗血清以及兔抗同一蛋白的抗血清的夹心酶联免疫反应。为了提高兔抗的特异性和敏感性,IgG使用蛋白A珠柱子的吸收进行纯化(HiTrap®,Pharmacia):HiTrap®柱子使用pH 7的200mM NaH₂PO₄/ZnNa₂HPO₄进行平衡。兔抗血清用同样的缓冲溶液进行pH调整(终浓度为20mM)然

后上样到柱子上,柱子随后连续用 pH8 的 100mM 和 10mM 的 Tris/HCl 进行清洗。IgG 部分用 pH3 的 0.1M 的柠檬酸进行洗脱。洗脱部分立即用 1M pH 8.9 的 Tris/HCl 进行中和。

[0047] 用豚鼠抗大鼠 PSP/reg 的 IgG 片段包被 96 孔微孔板 (Costar EIA 板,平底,高结合),4℃下包被,其中 IgG 片段用 TBS 稀释为 1 : 500 (100 μl/孔)。经过清洗步骤后,板用 150 μl 1% 的 BSA/TBS 封闭 1 小时,随后换用 100 μl 不同的标准浓度的重组人 PSP/reg (0,0.1,0.5,1.0,1.5,2.5,3.5,或 5.0ng/ml) 或 100 μl 的稀释样品。样品和标准品均要上双份样品,并且在室温下孵育 1 小时。在重复的清洗步骤后,孔板用 100 μl 兔抗鼠 PSP/reg IgG 进行孵育 1 小时,所述 IgG 稀释为 1 : 500。接着再次清洗,然后开始用 100 μl 商业可购得的鼠多克隆抗兔 IgG 抗体 (连接有碱性磷酸酶的鼠抗兔的 IgG 片段,稀释成 1 : 1000 ;购自 Sigma) 进行孵育 30 分钟。然后孔板被再次清洗,可溶的磷酸酶底物,磷酸对硝基苯酯 (Sigma 104®片剂),添加至碱性磷酸酶缓冲液中 (100mM Tris/HCl pH 9.5,100mM NaCl,0.8mM MgCl₂)。在孵育大约 20 分钟后,在 MRX 全自动定量绘图酶标仪上 (Dynatech Laboratories) 测量 405nm 处的光密度 (OD)。

[0048] 所有的稀释液 (除了包被抗体) 均使用 1% BSA/TBS 制备。所有的室温下的孵育都使用振荡 ELISA 孔板混合器 (Titramax 100, Heidolph, BioblockScientific) 进行。所有的清洗步骤都使用 TBS/Tween 20 (0.05%, v/v), 用自动微孔板洗涤器洗涤 (MRW, Dynatech Laboratories)。加入来自健康志愿者的稀释的血清的重组 PSP/reg 的治愈率如下:在 1 : 10 稀释时为 71%,在 1 : 20 稀释时为 118%,在 1 : 40 稀释时为 95%。板外和板内的差异小于 5% 和 10%, 分别对应标准的浓度范围 (0.1 到 3.5ng/ml 之间)。

[0049] 使用重组人 PSP/reg alpha 确定检测。重组 PSP/reg 1 beta, 第二种亚型, 使用相同的技术制备。相同的使用 ELISA 识别 PSP/reg 1 beta。因此,ELISA 对于已知的 PSP/reg 蛋白家族是特异性的。

[0050] 为证明原则的测试病人

[0051] 研究人群包括 63 位接受外伤外科手术 (一级创伤中心) 的受伤病人,位于苏黎士大学医院,时间为 2002 年 1 月到 2003 年 9 月。选择标准为创伤严重度评分 (ISS) > 16 点,病人年龄 > 16 岁,在事故后少于 4 小时入院,并且在重症监护病房 (ICU) 5 天后生存下来。胰腺受到损伤的病人被排除。所有的病人都按照进展性创伤生命维持 (ATLS) 指导以及标准的外伤程序进行治疗。简言之,在导气管,通风,以及监听心血管功能,包括体腔减压的救生步骤之后,执行出血和污染的控制。随后进行彻底的创伤清除术,隔间减压,以及多数通过外固定 (“紧急当天手术”) 的主骨折的基础稳定。其后,病人被转移到 ICU 恢复器官功能。众所周知的,所有的病人在创伤后 24 小时内到维持正常的肠道微生物菌群和肠粘液层都要接受肠内营养。当脓毒症病灶通过一种阳性的微生物培养物被确定时,使用抗生素。再者,对于开放性骨折,应用标准的抗生素 5 天,并且给药单发 (single shot) 的头孢霉素以预防骨折的骨缝。

[0052] 表 1 简要说明了住院当天的人口数据和创伤评分,创伤的严重程度与性别的分布非常相似。

[0053] 表 1 参加病人的人口统计数据

[0054]

参数	无感染	感染	脓毒症
数量	14	22	27
年龄 (年)	38.6±16.9	36.6±15.5	37.3±16.0
性别	11(78.6%)	15(68.2%)	22(81.5%)
ISS ^a (分数)	34.6±9.3	32.2±13.9	38.7±15.6
GCS ^b (分数)	8.9±5.2	9.2±4.9	8.8±5.1
APACHE II ^c (分数)	15.0±6.2	13.6±6.6	17.0±6.8
ICU ^d (天数)	9.1±5.9	16.3±8.2	26.6±9.9

[0055] 注释 ±SD. 括号内的数值为百分比。

[0056] ^aISS, 创伤严重程度评分

[0057] ^bGCS, 格拉斯哥昏迷量表

[0058] ^cAPACHE II, 急性病生理学和长期健康评估

[0059] ^dICU, 重症监护治疗病房。

[0060] 创伤病人的血液情况

[0061] 病人依据其分数被回顾性分成三组 :a) 无感染, b) 感染和 c) 脓毒症 (表 2)。为了指示用于测定炎症和损伤的程度的一些参数, 检测了白细胞计数和 C 反应蛋白。所有的病人在入院的第一天都显示了强烈的血液白细胞减少症状, 无论是多么严重的组别。白细胞逐渐增加为正常值, 而脓毒症患者是个例外, 其白细胞增加到了显著的高度, 在第 10 天达到了 $18 \times 10^6/L$ 。同时测定的 C 反应蛋白 (CRP) 显示了所有组从入院起的低水平增加到第 3 天大约 150ng/ml (图 1)。虽然无感染组始终比其他组的水平低, 但是并没有明显的模式去区分这三组病人。因此在第 5 天和第 7 天之间, 以及第 14 天和第 21 天之间, 脓毒症病人显示了比无感染病人更高的 CRP 值, 该差异小于两个中的一个因素。

[0062] 表 2 加入病人的损伤模式及手术后的过程

[0063]

参数	无感染 (n = 14)	感染 (n = 22)	脓毒症 (n = 27)
头部 (^a AIS, 分数)	85.7% (3.4)	86.4% (3.7)	70.4% (4.1)
胸部 (^a AIS, 分数)	78.6% (3.0)	36.4% (3.3)	63.0% (3.5)
腹部 (^a AIS, 分数)	50.0% (3.7)	36.4% (3.8)	44.4% (4.1)
四肢 (^a AIS, 分数)	57.1% (3.0)	68.2% (2.3)	63.0% (2.5)

骨盆 (^a AIS, 分数)	21.4% (3.0)	22.7% (2.6)	18.5% (2.8)
脊柱 (^a AIS, 分数)	42.9% (2.8)	36.4% (2.5)	25.9% (2.9)
无 SIRS ^b	2 (14.3%)	—	—
SIRS 2 ^b	5 (35.7%)	2 (9.1%)	—
SIRS 3/4 ^b	7 (50.0%)	20 (90.9%)	—
脓毒症	—	—	27 (100%)
死亡率	2 (14.3%)	2 (9.1%)	5 (18.5%)

[0064] ^aAIS, 简略损伤量表

[0065] ^bSIRS, 全身炎症反应综合征

[0066] 创伤病人的验证标准指示的检测

[0067] 为了检测是否炎症通常使用的指示物, 如 IL-6 (图 2) 以及原降钙素 (PCT, 图 3), 可以区别这严格区分的三组病人, 检测了这些病人住院整个过程中这些蛋白的血液水平。IL-6 在第 1 天很快达到了很高的水平。在前两天, 三组严格区分的病人的值是不同的, 其中脓毒症组 (1200pg/ml), 感染组 (600pg/ml), 均高于无感染组。统计学并没有显示其显著性是由于数据的高变异性, 而在 5-10 天时出现了不同。虽然脓毒症患者的这段时间有微小的增加 (350pg/ml), 这些数值与住院的首日相比都有了下降。

[0068] 脓毒症患者在患脓毒症之前和脓毒症期间 PCT 值清楚地上涨了 20 倍, 而其他组地值停留在 0.5-2ng/ml 附近水平 (图 3)。与健康受试者相比 PCT 地最大上涨为 25 倍。统计学并没有显示这种显著的差异归因于样品的高变异性。

[0069] PSP/reg 创伤后的正调节

[0070] PSP/reg 主要在胰脏和肠中被合成。为了应答局部组织损伤, 其被高度地上调。在没有胰脏组织损伤地情况下, 不会预期 PSP/reg 的上调。但是, 多发外伤导致了细胞因子的释放, 其可能影响 PSP/reg 的表达和分泌。因此, 实验测试在没有胰脏损伤的严重创伤的病人中这些蛋白是否会增加。在多发外伤之后的所有病人的复合数据显示了与第 0 天以及与健康受试者相比, 其在第 1 天时会有增加, 在第 3 天时增加变得显著 (图 4)。

[0071] 因此, 在多发外伤后胰石蛋白有着微小的提高。随后指定为无感染病人, 感染病人和脓毒症病人的分组来分析数据。在无感染病人中 PSP/reg 的值有轻微的上升, 在第 7-10 天达到峰值 (图 5A, 5B)。在表现感染的多发外伤的病人中, 有更进一步的上升。最后, 表现脓毒症的多发外伤病人显示了血清中 PSP/reg 大幅度的上升。

[0072] 增长开始于脓毒症发生临床标准前几天。PSP/reg 与脓毒症高度相关。在第 3 天, 当病人没有表现出脓毒症但是血液中 PSP 的平均水平显著提高到超过 100ng/ml, 并且在脓毒症过程中其达到大约 20 倍。 (图 5A, 5B, 第 5-10 天)。

[0073] 因此脓毒症病人体内早期的 PSP/reg 的增长可以用来作为预测脓毒症的血清指示。因此, 统计特异性, 阳性以及阴性的预测值作为 3 种潜在的甄别域 (cut-off value), 如, 在第 3 天和第 5 天时 30, 60 和 80ng/ml。特异性的预测值为 80% 左右, 以 60 到 80ng/ml 之间为甄别域。上述阳性和阴性预测值同样在 60 和 80% 之间, 显示了病人可以通过该方法及早确定病灶。

[0074] 表 3 同未发生并发性感染或局部感染的病人相比,脓毒症病人血清种 PSP 的敏感性,特异性,阳性和阴性预测值的 3 种甄别值。两组无感染同脓毒症组进行比较。不包括感染组。

[0075]

第 3 天	30ng/ml	60ng/ml	80ng/ml
敏感性 (%)	70.4	55.5	40.7
特异性 (%)	72.2	83.3	83.3
阳性预测值 (%)	65.5	71.4	64.7
阴性预测值 (%)	76.5	71.4	65.2
第 5 天	30ng/ml	60ng/ml	80ng/ml
敏感性 (%)	74.1	63.0	51.9
特异性 (%)	66.7	75.0	77.7
阳性预测值 (%)	62.5	65.4	63.6
阴性预测值 (%)	77.4	73.0	68.3

[0076] 分析是基于在创伤后第 3 天或第 5 天获得的 PSP 血清值。

序列表

<110> 苏黎世大学 (UNIVERSITAET ZUERICH)

<120> 检测分析人体脓毒症的方法

<130>PSP

<160>6

<170>PatentIn version 3.3

<210>1

<211>27

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于 PSP/reg 1alpha 的正向引物

<400>1

gaaaagacaa gaggcccgaga cagagtt 27

<210>2

<211>31

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>PSP/reg 1alpha 的延伸引物

<400>2

gtatctctcg agaaaagaca agaggcccg a 31

<210>3

<211>21

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于 PSP/reg 1alpha 的反向引物

<400>3

ctagtttttg aacttgcata c 21

<210>4

<211>28

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于 PSP/reg 1beta 的正向引物

<400>4

gaaaagacag gagtcccaga cagagctg 28

<210>5

<211>32

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于 PSP/reg 1beta 的延伸引物

<400>5

gtatctctcg agaaaagaca ggagtcccag ac 32

<210>6

<211>37

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于 PSP/reg 1beta 的反向引物

<400>6

atctgcagtc tagaat tctg caggaccagt tctagac 37

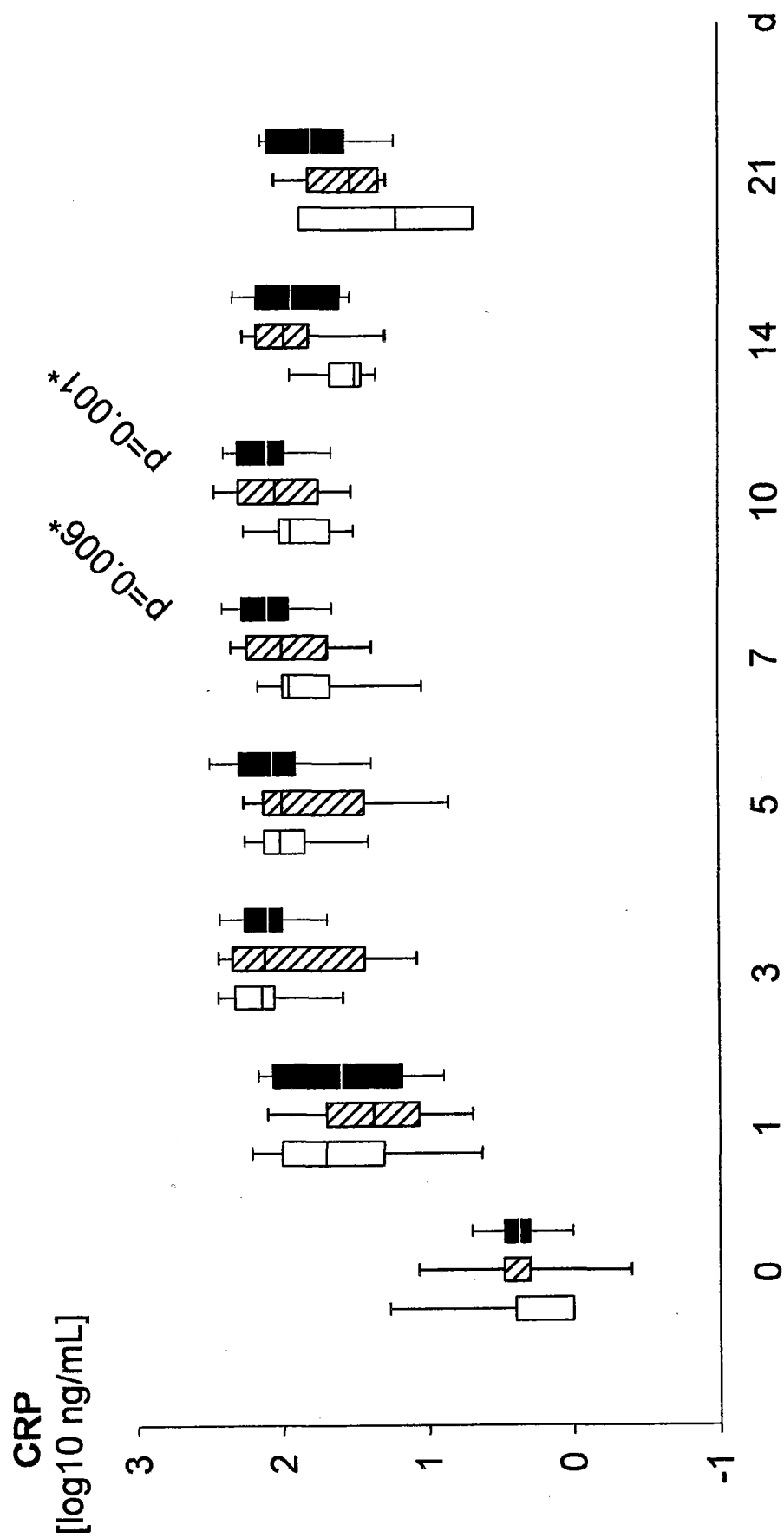


图 1

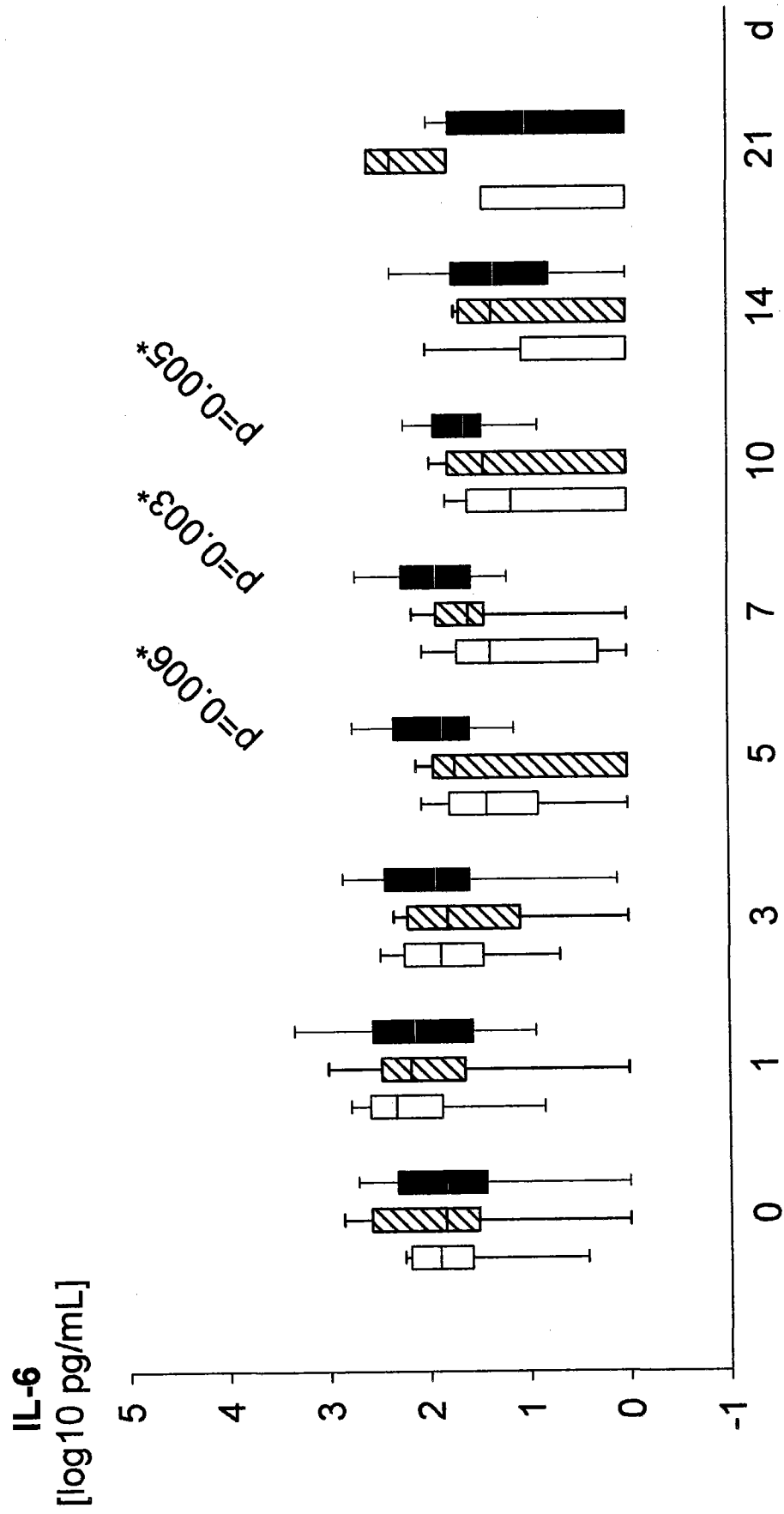


图 2

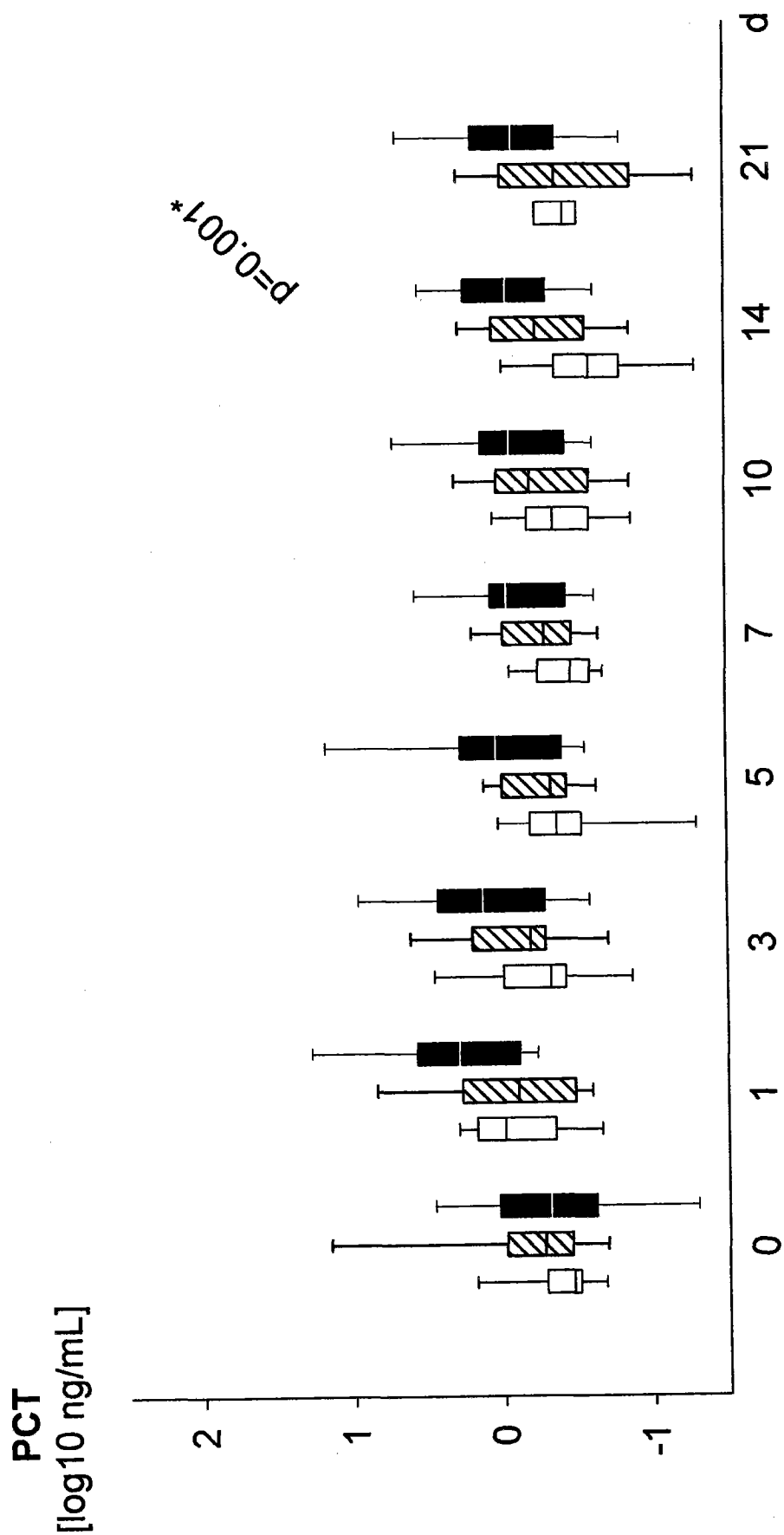


图 3

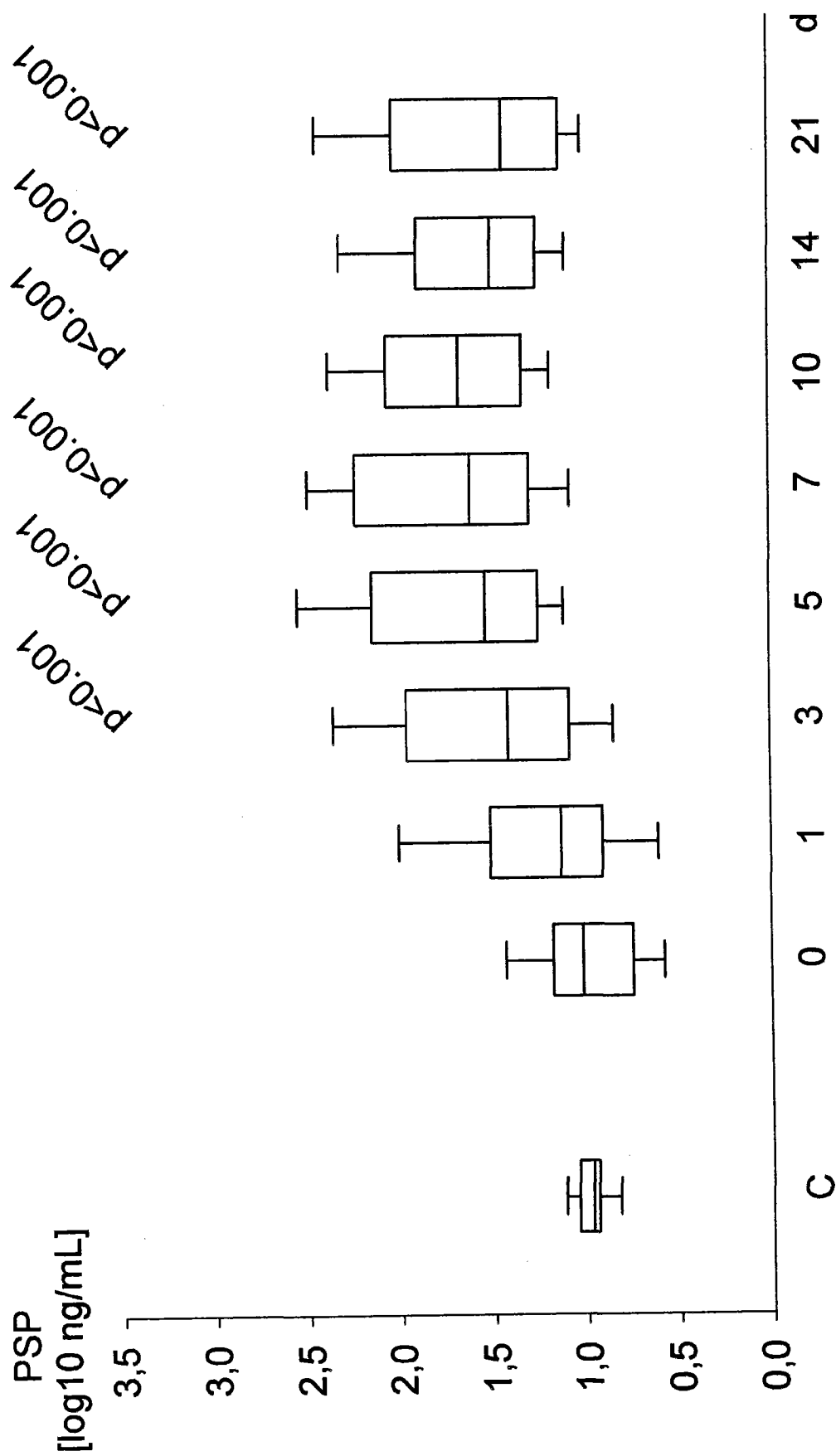


图 4

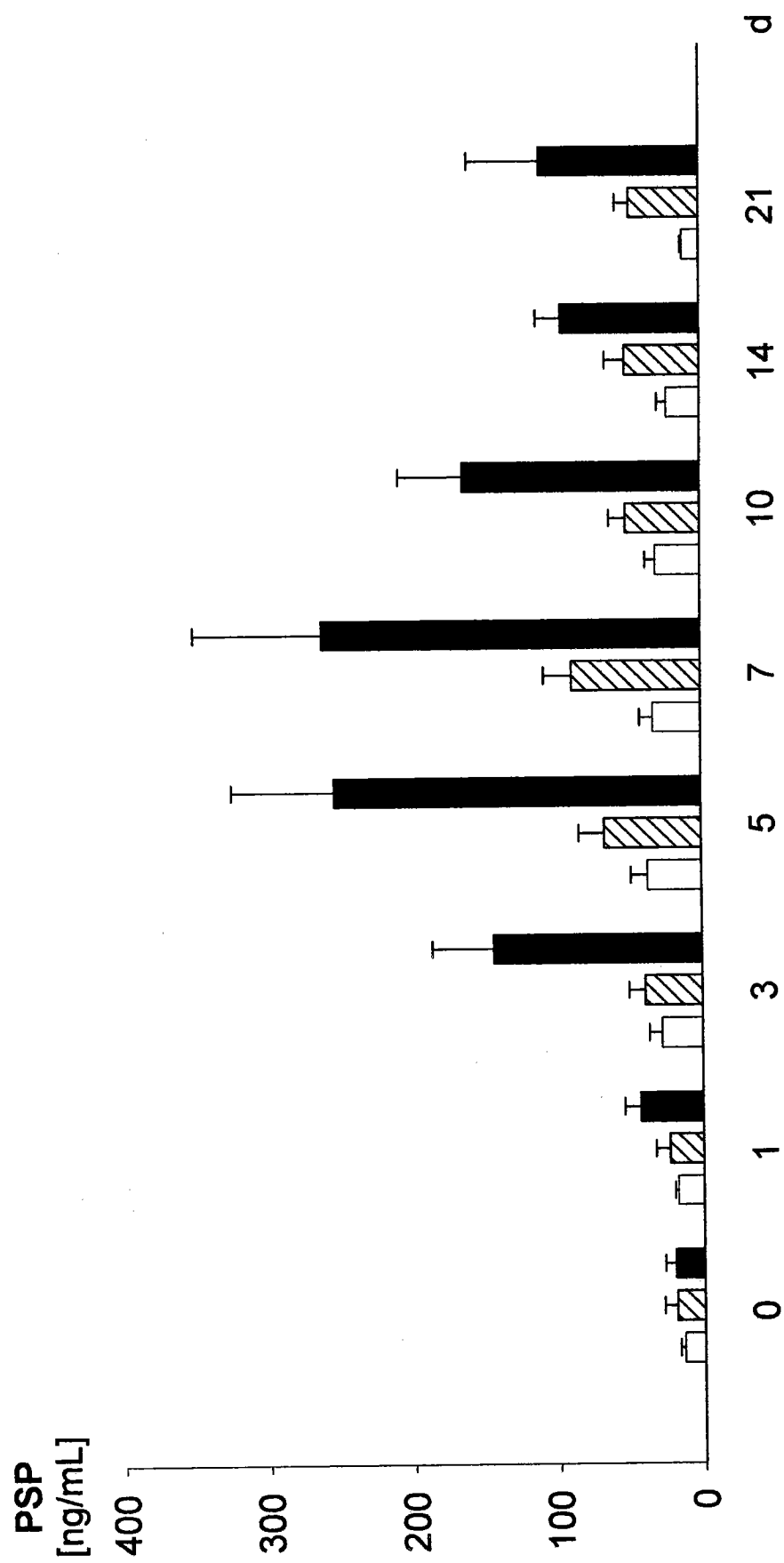


图 5A

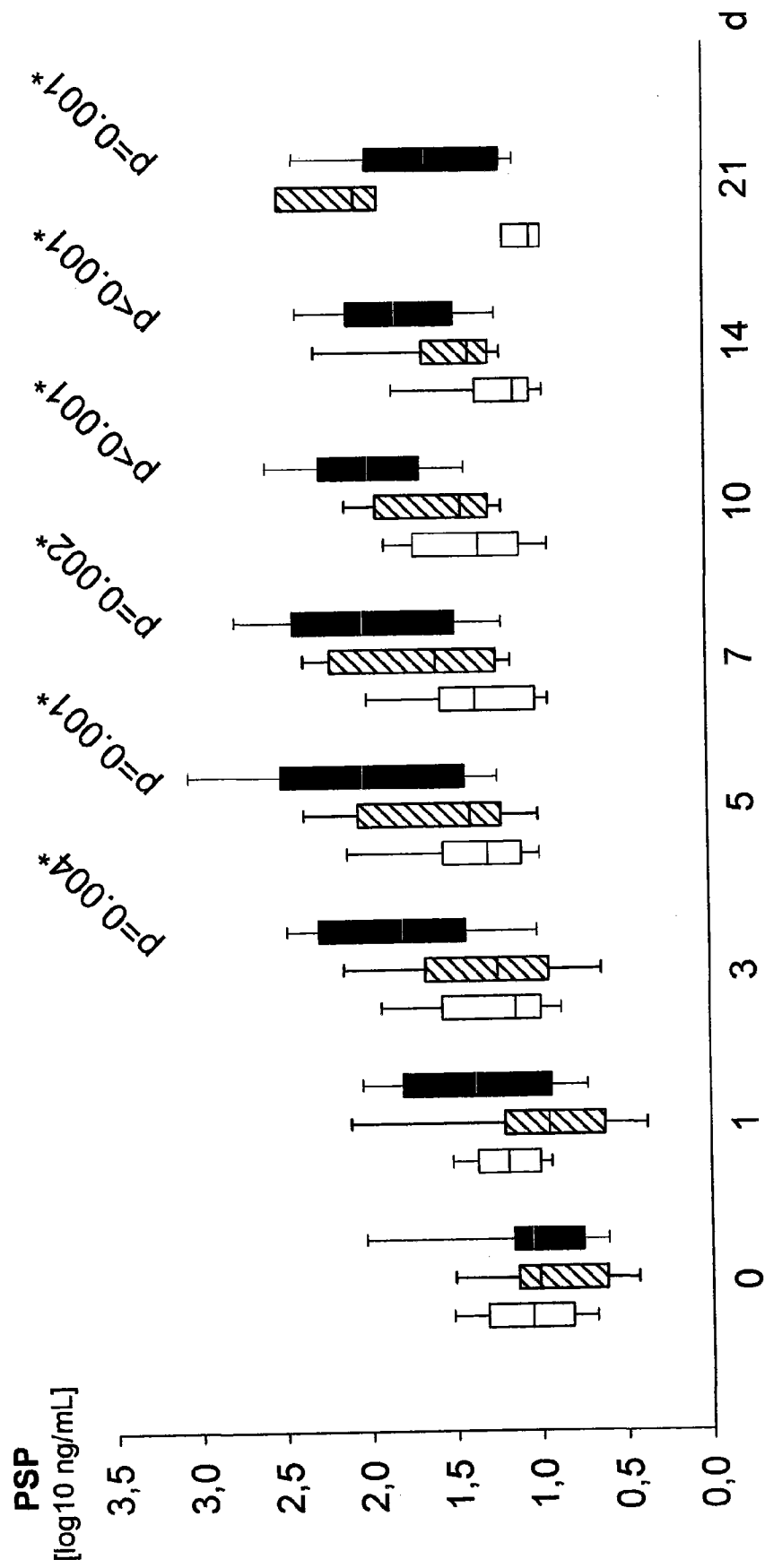


图 5B