(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 120102879 A
(43)申请公布日 2025.06.06

(21)申请号 202510261116.9

(22)申请日 2020.02.04

(30)优先权数据
16/267,120 2019.02.04 US

(62)分案原申请数据
202080027193.3 2020.02.04

(71)申请人 路易斯安娜州立大学监测委员会，农业和机械学院
地址 美国路易斯安那州

(72)发明人 金宣妗

(74)专利代理机构 北京世峰知识产权代理有限公司 11713
专利代理师 王建秀 刘小立

(51)Int.Cl.
G01N 33/573(2006.01)
G01N 33/68(2006.01)
C12Q 1/42(2006.01)

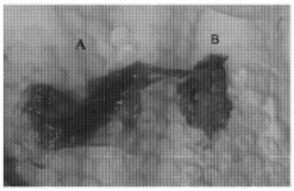
权利要求书1页 说明书109页 附图51页

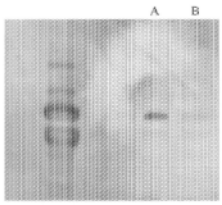
(54)发明名称

检测胃肠道疾病的组合物和方法

(57)摘要

本发明提供了检测胃肠道疾病的组合物和方法。本发明涉及检测和治疗胃肠疾病的组合物和方法。本发明涉及用于确定儿童中的肠碱性磷酸酶(iAP)活性以及iAP的量的试剂在制备用于在确定所述儿童的炎性肠病(IBD)的预后的方法中使用的试剂盒中的用途。





CN 120102879 A

1.用于确定儿童中的肠碱性磷酸酶(iAP)活性以及iAP的量的试剂在制备用于在确定所述儿童的炎性肠病(IBD)的预后的方法中使用的试剂盒中的用途,所述方法包括以下步骤(a)、(b)、(c):

(a)使用双状态转换矩阵和在多个受试者之间测量的倾向值拟合马尔可夫模型,

其中所述双状态转换矩阵包括第一状态和第二状态,其中第一状态包括非炎性肠病状态,其中第二状态包括炎性肠病状态,其中倾向值是在所述多个受试者中的受试者中发现的肠碱性磷酸酶(iAP)活性值和iAP量的函数,其中所述受试者为儿童;

(b)使用儿童的倾向值和拟合的马尔可夫模型估计从第一状态转换到第二状态的概率,其中拟合的模型指示儿童的倾向水平的增加显著增加从第一状态转换到第二状态的概率;

(c)建议当所述倾向值大于或等于0.5的阈值时治疗所述儿童。

2.根据权利要求1所述的用途,其中倾向值包括第一值和第二值的乘积,其中第一值包括一(1)减去第一比率,其中第一比率包括所述多个受试者中的受试者的iAP活性值除以在所述多个受试者中观察到的最大iAP活性值,其中第二值包括第二比率,其中第二比率包括来自所述多个受试者中的受试者的免疫测定值的iAP量除以来自在样品中观察到的免疫测定值的最大iAP量。

3.根据权利要求1所述的用途,其中倾向值包括第一值和第二值的乘积,其中第一值包括一(1)减去所述多个受试者中的受试者的iAP活性值,其中第二值包括来自所述多个受试者中的受试者的免疫测定值的iAP量。

4.根据权利要求2或3所述的用途,其中所述免疫测定包括蛋白质印迹、ELISA或免疫沉淀。

检测胃肠道疾病的组合物和方法

[0001] 本申请是与母案发明名称相同的分案申请,母案的中国申请号是202080027193.3,国际申请号是PCT/US2020/016646,申请日是2020年2月4日。

[0002] 本申请要求2019年2月4日提交美国专利申请16/267,120的优先权,将其每个的全部内容通过引用并入本文。

[0003] 本文引用的所有专利、专利申请和出版物均通过引用以其整体并入本文。这些出版物的公开内容通过引用以其整体并入本申请,以便更全面地描述截至本文所述和要求保护的本发明日期时本领域技术人员已知的现有技术。

[0004] 本专利公开包含受版权保护的材料。版权所有者不反对任何人以传真方式复制出现在美国专利商标局专利文件或记录中的专利文件或专利公开,但在其他方面保留任何和所有版权。

[0005] 政府利益

[0006] 本发明是在美国国家卫生研究院授予的R01GM097350号资助下在政府支持下完成的。政府对本发明享有一定的权利。

技术领域

[0007] 本发明涉及检测和治疗胃肠疾病的组合物和方法。

背景技术

[0008] 胃肠道疾病是指涉及胃肠道的疾病。例如,坏死性小肠结肠炎(NEC)是一种常见于早产儿的获得性胃肠道疾病。在NEC中,细菌侵入肠壁,引起局部感染和炎症。NEC的特点是高死亡率和长期发病率,包括短肠综合征、反复感染、营养缺乏和神经发育迟缓。尽管早产儿死亡率总体上净下降,但与NEC相关的死亡人数却有所增加。由于最初的非特异性症状和快速恶化,NEC通常难以诊断和管理。临床医生目前依靠放射学证据在疾病晚期做出诊断。

发明内容

[0009] 本发明提供了一种确定患者坏死性小肠结肠炎(NEC)预后的方法。在实施方案中,该方法包括使用双状态转换矩阵和在多个受试者之间测量的倾向值拟合马尔可夫模型,其中所述双状态转换矩阵包括第一状态和第二状态,其中第一状态包括非坏死性小肠结肠炎状态,其中第二状态包括坏死性小肠结肠炎状态(NEC),其中所述倾向值是在所述多个受试者中的受试者中发现的肠碱性磷酸酶(iAP)活性值和iAP量的函数;使用患者的倾向值和拟合的马尔可夫模型估计从第一状态转换到第二状态的概率,其中拟合的模型指示患者的倾向水平的增加显著增加从第一状态转换到第二个状态的概率;当所述倾向值大于或等于约0.5的阈值时治疗所述患者。

[0010] 在实施方案中,倾向值包括第一值和第二值的乘积,其中第一值包括一(1)减去第一比率,其中第一比率包括所述多个受试者中的受试者的iAP活性值除以在所述多个受试者中观察到的最大iAP活性值,其中第二值包括第二比率,其中第二比率包括来自所述多个

受试者的受试者的免疫测定值的iAP量除以来自在样品中观察到的免疫测定值的最大iAP量。

[0011] 免疫测定的非限制性实例包括蛋白质印迹分析、ELISA或免疫沉淀。例如,免疫测定可以包括利用化学发光报告基因的蛋白质印迹分析。在另一实例中,免疫测定可以包括使用荧光报告基因的蛋白质印迹分析。荧光报告的响应可以更线性。

[0012] 在实施方案中,免疫测定读数可以被认为是‘小型ELISA’,因为患者样品iAP丰度是针对2点曲线进行定量的。例如,可以通过将患者样品中的信号与人小肠裂解物(具有最高水平iAP或100%的阳性对照)和牛iAP(阴性对照,因为抗人iAP抗体不检测奶牛iAP或0%)之间的差异比值化比较患者样品中的信号。实施例9中的最大WB值是人小肠裂解物。

[0013] 在实施方案中,倾向值包括第一值和第二值的乘积,其中第一值包括一(1)减去多个受试者中的受试者的iAP活性值,其中第二值包括来自多个受试者中的受试者的免疫测定值的iAP量。

[0014] 在实施方案中,多个受试者包括患者。

[0015] 在实施方案中,治疗包括停止进食、施用抗生素或其组合。

[0016] 在实施方案中,样品是人小肠裂解物。

[0017] 在实施方案中,免疫测定包括蛋白质印迹、ELISA或免疫沉淀。

[0018] 本发明提供了鉴定患有胃肠(GI)疾病的受试者的方法。本发明的一个方面涉及用于诊断患有胃肠疾病的受试者的方法。本发明的另一方面涉及用于鉴定处于胃肠疾病风险中的受试者的方法。如本文所述的实施方案可以进一步识别胃肠疾病的早期阶段和胃肠疾病的晚期阶段。某些实施方案可以区分早期阶段和晚期阶段胃肠道疾病。例如,如本文所述的实施方案可以诊断晚期炎症状态,例如通过肠积气(门静脉或胆道气体)的放射学发现确定的炎症状态。作为另一实例,实施方案可以在生理上明显有肠道的猖獗炎症之前识别疾病的早期阶段。

[0019] 在实施方案中,该方法包括将来自受试者的生物样品与结合肠碱性磷酸酶(iAP)的试剂一起温育,在样品中检测结合iAP的试剂,以及检测和/或测量样品中iAP的量或活性,无论是否结合所述试剂。在实施方案中,结合iAP的试剂是至少一种GI疾病生物标志物,其包括iAP的AP酶活性、iAP蛋白水平、iAP二聚化/解离、翻译后修饰的iAP、总蛋白,例如总粪便蛋白,或其组合。在一些实施方案中,GI疾病生物标志物可用于诊断患有胃肠疾病的受试者,并且还可以指示患有胃肠(GI)疾病的受试者和/或处于发展GI疾病风险的受试者。在一些实施方案中,患有胃肠(GI)疾病的受试者可包括疾病的早期和晚期阶段。

[0020] 在实施方案中,iAP不被结合iAP结合试剂。例如,可以为样品中的酶提供底物,并监测底物的变化。在一个实施方案中,iAP不结合用于活性测定。例如,可以为样品中的酶提供底物并且可以监测酶的变化。不受理论的束缚,这对于与酶结合的AP也可以是相同的,其中在免疫测定中测量的底物变化是针对由抗体系统束缚的蛋白质,也是针对样品中的任何游离AP。

[0021] 本发明进一步提供了诊断受试者的GI疾病例如坏死性小肠结肠炎的方法,包括将来自受试者的生物样品与结合肠碱性磷酸酶(iAP)的试剂一起温育,在样品中检测结合iAP的试剂,以及检测和/或测量样品中结合iAP的试剂的量或活性。在实施方案中,结合iAP的试剂是至少一种GI疾病生物标志物,其包括iAP酶活性、iAP蛋白水平、iAP二聚化/解离、翻

译后修饰的iAP、总蛋白,例如总粪便蛋白,或其组合,并且其中GI疾病生物标志物指示患有胃肠(GI)疾病的受试者。本发明的结合iAP的试剂可以是与其同源底物结合的iAP、识别并结合iAP的抗体、针对并结合iAP的短肽序列等,其非限制性实例包括催化反应的小分子活化剂或抑制剂,金属离子(钨是碱性磷酸酶的过渡态效应物),引起产物变构释放的试剂,用作化学、酶促或光解触发物的不稳定化学部分,或与标记形式的iAP结合的基质。

[0022] 实施方案可以进一步包括将受试者诊断为患有GI疾病。例如,受试者可被诊断为患有GI疾病:如果样品中的总蛋白质浓度大于约1.0mg/ml、1.1mg/ml、1.2mg/ml、1.3mg/ml、1.4mg/ml、1.5mg/ml、1.6mg/ml、1.7mg/ml、1.8mg/ml、1.9mg/ml、2.0mg/ml、2.1mg/ml、2.2mg/ml、2.3mg/ml、2.4mg/ml、2.5mg/ml、2.6mg/ml、2.7mg/ml、2.8mg/ml、2.9mg/ml、3.0mg/ml、3.1mg/ml、3.2mg/ml、3.3mg/ml、3.4mg/ml、3.5mg/ml、3.6mg/ml、3.7mg/ml、3.8mg/ml、3.9mg/ml、4.0mg/ml、4.1mg/ml、4.2mg/ml、4.3mg/ml、4.4mg/ml、4.5mg/ml、4.6mg/ml、4.7mg/ml、4.8mg/ml、4.9mg/ml或5.0mg/ml;如果iAP活性小于约10mU/mg、20mU/mg、30mU/mg、40mU/mg、50mU/mg、60mU/mg、70mU/mg、80mU/mg、90mU/mg、100mU/mg、200mU/mg、300mU/mg、400mU/mg、500mU/mg、600mU/mg、700mU/mg、800mU/mg、900mU/mg、1000mU/mg、1050mU/mg、1100mU/mg、1150mU/mg、1200mU/mg、1250mU/mg、1300mU/mg、1350mU/mg100mU/mg、1450mU/mg、1500mU/mg、1600mU/mg、1700mU/mg、1800mU/mg、1900mU/mg;如果iAP活性小于约5U/mg、10U/mg、50U/mg、100U/mg、200U/mg、300U/mg、400U/mg、500U/mg、600U/mg、700U/mg、800U/mg、900U/mg、1000U/mg;如果iAP蛋白的水平大约对照样品的.05%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、125%、150%、175%、200%、225%、250%、275%,或其组合。不受理论的束缚,如本文所述的样品中的总蛋白质浓度可以是粪便样品的,其中对于缓冲液的鲜重设定为1g/mL。否则,技术人员知道可以稀释或浓缩样品以改变蛋白质浓度。

[0023] 在实施方案中,如果样品中的总蛋白质浓度大于约1.8mg/ml,如果iAP活性低于约979mU/mg,如果iAP蛋白质的水平是大于对照样品的10.7%,或其组合,则受试者可被诊断患有GI疾病。在一些实施方案中,如果样品中的总蛋白质浓度大于约1.6mg/ml,如果iAP活性低于约1256mU/mg,如果iAP蛋白质的水平是大于对照样品的4.8%,或其组合,则受试者可被诊断患有GI疾病。

[0024] 本发明提供了一种诊断受试者的胃肠(GI)疾病的方法,包括从受试者获得样品,检测样品中至少一种GI疾病生物标志物的存在,其中GI疾病生物标志物可以包括肠碱性磷酸酶(iAP)蛋白质,将GI疾病生物标志物谱与从对照样品获得的谱比较,并治疗受试者。在实施方案中,对照样品可以包括两个或更多个对照样品。

[0025] 本发明进一步提供了一种在有需要的受试者中预防胃肠疾病进展的方法,包括从受试者获得样品,检测样品中至少一种GI疾病生物标志物的存在,其中GI疾病生物标志物可以包括肠碱性磷酸酶(iAP)蛋白质,将GI疾病生物标志物谱与从对照样品获得的谱比较,并治疗受试者。在实施方案中,对照样品可以包括两个或更多个对照样品。

[0026] 本发明进一步提供了一种在有需要的受试者中改善与胃肠疾病相关的症状的方法,包括从受试者获得样品,检测样品中至少一种GI疾病生物标志物的存在,其中GI疾病生物标志物可以包括肠碱性磷酸酶(iAP)蛋白质,将GI疾病生物标志物谱与从对照样品获得的谱比较,并治疗受试者。在实施方案中,对照样品可以包括两个或更多个对照样品。

[0027] 在实施方案中,治疗被诊断患有GI疾病的受试者包括施用有效量的抗生素、益生菌、静脉内流体或其组合;停止口服进食;施用iAP替代组合物;消炎药;治疗师;催化活性的小分子活化剂和/或效应物;肠胃外(或静脉内)营养或其组合。

[0028] 可根据本发明使用的治疗剂的非限制性实例包括Toll样受体(TLR)抑制剂(Neal et al.Discovery and validation of a new class of small molecule Toll-like receptor 4(TLR4)inhibitors.PloS One 12,e65779)和eNOS-NO-亚硝酸盐信号传导的中断(Yazji et al.Endothelial TLR4 activation impairs intestinal microcirculatory perfusion in necrotizing enterocolitis via eNOS-NO-nitrite signaling.Proceeedings of the National Academy ofScience USA 110,9451-9456)。

[0029] 具有催化活性的小分子效应物的非限制性实例包括左旋咪唑、茶碱、基于三唑的化合物、磺酰胺衍生物、磷酸酶衍生物、金属和氨基酸(Borgers M.The cytochemical application of new potent inhibitors of alkaline phosphatases.Journal of Histochemistry&Cytochemistry 21,812-824;Klemperer et al.The inhibition of alkaline phosphatase by beryllium.Journal of Biological Chemistry 180,281-288;Bobkova et al.Modulators of intestinal alkaline phosphatase.Methods Mol Biol 1053,135-144;Narisawa et al.Novel inhibitors of alkaline phosphatase suppress vascular smooth muscle cell calcification.Journal of Bone and Mineral Research 22,1700-1710;al-Rashida和Iqbal.Inhibition of alkaline phosphatase:an emerging new drug target.Minireviews in Medicinal Chemistry 15,41-51。

[0030] 此类抗生素的非限制性实例包括万古霉素、氨苄西林、Zosyn(哌拉西林和他唑巴坦的组合)、庆大霉素、Flagyl(甲硝唑仿制药)、美罗培南、甲硝唑、头孢噻肟、克林霉素或其任何组合。在一些实施方案中,可以进一步施用抗真菌剂。在其他实施方案中,抗真菌剂可以是氟康唑、特康唑、伏立康唑、泊沙康唑、喷他脒、伊曲康唑和酮康唑。

[0031] 益生菌生物体的非限制性实例包括乳杆菌属、乳球菌属、双歧杆菌属、片球菌属、布拉氏酵母菌属以及相关细菌和酵母中的那些。

[0032] 此类静脉内流体的非限制性实例包括盐水(例如水中0.9%NaCl或水中0.45%盐水)、乳酸林格氏液(0.9%NaCl与电解质和缓冲液)、D_5W(5%葡萄糖水溶液)、D_5NS(0.9%盐水中的5%葡萄糖)、$D_5$1/2NS(0.45%盐水中的5%葡萄糖)、D_5LR(乳酸林格氏液中的5%葡萄糖)或Normosol-R。在实施方案中,静脉内流体溶液可以是等渗的。在其他实施方案中,静脉内流体溶液可以是低渗的。

[0033] 肠胃外(或静脉内)营养的非限制性实例包括静脉内葡萄糖溶液、静脉内氨基酸溶液、静脉内脂肪乳液、静脉内维生素和矿物质补充剂或其组合。

[0034] 抗炎剂可选自多种甾体、非甾体和水杨酸盐水溶性和水不溶性药物及其酸加成盐或金属盐。可以使用有机盐和无机盐,前提是抗炎剂保持其药用价值。抗炎剂可选自范围广泛的治疗剂和治疗剂的混合物,它们可以以持续释放或延长作用的形式施用。抗炎剂的非限制性实例包括布洛芬、萘普生、舒林酸、二氟尼柳、吡罗昔康、消炎痛、依托度酸、甲氯芬酸钠、非诺洛本钙、酮洛芬、甲芬那酸、萘普生、酮咯酸氨丁三醇、双氯芬酸和月见草油(含有约72%的亚油酸和约9%的γ亚油酸)。水杨酸盐抗炎剂的非限制性实例包括乙酰水杨酸、美

沙拉嗪、双水杨酸酯、二氟尼柳、水杨基水杨酸和三水杨酸胆碱镁。甾体抗炎剂的非限制性实例包括氟尼缩松、曲安西林、曲安奈德、二丙酸倍氯米松、二丙酸倍他米松、氢化可的松、可的松、地塞米松、泼尼松、甲基泼尼松龙和泼尼松龙。

[0035] 在实施方案中,胃肠疾病可包括结肠炎、炎性肠病(IBD)或其组合。在实施方案中,结肠炎可包括坏死性小肠结肠炎(NEC)、成人坏死性小肠结肠炎(ANEC)、假膜性小肠结肠炎、感染性结肠炎、溃疡性结肠炎、克罗恩病、缺血性结肠炎和放射性结肠炎。

[0036] 在实施方案中,样品可以包括从受试者获得的生物样品。例如,生物样品可以是生物流体、生物固体或生物半固体。在实施方案中,样品可包括粪便、胎粪、呕吐物、外周血、血清、血浆或尿液。

[0037] 在实施方案中,GI疾病生物标志物可包括iAP酶活性、AP酶活性、iAP蛋白水平、iAP二聚化/解离、翻译后修饰的iAP、总蛋白,例如总粪便蛋白,或其组合。在实施方案中,翻译后修饰可包括乙酰化、酰化、烷基化、酰胺化、丁酰化、脱酰胺化、甲酰化、糖基磷脂酰肌醇化(glypiation)、糖基化、羟基化、碘化、ISG化、脂酰化、丙二酰化、甲基化、肉豆蔻酰化、棕榈酰化、磷酸化、phosphopantetheinylation、异戊烯化、丙酰化、核糖基化、琥珀酰化、硫酸化、SUMO化或泛素化。

[0038] 在实施方案中,GI疾病生物标志物可包括NEC生物标志物。

[0039] 在实施方案中,检测可包括免疫测定、比色测定、荧光测定或两者的组合。在实施方案中,免疫测定可包括蛋白质印迹测定、酶联免疫吸附测定(ELISA)、免疫沉淀、飞升室阵列中的单分子免疫测定、单一和多重形式的数字酶测定或其组合。在实施方案中,检测包括将样品与抗iAP抗体接触。在实施方案中,抗iAP抗体是多克隆或单克隆抗体。在实施方案中,检测可包括动力学测定、终点测定、布拉德福德测定、二辛可宁酸(BCA)测定、Lowry测定、连苯三酚红蛋白染料结合测定、考马斯蓝染料结合测定或其组合。

[0040] 在其他实施方案中,检测可包括本领域技术人员已知的技术,例如质谱(MS)、RNA测序和患者样品的免疫染色。例如,肠道碱性磷酸酶或其他碱性磷酸酶的RNA测序是检测iAP等分子的快速方法(Knight et al.Non-invasive analysis of intestinal development in preterm and terminfants using RNA-sequencing.2014.Scientific Reports 4,5453)。

[0041] 在实施方案中,该测定可以检测磷酸酶活性。此类测定的非限制性实例包括荧光、化学发光或比色检测方法,检测ATP水解和/或ATP水解产物的测定,或其组合。

[0042] 在实施方案中,检测可包括动力学测定,该测定包括使用4-甲基伞形酮磷酸酯、CPD Star(2-氯-5-(4-甲氧基螺[1,2-二氧杂环丁烷-3,2'-(5-氯三环[3.3.1.1$^{3.7}$]癸烷])-4-基]-1-苯基磷酸二钠)、AttosPho(2'-[2-苯并噻唑基]-6'-羟基苯并噻唑磷酸盐[BBTP])或任何其他荧光或比色信号,检测ATP水解和/或ATP水解产物(例如孔雀石绿、NADH耦合的或其他专有变体)的测定法,或其组合。

[0043] 在实施方案中,碱性磷酸酶活性,例如肠碱性磷酸酶活性,可以通过将碱性磷酸酶的显色底物和/或荧光底物例如iAP与生物样品混合一段时间直接检测和/或测量。例如,4-甲基伞形酮磷酸酯(MUP)是碱性磷酸酶的荧光底物,并且碱性磷酸酶介导的其磷酸取代基的水解产生蓝色荧光4-甲基伞形酮(激发/发射~386/448nm)。在实施方案中,MUP可以直接与生物样品例如粪便混合,从而允许直接检测碱性磷酸酶的存在或其活性的测量。

[0044] 碱性磷酸酶(AP)底物的非限制性实例包括AP-蓝底物(蓝色沉淀物,Zymed目录p.61);AP-橙底物(橙色,沉淀物,Zymed),AP-红底物(红色,红色沉淀物,Zymed),5-溴,4-氯,3-吲哚磷酸盐(BCIP底物,绿松石沉淀物),5-溴,4-氯,3-吲哚磷酸盐/硝基蓝四唑/碘硝基四唑(BCIP/INT底物,黄褐色沉淀物,Biomeda),5-溴,4-氯,3-吲哚磷酸盐/硝基蓝四唑(BCIP/NBT底物,蓝色/紫色),5-溴,4-氯,3-吲哚磷酸盐/硝基蓝四唑/碘硝基四唑(BCIP/NBT/INT,棕色沉淀物,DAKO,坚牢红(红色),品红色磷(品红色),萘酚AS-双磷酸盐(NABP)/坚牢红TR(红色),萘酚AS-BI-磷酸盐(NABP)/New Fuchsin(红色),萘酚AS-MX-磷酸盐(NAMP)/New Fuchsin(红色),New Fuchsin AP底物(红色),p-磷酸硝基苯酯(PNPP,黄色,水溶性),VECTOR™黑(黑色),VECTOR™蓝(蓝色),VECTOR™红(红色),Vega Red(覆盆子红色),荧光素二乙酸酯,4-甲基伞形酮基乙酸酯,4-甲基伞形酮基酪蛋白,4-甲基伞形酮基-α-L-吡喃阿拉伯糖苷,4-甲基伞形酮基-β-D-吡喃岩藻糖苷,4-甲基伞形酮基-α-L-吡喃岩藻糖苷,4-甲基伞形酮基-β-L-吡喃岩藻糖苷,4-甲基伞形酮基-α-D-吡喃半乳糖苷,4-甲基伞形酮基-β-D-吡喃半乳糖苷,4-甲基伞形酮基-β-D-吡喃半乳糖苷,4-甲基伞形酮基-α-D-吡喃葡萄糖苷,4-甲基伞形酮基-β-D-吡喃葡萄糖苷,4-甲基伞形酮基-β-D-葡糖苷酸,4-甲基伞形酮基壬酸酯,4-甲基伞形酮基油酸酯,4-甲基伞形酮基磷酸酯、双(4-甲基伞形酮基)磷酸酯、4-甲基伞形酮基焦磷酸二酯、4-甲基伞形酮基-β-D-吡喃木糖苷。

[0045] 用于本发明的合适显色底物的非限制性实例包括邻硝基苯基-β-D-吡喃半乳糖苷、对硝基苯基-β-D-吡喃半乳糖苷、邻硝基苯基-β-D-吡喃葡萄糖苷、对硝基苯基-α-D-吡喃葡萄糖苷、对硝基苯基-β-D-吡喃葡萄糖苷、对硝基苯基-β-D-葡糖苷酸、对硝基苯基磷酸酯、邻硝基苯基-β-D-吡喃木糖苷、对硝基苯基-α-D-吡喃木糖苷、对硝基苯基-β-D-吡喃木糖苷和酚酞-β-D-葡糖苷酸。

[0046] 在实施方案中,如本文所述的方法进一步包括如果样品中iAP的蛋白质水平比对照样品的平均蛋白质水平高至少两个标准偏差,则诊断受试者患有胃肠道疾病。在实施方案中,如本文所述的方法进一步包括如果样品中iAP的蛋白质水平比对照样品的平均蛋白质水平高至少1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5个标准偏差,则诊断受试者患有胃肠道疾病。在实施方案中,对照样品可以包括两个或更多个对照样品。实施方案可以包括10mg、20mg、30mg、40mg、50mg、60mg、70mg、80mg、90mg、100mg、125mg、150mg、175mg、200mg、225mg、250mg、275mg或300mg鲜重粪便/mL无菌水或缓冲液。例如,实施方案可包含200mg鲜重粪便/mL无菌水或缓冲液。在实施方案中,如本文所述的方法进一步包括如果样品中iAP的蛋白质水平大于对照样品的4.8%,则诊断受试者患有胃肠道疾病或处于胃肠道疾病风险中。在其他实施方案中,本文所述的方法进一步包括如果样品中iAP的蛋白质水平大于对照样品的107%,则诊断受试者患有胃肠道疾病或处于胃肠道疾病风险中。在实施方案中,本文所述的方法进一步包括如果样品中iAP的蛋白质水平大于对照样品的2.5%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、125%、150%、175%、200%、225%、250%、275%、300%、325%、350%、375%、400%,则诊断受试者患有胃肠道疾病或处于胃肠道疾病风险中。

[0047] 在实施方案中,如本文所述的方法还包括如果样品中的iAP酶活性水平比对照样品的平均iAP酶活性低至少两个标准偏差,则诊断受试者患有胃肠道疾病。在实施方案中,如本文所述的方法进一步包括如果样品中iAP酶活性水平比对照样品的平均酶活性水平高

至少1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5个标准偏差,则诊断受试者患有胃肠道疾病。在实施方案中,对照样品可以包括两个或更多个对照样品。在实施方案中,如本文所述的方法进一步包括如果样品中的iAP酶活性水平低于约10mU/mg、20mU/mg、30mU/mg、40mU/mg、50mU/mg、60mU/mg、70mU/mg、80mU/mg、90mU/mg、100mU/mg、200mU/mg、300mU/mg、400mU/mg、500mU/mg、600mU/mg、700mU/mg、800mU/mg、900mU/mg、1000mU/mg、1100mU/mg、1200mU/mg、1300mU/mg、1400mU/mg、5U/mg、10U/mg、50U/mg、100U/mg、300U/mg、400U/mg、500U/mg、600U/mg、700U/mg、800U/mg、900U/mg、1000U/mg,例如小于979mU/mg或小于1256mU/mg,则诊断受试者患有胃肠疾病或处于胃肠疾病风险中。在实施方案中,如本文所述的方法进一步包括如果样品中的iAP酶活性水平低于1500mU/mg、1000mU/mg、500mU/mg,例如小于1256mU/mg,则诊断受试者患有胃肠疾病或处于胃肠疾病风险中。

[0048] 在实施方案中,如本文所述的方法进一步包括如果样品中粪便蛋白质水平比对照样品的平均粪便蛋白质水平高至少两个标准偏差,则诊断受试者患有胃肠道疾病。在实施方案中,如本文所述的方法进一步包括如果样品中粪便蛋白质水平比对照样品的平均粪便蛋白质水平高至少1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5个标准偏差,则诊断受试者患有胃肠道疾病。在实施方案中,对照样品可以包括两个或更多个对照样品。在实施方案中,如本文所述的方法进一步包括如果样品中的粪便蛋白水平超过1.6mg/ml,或例如超过1.8mg/ml,则诊断受试者患有胃肠疾病或处于患胃肠疾病风险中。在实施方案中,如本文所述的方法进一步包括如果样品中的粪便蛋白水平超过1.0mg/ml、1.1mg/ml、1.2mg/ml、1.3mg/ml、1.4mg/ml、1.5mg/ml、1.6mg/ml、1.7mg/ml、1.8mg/ml、1.9mg/ml、2.0mg/ml、2.1mg/ml、2.2mg/ml、2.3mg/ml、2.4mg/ml、2.5mg/ml、2.6mg/ml、2.7mg/ml、2.8mg/ml、2.9mg/ml、3.0mg/ml、3.1mg/ml、3.2mg/ml、3.3mg/ml、3.4mg/ml、3.5mg/ml、3.6mg/ml、3.7mg/ml、3.8mg/ml、3.9mg/ml、4.0mg/ml、4.1mg/ml、4.2mg/ml、4.3mg/ml、4.4mg/ml、4.5mg/ml、4.6mg/ml、4.7mg/ml、4.8mg/ml、4.9mg/ml、5.0mg/ml,则诊断受试者患有胃肠疾病或有患胃肠疾病的风险。

[0049] 在实施方案中,如本文所述的方法进一步包括治疗受试者。在实施方案中,治疗可包括向诊断出患有胃肠道疾病的受试者施用有效量的抗生素、益生菌、静脉内流体、停止口服进食的步骤、iAP替代组合物、肠胃外(或静脉内)营养或其组合。

[0050] 在实施方案中,受试者可以包括哺乳动物。在实施方案中,哺乳动物可包括狗、猫、马、牛、猪或人。在一些实施方案中,本发明的生物标志物可用于诊断马的绞痛。在实施方案中,人可以包括婴儿。在实施方案中,婴儿可包括早产儿。

[0051] 本发明进一步提供了一种用于筛选受试者(例如有患胃肠疾病风险的受试者或患有无症状胃肠疾病的受试者)中特征的存在的方法,包括从受试者获得样品,测量在样品中的至少一种GI疾病生物标志物,其中GI疾病生物标志物可包含肠碱性磷酸酶(iAP)蛋白,将GI疾病生物标志物谱与从对照或参考样品获得的谱进行比较,并治疗受试者。在实施方案中,对照或参考样品可以包括两个或更多个对照样品。在实施方案中,样品是粪便样品。

[0052] 本发明进一步提供了一种用于鉴定有患胃肠疾病风险的受试者或患有无症状胃肠疾病的受试者的方法,包括从受试者获得样品,测量在样品中的至少一种GI疾病生物标志物,其中GI疾病生物标志物可包含肠碱性磷酸酶(iAP)蛋白,将GI疾病生物标志物谱与从对照样品获得的谱进行比较,并治疗受试者。在实施方案中,对照样品可以包括两个或更多

个对照样品。

[0053] 在实施方案中,胃肠疾病可包括结肠炎、炎性肠病(IBD)或其组合。在实施方案中,结肠炎可包括坏死性小肠结肠炎、成人坏死性小肠结肠炎(ANEC)、假膜性小肠结肠炎、感染性结肠炎、溃疡性结肠炎、克罗恩病、缺血性结肠炎、放射性结肠炎。

[0054] 在实施方案中,样品可以包括从受试者获得的生物样品。例如,生物样品可以是生物流体、生物固体或生物半固体。在实施方案中,样品可包括粪便、胎粪、呕吐物、外周血、血清、血浆或尿液。

[0055] 在实施方案中,GI疾病生物标志物还可包含iAP酶活性、总粪便蛋白、iAP二聚化/解离、翻译后修饰的iAP或其组合。在实施方案中,翻译后修饰可包括乙酰化、酰化、烷基化、酰胺化、丁酰化、脱酰胺化、甲酰化、糖基磷脂酰肌醇化(glypiation)、糖基化、羟基化、碘化、ISG化、脂酰化、丙二酰化、甲基化、肉豆蔻酰化、棕榈酰化、磷酸化、phosphopantetheinylation、异戊烯化、丙酰化、核糖基化、琥珀酰化、硫酸化、SUMO化或泛素化。

[0056] 在实施方案中,测量可包括进行测定以确定样品中的总蛋白质浓度、肠碱性磷酸酶活性、肠碱性磷酸酶蛋白质浓度或其组合。在实施方案中,测量可包括布拉德福德测定、二辛可宁酸(BCA)测定、Lowry测定、连苯三酚红蛋白染料结合测定、考马斯蓝染料结合测定或其组合。在实施方案中,测量可包括动力学测定。在实施方案中,动力学测定可包括使用4-甲基伞形酮基磷酸酯、磷酸硝基苯酯或任何其他荧光或比色信号、检测ATP水解的测定、或其组合。在实施方案中,测量可包括免疫测定、比色测定、荧光测定或两者的组合。

[0057] 在实施方案中,免疫测定可包括蛋白质印迹测定、酶联免疫吸附测定、免疫沉淀或其组合。在实施方案中,测定可以包括抗iAP抗体。在实施方案中,抗iAP抗体是单克隆或多克隆抗体。

[0058] 在实施方案中,本文公开的方法可以进一步包括当样品中的总蛋白质浓度比对照样品的平均值高至少两个标准偏差、肠碱性磷酸酶蛋白质的浓度比对照样品的平均值高至少两个标准偏差、肠碱性磷酸酶活性对照样品的平均值低至少两个标准偏差、或其组合时,诊断受试者患有胃肠道疾病。在实施方案中,本文公开的方法可以进一步包括当样品中的总蛋白质浓度比对照样品的平均值高至少1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5个标准偏差、肠碱性磷酸酶蛋白质的浓度比对照样品的平均值高至少1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5个标准偏差、肠碱性磷酸酶活性对照样品的平均值低至少1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5个标准偏差、或其组合时,诊断受试者患有胃肠道疾病。在实施方案中,对照样品可以包括两个或更多个对照样品。

[0059] 在实施方案中,本文公开的方法可进一步包括治疗受试者。在实施方案中,治疗可包括向诊断出患有胃肠道疾病的受试者施用有效量的抗生素、益生菌、静脉内流体、停止经口进食、iAP替代组合物、抗炎剂、潜在治疗剂、肠胃外(或静脉内)营养,或其组合。

[0060] 在实施方案中,如果粪便样品中的蛋白质浓度大于约1.0mg/ml、1.1mg/ml、1.2mg/ml、1.3mg/ml、1.4mg/ml、1.5mg/ml、1.6mg/ml、1.7mg/ml、1.8mg/ml、1.9mg/ml、2.0mg/ml、2.1mg/ml、2.2mg/ml、2.3mg/ml、2.4mg/ml、2.5mg/ml、2.6mg/ml、2.7mg/ml、2.8mg/ml、2.9mg/ml、3.0mg/ml、3.1mg/ml、3.2mg/ml、3.3mg/ml、3.4mg/ml、3.5mg/ml、3.6mg/ml、3.7mg/ml、3.8mg/ml、3.9mg/ml、4.0mg/ml、4.1mg/ml、4.2mg/ml、4.3mg/ml、4.4mg/ml、

4.5mg/ml、4.6mg/ml、4.7mg/ml、4.8mg/ml、4.9mg/ml、5.0mg/ml,例如1.6mg/ml或例如1.8mg/ml,则受试者可以被诊断患有胃肠疾病或有患胃肠疾病的风险。在实施方案中,如果iAP活性低于约10mU/mg、20mU/mg、30mU/mg、40mU/mg、50mU/mg、60mU/mg、70mU/mg、80mU/mg、90mU/mg、100mU/mg、200mU/mg、300mU/mg、400mU/mg、500mU/mg、600mU/mg、700mU/mg、800mU/mg、900mU/mg、1000mU/mg、1100mU/mg、1200mU/mg、1300mU/mg、1400mU/mg、5U/mg、10U/mg、50U/mg、100U/mg、200U/mg、300U/mg、400U/mg、500U/mg、600U/mg、700U/mg、800U/mg、900U/mg、1000U/mg,例如972mU/mg,或例如1256mU/mg,则受试者可以被诊断患有胃肠疾病或有患胃肠疾病的风险。在实施方案中,如果通过密度测定抗iAP抗体检测iAP蛋白超过对照的4.8%,则受试者可以被诊断患有胃肠疾病或有患胃肠疾病的风险。在实施方案中,如果iAP蛋白的水平比对照样品的平均值高至少两个标准差,则可以诊断受试者患有胃肠道疾病。在实施方案中,对照样品可以包括两个或更多个对照样品。在实施方案中,受试者可以包括哺乳动物。在实施方案中,哺乳动物可包括狗、猫、马、牛或人。在实施方案中,人可以包括婴儿。在实施方案中,婴儿可包括早产儿。

[0061] 本发明还提供一种一次性物品,该一次性物品包括生物传感器,其中该生物传感器可以包括至少一个生物识别元件,并且其中该生物传感器检测样品中的iAP。

[0062] 在实施方案中,生物传感器进一步检测iAP酶活性、总粪便蛋白、iAP二聚化/解离、翻译后修饰的iAP或其组合。在实施方案中,翻译后修饰可包括乙酰化、酰化、烷基化、酰胺化、丁酰化、脱酰胺化、甲酰化、糖基磷脂酰肌醇化(glypiation)、糖基化、羟基化、碘化、ISG化、脂酰化、丙二酰化、甲基化、肉豆蔻酰化、棕榈酰化、磷酸化、phosphopantetheinylation、异戊烯化、丙酰化、核糖基化、琥珀酰化、硫酸化、SUMO化或泛素化。

[0063] 在实施方案中,样品可以包括从受试者获得的生物样品。例如,生物样品可以是生物流体、生物固体或生物半固体。在实施方案中,样品可包括粪便、胎粪、呕吐物、外周血、血清、血浆或尿液。

[0064] 在实施方案中,生物传感器是免疫传感器。在实施方案中,生物传感器可包括检测信号。在实施方案中,检测信号可包括比色信号、荧光信号或两者。在实施方案中,生物识别元件可包含抗iAP抗体。在实施方案中,抗iAP抗体可包括多克隆或单克隆抗体。

[0065] 在示例性实施方案中,生物传感器可以包括侧流免疫测定,也称为免疫层析测定或条带测试。侧流免疫测定包括适于沿单轴操作以适应测试条格式的免疫测定。典型的侧流测试条包括样品垫(将测试样品施加到其上的吸附垫)、偶联物或试剂垫(这包含针对目标分析物偶联物的结合剂,例如抗体,其结合着色颗粒,例如胶体金纳米颗粒或乳胶微球)、反应膜(通常是硝酸纤维素膜或醋酸纤维素膜,在其上将抗目标分析物结合剂如抗体固定在一条穿过膜的线中,以用作捕获区或测试线。还将存在控制区,其包含对偶联物抗体具有特异性的抗体)和芯或废物储器(另一个吸收垫,其旨在通过毛细作用将样品抽过反应膜并将它收集)。条带的组件通常固定在惰性背衬材料上,可以以简单的浸量尺形式或在塑料外壳内提供,其样品端口和反应窗口显示捕获区和控制区。

[0066] 在实施方案中,制品可包括由受试者穿着的尿布、用于清洁受试者的擦拭物、浸量尺、勺子、小铲勺、滤纸或拭子。

[0067] 在实施方案中,受试者可以包括哺乳动物。在实施方案中,哺乳动物可包括狗、猫、

马、牛或人。在实施方案中,人可以包括婴儿。在实施方案中,婴儿可包括早产儿。

[0068] 本发明进一步提供用于诊断患有胃肠疾病的受试者的试剂盒。在实施方案中,试剂盒可包括如本文所述的一次性物品。在实施方案中,胃肠疾病可包括结肠炎、炎性肠病(IBD)或其组合。在实施方案中,结肠炎可包括坏死性小肠结肠炎、成人坏死性小肠结肠炎(ANEC)、假膜性小肠结肠炎、感染性结肠炎、溃疡性结肠炎、克罗恩病、缺血性结肠炎、放射性结肠炎。

[0069] 在实施方案中,该试剂盒可包含固定于固体支持物的iAP生物识别元件及其使用说明书。

[0070] 在实施方案中,胃肠疾病可包括结肠炎、炎性肠病或其组合。在实施方案中,结肠炎可包括坏死性小肠结肠炎、成人坏死性小肠结肠炎(ANEC)、假膜性小肠结肠炎、感染性结肠炎、溃疡性结肠炎、克罗恩病、缺血性结肠炎、放射性结肠炎。

[0071] 在实施方案中,生物识别元件可包含针对iAP的抗体或针对iAP的寡核苷酸,例如,其直接或间接固定至固相支持物。实施方案还可包含对附着于固体支持物的iAP具有高结合亲和力的荧光底物或抑制剂。

[0072] 在实施方案中,固体支持物可包括塑料、纸板或玻璃。在实施方案中,固体支持物可以包括浸量尺。

[0073] 在实施方案中,受试者可以包括哺乳动物。在实施方案中,哺乳动物可包括狗、猫、马、牛或人。在实施方案中,人可以包括婴儿。在实施方案中,婴儿可包括早产儿。

[0074] 本发明还提供了一种分子生物标志物的诊断试剂盒,用于鉴定表现出或具有发展胃肠疾病的倾向的受试者。在实施方案中,该试剂盒可以包括用于确定总粪便蛋白浓度的工具、用于确定肠碱性磷酸酶(iAP)活性的工具和iAP生物识别元件中的至少一种,其中一起代表指示人类受试者中胃肠道疾病的存在或发展的倾向。在实施方案中,胃肠疾病可包括结肠炎、炎性肠病(IBD)或其组合。在实施方案中,结肠炎可包括坏死性小肠结肠炎、成人坏死性小肠结肠炎(ANEC)、假膜性小肠结肠炎、感染性结肠炎、溃疡性结肠炎、克罗恩病、缺血性结肠炎、放射性结肠炎。

[0075] 在实施方案中,特征可以包括比对照样品的平均值高至少两个标准偏差的总蛋白质浓度、比对照样品的平均值高至少两个标准偏差的肠碱性磷酸酶蛋白浓度、或比对照样品的平均值低至少两个标准偏差的肠碱性磷酸酶活性。在实施方案中,对照样品可以包括两个或更多个对照样品。

[0076] 在实施方案中,特征可以选自包括比对照样品的平均值高至少两个标准偏差的总蛋白质浓度、比对照样品的平均值高至少两个标准偏差的肠碱性磷酸酶蛋白浓度和比对照样品的平均值低至少两个标准偏差的肠碱性磷酸酶活性的组中的至少两项。在实施方案中,对照样品可以包括两个或更多个对照样品。

[0077] 在实施方案中,受试者可以包括哺乳动物。在实施方案中,哺乳动物可包括狗、猫、马、牛或人。在实施方案中,人可以包括婴儿。在实施方案中,婴儿可包括早产儿。

[0078] 本发明的方面还涉及通过改变进食方案来治疗患有NEC的受试者。在一个实施方案中,本发明提供了一种治疗患有NEC的受试者的方法。在一些实施方案中,该方法包括在根据本文所述的方法从受试者获得的样品中测量结合iAP的试剂的量或活性,其中结合iAP的试剂是至少一种GI疾病生物标志物,其包含iAP酶活性、AP酶活性、iAP蛋白水平、AP蛋白

水平、iAP二聚化/解离、翻译后修饰的iAP、总粪便蛋白或其组合;确定受试者的产后发育年龄;并在足以解决胃肠道炎症过程或进食不耐受迹象的一段时间内停止肠内进食。在一些实施方案中,该方法进一步包括单独或组合施用抗生素或抗真菌剂。在一些实施方案中,该方法进一步包括单独或以其组合施用益生菌、其他生物制品(例如干细胞或转录因子)或治疗剂(例如TLR4小分子、碱性磷酸酶抑制剂或激活剂)、抗生素、静脉内流体、iAP替代组合物(例如外源性提供)、小分子活化剂和/或催化活性效应物、抗炎剂、肠胃外(或静脉内)营养。在一些实施方案中,受试者的产后发育年龄可以是‘月经后年龄’或‘月经后发育年龄’。

[0079] 例如,可以暂停口服进食1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、22天、23天、24天、25天、26天、27天、28天、29天或30天。

[0080] 生物制品的非限制性实例包括干细胞和转录因子。小肠上皮处于恒定的动态流动状态,每3-6天更换一次。这种持续更新对于维持正常的肠道结构和功能是必要的。此外,转录因子的非限制性实例包括那些可以表达并用于肠细胞分化的转录因子,例如Kruppel样因子(GKLF或KLF4)家族。

[0081] 在实施方案中,进食方案可包括间歇进食方案。例如,在暂停经口进食的延长期间,可以有一天或多天的进食。例如,可以暂停进食约2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、22天、23天、24天、25天、26天、27天、28天、29天或30天,在此期间可有一天或多天的口服进食。例如,医生可能怀疑NEC并在短时间内暂停进食,例如一天或两天,直到实验室测试/检查表明婴儿没有NEC,届时他们会再次恢复进食。数小时或数天后,可再次出现NEC恐慌,并且在一段时间内再次禁止婴儿进食。在受试者住院期间,间歇性进食可以发生一次或多次。这种间歇性进食可以允许临床医生确定受试者对进食的耐受性。在其他实施方案中,可以为有患胃肠道疾病风险的受试者推荐间歇进食。本发明的其他目的和优点将从随后的描述中变得显而易见。

[0082] 本文包括如下实施方案:

[0083] 1.一种确定患者坏死性小肠结肠炎(NEC)预后的方法,所述方法包括:

[0084] a.使用双状态转换矩阵和在多个受试者之间测量的倾向值拟合马尔可夫模型,其中所述双状态转换矩阵包括第一状态和第二状态,其中第一状态包括非坏死性小肠结肠炎状态,其中第二状态包括坏死性小肠结肠炎状态(NEC),其中倾向值是在所述多个受试者中的受试者中发现的肠碱性磷酸酶(iAP)活性值和iAP量的函数;

[0085] b.使用患者的倾向值和拟合的马尔可夫模型估计从第一状态转换到第二状态的概率,其中拟合的模型指示患者的倾向水平的增加显著增加从第一状态转换到第二个状态的概率;

[0086] c.当所述倾向值大于或等于约0.5的阈值时治疗所述患者。

[0087] 2.根据实施方案1所述的方法,其中倾向值包括第一值和第二值的乘积,其中第一值包括一(1)减去第一比率,其中第一比率包括所述多个受试者中的受试者的iAP活性值除以在所述多个受试者中观察到的最大iAP活性值,其中第二值包括第二比率,其中第二比率包括来自所述多个受试者的受试者的免疫测定值的iAP量除以来自在样品中观察到的免疫测定值的最大iAP量。

[0088] 3.根据实施方案1所述的方法,其中倾向值包括第一值和第二值的乘积,其中第一

值包括一(1)减去所述多个受试者中的受试者的iAP活性值,其中第二值包括来自所述多个受试者中的受试者的免疫测定值的iAP量。

[0089] 4.根据实施方案1所述的方法,其中所述多个受试者包括所述患者。

[0090] 5.根据实施方案1所述的方法,其中治疗包括停止进食、施用抗生素或其组合。

[0091] 6.根据实施方案2所述的方法,其中所述样品是人小肠裂解物。

[0092] 7.根据实施方案2或3所述的方法,其中所述免疫测定包括蛋白质印迹、ELISA或免疫沉淀。

附图说明

[0093] 专利或申请文件至少包含一张彩色绘图。本专利或专利申请出版物的带有彩色附图的副本将在请求和支付必要费用后由专利局提供。

[0094] 图1显示了对两个早产儿的总粪便蛋白、iAP酶活性和iAP蛋白的免疫印迹检测的纵向测量。(小图A)患者1出生于妊娠30周,出生后第7天出现NEC,接受药物治疗,随后在出生后第31天出现复发性NEC和肠穿孔。婴儿在放置腹腔引流管和额外10天的肠道休息和抗生素后康复。红色符号和柱代表NEC事件。7A和7B指的是在生命第7天收集的2份单独的粪便样品,一份在NEC诊断之前和一份在之后。(小图B)患者2出生于妊娠25周,在DOL 19出现腹胀,怀疑NEC(绿色符号和柱)。婴儿对医疗管理反应迅速,很快恢复了肠内进食。患者在DOL 32上出现明确的NEC(红色符号和柱),需要辅助通气和积极的医疗管理,但在DOL 48时完全康复。每个图下方的表格说明了哪些粪便检测符合NEC标准(+),哪些不符合(-)。这些标准由对照值的95%置信区间之外的值定义。如果出现以下情况,则认为NEC风险增加:蛋白质浓度超过1.8mg/ml;iAP活性小于979mU/mg;或通过蛋白质印迹检测iAP蛋白超过对照的10.7%。缩写:ip,肠穿孔;ad,腹胀;MW,分子量阶梯;和kDa,千道尔顿。

[0095] 图2显示了在NEC诊断时总粪便蛋白浓度增加、粪便iAP酶活性降低以及蛋白质印迹上iAP检测增加。在以下小图中,红色圆圈代表在6名患者的7次不同NEC事件期间收集的个体粪便样品;黑色圆圈代表来自12名对照患者的2-17个粪便样品的复合平均值±标准误差。红色和灰色柱分别代表在NEC事件中收集的所有样品和来自对照受试者的所有样品的平均值±标准误差。(小图A)与对照样品相比,NEC诊断时患者粪便样品中的蛋白质浓度更高(p值=0.005)。(小图B)NEC诊断时患者粪便样品中的iAP活性低于对照样品(p值<0.0001)。(小图C)通过与阳性对照标准比较量化的粪便中iAP蛋白的量,与对照样品相比,在NEC诊断时的患者中更高(p值=0.002)。统计检验:Mann-Whitney。

[0096] 图3显示粪便iAP相关测量具有高特异性和敏感性。(小图A)我们的候选生物标志物测量值的3维散点图,其中红色菱形代表NEC样品,黑色圆圈代表对照。(小图B)3维散点图的2维投影,其专门与iAP活性和蛋白质印迹强度测量相关。(小图C)每个候选生物标志物的敏感性和特异性曲线,以及同时考虑所有3个特征的组合朴素贝叶斯分类器的敏感性和特异性曲线。分析涵盖49个样品,其中13个NEC样品、9个NEC患者来源的对照样品和27个对照患者来源的对照样品。蛋白质印迹强度和总蛋白含量比较的Spearman相关系数为0.19,总蛋白含量和iAP活性的Spearman相关系数为-0.48,iAP活性和蛋白质印迹强度的Spearman相关系数为-0.58。

[0097] 图4显示了研究受试者的人口统计信息。显示了胎龄和出生体重的平均值和标准

偏差。还报告了胎龄、性别和贝尔分期的分布。

[0098] 图5显示碱性磷酸酶活性主要是由于肠碱性磷酸酶(iAP)。L-Phe是一种肠道碱性磷酸酶活性的特异性抑制剂,其抑制活性。NEC样品和对照样品之间的抑制程度没有可观察到的差异。NEC样品显示90％抑制,标准偏差为+/-10。对照样品显示91％的抑制,标准偏差为+/-9。这代表来自6名NEC患者的12个样品和来自对照患者(n＝18)的64个样品。

[0099] 图6显示了研究中患者登记的人口统计学。

[0100] 图7显示与对照样品相比,在NEC诊断时来自患者的粪便样品中的iAP活性较低。红色圆圈代表6名患者(后孕周数:29-43周)的7次不同NEC事件期间的iAP活性。每个黑色圆圈代表来自12个对照(后孕周数29-45周)中每一个的2-8个粪便样品的复合平均值+/-SEM。统计显著性分析:Mann-Whitney检验,P<0.0001。

[0101] 图8显示与对照样品相比,在NEC诊断时来自患者的粪便样品中的总粪便蛋白更高。红色圆圈代表6名患者(后孕周数:29-43周)的7次不同NEC事件期间的总粪便蛋白水平。每个黑色圆圈代表来自12个对照(后孕周数:29-45周)的2-16个粪便样品的复合平均值＝/-SEM。统计分析:Mann-Whitney检验,P＝0.005

[0102] 图9显示与对照样品相比,在来自NEC诊断时的患者的粪便样品中量化为阳性对照信号的百分比的iAP蛋白信号的强度高得多。红色圆圈代表6名患者(后孕周数:29-43)的7次不同NEC事件期间iAP蛋白信号的强度。每个黑色圆圈代表来自7个对照(孕后周数29-35周)的至少1个粪便样品。统计分析:Mann-Whitney检验,P＝0.002

[0103] 图10显示在NEC诊断时粪便iAP酶活性降低、粪便总蛋白增加和WB的iAP检测增加。(小图A)说明了随后发生穿孔的NEC患者的iAP活性、总粪便蛋白和iAP酶活性的纵向测量。红点和柱代表NEC事件。与诊断时间相对应的粪便iAP活性急剧下降,表明粪便iAP活性可作为NEC的诊断工具。在蛋白质印迹上出现了强烈的iAP蛋白检测。患者完成了14天的治疗,但在生命第31天出现肠穿孔(ip)。在肠道休息额外10天后,抗iAP抗体不再强烈检测iAP,并且iAP活性呈升高趋势。(小图B)在第二位患者的NEC诊断时,同样观察到粪便iAP活性降低和iAP量增加。绿点代表血便发作,对应于疑似NEC伴肠胀(bd)。在NEC监测期间出现了iAP检测,其直到生命第32天NEC诊断才变得明显。再次注意到围绕NEC诊断(红点和柱)的活动下降,并且在恢复后趋向于更高的活性和WB上iAP检测减少。(小图C)NEC与低粪便iAP活性、高粪便蛋白和高粪便iAP量有关(在WB上)。在NEC诊断时来自3名NEC患者的三个样品(标记为N,红色柱)与来自具有相似胎龄和实际年龄的3个对照受试者(标记为C,白色柱)的3个样品相匹配。第3组的差异不那么显著,可能代表了患有进食不耐受的早产儿的亚临床疾病。(小图D)该图代表了诊断前(标记为pre,白色柱)和诊断时(标记为d,红色柱)在具有相应的iAP酶活性、总粪便蛋白和蛋白质印迹上的iAP检测的4名NEC患者中的顺序粪便取样。

[0104] 图11显示,组合所有3种生物标志物在敏感性和特异性方面具有可能的临床效用和改进。图代表来自6名NEC患者和7名对照的数据点,总共包括51个样品。(小图A)显示了比较WB数据、粪便iAP活性和粪便蛋白的3D散点图。红色菱形代表诊断时来自NEC患者的粪便样品的平均总粪便蛋白、iAP活性和WB百分比。黑色圆圈代表对照点(包括无病期的NEC患者)的平均总粪便蛋白、iAP活性和WB百分比。(小图B)代表2D散点图,显示粪便iAP活性和WB百分比之间的关系。在较低的WB百分比和高活性趋势中存在对照样品的聚类(黑色圆圈)。NEC样品证明了相反的情况,即具有更高的WB百分比和低活性。(小图C)说明朴素贝叶斯分

类器的示意图,用于证明所有三种生物标志物单独和组合的敏感性和特异性,以提高性能。

[0105] 图12显示在那些良好耐受进食并且迅速进展到完全进食而没有问题的婴儿中,存在朝向较低粪便蛋白(小图A)和较高粪便iAP酶活性(小图B)的可识别趋势。图表表示在生命的第一个月期间来自10名对照患者的粪便中的平均总粪便蛋白和粪便iAP活性与实现完全肠内进食之前的持续时间相关。

[0106] 图13显示粪便样品可以是异质的。来自NEC患者的粪便样品中有两个可识别的稠度区室。将粪便区室分开,并对每个区室分别进行蛋白质印迹分析,结果不同。

[0107] 图14显示了相对iAP含量(小图A)、iAP活性(小图B)和蛋白质浓度(小图C)。NEC根据Bell等人的标准进行分类,并由Walsh和Kliegman修改。对于此分析,术语'疑似NEC'是I期,'已证实NEC'是II期和更严重的阶段;术语'穿孔NEC'仅用于描述IIIB期。来自图表审查的信息用于诊断I期。II期的放射学确定需要肠道充气的记录。

[0108] 图15显示了肠组织的免疫组织化学染色。

[0109] 图16显示了iAP的许多功能的示意图。

[0110] 图17显示NEC患者的粪便总蛋白含量高于对照婴儿。

[0111] 图18显示在NEC群体中粪便AP催化活性一致地较低。

[0112] 图19显示在匹配的患者样品中,在NEC诊断时AP酶活性总是较低。

[0113] 图20显示检测到与NEC相关的高水平iAP蛋白。

[0114] 图21显示了在NEC发作中粪便iAP蛋白水平增加。

[0115] 图22显示了在NEC发作中增加的iAP蛋白水平和减少的iAP酶活性。

[0116] 图23显示了用于测试二抗的非特异性结合的示意图。不受理论束缚,酶测定可以仅用与AP缀合的二抗进行。

[0117] 图24显示了将符合X射线和NEC怀疑(由新生儿学家定义)与对照相匹配的NEC诊断与对照分开的临床数据,证明生物标志物可以更早地在分子上定义NEC。

[0118] 图25是柱状图,显示碱性磷酸酶的测量可能被来自二抗的信号混淆。分离的碱性磷酸酶可以催化水解MUP,形成荧光产物MU。来自两个不同商业制造商的与AP结合的二抗也可以水解MUP以形成荧光产品。当碱性磷酸酶蛋白和二抗在同一测量中时,观察到催化活性水平增加。这可以通过生化活性的标准分光光度读数和蛋白质印迹来监测。

[0119] 图26显示了非NEC到NEC转换和NEC到非NEC转换的风险。

[0120] 图27示出了转换模型的示意图。

[0121] 图28显示了早产儿粪便中发现的肠道碱性磷酸酶的丰度和催化能力的双变量分析。在疾病时采样的生物样品以彩色圆圈显示;疑似坏死性小肠结肠炎为粉红色,严重坏死性小肠结肠炎为红色,迟发性败血症为蓝色。互补对照组显示为空心灰色圆圈。

[0122] 图29显示了在早产儿粪便中发现的肠碱性磷酸酶相对于诊断的放射照相临床证据的分析。相对于人类小肠裂解物,婴儿粪便样品中iAP的丰度显示在左小图中。在临床确定疾病时采样的生物样品(垂直蓝条)以彩色圆圈显示;从患有NEC的婴儿中收集的患病前和患病后样品以空心红色菱形显示;从非NEC患者收集的样品以灰色显示。将iAP的归一化iAP丰度和归一化iAP催化活性相乘以产生倾向分数(NECPredict),这些分数显示在右小图上。箱线图显示了临床诊断时NECPredict的中值(x轴第零天上的红色框),以及在放射学确定疾病之前二、四和六天的该值。还显示了从非NEC婴儿样品中获得的NECPredict值的箱线

图。Whisker方法是相邻的数据点,四分位数方法是Tukey。

[0123] 图30显示(小图A)NEC、败血症和肠道防御机制之间的关系。微生物群在肠腔和粘膜中创造了独特的生态系统。各种共生和致病的粘膜微生物群调节婴儿宿主的肠道免疫功能。微生物群对先天性和适应性免疫系统的激活反过来调节全身免疫反应。在败血症中,远端器官的免疫反应由于极端信号而被触发。宿主蛋白iAP(绿色)、TLR4和IL-8(蓝色)是参与炎症早期和晚期微生物群反应的蛋白质。(小图B)早产儿护理标准需要新方法来监测NEC疾病。诊断的黄金标准是x射线(蓝框),仅能识别44%的晚期NEC病例;其他诊断方法(浅蓝色框)是床边可观察状态,但不是分子定义。NEC中当前的管理选择(白色框)与使用提议的生物标志物(绿色)的潜在临床结果(红色框)形成对比。

[0124] 图31显示了在粪便样品中测量的iAP蛋白的量及其催化活性。(小图A)免疫印迹分析表明,如果校准物≤1μg,则在人小肠裂解物的连续稀释中检测到的相对iAP含量具有线性关系。免疫印迹条带在黑色背景下呈白色。叠加了信号与校准物的对数图;显示了5次重复的平均值和SEM。(小图B)显示了无疾病(白色)、诊断有NEC(红色)、疑似有NEC(粉色)和诊断有败血症(蓝色)的样品的iAP含量的平均值±SEM。使用人肠道作为线性范围内的最大阳性对照(100%iAP含量)和小牛iAP作为阴性对照(0%iAP含量)确定每个样品中iAP的定量。星号表示使用Mann-Whitney U检验,p值<0.001以及疾病状态与对照的中位数之间的显著差异。使用简单的基于阈值的分类器,通过NEC诊断(小图C)和败血症(小图D)的敏感性/特异性计算评估免疫印迹功效。(小图E)粪便iAP活性与受孕后年龄(PCA)之间存在直接相关性。显示的是由PCA分箱的平均值和标准误差。每个对照PCA箱N=14-33个样品。(小图F)显示了无疾病(白色)、诊断有NEC(红色)、疑似有NEC(粉色)和诊断有败血症(蓝色)的样品的酶活性的平均值±SEM。星号表示p值<0.05。在NEC诊断(小图G)和败血症(小图H)时评估样品的iAP活性生物标志物的敏感性/特异性。

[0125] 图32显示了考虑样品大小合理性的刺激方案。

[0126] 图33显示了不同效果大小的功效分析结果。

[0127] 图34显示了可用作质谱定量校准物的iAP肽。(小图A)人碱性磷酸酶的氨基酸序列比对:肠道碱性磷酸酶(iAP;P09923)、胎盘样碱性磷酸酶(PLAP;P05187)、组织非特异性碱性磷酸酶(TNAP;P05186)和生殖细胞碱性磷酸酶(GCAP);P10696)。框P1-P6具有6个肽,其具有独特的质谱特征,可区分四种人AP蛋白。(小图B)人类群体中错义、单核苷酸多态性目录的等位基因频率。(小图C)适用于蛋白质丰度的质谱定量的六种iAP肽的序列,和为每个残基位置确定的单核苷酸错义多态性。在x轴上与零偏差最小且在y轴上具有最低多态频率的肽是MS参考标准的最佳候选者。

[0128] 图35显示坏死性小肠结肠炎(NEC)和迟发性败血症与肠道防御机制的关联。小图A-小图C,与NEC相关的肠道生理和结构变化,叠加在小肠的横截面视图中。开发NEC生物标志物的研究工作集中在免疫级联和微生物群失调中的蛋白质上。我们的方法侧重于参与微生物群管理的宿主蛋白质。小图D,患有NEC和其他确诊感染的早产儿的前瞻性招募。小图E,粪便样品制备的工作流程针对测定重现性和标准化进行了优化。GI表示胃肠道;IAP,肠碱性磷酸酶。

[0129] 图36显示了患有严重NEC、疑似NEC或无NEC的患者的临床特征。缩写:IQR,四分位距;NA,不适用;NEC,坏死性小肠结肠炎;NICU,新生儿重症监护室;NPO,禁食(nil per os);

PCA,受孕后年龄。(a)使用适当的方法(方差分析、Kruskal-Wallis或Fisher精确检验)比较组间差异,P<.05表明3个婴儿群体之间存在统计学上的显著差异。(b)通过父母认定为超过1个种族。

[0130] 图37显示了其他确诊感染患者的临床特征。缩写:GI,胃肠;IQR,四分位距;NA,不适用;NEC,坏死性小肠结肠炎;NICU,新生儿重症监护室;NPO,禁食;PCA,受孕后年龄。(a)使用适当的方法(方差分析、Kruskal-Wallis或Fisher精确检验)比较组间差异,P<.05表明3个婴儿群体之间存在统计学上的显著差异。(b)通过父母认定为超过1个种族。

[0131] 图38显示粪便肠碱性磷酸酶(IAP)含量和活性与坏死性小肠结肠炎(NEC)和其他确诊感染的关联。小图A,显示了在严重(n=20)和疑似NEC(n=15)时收集的样品的粪便丰度和IAP活性的箱线图和小提琴图。也显示了来自没有NEC的患者(n=86)的样品,在为NEC收集样品时年龄匹配。箱线图须标记第9个和第91个百分位数。小图B,在严重(橙色)或疑似(棕色)NEC期间收集的样品中接受者操作特征曲线,IAP丰度(实心圆圈)和活性(空心圆圈)。小图C,显示了在败血症(n=18)、其他非胃肠(GI)道感染(n=10)和年龄匹配对照患者(n=91)期间收集的样品的粪便丰度和IAP活性的箱线图和小提琴图。箱线图须标记第9个和第91个百分位数。小图D,在败血症(深蓝色)和其他非GI道感染(浅蓝色)期间收集的样品中IAP丰度(实心圆圈)和活性(空心圆圈)的接收器IAP丰度(实心圆)和活性(空心圆)的接受者操作特征曲线。(a)P<.001;(b)P=.005

[0132] 图39显示对照实验证明了操作者再现性、抗体试剂特异性和生物样品特异性。五个不同的操作者在患者粪便样品中进行了(小图A)活性测定测量和(小图B)iAP含量测定;虚线标记了重复1和重复2之间的1:1对应关系。(小图C)本研究中使用的抗人iAP抗体针对人小肠裂解物(GI)、纯化的人胎盘碱性磷酸酶(PL)、纯化的人组织非特异性碱性磷酸酶(TN)和牛肠碱性磷酸酶(cI)进行了测试。AP总量的密度测量定量被列为平均值和SE:100.0±0.1%(GI);1.0±0.4%(PL);0.9±0.5%(TN);0.3±0.1%(cl);N=5。(小图D)所用免疫印迹法的定量对人肠碱性磷酸酶的量具有线性响应。5-7总iAP的平均相对荧光单位和标准误差(空心三角形)为:对于7.5μg,216,692±14,533;对于3.75μg,233,533±20,264;对于1.875μg,211,176±132,267;对于0.938μg,142,834±13,019;对于0.469μg,75,727±7,637;对于0.234μg,44,101±1,410;对于0.117μg,18,234±450;对于0.059μg,4,918±549;对于0.029μg,1,164±79;和对于0.015μg,227±57。(小图E)如果血清临床试验和粪便样品是在采样日收集的,比较血清AP活性和粪便iAP活性。没有观察到血清AP活性和粪便iAP活性测量之间的关系。N=148;实线是粪便iAP活性和血清AP活性之间的最佳线性拟合。

[0133] 图40显示4种人碱性磷酸酶和小牛肠碱性磷酸酶的序列比对。显示的序列是人肠碱性磷酸酶(iAP人;P09923UniprotID)、小牛肠碱性磷酸酶(iAP牛;P19111)、生殖细胞碱性磷酸酶(GCAP人;P10696)、胎盘样碱性磷酸酶(PLAP人,P05187)和组织非特异性碱性磷酸酶(TNAP人,P05186)。信号肽在序列的N端以灰色表示。前肽在序列的C端以灰色斜体表示。涉及金属结合的残基用星号标注;候选糖基化位点带有#符号。从人胎盘碱性磷酸酶晶体(PDB ID 1EW2)显示二级结构基序。人群中发现的多态性数量的彩色热图覆盖在IAP人类序列上。

具体实施方式

[0134] 缩写和定义

[0135] 本文提供了一个或多个优选实施方案的详细描述。然而,应当理解,本发明可以以各种形式体现。因此,本文公开的具体细节不应被解释为限制,而是作为权利要求的基础和作为教导本领域技术人员以任何适当方式应用本发明的代表性基础。

[0136] 除非上下文另有明确规定,否则单数形式“一个”、“一种”和“该”包括复数形式。在权利要求和/或说明书中与术语“包括”一起使用时词“一个”或“一种”的使用可以表示“一个”,但也与“一个或多个”、“至少一个”和“一个或多于一个”的含义一致。

[0137] 除非另有明确说明,在本文中使用任何短语“例如”、“诸如”、“包括”等的地方,都应理解为其后有短语“并且不限于”。类似地,“示例”、“示例性”等被理解为非限制性的。

[0138] 术语“基本上”允许对预期目的没有负面影响的描述词偏差。描述性术语应理解为由术语“基本上”修饰,即使“基本上”一词并未明确提及。

[0139] 术语“其包括”和“其包含”和“其具有”和“其涉及”(以及类似地“包括”、“包含”、“具有”和“涉及”)等可以互换使用并且具有相同的含义。具体而言,每个术语的定义与美国专利法对“包括”的常规定义一致,因此被解释为开放式术语,意思是“至少以下”,并且也被解释为不排除其他特征、限制、方面等。因此,例如,“涉及步骤a、b和c的过程”意味着该过程至少包括步骤a、b和c。无论在哪里使用术语“一个”或“一种”,都应理解为“一个或多个”,除非这种解释在上下文中是无意义的。

[0140] 如本文所用,术语“约”可指大致、粗略、围绕或在……的范围内。当术语“约”与数值范围结合使用时,它通过扩展所述数值之上和之下的边界来修改该范围。一般而言,术语“约”在本文中用于通过向上或向下(更高或更低)20%的方差来修改高于和低于所述值的数值。

[0141] 本发明涉及检测和治疗胃肠疾病的组合物和方法。

[0142] 胃肠道疾病

[0143] 胃肠道疾病是指涉及胃肠道的疾病。例如,坏死性小肠结肠炎(NEC)是一种常见于早产儿的获得性胃肠道疾病。在NEC中,细菌侵入肠壁,引起局部感染和炎症。NEC的特点是高死亡率和长期发病率,包括短肠综合征、反复感染、营养缺乏和神经发育迟缓。尽管早产儿死亡率总体上净下降,但与NEC相关的死亡人数却有所增加。由于最初的非特异性症状和快速恶化,NEC通常难以诊断和管理。

[0144] 除了见于新生儿和早产儿的坏死性小肠结肠炎外,坏死性小肠结肠炎也会影响非新生儿。例如,非新生儿如成人的坏死性小肠结肠炎可由以下引起:炎症介质;营养障碍,如厌食症或体重明显减轻;胃肠功能障碍;酗酒;吸收不良;阻断肠道蛋白酶的药物;抽烟;循环障碍,如肠系膜血流量减少、肠缺血、肠动脉粥样硬化;胆石症;药物施用;免疫缺陷,例如IgA分泌成分或肠道T淋巴细胞的缺陷,并伴有抗体反应差;粪便嵌塞或便秘;或传染原,例如细菌感染、食源性感染和食源性疾病。

[0145] 此类药物的非限制性实例包括具有抗胆碱能特性的那些,例如精神安定剂或基于吩噻嗪的精神安定剂、麻醉剂、炎症介质、抗抑郁剂、铁丸、轻泻剂或抗酸剂。

[0146] 此类传染原的非限制性实例包括细菌如克雷伯氏菌、大肠杆菌、肠杆菌属、假单胞菌、梭状芽孢杆菌和表皮葡萄球菌,病毒如冠状病毒、轮状病毒和肠病毒,以及罕见的真菌如白色念珠菌。肠致病病毒被认为会感染上皮细胞,导致细胞破坏、坏死和肠穿孔。

[0147] 便秘或粪便影响可能具有本领域已知的许多不同原因,其非限制性实例包括含有

钙或铝的抗酸药、饮食或活动的改变、结肠癌、乳制品、饮食失调、神经系统疾病、不活动、脱水、消耗纤维、过度使用泻药、怀孕、消化系统疾病、抵抗排便的冲动、药物、压力或甲状腺功能减退。

[0148] 本发明的方面涉及胃肠疾病。胃肠疾病是指涉及胃肠道,即食道、胃、小肠、大肠和直肠,以及消化的附属器官肝、胆、胰的疾病。例如,此类疾病可由感染性、自身免疫性和生理状态引起。胃肠疾病的非限制性实例包括结肠炎、炎性肠病(IBD)、胃炎、胃肠炎、幽门狭窄、胃癌、感染性腹泻、粪便嵌塞、便秘、肠梗阻和假性梗阻或吸收不良。除了坏死性小肠结肠炎(NEC),结肠炎类型的非限制性实例包括成人坏死性小肠结肠炎(ANEC)、假膜性小肠结肠炎、感染性结肠炎、溃疡性结肠炎、克罗恩病、缺血性结肠炎、放射性结肠炎。

[0149] 肠碱性磷酸酶(iAP)

[0150] 使用来自三个健康人类供体的单个100-150mg粪便样品,鉴定了从胃肠道分泌的234种人类蛋白质。其中,确定了这三个人类个体之间共有的57种蛋白质的核心蛋白质组。尽管这个核心蛋白质组的存在可重复,但大多数共享蛋白质的相对丰度在三个人类受试者之间有所不同,这表明核心蛋白质组可用于鉴定宿主特异性蛋白质组学特征。

[0151] 肠道碱性磷酸酶(iAP)在小肠肠细胞中表达,共同分泌到肠腔和体循环中,并通过解毒细菌脂多糖和维持微生物稳态在维持肠道屏障功能中发挥不可或缺的作用。作为粪便中的主要碱性磷酸酶,iAP已被鉴定为核心人类粪便蛋白质组中的57种蛋白质之一。

[0152] 本发明的方面涉及用于诊断受试者胃肠疾病的方法。例如,该方法包括以下步骤:从受试者获得样品;检测样品中至少一种GI疾病生物标志物的存在,其中GI疾病生物标志物包括肠碱性磷酸酶(iAP)蛋白质;将GI疾病生物标志物谱与从对照样品获得的谱比较;并治疗受试者。实施方案还可以涉及在有需要的受试者中预防胃肠疾病的进展,以及在有需要的受试者中改善与胃肠疾病相关的症状。在实施方案中,对照样品可以包括两个或更多个对照样品。

[0153] 如本文所用,“与对照样品或受试者相比改变”被理解为待检测分析物或诊断或治疗指示剂(例如,标志物,例如iAP)的水平处于在统计学上不同于来自正常、未经处理或异常状态对照样品的样品的水平。统计显著性的确定在本领域技术人员的能力范围内,例如,构成阳性或阴性结果的均值的标准偏差的数量以及达到这些区间的统计分析。

[0154] 如果受试者被诊断患有胃肠道疾病,本发明的实施方案包括治疗受试者。例如,治疗受试者可包括向受试者施用有效量的抗生素、益生菌、静脉内流体、iAP替代组合物、肠胃外(或静脉内)营养或其组合。另一种治疗方法可以是不让受试者进食。iAP替代组合物的非限制性实例包括基因或蛋白质替代组合物。

[0155] 术语“施用”或“正施用”可以指将物质例如iAP蛋白或抗生素和/或抗真菌剂引入受试者。通常,可以使用任何施用途径,包括例如冠状动脉内、心肌内、静脉内、动脉内或其任何组合。例如,iAP可以在GI疾病例如NEC的诊断之前、同时或之后施用于受试者。

[0156] 蛋白质疗法可以通过有效地将iAP蛋白质或其片段引入受试者以恢复或增强iAP活性的任何方法来完成。有效量的iAP蛋白(例如足以减轻或消除与胃肠疾病相关的症状的量)可以单独施用或与促进蛋白施用或活性的试剂联合施用。“有效量”可由本领域技术人员基于诸如所治疗症状的类型和严重程度、受试者的体重和/或年龄、受试者的既往病史和所选择的药剂施用路线确定。

[0157] 在实施方案中,iAP蛋白可以与脂质结合,例如去污剂或其他两亲分子胶束、膜囊泡、脂质体、病毒体或微粒体。天然融合的或可被设计成融合的(例如通过将融合蛋白掺入脂质中)的脂质组合物是特别优选的。融合蛋白可以从病毒中获得,例如副流感病毒1-3、呼吸道合胞病毒(RSV)、甲型流感、仙台病毒和披膜病毒融合蛋白。非病毒融合蛋白包括介导细胞-细胞融合的正常细胞蛋白。其他非病毒融合蛋白包括精子蛋白PH-30,它是位于精子细胞表面的完整膜蛋白,被认为介导精子和卵子之间的融合。其他非病毒融合蛋白包括嵌合PH-30蛋白,例如PH-30和来自流感病毒的血凝素和PH-30的结合成分和解聚素(例如bitistatin、barbourin、蝮蛇毒素(kistrin)和蛇毒锯鳞蝰素(echistatin))。此外,脂质膜可以使用传统的化学融合剂如聚乙二醇(PEG)进行融合。

[0158] 在实施方案中,可以通过施用有效量的iAP蛋白来治疗受试者,任选地在药学上可接受的载体或稀释剂中。iAP蛋白的有效量可以是足以减轻胃肠疾病症状的量。iAP可以皮下、静脉内、腹膜内、肌肉内、肠胃外、口服、粘膜下、通过吸入(例如雾化药物组合物)或有效剂量范围内的其他适当施用途径施用。如果需要特定的施用方式,iAP可以封装在保护其免受酶促降解的材料中。此外,在施用之前,施用清除细菌感染的药剂可能是有用的。

[0159] 或者,可将编码iAP的基因或其片段的制品掺入合适的载体中以将基因递送到受试者的细胞中。在实施方案中,iAP基因疗法可以是暂时的并且需要向受试者重复递送。在其他实施方案中,基因疗法可以治愈胃肠疾病。例如,如果将编码iAP的遗传物质整合到受试者的干细胞中,则此类细胞的所有后续世代都可以从整合的序列中产生真正的iAP并纠正缺陷。可用于进行iAP基因治疗的方法和载体的非限制性实例包括逆转录病毒、腺相关病毒、裸DNA、DNA-脂质复合物、受体介导的进入或腺病毒。

[0160] 治疗的非限制性施用方式包括静脉内(IV);粘膜内;肌肉内;皮下,和非侵入性施用方式,例如口服、鼻内、口腔、肺内、支气管内和经皮。

[0161] 本发明的方面还涉及用于筛选有患胃肠疾病风险的受试者或患有无症状胃肠疾病的受试者中特征的存在的方法。例如,该方法的步骤包括从受试者获得样品;检测样品中至少一种GI疾病生物标志物,其中GI疾病生物标志物包括肠碱性磷酸酶(iAP)蛋白质;将GI疾病生物标志物谱与从对照样品获得的谱比较;并治疗受试者。类似地,方面还可以涉及用于识别有患胃肠疾病风险的受试者或患有无症状胃肠疾病的受试者的方法。在实施方案中,对照样品可以包括两个或更多个对照样品。

[0162] 本发明的方面包括测量样品中的总蛋白质浓度、样品中的肠碱性磷酸酶蛋白质浓度、样品中的肠碱性磷酸酶活性或其组合。此类方法中使用的样品和用于收集此类测量值的分析在本文中进行了描述。例如,如果样品中的蛋白质浓度大于约1.0mg/ml、1.1mg/ml、1.2mg/ml、1.3mg/ml、1.4mg/ml、1.5mg/ml、1.6mg/ml、1.7mg/ml、1.8mg/ml、1.9mg/ml、2.0mg/ml、2.1mg/ml、2.2mg/ml、2.3mg/ml、2.4mg/ml、2.5mg/ml、2.6mg/ml、2.7mg/ml、2.8mg/ml、2.9mg/ml、3.0mg/ml、3.1mg/ml、3.2mg/ml、3.3mg/ml、3.4mg/ml、3.5mg/ml、3.6mg/ml、3.7mg/ml、3.8mg/ml、3.9mg/ml、4.0mg/ml、4.1mg/ml、4.2mg/ml、4.3mg/ml、4.4mg/ml、4.5mg/ml、4.6mg/ml、4.7mg/ml、4.8mg/ml、4.9mg/ml、5.0mg/ml,则受试者可以被诊断患有GI疾病。作为另一个例子,如果iAP活性低于约10mU/mg、20mU/mg、30mU/mg、40mU/mg、50mU/mg、60mU/mg、70mU/mg、80mU/mg、90mU/mg、100mU/mg、200mU/mg、300mU/mg、400mU/mg、500mU/mg、600mU/mg、700mU/mg、800mU/mg、900mU/mg、1000mU/mg、1100mU/mg、1200mU/

mg、1300mU/mg、1400mU/mg、5U/mg、10U/mg、50U/mg、100U/mg、200U/mg、300U/mg、400U/mg、500U/mg、600U/mg、700U/mg、800U/mg、900U/mg、1000U/mg,则受试者可以被诊断患有GI疾病。例如,如果粪便样品中的蛋白质浓度大于约1.6mg/ml,或大于约1.8mg/ml;如果iAP活性低于约979mU/m,或低于约1256mU/mg;或者如果iAP蛋白的水平比对照样品的平均值高出至少两个标准偏差,则可以诊断受试者患有胃肠道疾病。作为另一个例子,如果iAP蛋白水平大于对照样品的约0.05%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、125%、150%、175%、200%、225%、250%、275%,则可以诊断受试者患有GI疾病。例如,如果通过密度测定的通过抗iAP抗体检测的iAP蛋白超过对照的10.7,或通过密度测定的超过对照的4.8%,则可以诊断受试者患有胃肠道疾病。在其他实施方案中,如果满足两个阈值,或者如果满足所有三个阈值,则可以诊断受试者患有胃肠疾病。在实施方案中,对照样品可以包括两个或更多个对照样品。

[0163] 术语“阈值”,例如指示NEC的阈值,是指源自多个生物样品(例如供体粪便样品)的关于生物标志物的值,例如iAP蛋白水平、iAP催化活性或总粪便蛋白水平,高于该阈值与患有和/或发展胃肠道疾病例如NEC)的可能性增加有关。

[0164] 本发明的实施方案包括如果样品中iAP的蛋白质水平、样品中iAP酶活性的水平或粪便蛋白质水平至少比对照样品的平均水平高0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5或10个标准差,则诊断受试者患有胃肠道疾病。在其他实施方案中,如果满足两个阈值,或者如果满足所有三个阈值,则可以诊断受试者患有胃肠疾病。在实施方案中,对照样品可以包括两个或更多个对照样品。

[0165] 本发明的实施方案包括机器学习技术或应用以确定适当的临床阈值。例如,此类技术包括本领域已知的技术,包括朴素贝叶斯分类器(NBC)、线性判别分析(LDA)或支持向量机(SVM),以及支持向量机选项。本领域技术人员容易理解,这样的阈值可以根据所分析的样品大小和所采用的统计分析而变化。

[0166] 本发明的方面还包括识别和/或诊断胃肠疾病的早期阶段和胃肠疾病的晚期阶段。某些实施方案可以区分早期阶段和晚期阶段胃肠道疾病。例如,如本文所述的实施方案可以诊断晚期炎症状态,例如通过肠积气(门静脉或胆道气体)的放射学发现确定的炎症状态。作为另一实例,实施方案可以在生理上明显有肠道的猖獗炎症之前识别疾病的早期阶段。目前医生从一系列体征中怀疑胃肠道疾病,例如腹胀、腹部压痛、肠鸣音减弱、便血、呼吸暂停增加、体温不稳定、胆汁分泌物和进食不耐受。疑似疾病的临床症状是肠袢扩张和放射学显示的肠壁增厚。疑似疾病的实验室检查结果是血小板减少、白细胞计数减少或增加、条带计数增加和代谢性酸中毒。实施方案可以匹配炎症晚期阶段肠积气(门静脉或胆道气体)的放射学发现的鉴定。该方法还可以在生理上明显的肠道炎症猖獗之前识别疾病的早期阶段。

[0167] 样品

[0168] 本发明的方面包括测量或检测生物样品中胃肠疾病的生物标志物。可以在不同类型的生物样品中测量本发明的生物标志物。可用于本发明的方法中的生物样品的非限制性实例包括粪便、血浆、脐带血、新生儿血、脑脊髓液、眼泪、呕吐物、唾液、尿液、粪便和胎粪。如果需要,可以制备样品以增强生物标志物的可检测性。例如,可以分馏来自受试者的样品。可以使用富集感兴趣的生物标志物多肽的任何方法。样品制备,例如预分馏方案,是可

选的,并且根据所使用的检测方法,对于提高生物标志物的可检测性可能是必要的,也可能不是必要的。例如,如果使用特异性结合生物标志物的抗体来检测样品中生物标志物的存在,则样品制备可能是不必要的。样品制备可以涉及样品的分馏和确定含有生物标志物的级分的收集。预分馏的方法包括例如尺寸排阻色谱法、离子交换色谱法、肝素色谱法、亲和色谱法、顺序提取、凝胶电泳、质谱法和液相色谱法。

[0169] 本文所述的方法可涉及从受试者例如婴儿获得生物样品。如本文所用,短语"获得生物样品"是指从受试者直接或间接获得生物样品的任何过程。例如,可以通过从受试者获取组织或流体样品(例如抽血、骨髓样品、脊椎抽液),获得生物样品(例如在护理设施处,诸如医生办公室、医院、实验室设施)。或者,可以通过从直接从受试者获得样品的一个或多个人接收生物样品(例如,在实验室设施处)来获得生物样品。生物样品可以是来自受试者的例如粪便如大便、组织(例如血液)、细胞(例如造血细胞,例如造血干细胞、白细胞或网织红细胞、干细胞或浆细胞)、囊泡、生物分子聚集体或血小板。

[0170] 检测和抗体

[0171] 本发明的方面包括GI疾病的生物标志物。例如,方面包括坏死性小肠结肠炎的生物标志物。例如,GI疾病的生物标志物包括iAP酶活性、iAP蛋白水平、iAP二聚化/解离、翻译后修饰的iAP、总粪便蛋白或其组合。

[0172] 本发明的方面包括测量iAP酶活性的测定。本发明的方面包括测量iAP蛋白质水平的测定。本发明的方面包括测量iAP二聚化/解离的测定。本发明的方面包括测量翻译后修饰的iAP的测定。本发明的方面包括测量总粪便蛋白的测定。

[0173] 翻译后修饰的非限制性实例包括乙酰化、酰化、烷基化、酰胺化、丁酰化、脱酰胺化、甲酰化、糖基磷脂酰肌醇化(glypiation)、糖基化、羟基化、碘化、ISG化、脂酰化、丙二酰化、甲基化、肉豆蔻酰化、棕榈酰化、磷酸化、phosphopantetheinylation、异戊烯化、丙酰化、核糖基化、琥珀酰化、硫酸化、SUMO化或泛素化。

[0174] iAP是同型二聚体;每个原体结合4个二价(Zn^{2+}和Mg^{2+})离子,这对于维持酶的结构完整性和催化活性至关重要。iAP是在人体组织中发现的与生理功能相关的四种不同碱性磷酸酶之一。尽管在微绒毛刷状缘上的肠细胞分泌的腔内囊泡中发现了高浓度的iAP,但仍有少量iAP被释放到血液和肠腔中,后者在肠道中行进。

[0175] 本发明的实施方案包括使用本领域已知的测定来测量或检测此类生物标志物。测定的非限制性实例包括免疫测定、比色测定、荧光测定或其组合。免疫测定的非限制性实例包括蛋白质印迹测定、酶联免疫吸附测定(ELISA)、免疫沉淀或其组合。例如,从受试者收集的生物样品可以与生物标志物特异性抗体例如抗iAP抗体或其片段一起温育,并且检测或测量抗体与样品中生物标志物的结合。

[0176] 在实施方案中,抗体或其片段可以对iAP具有特异性(抗iAP)。抗体可以是多克隆抗体或单克隆抗体。可以使用已知方法将抗体或其片段连接至能够识别、可视化或定位的分子。合适的可检测标记包括放射性同位素标记、酶标记、非放射性同位素标记、荧光标记、毒素标记、亲和标记和化学发光标记。

[0177] 可用于本发明的方法中的测定的实例虽然不意欲是限制性的但包括布拉德福德测定、二辛可宁酸(BCA)测定、Lowry测定、连苯三酚红蛋白染料结合测定、考马斯蓝染料结合测定、终点测定、动力学测定,例如使用荧光底物如4-甲基伞形酮基磷酸酯、化学发光底

物如CSPD和CDP-Star、具有RapidGlow增强剂的DynaLight底物或比色4-硝基苯基磷酸酯的动力学测定,检测磷酸酶反应的测定、检测ATP水解的测定,或其组合。在实施方案中,可以以多孔形式提供测定,例如6-、12-、24-、48-或96-孔板。在实施方案中,可以在标准比色皿中提供测定,例如1ml比色皿。

[0178] 总蛋白,例如总粪便蛋白,可以通过本领域技术人员已知的测定来测量(参见例如Cardinal Health catalogue,Dublin,Ohio,2013的第7、27和85页,该文献通过引用以其全部并入本文,参见Roche总蛋白/TP2、Cobas c502 TPUC3或Abbott总蛋白试剂盒)。例如,Pyrogallol Red Molybdate染料结合方法提供了一种具有更高线性度的总蛋白质定量比色方法,其在手动或自动系统中使用微升体积的生物样品。如本文所述,连苯三酚红可以以试剂盒形式提供,该试剂盒包含试剂、对照和试剂标准品,例如25mg/dL、50mg/dL、100mg/dL和200mg/dL。

[0179] 在本文的实施方案中使用的酶,例如用于检测蛋白质水平或酶活性,可以是例如碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶、β-半乳糖苷酶和/或葡萄糖氧化酶;底物可以分别是碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶、β-半乳糖苷酶或葡萄糖氧化酶底物(参见Molecular Probes Handbook-A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies,11th Edition (2010),Invitrogen,其通过引用以其全部并入本文中)。

[0180] 在实施方案中,酶,例如碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶,可以连接到二抗。不受理论束缚,碱性磷酸酶的测量可被来自二抗的信号混淆。分离的碱性磷酸酶可以催化水解MUP,形成荧光产物MU。来自两个不同商业制造商的与AP结合的二抗例如也可以水解MUP以形成荧光产品。当碱性磷酸酶蛋白和二抗在同一测量中时,观察到催化活性水平增加。这种活性可以通过生化活性的标准分光光度读数和蛋白质印迹来监测。

[0181] 碱性磷酸酶(AP)底物包括但不限于AP-蓝底物(蓝色沉淀物,Zymed目录p.61);AP-橙底物(橙色,沉淀物,Zymed),AP-红底物(红色,红色沉淀物,Zymed),5-溴,4-氯,3-吲哚磷酸盐(BCIP底物,绿松石沉淀物),5-溴,4-氯,3-吲哚磷酸盐/硝基蓝四唑/碘硝基四唑(BCIP/INT底物,黄褐色沉淀物,Biomeda),5-溴,4-氯,3-吲哚磷酸盐/硝基蓝四唑(BCIP/NBT底物,蓝色/紫色),5-溴,4-氯,3-吲哚磷酸盐/硝基蓝四唑/碘硝基四唑(BCIP/NBT/INT,棕色沉淀物,DAKO,坚牢红(红色),品红色磷(品红色),萘酚AS-双磷酸盐(NABP)/坚牢红TR(红色),萘酚AS-BI-磷酸盐(NABP)/New Fuchsin(红色),萘酚AS-MX-磷酸盐(NAMP)/New Fuchsin(红色),New Fuchsin AP底物(红色),p-磷酸硝基苯酯(PNPP,黄色,水溶性),VECTOR™黑(黑色),VECTOR™蓝(蓝色),VECTOR™红(红色),Vega Red(覆盆子红色)。

[0182] 辣根过氧化物酶(HRP,有时缩写为PO)底物包括但不限于2,2'Azino-二-3-乙基苯并噻唑啉磺酸盐(ABTS,绿色,水溶性),氨乙基咔唑,3-氨基,9-乙基咔唑AEC(3A9EC,红色)。α-萘酚吡喃素(红色)、4-氯-1-萘酚(4C1N,蓝色,蓝黑色)、3,3'-二氨基联苯胺四盐酸盐(DAB,棕色)、邻联苯胺(绿色)、邻苯二胺(OPD,棕色,水溶性)、TACS Blue(蓝色)、TACS Red(红色)、3,3',5,5'四甲基联苯胺(TMB,绿色或绿色/蓝色),TRUE BLUE™(蓝色),VECTOR™VIP(紫色)、VECTOR™SG(烟熏蓝灰色)和Zymed Blue HRP底物(鲜蓝色)。

[0183] 葡萄糖氧化酶(GO)底物包括但不限于硝基蓝四唑(NBT,紫色沉淀)、四硝基蓝四唑(TNBT,黑色沉淀)、2-(4-碘苯基)-5-(4-硝基苯)-3-苯基四唑氯化物(INT,红色或橙色沉淀)、四唑蓝(蓝色)、硝基四唑紫(紫色)和3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四唑溴化

物(MTT,紫色)。所有四唑底物都需要葡萄糖作为共底物。葡萄糖被氧化,四唑盐被还原,形成不溶性甲臜,其形成有色沉淀。

[0184] β-半乳糖苷酶底物包括但不限于5-溴-4-氯-3-吲哚基β-D-吡喃半乳糖苷(X-gal,蓝色沉淀)。

[0185] 碱性和酸性磷酸酶底物的其他例子包括9H-(1,3-二氯-9,9-二甲基吖啶-2-酮-7-基)磷酸盐、二铵盐(DDAO磷酸盐)、6,8-二氟-4-甲基伞形酮基磷酸盐(DiFMUP)、二磷酸荧光素、四铵盐(FDP)、4-甲基伞形酮基磷酸盐、游离酸(MUP)和4-甲基伞形酮基磷酸盐、二环己基铵盐、三水合物(MUP DCA盐)。

[0186] 碱性磷酸酶活性,例如肠碱性磷酸酶活性,可以使用碱性磷酸酶的生色底物和/或荧光底物来检测和/或测量。例如,4-甲基伞形酮磷酸酯(MUP)是碱性磷酸酶的荧光底物,并且碱性磷酸酶介导的其磷酸取代基的水解产生蓝色荧光4-甲基伞形酮(激发/发射~386/448nm)。在实施方案中,碱性磷酸酶底物可以直接与生物样品例如粪便混合,从而允许直接检测碱性磷酸酶的存在或其活性的测量。

[0187] 碱性磷酸酶(AP)底物包括但不限于AP-蓝底物(蓝色沉淀物,Zymed目录p.61);AP-橙底物(橙色,沉淀物,Zymed),AP-红底物(红色,红色沉淀物,Zymed),5-溴,4-氯,3-吲哚磷酸盐(BCIP底物,绿松石沉淀物),5-溴,4-氯,3-吲哚磷酸盐/硝基蓝四唑/碘硝基四唑(BCIP/INT底物,黄褐色沉淀物,Biomeda),5-溴,4-氯,3-吲哚磷酸盐/硝基蓝四唑(BCIP/NBT底物,蓝色/紫色),5-溴,4-氯,3-吲哚磷酸盐/硝基蓝四唑/碘硝基四唑(BCIP/NBT/INT,棕色沉淀物,DAKO,坚牢红(红色),品红色磷(品红色),萘酚AS-双磷酸盐(NABP)/坚牢红TR(红色),萘酚AS-BI-磷酸盐(NABP)/New Fuchsin(红色),萘酚AS-MX-磷酸盐(NAMP)/New Fuchsin(红色),New Fuchsin AP底物(红色),p-磷酸硝基苯酯(PNPP,黄色,水溶性),VECTOR™黑(黑色),VECTOR™蓝(蓝色),VECTOR™红(红色),Vega Red(覆盆子红色)。

[0188] 本领域已知的其他底物,包括本文所述的那些,可用于本发明的实施方案(参见Molecular Probes Handbook-A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies,第11版(2010年),Invitrogen,其通过引用以其全部并入本文中)。此外,根据需要,本领域已知的各种荧光团可以共价连接至底物例如MUP。

[0189] 酶反应可以为检测样品中的特定蛋白质(例如粪便中的iAP)提供高度特异性、快速和灵敏的测定。可在本发明中使用的合适的荧光底物的实例包括二乙酸荧光素、4-甲基伞形酮基乙酸酯、4-甲基伞形酮基酪蛋白、4-甲基伞形酮基-α-L-吡喃阿拉伯糖苷、4-甲基伞形酮基-β-D-吡喃岩藻糖苷、4-甲基伞形酮基-α-L-吡喃岩藻糖苷、4-甲基伞形酮基-β-L-吡喃岩藻糖苷、4-甲基伞形酮基-α-D-吡喃半乳糖苷、4-甲基伞形酮基-β-D-吡喃半乳糖苷、4-甲基伞形酮基-α-D-吡喃葡萄糖苷、4-甲基伞形酮基-β-D-吡喃葡萄糖苷、4-甲基伞形酮基-β-D-葡糖苷酸、4-甲基伞形酮基壬酸酯、4-甲基伞形酮油酸酯、4-甲基伞形酮磷酸酯、双(4-甲基伞形酮基)磷酸酯、4-甲基伞形酮基焦磷酸二酯、4-甲基伞形酮基β-D-吡喃木糖苷。

[0190] 用于本发明的合适显色底物的非限制性实例包括邻硝基苯基-β-D-吡喃半乳糖苷、对硝基苯基-β-D-吡喃半乳糖苷、邻硝基苯基-β-D-吡喃葡萄糖苷、对硝基苯基-α-D-吡喃葡萄糖苷、对硝基苯基-β-D-吡喃葡萄糖苷、对硝基苯基-β-D-葡糖苷酸、对硝基苯基磷酸酯、邻硝基苯基-β-D-吡喃木糖苷、对硝基苯基-α-D-吡喃木糖苷、对硝基苯基-β-D-吡喃木糖苷和酚酞-β-D-葡糖苷酸。

[0191] 受试者

[0192] 如本文所述,本发明的实施方案包括测量或检测受试者的胃肠生物标志物。术语“受试者”或“患者”可以指可以向其施用本发明的方面的任何生物体,例如用于实验、诊断、预防和/或治疗目的。可以施用本公开的化合物的典型受试者是哺乳动物,特别是灵长类动物,特别是人类。对于兽医应用,广泛种类的受试者将是合适的,例如家畜如牛、绵羊、山羊、奶牛、猪等;家禽,例如鸡、鸭、鹅、火鸡等;和驯养的动物,特别是宠物,如狗和猫。对于诊断或研究应用,多种哺乳动物将是合适的受试者,包括啮齿动物(例如小鼠、大鼠、仓鼠)、兔、灵长类动物和猪例如近交猪等。术语“活的受试者”是指上述受试者或另一种活的生物。术语“活的受试者”是指整个受试者或生物体,而不仅仅是从活的受试者中切除的部分(例如肝脏或其他器官)。

[0193] 在本文的实施方案中,受试者包括哺乳动物,例如人类或脊椎动物。此类的实例包括但不限于狗、猫、马、牛、猪、绵羊、山羊、鸡、灵长类动物,例如猴子,鱼(水产养殖物种),例如鲑鱼、大鼠和小鼠。人包括早产儿、婴儿、儿童、青少年、成人或老年人。

[0194] 尽管本文所述的本发明的方面涉及人类胃肠道疾病,但本发明的方面也适用于其他非人类脊椎动物。本发明的方面适用于兽医用途,例如用于家畜。一般而言,各方面将根据使用类型和施用方式以及个体受试者的具体要求而变化。

[0195] 在实施方案中,受试者可以处于抗生素方案中。术语“抗生素方案”是指疾病如感染的治疗或预防,或实现所需改变的方法,如减少或预防感染,其中所述治疗包括向受试者施用抗生素以使其有效治疗疾病或产生生理变化。抗生素方案可以包括本领域技术人员已知的变化,例如抗生素选择(例如,包括正确的药物选择、施用途径和给药方案)、施用时间和持续时间。此类抗生素的非限制性实例包括万古霉素、氨苄西林、Zosyn(哌拉西林和他唑巴坦的组合)、庆大霉素、Flagyl(甲硝唑仿制药)、美罗培南、甲硝唑、头孢噻肟、克林霉素或其任何组合。在一些实施方案中,可以进一步施用抗真菌剂。在其他实施方案中,抗真菌剂可以是氟康唑、特康唑、伏立康唑、泊沙康唑、喷他脒、伊曲康唑、酮康唑。在实施方案中,本文公开的方法可进一步包括治疗受试者。在实施方案中,治疗可包括向诊断出患有胃肠道疾病的受试者施用有效量的抗生素、益生菌、静脉内流体、停止口服进食、iAP替代组合物、肠胃外(或静脉内)营养或其组合。

[0196] 在一个实施方案中,例如患有NEC的受试者,可以将抗生素给予受试者足够的时间,例如10-14天,其中给予婴儿抗生素。对于其他实施方案,例如患有败血症的受试者,可以向患者施用7天的抗生素。例如,抗生素施用和/或处方可以用于广谱覆盖,例如用于(i)革兰氏阳性菌、(ii)革兰氏阴性菌和(iii)厌氧菌。此类方案的非限制性实例包括万古霉素(革兰氏阳性,包括MRSA)、头孢他啶(第三代头孢菌素-革兰氏阴性、一些革兰氏阳性和假单胞菌)、甲硝唑(厌氧菌覆盖)、苯唑西林(革兰氏阳性)。一般抗生素方案的非限制性实例包括氨苄青霉素+庆大霉素用于可能来自母亲的垂直获得性感染,以及万古霉素+西他啶用于可能的医院获得性感染。从2017年4月NEC研讨会上的46位新生儿科医师的回复来看,用于NEC治疗的常用抗生素/抗真菌药是庆大霉素(32%)、万古霉素(28%)、氨苄青霉素(25%)、Zosyn(哌拉西林和他唑巴坦的组合;15%)、Flagyl(甲硝唑仿制药;19%)、克林霉素(6%)、美罗培南(4%)、氟康唑(抗真菌剂,7%)和其他(1%)。

[0197] 在一些实施方案中,益生菌也可以施用于受试者。如本文所用,益生菌是指可帮助

重建胃肠道中的正常菌群的活微生物的单一或混合培养物。益生菌可以增强免疫反应,引发降解毒素和/或阻断结肠附着位点的酶的产生。参见,见McFarland,J.Medic.Microbiol.2005,54:101-111。益生菌生物体的非限制性实例包括双歧杆菌属、乳杆菌属、乳球菌属和片球菌属、布拉氏酵母菌属以及相关细菌和酵母中的那些。

[0198] 在一些实施方案中,可以向受试者施用静脉内流体或静脉内疗法。静脉内疗法可以指将液体物质直接输注到受试者的静脉中。此类流体的非限制性实例包括盐水(例如水中0.9%NaCl或水中0.45%盐水)、乳酸林格氏液(0.9%NaCl与电解质和缓冲液)、D_5W(5%葡萄糖水溶液)、D_5NS(0.9%盐水中的5%葡萄糖)、$D_5$1/2NS(0.45%盐水中的5%葡萄糖)、D_5LR(乳酸林格氏液中的5%葡萄糖)或Normosol-R。在实施方案中,溶液可以是等渗的。在其他实施方案中,溶液可以是低渗的。

[0199] 在一些实施方案中,可以向受试者施用肠胃外(或静脉内)营养。肠胃外(或静脉内)营养的非限制性实例包括静脉内葡萄糖溶液、静脉内氨基酸溶液、静脉内脂肪乳液、静脉内维生素和矿物质补充剂或其组合。

[0200] 在实施方案中,可以对受试者停止进食,例如经口进食,直到可以证明进食耐受性。例如,当早产儿能够安全地摄取和消化规定的肠内(通过口腔)进食而没有与胃肠功能障碍或感染相关的并发症时,就可以证明进食耐受性。极低出生体重早产儿进食耐受性的临床证据可包括达到完全进食量所需的天数(报告范围为每天每kg 100-160mL)、进食不耐受发作次数、由于进食不耐受症状而停止进食的天数、恢复出生体重的时间、小腿生长、体重增加、枕额头围和长度。

[0201] 在实施方案中,进食是指婴儿配方食品的摄入,例如EleCare(Abbott Nutrition)、Neosure(Similac)、EnfaCare(Enfamil)、Pregestimil(Enfamil)、Similac Special Care或SSC(Similac)、Gentlease(Enfamil)。进食也可以指补充剂的摄入,例如微脂(Nestle Health Science)。

[0202] 在实施方案中,iAP替代疗法可以指蛋白质替代疗法。术语"蛋白质替代"可以指将非天然的、纯化的蛋白质例如iAP引入到缺乏这种蛋白质的个体中。施用的蛋白质可以从天然来源或通过重组表达获得。该术语还指在个体中引入纯化的蛋白质,该个体否则需要或受益于施用纯化的蛋白质,例如,患有蛋白质不足。引入的蛋白质可以是体外产生的纯化的重组蛋白质,或从分离的组织或体液,例如胎盘或动物乳,或从植物中纯化的蛋白质。例如,在早产儿的人类粪便中也检测到双歧杆菌、克雷伯氏菌和大肠杆菌碱性磷酸酶(Swittink等人,2017.Metaproteomics reveals functional differences in intestinal microbiota development of preterm infants.Molecular&Cellular Proteomics.DOI:10.1074/mcp.RA117.000102(印刷中)),因此可以成为用于蛋白质替代疗法的iAP蛋白质的来源。因此,在实施方案中,增加的AP活性可能是细菌菌群的结果,而不仅仅来自人类iAP。

[0203] 一次性物品

[0204] 本发明的方面包括用于检测或测量胃肠疾病的生物标志物的一次性物品。一次性物品可以包括生物传感器,并且可以任选地包括本领域已知的其他部件。在实施方案中,生物传感器可包括至少一个生物识别元件。

[0205] 在实施方案中,生物传感器可以检测或测量样品中的iAP。在其他实施方案中,生物传感器可以检测或测量iAP酶活性、总粪便蛋白、iAP二聚化/解离、翻译后修饰的iAP或其

组合。本文描述了翻译后修饰和样品的非限制性实例。

[0206] 在实施方案中,生物传感器可以是免疫传感器,并且可以进一步包括检测信号。检测信号的非限制性实例包括放射性信号、比色信号、荧光信号、化学发光信号或其组合。例如,生物传感器可以产生新的颜色或光谱吸收的变化。在实施方案中,本发明的生物传感器包括生物识别元件或分子识别元件,其为特定分析物例如iAP提供高度特异性结合或检测选择性。生物识别元件或系统可以是生物来源材料,例如酶或酶序列;抗体或其片段;膜受体蛋白;DNA;细胞器、天然或合成的细胞膜;完整或部分有活力或无活力的细菌、植物或动物细胞;或一块植物或哺乳动物组织,并且通常用于与目标生物分析物特异性相互作用。生物识别元件负责选择性识别分析物和为输出信号提供基础的物理化学信号。由一个或多个生物识别元件产生的物理化学信号可以在视觉上传达给佩戴者或看护者(即,通过人眼可见的颜色变化)。其他实施方案可以产生光信号,这可能需要其他仪器来增强信号。这些包括荧光、生物发光、全内反射共振、表面等离子体共振、拉曼方法和其他基于激光的方法。

[0207] 或者,可以通过相关联的换能器处理信号,例如,该换能器可以产生可以显示的电信号(例如,电流、电位、电感或阻抗)(例如,在诸如LED或LCD显示器的读数上显示)或触发听觉或触觉(例如,振动)信号或可触发致动器,如本文所述。信号可以是定性的(例如,指示目标生物分析物的存在)或定量的(即,目标生物分析物的量或浓度的测量)。在这样的实施方案中,换能器可以可选地产生光、热或声信号。

[0208] 在任何情况下,信号也可以是持久的(即,在一段时间内稳定和可读,通常至少与物品的使用寿命具有相同的量级)或瞬态的(即,记录实时测量)。此外,信号可以被传输到远程指示器地点(例如,通过电线或发射器,例如红外或射频发射器),其包括物品或远程设备内或上的其他位置。此外,生物传感器60或其任何部件可适于仅检测和/或发信号通知目标生物分析物的高于预定阈值水平的浓度(例如,在目标生物分析物通常存在于身体废物中的情况下或当分析物的浓度低于已知的“危险”水平时)。

[0209] 在一个实施方案中,一次性物品可以是要由受试者穿着的尿布。额外的一次性物品的非限制性实例包括用于清洁受试者的擦拭物、浸量尺、勺子、小铲勺、滤纸或拭子。

[0210] 在本发明的方面,如本文所述的一次性物品可以是可用于诊断受试者患有胃肠疾病的试剂盒的组件。本发明的试剂盒的附加组件可包括生物识别元件、支撑结构及其使用说明书。例如,iAP生物识别元件,例如本文所述的抗体,可以固定到固体支撑结构上。

[0211] 固体支撑结构的组成的非限制性实例包括塑料、纸板、玻璃、有机玻璃、锡、纸或其组合。固体支撑物还可以包括浸量尺、勺子、小铲勺、滤纸或拭子。

[0212] 本发明的方面还涉及用于鉴定表现出或具有发展胃肠疾病的倾向的受试者的分子生物标志物的诊断试剂盒。在实施方案中,该试剂盒包含用于确定总粪便蛋白浓度的工具、用于确定肠碱性磷酸酶(iAP)活性的工具和iAP生物识别元件中的至少一种,其中一起代表指示人类受试者中胃肠道疾病的存在或发展的倾向。在实施方案中,特征包含比对照样品的平均值高至少两个标准偏差的总蛋白质浓度、比对照样品的平均值高至少两个标准偏差的肠碱性磷酸酶蛋白浓度、或比对照样品的平均值低至少两个标准偏差的肠碱性磷酸酶活性。在又其他实施方案中,特征可以选自包括比对照样品的平均值高至少两个标准偏差的总蛋白质浓度、比对照样品的平均值高至少两个标准偏差的肠碱性磷酸酶蛋白浓度和比对照样品的平均值低至少两个标准偏差的肠碱性磷酸酶活性的组中的至少两项。在实施

方案中,对照样品可以包括两个或更多个对照样品。

[0213] 在一个实施方案中,该试剂盒包括(a)含有如本文所述的组分和支撑结构的容器,以及任选的(b)信息材料。信息材料可以是与本文描述的方法和/或试剂用于诊断目的的用途相关的描述性、指导性、营销性或其他材料。在一个实施方案中,试剂盒还包括治疗剂,例如抗生素、益生菌或iAP替代组合物。

[0214] 试剂盒的信息材料的形式不受限制。在一个实施方案中,信息材料可以包括关于试剂盒组分生产的信息,例如分子量、浓度、失效日期、批次或生产地点信息等。在一个实施方案中,信息材料涉及使用试剂盒组件的方法(例如,诊断患有GI疾病的受试者)。信息可以多种格式提供,包括印刷文本、计算机可读材料、视频记录或音频记录,或提供指向实质性材料的链接或地址的信息。

[0215] 该试剂盒可以包括其他成分,例如溶剂或缓冲液、稳定剂或防腐剂。任选地,试剂盒可包含治疗剂,例如iAP替代组合物或抗生素,其可以以任何形式提供,例如液体、干燥或冻干形式,优选基本上纯的和/或无菌的。当试剂以液体溶液提供时,液体溶液优选为水溶液。当试剂以干燥形式提供时,重构通常是通过添加合适的溶剂。溶剂,例如无菌水或缓冲液,可以任选地提供在试剂盒中。

[0216] 实施例

[0217] 下面提供实施例以促进对本发明的更完整理解。以下实施例说明了制造和实践本发明的示例性方式。然而,本发明的范围不限于这些实施例中公开的具体实施方案,这些实施例仅用于说明的目的,因为可以利用替代方法来获得类似的结果。

[0218] 实施例1

[0219] 本文描述了用于诊断早产儿常见的获得性胃肠急症的方法。这种疾病(坏死性小肠结肠炎或NEC)发生在12%的早产儿中;30%的NEC患者无法生存。在美国,每年总共有大约5000名婴儿患有NEC。由于非特异性症状,该医疗状况延迟和诊断不佳。需要用于可靠诊断的生物标志物。使用婴儿粪便样品,进行了三种生物标志物测量;对总共三种生物标志物的分类器分析表明,NEC可以通过高总蛋白浓度、低肠碱性(iAP)磷酸酶活性和高水平肠碱性磷酸酶蛋白来诊断。单独通过蛋白质印迹检测肠碱性磷酸酶蛋白与NEC诊断密切相关,并且可以以ELISA形式使用。

[0220] 目前临床上的诊断方法依赖于成像:X射线、CT和超声。放射照相术的诊断成功率最多只有48%。如本文所述的实施方案对于疾病诊断具有93%的真阳性率和95%的真阴性率。如本文所述的实施方案可具有对疾病进行风险评估和监测的潜力。

[0221] 与蛋白质组学工作和质谱法相比,该方法相对快速且便宜。此外,其他专利申请使用血清或尿液;血清是侵入性的,并且需要从非常脆弱的患者身上提取液体,而尿液分析不能直接读出胃肠道不适。

[0222] 实施例2

[0223] 缩写:AP,碱性磷酸酶;DOL,生命天数;iAP,肠碱性磷酸酶;MUP,4-甲基伞形酮基磷酸酯;NBC,朴素贝叶斯分类器;NEC,坏死性小肠结肠炎;WB,蛋白质印迹

[0224] 概要

[0225] 目标:坏死性小肠结肠炎(NEC)是早产儿最常见的胃肠道急症,死亡率和发病率高。由于非特异性症状、不一致的放射学发现和快速恶化,诊断和管理可能困难。进行这项

调查是为了测试粪便肠道碱性磷酸酶(iAP)是否是NEC的特定生物标志物。

[0226] 研究设计:在一项前瞻性、纵向、病例对照研究中,收集了6名NEC患者和12名对照婴儿的连续粪便样品,用于测量总粪便蛋白、iAP活性和通过蛋白质印迹检测iAP蛋白。在基于分类器的分析中,通过个体患者的纵向评估、组间比较和敏感性/特异性评估来评估数据。

[0227] 结果:2组之间的胎龄或出生体重没有显著差异。在纵向随访的2名患者中,粪便蛋白增加,iAP活性降低,并且在NEC发展后,蛋白质印迹检测到iAP蛋白。与对照组相比,NEC患者在诊断时平均粪便蛋白含量更高($p=0.005$),iAP活性更低($p<0.0001$)和蛋白质印迹上的特定iAP蛋白条带强度更高($p=0.002$)。3特征朴素贝叶斯分类器以93%的灵敏度和95%的特异性将NEC与对照样品区分开来。

[0228] 结论:尽管受试者和样品数量有限,但研究结果表明,在NEC期间,粪便蛋白、iAP活性和iAP蛋白质印迹强度会发生特定变化。初步的敏感性和特异性研究表明,三组分生物标志物具有作为NEC非侵入性诊断和监测工具的潜力。

[0229] 引言

[0230] 坏死性小肠结肠炎(NEC)是一种严重的胃肠道炎症性疾病,每年影响>5000名极低出生体重(≤1500g)婴儿。[1,2]它的特点是死亡率高(高达30%)和长期发病率,包括短肠综合征、反复感染、营养缺乏和神经发育迟缓。[3,4]尽管早产儿死亡率总体上净下降,但与NEC相关的死亡人数却有所增加。[5]由于最初的非特异性症状和快速恶化,该疾病通常难以诊断和管理。临床医生依靠放射学证据如肠积气来做出诊断,但据报道这一发现的敏感性低至44%。[6]尽管许多NEC生物标志物正在研究中,[7]目前没有一种在临床实践中得到广泛应用。

[0231] 不受理论的束缚,在粪便中测量的肠碱性磷酸酶(iAP)作为肠病理学的标志物提供诊断价值。这种蛋白质在小肠肠细胞中表达,共同分泌到肠腔和体循环中[8]并通过解毒细菌脂多糖和维持微生物稳态,在维持肠道屏障功能方面发挥不可或缺的作用。[9,10]作为粪便中主要的碱性磷酸酶,[3,4]iAP已被鉴定为核心人类粪便蛋白质组中的57种蛋白质之一。[11]由于其保护作用,已在动物模型中对其作为NEC的潜在治疗方法进行了研究。[12-15]然而,大多数研究并没有将iAP作为一种诊断工具进行评估,只有少数研究在人类中检查了iAP。在这项调查中,我们检查了粪便iAP作为无创监测新生儿NEC发展的潜在生物标志物。据我们所知,这项研究是首次调查人类早产儿粪便iAP水平的研究,以确定其与NEC的关系。

[0232] 方法

[0233] 研究设计和参与者。这项前瞻性、纵向病例对照研究得到路易斯安那州立大学医学院机构审查委员会的批准。它是根据世界医学协会的道德准则(赫尔辛基宣言)进行的。在获得父母的书面知情同意后,18名胎龄23-37周的早产儿被纳入新奥尔良儿童医院和图罗医院。表1显示了6名NEC患者和12名对照婴儿的人口统计学数据。所有患者样品在分析前都进行了去标识化处理。回顾性评估患者记录以确定临床相关性。本研究中没有患者已知染色体异常或先天性异常而无法进行肠内进食。

[0234] 样品收集/制备:在自发排便后从研究受试者的尿布中连续收集粪便样品。粪便在医院标本冰箱中短暂储存,直到用冷藏箱运送到实验室。在最初的处理步骤中,测量了大约200mg的粪便,然后加入无菌分子级水(Sigma Aldrich)以达到200mg/ml的所需浓度。将混合物剧烈涡旋30-60秒,或直到出现充分混合的浆液。然后将混合物在4℃下以22,000xg离

心30分钟。收集上清液并储存在-20℃直到进行测定。

[0235] 蛋白质浓度:粪便上清液中总蛋白质的浓度通过布拉德福德测定法(考马斯加蛋白质测定试剂,Thermo-Scientific)测定,其使用牛血清白蛋白作为标准。

[0236] 变性凝胶电泳和蛋白质印迹:将粪便样品的上清液与6X凝胶上样缓冲液(375mM Tris pH 6.8、50%(w/v)甘油、600mM二硫苏糖醇、420mM十二烷基硫酸钠)混合并煮沸5分钟。变性4-12% Bis-Tris凝胶(Novex,Life Technologies)的每个泳道上样总共10μg的总蛋白。阳性对照是小肠组织裂解物(Abcam)。来自肠粘膜(Sigma Aldrich)的纯化牛碱性磷酸酶用作阴性对照。运行重复的凝胶:一个是考马斯染色的,以显示每个泳道中的所有蛋白质,第二个中的蛋白质被转移到PVDF膜上,用于肠道碱性磷酸酶的免疫印迹检测。将膜在50mM Tris-HCl pH 7.5、150mM NaCl和0.1% Tween中的5%(w/v)脱脂奶中连续封闭,与抗人iAP的兔原代多克隆抗体(Abcam、ab7322或ab198101)一起温育,洗涤,并与辣根过氧化物酶偶联的山羊抗兔二抗(Abcam,ab6721)在室温下温育。使用Pierce ECL蛋白质印迹底物(ThermoScientific)启动化学发光信号,并在显影的照相胶片(AFP Imaging)上捕获。使用Image J对扫描的胶片(BioradGelDoc XR)进行蛋白质印迹密度测定。在数字化蛋白质印迹中,手动识别对应于iAP的60kDa条带。对每个蛋白质印迹的每个泳道定量等效面积。从每个患者样品中减去阴性对照,并将差异计算为阳性对照标准的百分比。

[0237] 粪便iAP催化活性:在iAP抑制剂L-苯丙氨酸存在和不存在的情况下,使用4-甲基伞形酮基磷酸酯(MUP)作为荧光底物(Abcam,ab83371)测量碱性磷酸酶活性。使用Spectra Max M2e分光光度计(Molecular Devices,Sunnyvale,CA)测量360/440nm处的相对荧光单位(RFU)。使用了九十六孔黑色光学底板。为每次板运行准备标准品和阴性对照。总AP活性测定为:AP活性(mU/mL)=(B x稀释因子)/(T x V),其中B是产品的nmol;V是加入孔中的样品体积;T是反应时间;U是在pH 10.0和25℃下每分钟导致1μmol MUP水解的酶量。每天使用时,在分子级水中新鲜制备100mM L-苯丙氨酸储备液(纯度>98%;Sigma Aldrich)。10mM Phe的最终测定浓度用于评估iAP特异性活性的抑制。

[0238] iAP生物标志物分类的统计和计算分析:使用非参数Mann-Whitney U检验测试NEC和对照组之间总粪便蛋白、iAP活性和蛋白质印迹上60kDaiAP条带强度的平均值差异;p值<0.05被认为是显著的。通过敏感性(真阳性率)和特异性(真阴性率)计算,评估潜在的生物标志物功效。在分析的49个独特的粪便样品中,13个是在临床诊断时从NEC患者中获得的。三十六个样品被标记为对照,其中27个来自对照受试者,9个来自健康间隔期间的NEC患者。对于每个感兴趣的变量,最初使用简单的基于阈值的分类器获得特异性和敏感性。随后,使用Python中的scikit-learn包,[16]通过训练朴素贝叶斯分类器(NBC)执行多变量分类器性能。NBC假设每个特征在统计上都是独立的;然而,它可以在多特征分类问题上表现良好,即使在统计独立特征的假设不成立时也是如此。[17]对于每个分类器,我们通过执行五轮分层折刀重采样来计算我们灵敏度和特异性估计的标准误差,其中每轮重采样排除20%的数据。我们使用了一个5折叠分层交叉验证方案,其中,对于每一折叠,NBC在80%的数据上训练,并测试了所得分类器对其余20%数据的敏感性和特异性。

[0239] 结果

[0240] 纵向研究:为了探索这3个粪便参数是否与NEC相关,随着时间的推移观察了两名早产儿,并反复监测了他们的粪便样品。

[0241] 患者1(小图1A)在生命第7天(DOL)被诊断出患有NEC。经过14天的药物治疗,包括肠道休息和抗生素治疗,临床症状和肠积气得到解决。重新开始肠内进食,取得不同程度的成功,直到婴儿在DOL 31时出现复发性NEC和随后的肠穿孔。进行了三种粪便分析:可溶性蛋白浓度、iAP的催化活性和iAP的免疫印迹检测。在DOL 7上获得了两个粪便样品:在NEC诊断之前(7A,小图1A)和当天晚些时候的血便(7B,小图1A)。还提供了来自其他五个粪便样品(DOL 13、20、29、32和42)的数据。

[0242] 对患者1的纵向监测表明,3个候选生物标志物具有诊断价值(小图1A)。DOL 7A粪便样品的蛋白质浓度为1.85mg/mL,催化活性为2218U/g,在蛋白质印迹中没有检测到60kDa的信号。数小时后收集的DOL 7B粪便样品的蛋白质浓度为2.1mg/mL,催化活性为250U/g,并且对iAP进行了明确的免疫检测。NEC发作前后来自同一患者的两个粪便样品的比较表明iAP活性的急剧下降和iAP蛋白的增加是NEC的特征。

[0243] 这些生物标志物也表现出监测价值。在对DOL 7进行初步NEC诊断后,在药物治疗、明显的“恢复”和重新肠内进食期间收集的粪便样品中,低iAP酶活性和高iAP蛋白水平的免疫检测持续存在。婴儿随后在出生第31天再次发生NEC并伴有肠穿孔。结合起来,在蛋白质印迹中粪便蛋白增加、iAP酶活性低和iAP蛋白水平高预示着穿孔。经过10天的治疗,其包括腹膜引流、肠道休息和抗菌治疗,在DOL 42收集的粪便的测定值接近于诊断NEC之前的值。

[0244] 纵向监测还表明了三种候选生物标志物的预后潜力。患者2(小图1B)在DOL 19被诊断为疑似NEC,在恢复肠内进食之前保持“NEC观察”(NEC监测、肠道休息、抗生素)数天。尽管直到DOL 32才对NEC做出明确诊断,但DOL 13和19的粪便样品中有三分之二的生物标志物处于NEC关联的阳性范围内,可能预测NEC。

[0245] 横断面研究:在对从6名NEC和12名对照婴儿收集的粪便材料的调查中,活性NEC患者的粪便样品与对照组的粪便样品之间的3次体外测量存在显著差异(图2)。NEC诊断时患者粪便样品中平均±SEM蛋白浓度为2.62±0.33mg/mL,与受孕后年龄匹配的对照患者粪便样品中发现的0.98±0.25mg/mL水平显著不同(p=0.005,小图2A)。此外,与受孕后年龄匹配的对照组相比,NEC患者在诊断时的平均粪便iAP酶活性低十倍以上(分别地162±30mU/mg vs.1826±376mU/mg,NEC vs.对照,$p<0.0001$,小图2B)。

[0246] 最后,来自2个患者群体的样品在特定iAP蛋白的相对量方面存在显著差异(p=0.002),这是通过用抗人iAP抗体探测的免疫印迹的光密度分析确定的,并表示为标准阳性对照的百分比。我们发现NEC患者的粪便样品中的iAP蛋白比健康早产受试者的样品高出近30倍(分别地215.0±47.6%vs.7.2±2.3%,NEC vs.对照,小图2C)。总之,与健康对照相比,来自NEC婴儿的粪便样品在诊断时总蛋白增加、iAP酶活性降低、iAP蛋白增加。

[0247] 敏感性特异性研究:在3维散点图中(小图3A),来自NEC样品(红色圆圈)的生物标志物独立于对照(黑色圆圈)聚集,表明这些生物标志物可以实现高灵敏度和特异性。尽管存在一些重叠,但即使将总粪便蛋白水平作为变量去除后,区分NEC和对照患者样品的潜力仍然很明显(小图3B)。我们直接使用单变量阈值分类器和朴素贝叶斯分类器(NBC)评估了敏感性和特异性,它们基于所有3个测试的整合对样品进行分类(小图3C)。显然,敏感性和特异性之间存在权衡。如果最大敏感性或真阳性率是主要目标,则3特征NBC生物标志物表现最佳,敏感性为100%,特异性为92%。然而,如果目标是同时最大化敏感性和特异性,那么3特征NBC显示出93%敏感性和95%特异性的性能。当使用300mU/mg iAP活性的阈值时,

单独考虑的iAP活性水平在这种情况下也表现得几乎一样好,敏感性和特异性水平均达到92%。不过,也许不足为奇的是,单独的粪便总蛋白水平并不是NEC的可靠生物标志物。在92%的敏感性下,使用1.35mg/mL的蛋白质阈值时,特异性降至67%。因此,粪便iAP活性水平和60kDa蛋白质印迹强度水平有望单独作为NEC生物标志物候选者。然而,总粪便蛋白活性水平只有在被视为多特征诊断评估的一部分时才可能有用。

[0248] 讨论

[0249] 由于我们目前无法在发生不可逆转的肠道损伤之前准确识别疾病,NEC的诊断和管理变得复杂。仅凭临床参数不能准确预测大多数患者的疾病进展。[18]尽管放射照相术,NEC诊断和分期的基石,[19]在重症监护病房中快速且可及,这种疾病病理学测量提供了定性而非定量的终点。对确定疾病严重程度的可观察放射学体征的解释存在充分证明的可变性。[6,20,21]令人不安的是,只有44%的病理证实的NEC报告了标志性的放射学发现即肠积气[22]。

[0250] 为了更好地了解NEC,例如区分正常和病理生物学过程或监测对临床干预的反应,仍需要以比率或间隔尺度测量的定量标志物。NEC的临床定义可以显著改善,从仅依赖临床印象和成像结果转变为包括可靠的分子生物标志物在内的扩展诊断调色板。鉴定适合在临床实践中采用的分子NEC生物标志物有可能减少新生儿死亡、发病率和相关的医疗保健成本。此外,这些参数的表征可以提供对细胞完整性、蛋白质表达和胃肠代谢变化的深入了解。从血清、尿液、粪便和口腔拭子中获得的NEC候选生物标志物的发现是当前研究的重点。[23-25]

[0251] 我们的研究证明了3个体外粪便参数与患者病理之间的相关性,这与动物研究的结果一致。在NEC患者中测量的总粪便蛋白浓度增加可能与粘膜脱落和疾病相关的炎症产物有关,例如血清淀粉样蛋白A、过敏毒素、C反应性蛋白、血小板激活因子、钙卫蛋白和α-1抗胰蛋白酶。[26-31]在这些基于炎症的生物标志物中,后三种是直接在新生儿粪便样品中测量的。[27,28,32-34]然而,与炎症相关的生物标志物虽然通常与胃肠道病理学相关,但对于NEC诊断并不具有特异性。

[0252] 在我们的研究中,通过蛋白质印迹检测增加的iAP与诊断时NEC患者粪便样品中较低的肠道AP酶活性呈负相关。我们的发现与文献中的其他报告一致。首先,基于酶组织化学分析,来自炎症性肠病患者的活检肠道组织显示出较低的AP活性。[35]其次,在将继续发展为NEC的患者中,血清iAP显示增加;然而,AP水平仅通过凝胶电泳监测,并没有详细说明肠道碱性磷酸酶的阳性检测。[36]第三,在诱导NEC的动物模型中,大鼠回肠末端组织样品显示蛋白质含量、活性和碱性磷酸酶特异性免疫荧光降低。[14,37]最后,在缺血再灌注后,动物模型中也报告了粘膜AP活性降低。[38]黏膜蛋白的脱落增加,包括灭活的iAP,可以解释我们的发现。

[0253] 我们有几个标准来评估我们NEC生物标志物的转化前景。首先,分子特征应该是胃肠道疾病的直接读数并且易于检测。在这项研究中,我们评估了三个候选者:总粪便蛋白、特定iAP活性和iAP的蛋白质印迹带强度。监测粪便中的总蛋白质水平具有病理生理学上的合理性,因为粪便中的高蛋白质水平与未成熟的新生儿肠道黏膜完整性差密切相关,炎症可能会加剧这种黏膜完整性差。iAP作为生物标志物的吸引力在于其在小肠中的组织特异性表达及其分泌到粘液层和肠腔中。[39,40]它也是粪便中大部分AP酶活性的原因[41,42]并已被用作动物模型中小肠毒性损伤的量度。[43,44]我们的所有三个粪便生物标志物候选者在诊断

时NEC患者与对照组受试者之间均显示出显著的平均值差异(图2)。

[0254] 其次,临床上有用的分子生物标志物的基本特征是易于患者样品处理和<3小时的快速周转时间。无菌水中的新鲜重量体积标准化是快速的,需要最少的试剂,并允许储存在便于包装和运输的小型一次性用品中。蛋白质浓度的测量需要不到30分钟。在目前的实施中,iAP酶促检测和蛋白质印迹可以分别在一或两个小时内完成。

[0255] 我们评估NEC生物标志物的第三个标准是优于放射学诊断的潜力。作为参考,WHO儿童疾病综合管理计划制定的临床诊断标准的7参数分析报告显示,85%的敏感性和75%的特异性是高的。[45]肠积气的检测的敏感性仅为44%。[22]相比之下,我们诊断方法的性能数据,包括特定的iAP活性、免疫印迹检测和三参数NBC,很有希望,因为敏感性和特异性都大于90%。我们还注意到,一般来说,与阴性诊断读数相比,阳性诊断读数(例如增加的免疫印迹检测和蛋白质浓度)的标记物性能更稳健:后一种模式更容易受到假阳性(和假阴性)诊断的影响。尽管未来涉及更多患者人群的研究可改变我们的性能数据,但我们得出结论,这种粪便样品分析具有改善NEC预后诊断和后续监测的潜在临床效用。

[0256] 采用我们的粪便生物标志物分析作为NEC诊断工具的挑战是一些粪便样品的异质成分、一些新生儿的间歇性和多变的排便模式,以及缺乏即时、按需的测试结果。然而,我们的3特征粪便生物标志物分析具有所需时间更少、无需特殊培训或专业知识的优势,并且与蛋白质组学或质谱技术相比价格低廉。使该测试适应新生儿重症监护病房中对早产儿的连续、无创监测将提供客观的措施来评估粘膜完整性,帮助评估与进食方案相关的风险,并有助于我们了解NEC。

[0257] 在未来的研究中,我们的朴素贝叶斯分类器方法可以扩展到同时分析iAP酶活性、蛋白质印迹信号和其他候选NEC生物标志物,如粪便钙卫蛋白和血小板激活因子。[7]这些粪便生物标志物可以添加到我们的分类方案中,而无需额外的新生儿患者血液或尿液样品。分析了尿液样品中蛋白质生物标志物区分NEC和败血症患者的分类器性能,确实,与区分NEC和正常患者相比,区分NEC和败血症患者的效率有所降低。[46]如果我们提出的生物标志物方案能够对具有更复杂对照组的更多患者群体保持高敏感性和特异性,那么iAP测量结合其他生物标志物候选者的机器学习分析可能导致NEC诊断和管理的重大进步。

[0258] 本实施例中引用的参考文献

[0259] [1]Fitzgibbons SC,Ching Y,Yu D,Carpenter J,Kenny M,Weldon C,Lillehei C,Valim C,Horbar JD,Jaksic T.Mortality of necrotizing enterocolitis expressed by birth weight categories.JPediatr Surg.2009;44:1072-6。

[0260] [2]González-Rivera R,Culverhouse RC,Hamvas A,Tarr PI,Warner BB.The age of necrotizing enterocolitis onset:an application of Sartwell's incubation period model.J Perinat.2011;31:519-23。

[0261] [3]Yee WH,Soraisham AS,Shah VS,Aziz K,Yoon W,Lee SK,Canadian Neonatal Network.Incidence and timing of presentation of necrotizing enterocolitis in preterm infants.Pediatrics.2012;129:e298-304。

[0262] [4]Young C,Sharma R,Handfield M,Mai V,Neu J.Biomarkers for infants at risk for necrotizing enterocolitis:clues to prevention?Pediatr Res.2009;65:91R-7R。

[0263] [5]Patel RM,Kandefer S,Walsh MC,Bell EF,Carlo WA,Laptook AR,Sanchez PJ,Shankaran S,Van Meurs KP,Ball MB,Hale EC,Newman NS,Das A,Higgins RD,Stoll BJ,Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child H,Human Development Neonatal Research Network.Causes and timing of death in extremely premature infants from 2000 through 2011.N Engl J Med.2015;372:331-40。

[0264] [6]Tam AL,Camberos A,Applebaum H.Surgical decision making in necrotizing enterocolitis and focal intestinal perforation:predictive value of radiologic findings.JPediatr Surg.2002;37:1688-91。

[0265] [7]Chu A,Hageman JR,Caplan MS.Necrotizing enterocolitis:predictive markers and preventive strategies.NeoReviews.2013;14:e113-e20。

[0266] [8]Eliakim R,Mahmood A,Alpers DH.Rat intestinal alkaline phosphatase secretion into lumen and serum is coordinately regulated.BiochimBiophys Acta.1991;1091:1-8。

[0267] [9]LallesJP.Intestinal alkaline phosphatase:multiple biological roles in maintenance of intestinal homeostasis and modulation by diet.Nutr Rev.2010;68:323-32。

[0268] [10]LallesJP.Luminal ATP:the missing link between intestinal alkaline phosphatase,the gut microbiota,and inflammation?Am J PhysiolGastrointest Liver Physiol.2014;306:G824-5。

[0269] [11]Lichtman JS,Marcobal A,Sonnenburg JL,Elias JE.Host-centric proteomics of stool:a novel strategy focused on intestinal responses to the gut microbiota.Mol Cell Proteomics.2013;12:3310-8。

[0270] [12]Biesterveld BE,Koehler SM,Heinzerling NP,Rentea RM,Fredrich K,Welak SR,GourlayDM.Intestinal alkaline phosphatase to treat necrotizing enterocolitis.J Surg Res.2015;196:235-40。

[0271] [13]Riggle KM,Rentea RM,Welak SR,Pritchard KA,Jr.,Oldham KT,GourlayDM.Intestinal alkaline phosphatase prevents the systemic inflammatory response associated with necrotizing enterocolitis.J Surg Res.2013;180:21-6。

[0272] [14]Rentea RM,Liedel JL,Welak SR,Cassidy LD,Mayer AN,Pritchard KA,Jr.,Oldham KT,GourlayDM.Intestinal alkaline phosphatase administration in newborns is protective of gut barrier function in a neonatal necrotizing enterocolitis rat model.JPediatr Surg.2012;47:1135-42。

[0273] [15]Heinzerling NP,Liedel JL,Welak SR,Fredrich K,Biesterveld BE,Pritchard KA,Jr.,GourlayDM.Intestinal alkaline phosphatase is protective to the preterm rat pup intestine.JPediatr Surg.2014;49:954-60。

[0274] [16]Pedregosa F,Varoquaux G,Gramfort A,Michel V,Thirion B,Grisel O,Blondel M,Prettenhofer P,Weiss R,Dubourg V.Scikit-learn:Machine learning in Python.J Machine Learning Research.2011;12:2825-30。

[0275] [17]Rish I.An empirical study of the naive Bayes classifier.IJCAI2001

workshop on empirical methods in artificial intelligence:IBM New York;2001.p.41-6。

[0276] [18]Ji J,Ling XB,Zhao Y,Hu Z,Zheng X,Xu Z,Wen Q,Kastenberg ZJ,Li P,Abdullah F,Brandt ML,Ehrenkranz RA,Harris MC,Lee TC,Simpson BJ,Bowers C,Moss RL,Sylvester KG.A data-driven algorithm integrating clinical and laboratory features for the diagnosis and prognosis of necrotizing enterocolitis.PLoS One.2014;9:e89860。

[0277] [19]Bell MJ,Ternberg JL,Feigin RD,Keating JP,Marshall R,Barton L,Brotherton T.Neonatal necrotizing enterocolitis.Therapeutic decisions based upon clinical staging.Ann Surg.1978;187:1-7。

[0278] [20]Kosloske AM,Musemeche CA,Ball WS,Jr.,Ablin DS,Bhattacharyya N.Necrotizing enterocolitis:value of radiographic findings to predict outcome.AJR Am J Roentgenol.1988;151:771-4。

[0279] [21]Coursey CA,Hollingsworth CL,Wriston C,Beam C,Rice H,Bisset G,3rd.Radiographic predictors of disease severity in neonates and infants with necrotizing enterocolitis.AJR Am J Roentgenol.2009;193:1408-13。

[0280] [22]Ballance WA,Dahms BB,Shenker N,KliegmanRM.Pathology of neonatal necrotizing enterocolitis:a ten-year experience.J Pediatr.1990;117:S6-13。

[0281] [23]Evennett N,Cerigioni E,Hall NJ,Pierro A,Eaton S.Smooth muscle actin as a novel serologic marker of severe intestinal damage in rat intestinal ischemia-reperfusion and human necrotisingenterocolitis.J Surg Res.2014;191:323-30。

[0282] [24]Ng PC,Ma TP,Lam HS.The use of laboratory biomarkers for surveillance,diagnosis and prediction of clinical outcomes in neonatal sepsis and necrotisingenterocolitis.Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.2015;100:F448-52。

[0283] [25]Sylvester KG,Ling XB,Liu GY,Kastenberg ZJ,Ji J,Hu Z,Peng S,Lau K,Abdullah F,Brandt ML,Ehrenkranz RA,Harris MC,Lee TC,Simpson J,Bowers C,Moss RL.A novel urine peptide biomarker-based algorithm for the prognosis of necrotising enterocolitis in human infants.Gut.2014;63:1284-92。

[0284] [26]Pourcyrous M,Korones SB,Yang W,Boulden TF,Bada HS.C-reactive protein in the diagnosis,management,and prognosis of neonatal necrotizing enterocolitis.Pediatrics.2005;116:1064-9。

[0285] [27]Amer MD,Hedlund E,Rochester J,Caplan MS.Platelet-activating factor concentration in the stool of human newborns:effects of enteral feeding and neonatal necrotizing enterocolitis.Biol Neonate.2004;85:159-66。

[0286] [28]Yang Q,Smith PB,Goldberg RN,CottenCM.Dynamic change of fecal calprotectin in very low birth weight infants during the first month of life.Neonatology.2008;94:267-71。

[0287] [29]Tayman C,Tonbul A,Kahveci H,Uysal S,Koseoglu B,Tatli MM,Dilmen U.C5a,a complement activation product,is a useful marker in predicting the severity of necrotizing enterocolitis.Tohoku J Exp Med.2011;224:143-50。

[0288] [30]Cetinkaya M,Ozkan H,Koksal N,Akaci O,Ozgur T.Comparison of the efficacy of serum amyloid A,C-reactive protein,and procalcitonin in the diagnosis and follow-up of necrotizing enterocolitis in premature infants.JPediatr Surg.2011;46:1482-9。

[0289] [31]Ng PC,Ang IL,Chiu RW,Li K,Lam HS,Wong RP,Chui KM,Cheung HM,Ng EW,Fok TF,Sung JJ,Lo YM,Poon TC.Host-response biomarkers for diagnosis of late-onset septicemia and necrotizing enterocolitis in preterm infants.J Clin Invest.2010;120:2989-3000。

[0290] [32]Rabinowitz SS,Dzakpasu P,Piecuch S,Leblanc P,Valencia G,Kornecki E.Platelet-activating factor in infants at risk for necrotizing enterocolitis.J Pediatr.2001;138:81-6。

[0291] [33]Moussa R,Khashana A,Kamel N,ElsharqawySE.Fecal calprotectin levels in preterm infants with and without feeding intolerance.JPediatr(Rio J).2016。

[0292] [34]Shulman RJ,Buffone G,Wise L.Enteric protein loss in necrotizing enterocolitis as measured by fecal alpha 1-antitrypsin excretion.J Pediatr.1985;107:287-9。

[0293] [35]Tuin A,Poelstra K,de Jager-Krikken A,Bok L,Raaben W,Velders MP,Dijkstra G.Role of alkaline phosphatase in colitis in man and rats.Gut.2009;58:379-87。

[0294] [36]Kampanatkosol R,Thomson T,Habeeb O,Glynn L,Dechristopher PJ,Yong S,Jeske W,Maheshwari A,Muraskas J.The relationship between reticulated platelets,intestinal alkaline phosphatase,and necrotizing enterocolitis.JPediatr Surg.2014;49:273-6。

[0295] [37]Whitehouse JS,Riggle KM,Purpi DP,Mayer AN,Pritchard KA,Jr.,Oldham KT,GourlayDM.The protective role of intestinal alkaline phosphatase in necrotizing enterocolitis.J Surg Res.2010;163:79-85。

[0296] [38]Sisley AC,Desai TR,Hynes KL,Gewertz BL,DudejaPK.Decrease in mucosal alkaline phosphatase:a potential marker of intestinal reperfusion injury.J Lab Clin Med.1999;133:335-41。

[0297] [39]Goldberg RF,Austen WG,Jr.,Zhang X,Munene G,Mostafa G,Biswas S,McCormack M,Eberlin KR,Nguyen JT,Tatlidede HS,Warren HS,Narisawa S,Millan JL,HodinRA.Intestinal alkaline phosphatase is a gut mucosal defense factor maintained by enteral nutrition.Proc Natl Acad Sci U S A.2008;105:3551-6。

[0298] [40]Shifrin DA,Jr.,McConnell RE,Nambiar R,Higginbotham JN,Coffey RJ,TyskaMJ.Enterocyte microvillus-derived vesicles detoxify bacterial products

and regulate epithelial-microbial interactions.Curr Biol.2012;22:627-31。

[0299] [41]Horrigan FD,DanovitchSH.The origin of human fecal alkaline phosphatase.Am J Dig Dis.1974;19:603-8。

[0300] [42]Malo MS.A high level of intestinal alkaline phosphatase is protective against type 2 diabetes mellitus irrespective of obesity.EBioMedicine.2015;2:2016-23。

[0301] [43]Lehmann FG,Hufnagel H,Lorenz-Meyer H.Fecal intestinal alkaline phosphatase:a parameter for toxic damage of the small intestinal mucosa.Digestion.1981;21:156-62。

[0302] [44]Thomas DW,HentonDH.The use of fecal alkaline phosphatase as an indicator of intestinal damage.Digestion.1985;31:82-8。

[0303] [45]Group YICSS.Clinical signs that predict severe illness in children under age 2 months:a multi-centrestudy.The Lancet.2008;371:135-42。

[0304] [46]Sylvester KG,Ling XB,Liu GY,Kastenberg ZJ,Ji J,Hu Z,Wu S,Peng S,Abdullah F,Brandt ML,Ehrenkranz RA,Harris MC,Lee TC,Simpson BJ,Bowers C,Moss RL.Urine protein biomarkers for the diagnosis and prognosis of necrotizing enterocolitis in infants.J Pediatr.2014;164:607-12e1-7。

[0305] 实施例3

[0306] 引言

[0307] 坏死性小肠结肠炎(NEC)是一种极其严重的胃肠道炎症性疾病,主要影响早产儿。它发生在高达10％的极低出生体重婴儿(出生时≤1500g)中,其特点是死亡率高(高达30％)和显著的长期发病率,包括婴儿短肠综合征、反复感染、肠外营养相关的胆汁淤积、营养缺乏和神经发育迟缓(1)。尽管新生儿学领域取得了进展,但NEC还是导致极早产儿死亡人数增加的原因(2)。该疾病的确切原因仍未得到很好的了解,这使得诊断和管理成为一项挑战。病程通常包括最初的非特异性症状和快速的临床恶化。虽然目前正在研究许多生物标志物作为诊断NEC的潜在助手,但没有一种被广泛用于确定受攻击肠道的真实完整性(3)。

[0308] 肠道碱性磷酸酶(iAP)已成为研究胃肠道疾病的一种酶。由近端小肠中的肠细胞产生和分泌,在整个小肠和大肠中都发现了iAP活性(4)。它是在粪便中检测到的主要碱性磷酸酶(AP)(5,6)。它具有多种功能,例如裂解革兰氏阴性菌产生的脂多糖(LPS)和干扰肠道中Toll样受体的激活(7)。它使ATP去磷酸化,并已显示通过这种相互作用影响微生物稳态(8)。

[0309] 由于涉及肠道稳态的如此广泛的功能,人们可能会期望NEC中的iAP发生改变。在大鼠中,Biesterveld等人证明在诱导NEC期间内源性iAP催化活性降低,随后在从损伤中恢复期间增加(9)。Lehmann和Lorenz Meyer观察到大鼠小肠毒性损伤后粪便iAP增加,随后粪便iAP显著减少(10)。他们建议粪便iAP可用作小肠毒性损伤的参数(10)。Thomas和Henton后来研究了使用粪便iAP作为肠道损伤的潜在标志物,但发现差异很大(11)。他们建议采用纵向方法来确定临床有效性(11)。补充iAP已被证明可以减轻一些与NEC相关的全身炎症反应(9,12,14)。最近的一项研究提出血清iAP作为潜在的生物标志物,并发现后来发展为NEC

的婴儿有高iAP水平的趋势(15)。这些观察结果表明iAP可能是NEC有用的生物标志物的假设。

[0310] 我们研究的重点是确定粪便iAP是否可以用作NEC的诊断工具。与已经接受多次血清学检查的早产新生儿的血清测量相比,粪便iAP测量的侵入性更小。迄今为止,尚未发表任何研究调查人类新生儿粪便iAP及其与NEC的关系。我们假设粪便iAP可用作诊断NEC和确定疾病后监测NEC病程的客观和特异性生物标志物。

[0311] 方法的发展

[0312] 在准备这项研究时,我寻求并获得了机构委员会审查的批准。我设计了一份知情同意书,总共招募了20名婴儿。我寻求NICU护士的帮助来帮助收集,并提出了可以保护患者隐私的标签系统。前瞻性收集粪便样品,并回顾性审查图表以确定临床相关性。关于粪便iAP测量的文献很少。我找到了一篇参考文献,描述了如何将大鼠粪便物与水混合,然后离心以获得上清液16,因此我继续采用类似的方法来处理人类粪便样品。我们确定200mg测量的粪便足以轻松收集上清液和定量蛋白质。粪便的稠度变化很大,使得湿重成为一个不可靠的参数。粪便总蛋白含量(由布拉德福德测定确定)用于标准化iAP测量。

[0313] 为了确认粪便中IAP的存在,我们选择了蛋白质印迹(WB)作为初始测定。令人惊讶的是,在我们的健康对照中,粪便中蛋白质的阳性检测极其困难。事实上,分析了10多个产生阴性结果的样品,其没有条带信号或信号位于远低于预期的位置。最初,我们认为我们的阴性结果是由于处理和/或存储失败造成的。然而,即使是当天对新鲜获得的粪便样品进行的测量,也没有在蛋白质印迹上产生抗iAP抗体识别蛋白质的证据。只有在分析了我们的第一个NEC患者的粪便样品后,我们才在蛋白质印迹上发现了全长蛋白质的证据。当我们招募了第二位NEC患者时,我们再次在WB上定位iAP时获得了阳性结果。

[0314] 至少在一些实验中确定WB上iAP蛋白的存在使我们有信心继续我们的研究。然后我们进行了实验以确定理想的处理和存储技术。我们将一些样品在4℃的冰箱中放置数天,在冰箱中放置5天后,蛋白质没有明显降解。蛋白质印迹显示抗iAP对iAP的持续阳性检测。酶活性测量显示每天的变化最小。我们还在-20℃下冷冻了我们的上清液,但确定在医院的冰箱中短期储存是可以接受的。

[0315] 我们认为需要200mg粪便才能产生可靠的结果。在一个案例中,虽然我们在NEC诊断时仅收集了10mg粪便,但我们仍然能够在蛋白质印迹上证明粪便iAP的强条带,表明即使有少量粪便可用,该测试也是有用的。

[0316] 我们选择荧光测定法来测量活性,因为它比比色法更灵敏(检测灵敏度约为1μU)(17)。我们惊讶地发现,即使在WB上没有产生信号的样品中,也有碱性磷酸酶活性的证据。由于我们的荧光活性测定对肠道碱性磷酸酶没有特异性,粪便中的其他碱性磷酸酶可能导致WB和活性测定之间的差异。我们的下一组研究旨在通过在存在和不存在L-苯丙氨酸(L-Phe)(一种iAP的特异性抑制剂)的情况下进行样品测定来测量iAP的实际活性(4,18)。L-Phe阻断了NEC患者样品中90％±10％(SD)的AP活性和对照组样品中91％±9％(SD)的AP活性,表明iAP是在研究的粪便样品中碱性磷酸酶活性的主要贡献者(图5)。这一发现与之前的报告(3,4)一致,证实iAP是粪便中最常见的AP。

[0317] 方法

[0318] 研究设计和参与者——这是一项前瞻性病例-对照研究。在获得父母知情同意后,

20名胎龄(WGA)23-37周的早产儿被纳入新奥尔良儿童医院和图罗医院。6名婴儿患有贝尔分期(19)定义的NEC。排除无法进食的已知染色体异常或先天性异常的婴儿。由于处理方式不同,来自2名受试者的粪便样品被排除在统计分析之外。其余18名受试者(6名NEC患者和12名对照者)的人口统计学数据见表1。粪便的处理——在自发排便后从研究受试者的尿布中连续收集粪便样品。粪便在医院的标本冰箱中短暂储存。样品在冷藏箱中运输到实验室进行初步处理。在可能的情况下,测量出大约200mg粪便,并加入分子级水以达到200mg/ml的所需浓度。将混合物剧烈涡旋30秒至1分钟,或直到出现充分混合的浆液。然后将混合物在4℃下以22,000xg离心30分钟。收集上清液并储存在-20℃直到进行测定。

[0319] 蛋白质浓度的测定-粪便上清液中的总蛋白质浓度通过布拉德福德测定法(考马斯加蛋白质测定试剂,Thermo-Scientific)测定,其使用牛血清白蛋白作为标准。

[0320] 变性凝胶电泳和蛋白质印迹-将粪便样品的上清液与凝胶上样缓冲液(375mM Tris pH 6.8、50%(w/v)甘油、600mM二硫苏糖醇、420mM十二烷基硫酸钠)混合,然后煮沸5分钟。预制变性4-12% Bis-Tris凝胶(Novex,Life Technologies)的每个泳道上样总共10微克的总蛋白。运行重复的凝胶。一块凝胶用考马斯染色,另一块凝胶电印迹到聚偏二氟乙烯膜(PVDF)上,并在5%脱脂奶粉中用Tris缓冲盐水和Tween 20(50mM Tris HCl,150mM NaCl,Tween 20)封闭。PVDF与全长人iAPab7322/ab198101(Abcam)的一抗和辣根过氧化物酶缀合的山羊抗兔二抗ab6721(Abcam)一起温育。我们使用Pierce ECL蛋白质印迹底物(Thermo-scientific)作为化学发光的过氧化物酶底物。显影剂(AFP Imaging;Mount Kisco,NY)用于在WB后生产胶片,成像仪(Biorad Gel-Doc XR;Hercules,CA)用于扫描蛋白质印迹和凝胶。进行密度测定以分析蛋白质印迹的数字化图像。我们在蛋白质印迹上手动识别了60kDa的条带,这对应于肠道碱性磷酸酶。然后我们计算了每个60kDa条带相对于背景的面积,然后将该值表示为阳性对照的百分比。阳性对照是肝细胞癌全细胞裂解物或小肠组织裂解物(Abcam)。来自肠粘膜(Sigma Aldrich)的纯化牛碱性磷酸酶用作阴性对照。

[0321] 粪便iAP活性-使用4-甲基伞形酮基磷酸酯作为荧光底物ab83371(Abcam)确定碱性磷酸酶活性。进行底物背景控制和背景控制以提高准确性。使用Spectra Max M2e分光光度计(Molecular Devices,Sunnyvale,CA)测量360/440nm波长处的相对荧光单位(RFU)。使用了九十六孔黑色光学底板。每次进行检测时都准备样品、标准品和阴性背景对照的反应孔,并使用以下方法确定总碱性磷酸酶活性:

[0322] ALP活性(mU/ml)=(B/T)/Vx稀释因子

[0323] 其中B是4-甲基伞形酮(4-MU)的nmol,V是加入孔中的样品体积,T是反应时间。U是在pH 10.0和25℃(甘氨酸缓冲液)下每分钟导致1μmol产物水解的酶量。在分子级水中新鲜制备100mM L-苯丙氨酸储备液(纯度>98%;Sigma Aldrich),每天进行测定。将最终浓度为10mM的L-Phe添加到每个孔中以抑制iAP活性。

[0324] iAP生物标志物分类的计算和统计分析-由于粪便处理的一致性和相似的胎龄,我们在粪便蛋白和粪便iAP数据集的分析中纳入了18名婴儿。使用非参数Mann-Whitney U检验(GraphPad Instat v.3;La Jolla,CA)测试NEC和对照组之间总粪便蛋白、iAP活性和WB上iAP蛋白条带强度的平均值差异。线性回归分析用于确定完全进食前的天数与总粪便蛋白之间以及完全进食前的天数与iAP活性之间的相关性(GraphPad Prism v7;La Jolla,CA)。P值小于0.05被认为是显著的。Igor Pro(Lake Oswego,OR)用于生成图10。

[0325] 单独的数据子集用于51个粪便样品(来自6个NEC患者和7个对照),我们可以测量其特定iAP活性、WB和粪便蛋白。对于蛋白质印迹条带强度和总粪便蛋白水平,我们分析了这些测量值的分布,并研究了这些测量值在用作预后和诊断生物标志物时的敏感性和特异性。敏感性相当于分类器的真阳性率,而特异性是1-分类器的FPR(假阳性率)。对于我们感兴趣的三个变量中的每一个,我们首先研究了使用基于简单阈值的分类器获得的特异性和敏感性。对于这些分类器中的每一个,我们通过执行五轮折刀重采样来计算我们的敏感性和特异性估计的标准误差,其中20%的数据被排除在每轮重采样的敏感性和特异性估计之外。我们的数据在重采样过程中按类别标签分层,因此每轮重采样6-7个对照样品和3-4个NEC样品(每类总数的20%)被排除在分析之外。

[0326] 在研究了单变量分类器之后,我们通过使用Python中的scikit-learn包训练朴素贝叶斯分类器(NBC)来探索多变量分类器的效用(20)。朴素贝叶斯分类器假设分类中使用的每个特征在统计上都是独立的(21)。对于我们的三个特征(iAP活性水平、总蛋白和WB强度),这种朴素的假设是不正确的。然而,机器学习社区的先前工作表明,即使统计独立特征的假设不成立,NBC也可以在多特征分类问题上表现良好(21)。为了避免多特征分类器的过度拟合,我们使用了一个5折叠分层交叉验证方案,其中,对于每一折叠,NBC在80%的数据上训练,然后在剩余的20%上测试所得分类器数据以估计敏感性和特异性。

[0327] 结果

[0328] 与来自孕龄和实际年龄大致匹配的对照的多个样品相比,诊断时NEC患者的粪便具有降低的iAP活性(图7)、增加的总粪便蛋白(图8)和增加的iAP蛋白检测(图9)。与平均对照相比,在诊断NEC时粪便iAP活性较低。当应用Mann-Whitney检验时,各组之间存在统计学显著性。粪便iAP活性的平均值为184mU/mg,测量标准误差(SEM)为34,而对照组为1932mU/mg,SEM为433($P<0.0001$)。这如图2所示。

[0329] 我们发现NEC患者在诊断时的粪便蛋白含量显著高于受孕后年龄的匹配对照。我们对29-43PCA之间的个体非NEC患者的蛋白质含量进行了平均,并将其与NEC诊断时的患者粪便样品进行了比较,总共6名患者发生了7事件(图3)。非参数检验(Mann-Whitney)用于比较非正态分布的数据,各组之间存在统计学上的显著差异($P=0.005$)。在NEC患者样品中,诊断时的平均值为2.62,SEM为0.33,而平均对照中的平均值为0.98,SEM为0.25。

[0330] 使用6名患者和7名对照患者的7次NEC事件按阳性对照的百分比进行WB量化。NEC患者样品中的平均WB百分比为193%,而对照组为6%($P=0.0022$)。NEC的测量标准误差为45,而对照组的为1.9。(图4)。

[0331] 我们选择用于蛋白质印迹分析的抗体不容易检测到粪便中的iAP,除了NEC的情况。2名NEC患者的纵向观察结果如图10小图A和图10小图B所示。小图A突出显示NEC病程延长、随后穿孔的早产儿。它显示了初始NEC诊断时iAP活性急剧下降和WB上iAP蛋白的出现、持续低iAP活性和初始治疗期间WB上iAP蛋白的证据,直到随后的穿孔。Penrose引流管放置和肠道休息十天后,WB上不再有高iAP蛋白的证据,但粪便iAP活性增加。小图B突出显示了在NEC之前具有多个NEC监测事件(一个事件由绿点表示)的不同婴儿。怀疑的NEC事件与WB上iAP蛋白的证据有关,但iAP活性正常。这在NEC时iAP活性急剧下降和WB上出现高iAP蛋白之前解决。从NEC进行医疗管理和恢复后,iAP活性增加,WB上不再有iAP蛋白。图10小图C显示了3组样品,每组样品由与密切匹配的对照组的粪便相比的NEC患者在诊断时的粪便组

成。第1组和第2组清楚地显示总粪便蛋白增加、iAP活性降低以及WB上iAP蛋白的证据。在第3组中,iAP活性和总粪便蛋白没有显著差异,但蛋白质印迹清楚地区分NEC和对照样品。图10小图D显示了4名不同NEC患者在诊断之前和诊断时的粪便。使用每个患者作为他或她自己的对照,NEC的诊断与iAP活性降低、总粪便蛋白增加和WB上iAP蛋白的证明有关。

[0332] 图11小图A是3D散点图,显示了NEC样品和对照的粪便iAP活性、粪便蛋白和WB数据点。NEC样品以红色标记。图11小图B描绘了显示iAP活性和WB百分比的2D散点图。对照中有高活性和低WB百分比。尽管样品量和患者数量少,但将所有3种生化分析结合起来提高了观察到的敏感性和特异性。图11小图C通过描述多个阈值和多个特征选择的敏感性和特异性之间的权衡,展示了同时检查多个特征的效用。对于10%阳性对照条带强度的检测阈值,单独考虑的蛋白质印迹强度在100%敏感性和70%特异性下表现最佳。但是,如果不需要100%敏感性并且目标是同时最大化敏感性和特异性,那么3特征朴素贝叶斯分类器的性能最佳,敏感性达到95%,特异性达到93%。当使用300mU/mg iAP活性的阈值时,单独考虑的iAP活性水平在这种情况下也表现得几乎一样好,敏感性水平为95%和特异性为91%。当以95%的敏感性单独考虑蛋白质印迹强度水平时,使用30%阳性对照条带强度阈值的特异性水平为88%。然而,也许不足为奇,单独的总粪便蛋白水平并不是NEC特有的。为了使总粪便蛋白水平达到95%的敏感性,特异性必须使用1.02mg/mL的内插阈值降至44%。因此,粪便iAP活性水平和60kDa蛋白质印迹强度水平有望单独作为NEC生物标志物候选者。

[0333] 根据达到目标肠内进食量所需的天数来定义,在进食不耐受的对照组中,有明显的粪便蛋白升高趋势(图12)。在iAP活性中可以看到相反的趋势,尽管这种关联不那么显著。

[0334] 粪便的异质性可能干扰测试的可靠性。在一个特定的不均质粪便中,含有粘液的部分(图13中的A)类似于其他NEC样品,而粪便的更固体部分(图13中的B)在WB上的iAP蛋白和iAP活性方面类似于对照。

[0335] 讨论

[0336] 在我们的研究中,我们观察到NEC患者在诊断时粪便总蛋白、WB测定的iAP蛋白和粪便中iAP活性的变化。NEC患者在诊断时粪便中的高蛋白质水平可以反映已经不成熟的肠道中粘膜完整性的丧失以及与该疾病相关的炎症产物。Shulman等人显示出类似的趋势,其中与对照组相比,NEC诊断时粪便中的α1抗胰蛋白酶显著增加(22)。

[0337] 肠道碱性磷酸酶主要在小肠的顶端肠细胞中表达,使其成为定位胃肠道疾病(如NEC)的理想的、相对特异性的候选生物标志物。它紧密粘附在膜上,但也会脱落到腔(4)中。Shifrin等人最近证明了iAP通过微绒毛囊泡脱落分布到粘液层和肠腔中(23)。在炎症损伤和肠坏死期间,粘膜屏障的破坏和细胞死亡以及粘膜内层的脱落会导致粘膜蛋白如iAP释放到粪便中增加。蛋白质印迹上iAP信号的稀有性,但对照受试者粪便中的高iAP活性仍不清楚。也许正常的脱落过程会以一种不允许我们特定抗体识别的方式改变游离的腔内iAP结构。该抗体的免疫原是来自小肠组织的全长天然人iAP,并且它对膜结合全长蛋白可能更敏感。或者,有2种已知的iAP同工酶,即经历发育变化的胎儿和成人形式(24,25)。NEC炎症可能与我们抗体识别的同工酶的产生有关,而在正常条件下产生的iAP是另一种未被识别的同工酶。在任何情况下,WB结果的差异都高度暗示健康和疾病状态之间粪便IAP的构象差异。

[0338] 我们在NEC诊断时从NEC患者的粪便样品中发现的整体粪便iAP活性突然降低在诱导NEC的大鼠幼崽中也同样发现(13,26)。Whitehouse等人通过肠道组织学和回肠末端组织取样证明组织iAP蛋白和活性降低(26)。在组织水平上用于解释iAP蛋白和活性降低的细胞损失和假定的肠腔脱落也有助于解释NEC患者粪便中iAP蛋白增加和活性降低。有趣的是,发现患有炎症性肠病的成年患者在活检的肠组织中表现出较低的AP活性(27)。

[0339] NEC时iAP活性低的机制似乎不是由于初始缺陷,因为我们观察到一些NEC患者的活性从正常水平迅速下降。iAP酶活性的丧失可以反映对酶催化位点的损害。在动物模型中,Sisley等人证明缺血再灌注后粘膜AP活性降低,并表明金属结合位点可能更容易受到氧化损伤(28)。

[0340] 粪便iAP活性的下降伴随着WB上粪便iAP蛋白的相应突然出现有时发生在诊断前几小时。这一观察结果表明,使用活性测定和蛋白质印迹检测iAP可以提供初始事件的诊断价值。在可以通过传统方法(血便、肠积气等)轻松识别NEC的情况下,这种额外的生物标志物几乎没有提供好处。然而,对于亚临床疾病患者或缺乏明确影像学证据的患者,使用粪便iAP最有利于确诊。尽管被认为是NEC的特征,但Ballance等人表明,在NEC患者群体中,只有48%的病理证实实际上存在肠积气(29)。粪便iAP也可用于NEC恢复期间,以衡量肠道的完整性并指导我们最脆弱的患者群体的进食策略,并确定恢复所需的时间长度。不受理论的束缚,一些儿童的需求可以从被认为是标准管理的7-14天的治疗变化。

[0341] 这些生物标志物甚至可用于没有NEC的患者。我们观察到进食不耐受和完全肠内进食延迟实现的对照婴儿具有较高的总粪便蛋白和较低的iAP活性的趋势。对进食耐受良好的对照婴儿表现出低总粪便蛋白和非常高的iAP活性。我们还没有关于通过WB是否存在iAP蛋白的信息,因为它与进食不耐受有关。如果这一点得到更大规模研究的证实,将提供更多动力去探索在这些情况下补充iAP的潜在益处。需要更多的研究来确定所有孕龄和实际年龄的每个参数的正常值,并确定可能影响它们的饮食和其他因素。

[0342] 没有方法是没有限制的。粪便iAP检测的一个潜在混杂因素是粪便的异质性。我们在NEC诊断时收集了一份粪便样品,其具有两种不同的稠度,即粘液和正常出现的粪便。我们将这些部分分开,正常出现的粪便具有与对照相似的结果,而含有粘液的部分在蛋白质印迹上具有预期的低iAP活性和高iAP信号(图13)。由于粪便准备的差异很大,我们没有在我们的分析中包括这些数据点。这是唯一存在此问题的样品,发生频率未知。我们面临的另一个挑战是与早产相关的不频繁和零星的排便模式,这不允许受试者之间有准确的标准化收集时间。在临床领域,仅依靠粪便样品可能会因排便不良而导致诊断延迟。没有生物标志物可以替代良好的体检和临床专业知识。粪便iAP作为生物标志物的最佳用途可能是作为建立NEC诊断、监测疾病进展以及监测或监视高危人群的辅助手段。

[0343] 在我们对与肠道碱性磷酸酶相关的3个潜在NEC生物标志物的检查中,我们已经证明粪便样品分析具有改善坏死性小肠结肠炎诊断的潜在临床效用。我们已经表明,当独立考虑时,特定的iAP活性水平和蛋白质印迹条带强度都可以用于以高敏感性和特异性识别NEC患者粪便样品。我们还表明,可以使用朴素贝叶斯分类器组合多个特征,以同时实现更好的敏感性和特异性水平。此外,在未来的工作中,我们的朴素贝叶斯分类器方法可以扩展到同时分析iAP活性、蛋白质印迹条带强度和多种其他候选NEC生物标志物,这些都超出了当前研究的范围。

[0344] 结论

[0345] WB上的粪便iAP蛋白和总粪便蛋白增加,但NEC患者在诊断时粪便iAP活性降低。WB对iAP蛋白的测量、iAP活性和粪便蛋白量是单独有用的生物标志物,但通过组合3个参数可以提高诊断的敏感性和特异性。需要更多的研究来单独和组合确定每个测定的敏感性和特异性。

[0346] 本实施例中引用的参考文献

[0347] 1Neu,J.&Walker,W.A.Necrotizing enterocolitis.NEngl J Med 364,255-264,doi:10.1056/NEJMra1005408(2011)。

[0348] 2Patel,R.M.et al.Causes and timing of death in extremely premature infants from 2000 through 2011.N Engl J Med 372,331-340,doi:10.1056/NEJMoa1403489(2015)。

[0349] 3Ng,P.C.,Chan,K.Y.&Poon,T.C.Biomarkers for prediction and diagnosis of necrotizing enterocolitis.ClinPerinatol40,149-159,doi:10.1016/j.clp.2012.12.005(2013)。

[0350] 4Goldberg,R.F.et al.Intestinal alkaline phosphatase is a gut mucosal defense factor maintained by enteral nutrition.Proc Natl Acad Sci U S A 105,3551-3556,doi:10.1073/pnas.0712140105(2008)。

[0351] 5Horrigan,F.D.&Danovitch,S.H.The origin of human fecal alkaline phosphatase.Am J Dig Dis 19,603-608(1974)。

[0352] 6 Malo,M.S.A High Level of Intestinal Alkaline Phosphatase Is Protective Against Type 2Diabetes Mellitus Irrespective of Obesity.EBioMedicine2,2016-2023,doi:10.1016/j.ebiom.2015.11.027(2015)。

[0353] 7 Fawley,J.&Gourlay,D.M.Intestinal alkaline phosphatase:a summary of its role in clinical disease.J Surg Res 202,225-234,doi:10.1016/j.jss.2015.12.008(2016)。

[0354] 8 Malo,M.S.et al.Intestinal alkaline phosphatase promotes gut bacterial growth by reducing the concentration of luminal nucleotide triphosphates.Am J PhysiolGastrointest Liver Physiol306,G826-838,doi:10.1152/ajpgi.00357.2013(2014)。

[0355] 9 Biesterveld,B.E.et al.Intestinal alkaline phosphatase to treat necrotizing enterocolitis.J Surg Res 196,235-240,doi:10.1016/j.jss.2015.02.030(2015)。

[0356] 10 Lehmann,F.G.,Hufnagel,H.&Lorenz-Meyer,H.Fecal intestinal alkaline phosphatase:a parameter for toxic damage of the small intestinal mucosa.Digestion21,156-162(1981)。

[0357] 11 Thomas,D.W.&Henton,D.H.The use of fecal alkaline phosphatase as an indicator of intestinal damage.Digestion31,82-88(1985)。

[0358] 12 Riggle,K.M.et al.Intestinal alkaline phosphatase prevents the systemic inflammatory response associated with necrotizing enterocolitis.J

Surg Res 180,21-26,doi:10.1016/j.jss.2012.10.042(2013)。

[0359] 13 Rentea,R.M.et al.Intestinal alkaline phosphatase administration in newborns is protective of gut barrier function in a neonatal necrotizing enterocolitis rat model.JPediatr Surg 47,1135-1142,doi:10.1016/j.jpedsurg.2012.03.018(2012)。

[0360] 14 Heinzerling,N.P.et al.Intestinal alkaline phosphatase is protective to the preterm rat pup intestine.JPediatr Surg 49,954-960;discussion 960,doi:10.1016/j.jpedsurg.2014.01.031(2014)。

[0361] 15 Kampanatkosol,R.et al.The relationship between reticulated platelets,intestinal alkaline phosphatase,and necrotizing enterocolitis.JPediatr Surg 49,273-276,doi:10.1016/j.jpedsurg.2013.11.037(2014)。

[0362] 16 Malo,M.S.et al.Intestinal alkaline phosphatase preserves the normal homeostasis of gut microbiota.Gut59,1476-1484,doi:10.1136/gut.2010.211706(2010)。

[0363] 17 Porstmann,B.,Porstmann,T.,Nugel,E.&Evers,U.Which of the commonly used marker enzymes gives the best results in colorimetric and fluorimetric enzyme immunoassays:horseradish peroxidase,alkaline phosphatase or beta-galactosidase?J Immunol Methods 79,27-37(1985)。

[0364] 18 McLachlan,R.,Coakley,J.,Murton,L.&Campbell,N.Plasma intestinal alkaline phosphatase isoenzymes in neonates with bowel necrosis.J Clin Pathol46,654-659(1993)。

[0365] 19 Uauy,R.D.et al.Necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants:biodemographic and clinical correlates.National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network.JPediatr119,630-638(1991)。

[0366] 20 Pedregosa,F.V.G.,Gramfort A,et al..Scikit-learn:Machine learning in{P}ython.J Mach Learn Res 12,2825-2830(2011)。

[0367] 21 Rish,I.An empirical study of the Naive Bayes Classifier IJCAI 2001Work Empir Methods ArtifIntell22230,41-46(2001)。

[0368] 22 Shulman,R.J.,Buffone,G.&Wise,L.Enteric protein loss in necrotizing enterocolitis as measured by fecal alpha 1-antitrypsin excretion.JPediatr107,287-289(1985)。

[0369] 23 Shifrin,D.A.,Jr.et al.Enterocyte microvillus-derived vesicles detoxify bacterial products and regulate epithelial-microbial interactions.Curr Biol 22,627-631,doi:10.1016/j.cub.2012.02.022(2012)。

[0370] 24 Mulivor,R.A.,Hannig,V.L.&Harris,H.Developmental change in human intestinal alkaline phosphatase.Proc Natl Acad Sci U S A 75,3909-3912(1978)。

[0371] 25 Vockley,J.,Meyer,L.J.&Harris,H.Differentiation of human adult and

fetal intestinal alkaline phosphatases with monoclonal antibodies.Am J Hum Genet 36,987-1000(1984)。

[0372] 26 Whitehouse,J.S.et al.The protective role of intestinal alkaline phosphatase in necrotizing enterocolitis.J Surg Res 163,79-85,doi:10.1016/j.jss.2010.04.048(2010)。

[0373] 27 Tuin,A.et al.Role of alkaline phosphatase in colitis in man and rats.Gut58,379-387,doi:10.1136/gut.2007.128868(2009)。

[0374] 28 Sisley,A.C.,Desai,T.R.,Hynes,K.L.,Gewertz,B.L.&Dudeja,P.K.Decrease in mucosal alkaline phosphatase:a potential marker of intestinal reperfusion injury.J Lab Clin Med 133,335-341(1999)。

[0375] 29 Ballance,W.A.,Dahms,B.B.,Shenker,N.&Kliegman,R.M.Pathology of neonatal necrotizing enterocolitis:a ten-year experience.JPediatr117,S6-13(1990)。

[0376] 实施例4

[0377] 概要:

[0378] 对早产儿粪便进行的三种不同生化测试的结果按受孕后年龄分组,这样可以比较早产儿和足月儿的肠道发育。粪便中相对iAP含量的测量是肠道感染的生物标志物。iAP活性的测量是早产儿肠道成熟的生物标志物。粪便蛋白浓度的测量与肠道炎症反应或疾病状态相关。

[0379] 综述和结果:

[0380] 坏死性小肠结肠炎(NEC)是一种多因素疾病,主要影响早产儿,并且是极早产儿晚期死亡和发病的主要原因(Caplan,2008;Christensen等,2010)。尽管NEC的病因尚不明确(Dominguez和Moss,2012;Gephart等,2012),但NEC被认为代表肠道中的严重炎症性疾病(Balance等,1990;Zhang等,2011)。未成熟肠道对环境损伤的过度炎症反应是NEC的标志(Chan等,2009)。具体而言,已表明LPS/TLR4信号水平的增加有助于NEC的发病机制(Chan等人,2009;Fusunyan等人,2001;Leaphart等人,2007;Nanthakumar等人,2011)。在动物模型中,LPS/TLR4信号传导的抑制可减轻肠道炎症并减轻NEC病理(Chan等人,2009;Gribar等人,2009)。

[0381] 肠道碱性磷酸酶(iAP)是先天肠道免疫的重要组成部分。这种酶通常固定在肠道刷状缘上,可以裂解磷酸基团,因此可以使脂多糖(LPS)去磷酸化。LPS去磷酸化抑制有效的信号通路;因此,通过LPS激活TLR4(toll样受体4;Lalles,2010)导致的促炎细胞因子释放和免疫反应被iAP阻断。此外,iAP集中在专门的膜囊泡中,这些膜囊泡从肠细胞微绒毛的远端释放到肠腔中(McConnell等人,2009;Shilfrin等人,2012)。这些释放的囊泡与细菌和细菌产物相互作用并限制其促炎潜力。

[0382] 因此,我们预计iAP可以在人类粪便样品中进行测量;iAP是人类粪便蛋白质组中的核心蛋白质之一证实了这一点。iAP的稳态基线可从腔内脱落并在粪便中检测到的肠上皮细胞中检测到。如果存在细菌引起的炎症风险,粪便中的iAP含量会因释放的载有iAP的膜囊泡而增加。来自按受孕后年龄分组的非NEC婴儿的样品(灰色条,图14小图A)显示,相对于来自人小肠组织裂解物的阳性对照,早产儿具有低量的iAP。我们的数据还显示,在临床

诊断时,患有NEC的婴儿的粪便样品中iAP的相对含量较高(阳性对照的120-320%)。

[0383] 其次,iAP同工酶形式的动态转变与胎儿肠道的成熟有关(Mulivor等人,1978;Suriura等人,1981)。肠道AP的胎儿同工型具有低生化活性,而成人iAP具有高生化活性。我们假设iAP活性会随着胎儿发育而改变,即早产儿的iAP活性低于足月婴儿。我们推断新生儿中有限的iAP生化活性可能导致过度活跃的LPS/TLR4信号。我们通过比较不同胎龄婴儿的粪便iAP活性检验这一假设。因此,粪便可准确测量新生儿肠道中的iAP活性。

[0384] 我们的数据表明,与足月婴儿相比,早产儿的iAP活性减少。图14小图B显示了按受孕后年龄(灰色条)分组的粪便样品的平均iAP活性,归一化至蛋白质浓度。iAP活性与受孕后年龄之间存在很强的正相关关系。在比较受孕后24-41周的iAP活性时,进行了单向ANOVA和Tukey多重比较检验,表明样品在统计上分为两组:早产组(受孕后年龄≤35周)和足月组(受孕后年龄≥36周)。将足月婴儿(受孕后年龄≥36周,n=28)的所有粪便样品与早产儿(受孕后年龄≤35周,n=79)的所有样品进行比较,发现后一组具有显著更低iAP活性($p<0.0001$;单尾t检验)。

[0385] 相比之下,与年龄匹配的对照组相比,在临床NEC诊断的同一天收集的婴儿粪便(红色条)具有低得多的iAP活性。因此,极低的iAP活性与NEC相关。iAP活性低于240U/mg的粪便样品可用作生物标志物,以识别NEC风险最大的婴儿。这种单变量生物标志物的敏感性为100%,95%CI为66-100%。特异性为100%,95%CI为97-100%。对于该样品集,疾病流行率为7.8%,阳性预测值为100%,阴性预测值为100%。

[0386] 不希望受理论束缚,早产儿肠使促炎性LPS去磷酸化的能力降低会增加对细菌定植和NEC发展的过度炎症反应的风险。此外,基于这些发现并且不希望受理论束缚,对早产儿预防性补充iAP可以作为降低NEC风险的策略进行进一步研究。我们的数据还显示,在临床诊断时,患有NEC的婴儿的粪便样品中iAP和蛋白质的相对含量高。

[0387] 实施例5

[0388] 当早产儿能够安全地摄取和消化规定的肠内(通过口腔)进食而没有与胃肠功能障碍或感染相关的并发症时,证明进食耐受性。极低出生体重早产儿进食耐受性的临床证据在文献中最经常描述为达到完全进食量所需的天数(报告范围为每天每kg 100-160mL)、进食不耐受发作次数、由于进食不耐受症状而停止进食的天数、恢复出生体重的时间、小腿生长、体重增加、枕额头围和长度。所研究的婴儿都没有达到完全进食量。

[0389] 配方类型包括但不限于:EleCare(Abbott Nutrition)、Neosure(Similac)、EnfaCare(Enfamil)、Pregestimil(Enfamil)、Similac Special Care或SSC(Similac)和Gentlease(Enfamil)。

[0390] 补充剂可以包括但不限于微脂(Nestle Health Science)。

[0391] 肠胃外(或静脉内)营养的非限制性实例包括静脉内葡萄糖溶液、静脉内氨基酸溶液、静脉内脂肪乳液、静脉内维生素和矿物质补充剂或其组合。

[0392] 实施例6

[0393] NEC是一种破坏性的GI疾病,主要影响早产儿(发生率:4-14%;死亡率:15-30%(高达50%);发病率:高达50%的幸存者)。NEC的临床表现包括腹胀、胃肠蠕动差和血便。X射线检查结果包括肠积气和穿孔。

[0394] NEC的诊断很困难,因为早期表现是非特异性的,肠道积气的存在不一致,并且尽

管积极管理,但临床症状迅速恶化。例如,在病理证实的坏死性小肠结肠炎中,只有48%会出现积气。目前没有生化措施来识别那些风险最大的婴儿并能够进行早期诊断。

[0395] 如本文所述,肠道碱性磷酸酶(iAP)可作为NEC的生物标志物,并且iAP的缺乏与NEC的易感性相关。

[0396] iAP由顶端肠细胞产生并分泌到腔刷状缘并催化磷酸单酯的水解。iAP作为同型二聚体具有活性,并且在活性位点需要Zn^{2+}和Mg^{2+}离子。iAP的底物包括LPS和核苷酸三磷酸。iAP具有多种影响肠道屏障功能和炎症的作用。iAP在粪便中脱落。iAP是组织特异性AP,意思是主要在肠中产生,如肠组织的免疫组织化学染色所证明的(图15)。

[0397] iAP维持肠道屏障功能(图16)。

[0398] 本研究调查了粪便iAP是否是NEC的诊断工具。在4天内收集和处理系列患者粪便样品。200mg粪便/1ml分子级水的浆液,在4摄氏度下以14000rpm离心。上清液储存在-20摄氏度直至分析。进行的生化分析包括粪便中总蛋白的浓度、碱性磷酸酶的酶活性和人iAP的蛋白质印迹。来自新奥尔良图罗医院和儿童医院的16名婴儿提供了样品(NEC:5名患者(25-35WGA);非NEC:11名患者(23-34WGA))。处理和分析了100多个粪便样品。

[0399] 将诊断时的5例NEC患者与11例对照患者进行比较,将与NEC患者校正胎龄相对应的校正胎龄29-35之间的对照患者粪便总蛋白取平均值。结果具有统计学显著性,NEC患者的中位总粪便蛋白为2.7mg/ml,非NEC患者为0.7mg/ml。NEC患者的粪便总蛋白质含量高于对照婴儿(图17)。粪便蛋白NEC的中位数(5%-95% CI)为2.7(1.6-3.6);对照为0.7(0.2-2.1)。

[0400] 粪便蛋白含量的测定需要约1小时的实验室工作。粪便蛋白浓度高于2mg/ml的测量值可作为NEC发病的早期指标。

[0401] 总粪便AP主要是肠道同工型。肠道中还有其他碱性磷酸酶,如细菌和TNAP。我们通过使用L-苯丙氨酸来量化粪便中肠道AP催化活性的比例,L-苯丙氨酸仅特异性抑制肠型碱性磷酸酶的活性。具体而言,我们用和不用L-Phe获得了AP活性以确定特定的iAP活性,并得出结论,iAP是粪便中AP的主要形式。粪便AP催化活性在NEC群体中始终较低(统计显著)(图18)。

[0402] 表1:

[0403] 中位值200和600.统计上显著的差异

[0404] 数据汇总

[0405]

参数：	nec	对照
平均值：	199.00	1501.6
点数：	5	11
标准偏差：	42.279	1426.7
标准误差：	18.908	430.17
最小值：	146.00	434.00
最大值：	250.00	3872.0
中位值：	189.00	598.00
95%CI 下限：	146.51	543.22
95%CI 上限：	251.49	2460.1

[0406] 当NEC患者与年龄和胎龄相似的特定对照相匹配时,AP酶活性较低(图19)。

[0407] 低AP活性(<200U/mg)的测量是NEC的潜在生物标志物。与匹配的对照相比,NEC患者的碱性磷酸酶活性均匀降低。不希望受理论束缚,iAP沉默可能是危重NEC患者肠道粘膜屏障功能障碍的一个组成部分。Goldberg et al.Proc Natl Acad Sci 105,3551。

[0408] 检测到与NEC相关的iAP蛋白水平出乎意料地高。在蛋白质印迹分析中使用了人iAP的特异性抗体,令人惊讶的是,仅在NEC样品(标记为N)中检测到适当的信号,而在对照样品中不存在。每组代表诊断时不同的NEC患者和年龄和胎龄匹配的对照。在诊断时,NEC患者的粪便中存在高得多的iAP量(图20)。

[0409] NEC发作表明粪便iAP蛋白水平增加。对一名NEC患者进行了连续跟踪,发现即使经过医疗管理,该患者的iAP水平仍然很高。患者随后穿孔,随后进行手术干预。手术后10天的粪便不再含有高水平的iAP蛋白。第42天没有信号(图21)。与AP活性相比,患者在手术干预之前保持较低的AP活性。手术后10天AP活性开始增加。持续的高粪便iAP水平和低活性的存在可能表明肠道受损导致穿孔。(图22)。

[0410] iAP受发育调控,其表达和活性在大鼠模型中已被证明在早产幼崽中减少。数据证实人类NEC婴儿的iAP活性降低,但其表达并未降低。不希望受理论束缚,第三个NEC生物标志物可以是早产儿iAP蛋白水平的蛋白质印迹分析或ELISA(Rentea et al.Eur J Pediatr Surg23,39;Heinzerling et al.J Pediatr Surg 49,954;Biesterveld et al.J Surg Res 196,235)。

[0411] 这项研究提供了初步证据,表明对粪便样品进行的三项实验室测试可以作为NEC的生物标志物。三项测试之间的技术、时间长度和所需设备各不相同。与使用单一生物标志物相比,结合这三种标志物可以增加诊断价值。随后的研究将优化每种方法的特异性和敏感性。

[0412] 哺乳大鼠肠道近端和远端一半之间存在差异。结构差异包括大部分iAP在肠的近半部分是膜结合的;然而,在回肠中,在肠匀浆的上清液部分中发现了iAP;在成人中,超过95%的iAP与膜相关。功能差异包括在哺乳期,回肠总碱性磷酸酶活性较高;当大鼠成熟时,回肠的活性下降而近端肠的活性升高。Yedlin et al.J Biol Chem 256,5620。

[0413] 测试二抗的非特异性结合(图23)。

[0414] 方法:荧光分析。碱性磷酸酶裂解非荧光4-甲基伞形酮磷酸二钠盐(MUP)底物的磷酸基团;导致去磷酸化后荧光信号增强;使用分光光度计测量。

[0415] 实施例7

[0416] 用于NEC的抗生素

[0417] 对于NEC,给婴儿施用10-14天的抗生素,但处方在医院实践之间是可变的。理想情况下,处方将用于广谱覆盖(i)革兰氏阳性菌、(ii)革兰氏阴性菌和(iii)厌氧菌。例如万古霉素(革兰氏阳性,包括MRSA)、头孢他啶(第三代头孢菌素-革兰氏阴性、一些革兰氏阳性和假单胞菌)、甲硝唑(厌氧菌覆盖)、苯唑西林(革兰氏阳性)。

[0418] 一般抗生素方案的例子是:氨苄青霉素+庆大霉素用于可能来自母亲的垂直获得性感染,以及万古霉素+西他啶用于可能的医院获得性感染。常用的抗生素有庆大霉素、万古霉素、氨苄西林、Zosyn(哌拉西林和他唑巴坦的组合)、Flagyl(甲硝唑仿制药)、克林霉素、美罗培南、氟康唑(抗真菌药)。

[0419] 对于败血症,将向患者施用7天的抗生素。

[0420] 早产儿的进食和营养方案:

[0421] 新生儿科医生面临的一项具有挑战性的任务是为早产儿充分和安全地提供营养。肠内供应(经口进食)是安全和营养之间最具挑战性的平衡。早产儿经常遇到进食不耐受或无法消化肠内进食的迹象。对肠内进食的不耐受可能是一种良性病症,但与坏死性小肠结肠炎有重叠。此外,有明显的与禁食相关的不利影响。

[0422] 在出生后的第一个下午提供完整的肠外营养(PN)溶液。婴儿在出生后前2小时接受含有葡萄糖(10g/dL)、氨基酸(2.5g/dL)和脂质的储备液。氨基酸溶液含有AminosynPF10%(Hospira Inc)或TrophAmine10%(B Braun Medical Inc)。Intralipid 20%(Baxter)Liposyn III 20%和Liposyn II 20%(Hospira Inc)提供肠胃外脂质。流体通常在出生时每天提供80至100mL/kg,并在出生后的第一周每天增加20mL/kg至140-160mL/kg。PN溶液中钠和钾的醋酸盐是针对代谢性酸中毒的缓冲剂。

[0423] PN溶液在出生后的第一周提供了大部分营养。肠内营养(EN)通常在第二周结束前仅提供最低限度的能量。通常在第四周结束之前实现向完全EN的过渡。在条件允许的情况下,婴儿接受母亲的母乳。在每天耐受150mL/kg的母乳后,婴儿接受补充母乳强化剂(Mead-Johnson)。当没有母乳时,婴儿接受专为早产儿准备的配方奶。补充母乳或配方奶的最大热量密度以0.8kcal/mL(80kcal/dL;24kcal/oz)提供。

[0424] 配方类型:Premature Enfamil Formula(Enfamil)、EleCare(Abbott Nutrition)、Neosure(Similac)、EnfaCare(Enfamil)、Pregestimil(Enfamil)、Similac Special Care或SSC(Similac)和Gentlease(Enfamil)。Pregesternil和Elecare是水解奶牛型配方,通常用于NEC后婴儿或有进食不耐受史的婴儿。Enfacare和Neosure是出院早产儿的配方。Premature Enfamily Formula和Similac Special Care是医院早产儿配方。

[0425] 当早产儿能够安全地摄取和消化规定的肠内进食而没有与胃肠功能障碍或感染相关的并发症时,证明进食耐受性。极低出生体重早产儿进食耐受性的临床证据在文献中最经常描述为达到完全进食量所需的天数(报告范围为每天每kg 100-160mL)、进食不耐受发作次数、由于进食不耐受症状而停止进食的天数、恢复出生体重的时间、小腿生长、体重

增加、枕额头围和长度。

[0426] 针对早产儿进食不耐受提出的预防/治疗策略包括：

[0427] 表2:针对早产儿进食不耐受提出的预防/治疗策略。

[0428]

改变的/不成熟的功能	预防/治疗策略
1.运动性	
a.吸吮-吞咽	非营养性吸吮
协调	管饲：
	I. 胃 vs 经幽门
	II.连续 vs 间歇性推注
b.胃-食管反流	婴儿定位
	预防/治疗呼吸暂停发作
	药物：
	I.抑酸剂
	II. 促动力
c.胃排空	脂肪含量低
	渗透压(？)
	促动力药
d.肠蠕动	促动力药
	渗透溶液
	灌肠
	腹部按摩(？)
2.消化	
a.乳糖	无乳糖配方
	乳糖酶处理配方
b.蛋白质	水解蛋白配方
	氨基酸型配方
c.胖的	MCT/LcPUFA 含量
3.“肠道菌群”	
a.微生物区系	益生菌
	益生元
	乳铁蛋白
b.肠屏障	谷氨酰胺
	益生菌
	乳铁蛋白

[0429] 本实施例中引用的参考文献：

[0430] Herrmann和Herrman.2010.Nutrition in Clinical Practice 25,69-75

[0431] Fanaro.2013.Early Human Development 89,S13-S20

[0432] 实施例8

[0433] PROP＝获得NEC的倾向＝(1-活性)*WB

[0434] 1.马尔可夫转换模型拟合了PROP、白细胞计数、抗生素(是/否)以及婴儿是否有一定量的食物(>0)。

[0435] 表3：

[0436]

	系数 + 置信区间	
变量	过渡到 NEC	过渡到非 NEC
PROP	**18.7845 (1.302252, 270.9)**	0.1038 (0.006116, 1.76)
白细胞计数	0.9975 (0.9777,1.018)	0.9726 (0.9246,1.023)
抗生素	0.5051 (0.1323, 1.928)	**11.9612 (3.8391,37.267)**
给定的体积>0	1.1571 (0.3602,3.717)	0.8028 (0.2958,2.179)

[0437] 给定的体积＝0

[0438] 不受理论的束缚,增加的PROP显著增加了过渡到NEC的风险。不希望受理论束缚,使用抗生素会增加从NEC状态转变为非NEC状态的可能性。

[0439] 不希望受理论束缚,当绘制来自表的数据时,状态1比2和状态2比1比率之间存在对称关系。

[0440] 例如,使用没有2019年额外检测数据的数据集,PROP的系数约为11或12。

[0441] 结果打印输出如下:

[0442] 最大似然估计

[0443] 基线将协变量设置为其均值

[0444] 每个协变量的具有风险比的转换强度

	基线	PROP
状态 1 - 状态 1	-0.01257 (-0.03220,-0.00491)	
状态 1 - 状态 2	0.01257 (0.00491, 0.03220)	18.7845 (1.302252,270.96)
状态 2 - 状态 1	1.22270 (0.43181, 3.46219)	0.1038 (0.006116, 1.76)
状态 2 - 状态 2	-1.22270 (-3.46219,-0.43181)	

[0445]

	抗生素	
状态 1 - 状态 1		
状态 1 - 状态 2	0.9975 (0.9777,1.018)	0.5051 (0.1323, 1.928)
状态 2 - 状态 1	0.9726 (0.9246,1.023)	11.9612 (3.8391,37.267)
状态 2 - 状态 2		

	VOL1TRUE
状态 1 - 状态 1	
状态 1 - 状态 2	1.1571 (0.3602,3.717)
状态 2 - 状态 1	0.8028 (0.2958,2.179)
状态 2 - 状态 2	

[0446] 使用其他变量(IT比率、血小板计数、时间)导致模型不收敛。不希望受理论束缚,这可能是由于观察进行到我们有缺失值的日子的事实。例如,如果在星期二知道婴儿星期一的PROP分数为.05,而直到星期四才获得另一个PROP值,则该婴儿星期二和星期三的PROP值为.05。

[0447] 2.在实施方案中,例如如果模型很复杂并且初步数据是有限的,则可以移除某些变量。当谈到预测向NEC状态的转变时,一个重要的变量是PROP(因为置信区间不包含1)。不希望受理论束缚,如果模型只拟合了该项,则表格如下:

[0448] 表4:

[0449]

	系数 + 置信区间	
变量	过渡到 NEC	过渡到非 NEC
PROP	**52.5438 (5.51, 500.99)**	0.2727 (0.012, 6.01)

[0450] 在另一个实施方案中,抗生素留在分析中,这似乎与从NEC状态到非NEC状态的转换显著相关。不希望受理论束缚,在这种情况下,表格如下:

[0451]

	系数 + 置信区间	
变量	过渡到 NEC	过渡到非 NEC
PROP	**24.12 (1.85, 313.85)**	0.137 (0.0079, 2.38)
抗生素	0.3871 (0.126, 1.19)	**10.52 (3.59,30.81)**

[0452] 3.PROP分数的线性混合模型的拟合

[0453] 接下来,运行线性混合模型来预测PROP分数作为随着时间的推移仅当前拥有的值的函数(即我们没有通过向前推进来估算PROP的值)。这产生了92名患者的580个数据点,其中约45(7%)个数据点包含与当时诊断为NEC的患者对应的PROP值。该模型仅适用于协变量NEC、抗生素(是/否)和进食量>0(否/是),因为引入更多协变量会将完整病例降至78个数据点。最初包括线性和二次时间效应,但不受理论约束,似然比检验表明这不是必需的。没有时间效应的简化模型的结果如下:

[0454]

	系数	S.E.	t	Pr(>|t|)
截距	-0.0636	0.0178	-3.57	0.0004
NEC	**0.0733**	0.0149	4.93	**<0.0001**
ANTI	0.0074	0.0086	0.86	0.3876
VOL1	**0.0502**	0.0128	3.92	**0.0001**

[0455] 在另外的实施方案中,具有明确的数学项可以允许分析来自线性混合模型的数据。

[0456] 不希望受理论束缚,混合模型用于分析相关数据,例如纵向数据或可能具有多重依赖性的信息。混合模型的一个关键特征是,通过在固定效应之外还引入随机效应,它们允许解决多个变异源,即受试者内和受试者间的变异,以及离散和连续变量的组合之间的相互作用。在一个实施方案中,实施例8中信息中的‘t’可以指时间的缩写。在该实施方案中,NEC PROP可能能够在X射线之前4.93天预测疾病。

[0457] 如本文所述,如果患者在给定日期被诊断出患有NEC,则可以预测他们将具有显著更高的PROP分数,因为NEC系数为正(0.0733)并且p值小于0.0001。NEC Prop和没有进食之间存在相互作用;Vol1系数为0.0502。这种相互作用很重要,因为它的p值为0.0001。不希望受理论束缚,这种相互作用是可以预料的,因为在诊断出NEC时医务人员停止进食。抗生素的使用与NEC倾向没有相关的相互作用。这种混合模型考虑了每个时间间隔上的多次观察。

[0458] 实施例9

[0459] 不希望受理论束缚,PROP分数可以是iAP活性和WB值的函数:

[0460] $$Prop_i = (1 - \frac{iAP_{活性_i}}{\max(\mathrm{iAP}_{活性})}) \frac{\mathrm{WB_i}}{\max(\mathrm{WB})}$$

[0461] 过渡模型:

[0462] 增加的PROP会增加(减少)过渡A和B的速率吗?

[0463] A.仅PROP

[0464] 在一个实施方案中,分析将患者的PROP分数进行到没有数据的天数。例如,如果患

者具有在第3天和第7天的PROP分数,则其第4-6天的PROP分数等于第3天的分数。

[0465] 表5:

[0466]

	系数 + 置信区间	
变量	过渡到 NEC	过渡到非 NEC
PROP	52.5 (5.51, 501)	0.273 (0.01, 6.01)

[0467] 增加的PROP与向NEC怀疑/(+)的转变风险显著增加有关。

[0468] B.PROP和抗生素

[0469] 对抗生素也做了同样的推进,只考虑婴儿有没有用抗生素,不考虑用什么抗生素。例如。

[0470] 表6:

[0471]

	系数 + 置信区间	
变量	过渡到 NEC	过渡到非 NEC
PROP	24.1 (1.85, 314)	0.14 (0.01, 2.38)
抗生素	0.39 (0.13, 1.19)	10.52 (3.59, 30.8)

[0472] PROP增加与过渡到NEC的风险增加有关。抗生素增加了从NEC过渡到NEC(-)的可能性。

[0473] C.全模型

[0474] 表7:

[0475]

	系数 + 置信区间	
变量	过渡到 NEC	过渡到非 NEC
PROP	18.8 (1.30, 271)	0.10 (0.01, 1.76)
白细胞计数	1.00 (0.98, 1.02)	0.97 (0.92, 1.02)
抗生素	0.51 (0.13, 1.93)	12.0 (3.84, 37.3)
给定的体积 = 0	1.16 (0.36, 3.72)	0.80 (0.30, 2.18)

[0476] 在所述的实施方案中,由于收敛问题,不能考虑额外的协变量。

[0477] 白细胞计数继续进行,如同患者是否接受食物。

[0478] 在调整白细胞计数和患者是否接受食物后,结果表明PROP和抗生素是转变风险的重要预测因子。

[0479] 数据显示与图26中的数据部分对称。

[0480] 与1的区间重叠推断没有显著差异。

[0481] PROP分数的线性混合模型

[0482] 注意,我们没有进一步进行任何点;因此,不希望受理论束缚,我们在92名患者上使用了观察到的580个PROP数据点

[0483] 模型拟合:

[0484] $$PROP_{ij} = a_1 NEC_{ij} + a_2 ANTI_{ij} + a_3 VOLO_{ij} + a_4 t_{ij} + a_5 t_{ij}^2 + b_i$$

[0485] $PROP_{ij}$是患者i在第j次测量时的prop分数。

[0486] t_{ij}是患者i第j次测量的时间(以PCA天为单位)。

[0487] 回归模型中不需要Time和Time^2。

[0488] 表8:

[0489]

变量	系数	检验统计	P值
Nec+	.0733	4.93	<.0001
抗生素	.0074	.086	.3876
体积=0	.0502	3.92	.0001

[0490] NEC与PROP分数的显著增加相关。

[0491] 不希望受理论束缚,在给定的一天不进食与PROP分数显著增加相关。

[0492] 不希望受理论束缚,PROP.Aβ回归的假设正态性具有混合效应建模能力。

[0493] 使用没有混合效应的β回归,得到相同的结果

[0494] 如果需要,实施方案可以使用贝叶斯方法拟合β混合回归。

[0495] 实施例10

[0496] 例如,实施例10参见图28和图29。我们一直在收集早产儿的粪便样品,并分析肠道碱性磷酸酶(iAP)的丰度和酶能力。我生成的原始图之一(图28)强调了这两种生化特性将NEC疾病与非疾病分开。在此样品患者群体中检查败血症时,没有将这种血液感染与非血液感染分开。

[0497] 鉴于iAP的这两种生化特性都可以区分NEC疾病,我们有兴趣开发一个简单的代数公式,以结合两个参数的同等贡献。我们精心设计了一个公式,其中iAP丰度乘以iAP酶功能障碍的程度。该乘积可称为PROP分数或'NECPredict'分数。

[0498] 公式中的第一项是iAP丰度。如果无益的细菌失衡,iAP将脱落入肠腔,从而在粪便中发现。当存在细菌失衡或NEC诊断时,iAP的归一化百分比相对于在人类小肠裂解物样品中发现的百分比高(参见Heath,Maya,et al."Association of Intestinal Alkaline Phosphatase With Necrotizing Enterocolitis Among Premature Infants."JAMA network open 2.11(2019):e1914996-e1914996,将其通过引用方以其全部并入本文)。我还知道我们在临床诊断之前就检测了粪便样品中iAP蛋白的含量(图29)。

[0499] NECPredict公式中的第二项(也称为PROP分数)是iAP功能障碍。iAP,其负责中和源自革兰氏阴性菌的信号并触发人类先天免疫反应。具有强大iAP功能的人类可以防止人体肠道中不适当的促炎信号级联反应,并有助于有益微生物群的成熟。在患有NEC的婴儿中,我们发现在临床研究期间的任何时间,与对照婴儿相比,iAP都没有功能。为了为这种功能障碍提供一个数学项,确定了在我们的患者群体中发现的最大iAP活性与任何给定的粪便读数之间的差异;需要对这种代数减法进行归一化,以在蛋白质丰度和蛋白质功能之间赋予相等的权重。iAP丰度和iAP功能项相乘以提供倾向(NECPredict)分数。

[0500] 在临床诊断时,中值NECPredict分数接近1(图29),明显高于对照。即使在临床诊断之前,患病婴儿的NECPredict分数也与对照婴儿显著不同。这些数据表明NEC疾病存在明确的临床-iAP生化关系。不希望受理论束缚,任何高于0.5的NECPredict分数都可以用作临

床疾病干预的辅助手段,例如在新生儿重症监护病房中暂停通过口的进食和开具抗生素处方。

[0501] 实施例11

[0502] 该项目的目标是获得预测坏死性小肠结肠炎(NEC)的预后生物标志物的数据,NEC是早产儿最常见和最致命的胃肠道疾病。这种对疾病敏感且特异的工具对于支持在这个最小和最脆弱的患者群体中开发新药至关重要。此外,这项工作直接解决了当前临床实践中的关键决策点:该领域的新生儿科医生和患者权益团体直接激励我们寻找疾病可逆性的窗口。团队首先为NEC开发了一种诊断测试,NECDetect。NECDetect对三家医院135名早产儿的样品进行分析,在疾病发生时识别出>95%的真阳性和>95%的真阴性;重要的是,它与新生儿迟发性败血症无关。不希望受理论束缚,NECDetect组件可用于在NEC严重发作之前评估其风险。我们的前瞻性观察性研究将评估NECPredict(一种基于婴儿生化数据的计算概率)是否能在出现临床症状前36-48小时预测疾病,以及Neonatal DDx(一种遗传多态性筛查)是否能在出生时识别出有发展NEC倾向的婴儿。入组目标是150名早产儿,具有90%的统计功效。尽管早产儿人数少限制了参加者,但这一目标仍然超过了在ClinicalTrials.gov上注册的大多数研究的目标,该大多数研究中62%的参与者少于100人。这项工作也是涉及NECBiorepository的首次研究,NEC Biorepository是一个由8家不同学术中心医院组成的虚拟生物库。在该财团基础设施的支持下,未来的临床研究将可以招募数千名婴儿患者,这将使其成为临床研究招募目标的前6%。如果成功,准确、快速和廉价的诊断可以使婴儿肠道炎症的个性化管理和治疗改进成为可能。

[0503] 坏死性小肠结肠炎是早产儿最常见的胃肠道疾病。由于没有可用的诊断方法,因此更好地了解这种疾病中人类-微生物组串扰的发病机制至关重要。这些研究将定义可逆性窗口,在该窗口中可以选择婴儿进行主动管理和治疗干预的临床试验。

[0504] 具体目标

[0505] 早产儿坏死性小肠结肠炎(NEC)是一种破坏性的胃肠道疾病,具有很高的死亡率和发病率。最初描述于200年前,关于这种罕见疾病仍然存在基本知识空白。我们不知道它的原因,但它与婴儿发育、进食和微生物群落分类群的变化有关。其次,在临床上更紧迫的是,没有任何单一因素或已知因素的组合可以解释NEC发病的广泛变异性:我们不知道谁会在什么时候患上这种疾病。这种见解将开辟新的护理途径,例如在新生儿重症监护病房(NICU)中更早、更有效地管理脆弱的早产儿,以及选择婴儿进行治疗性临床试验。

[0506] 该提案解决了对预测新生儿NEC发病的预后生物标志物的未满足需求。为了实现这一目标,最初的障碍是阐明与生态失调、人类上皮功能和NEC相交叉的分子特征或生物标志物。不希望受理论束缚,早产儿宿主和肠道细菌之间的异常生化通信是坏死性小肠结肠炎的预测因子。我们的初步数据强调,测量宿主对肠道细菌反应的生化分析是NEC的诊断生物标志物。在检查来自三家不同医院的135名极低出生体重婴儿的生物样品时,NECDetect的主要特点是它改进了在疾病发生时对真阳性的识别。NECDetect的另一个显著特点是它的可用性;它是非侵入性的、快速的、低成本的,并且很容易集成到现有的病理工作流程中。

[0507] 根据回答‘是否’问题的该先决条件工作,该应用将确定NECDetect组件是否可用作解决‘谁’和‘何时’的预后生物标志物。我们的方法是对两个不同城市NICU中的早产儿进行前瞻性纵向研究,并定期收集生物样品。我们将从两个临床中心招募150名早产儿和/或

生长受限婴儿(<34周胎龄;<2.5kg出生体重)。本研究分析了NEC和非NEC患者的特定生物标志物和时间临床相关性。对于此应用,我们将专注于以下目标:

[0508] 目标1:iAP多态性是否可以预测NEC易感性?我们的假设是被诊断为NEC的婴儿的肠道碱性磷酸酶ALPI会发生基因突变,这降低其对有害革兰氏阴性菌的解毒能力。方法将包括对从诊断为NEC的婴儿和没有NEC的婴儿的基因组DNA中扩增的PCR产物进行Sanger测序。将从脸颊拭子或外周血细胞中分离DNA。这项工作的意义将是疾病严重程度、生物化学和遗传多态性之间的首次机械定义。如果实现,这种称为Neonatal DDx的NEC易感性筛查对于确定最早可能的治疗方案和改善长期结果和生活质量将是必不可少的。

[0509] 目标2:粪便中的肠道碱性磷酸酶(iAP)水平是NEC的预后生物标志物吗?这个目标将确定NEC的发作是否可以在临床水平上可以观察到最严重的身体症状之前在分子水平上确定。不希望受理论束缚,人肠腔中iAP蛋白的释放增加是对NEC中微生物诱导的炎症的反应并且可作为时间的函数进行测量。总共将纵向收集2,000多个患者样品并分析iAP蛋白质含量。体外结果和相应的临床数据将用于通过计算平台NECPredict验证作为生物标志物的iAP与NEC诊断预测之间的关联。它的意义是双重的。这项工作将是测试连续时间过程的首次研究,其中患者在疾病过程中在临床状态之间变动,而不是NEC事件和非NEC事件之间的传统二元区别。它还将为主动而非被动的医疗管理确定可逆性的时间窗口。

[0510] 实际上,这些目标提供了个性化的预测方法来处理人类多样性、婴儿肠道发育的可变性和临床护理选择。为此,需要患者样品和临床信息的时间粒度;由于我们的生物样品获取具有非侵入性,因此才能实现这样的努力。在这项工作中嵌入的是一个平台,用于研究我们的临床研究方案中的操作和可行性问题,以获取和整合两个大型学术医疗中心之间的大型临床和生化信息数据集。这种跨广泛临床措施的研究优化和数据协调将证明未来的多中心研究是合理的,该研究具有更多NICU,通过新生的美国国家NEC生物库进行协调。重要的是,该提议将验证一种迫切需要的可以预测和检测NEC的生物标志物。这些研究对于提高我们对最脆弱婴儿胃肠道疾病的了解至关重要,并且可以扩展到成年人群。

[0511] 研究策略

[0512] (a)背景和意义

[0513] 我们的目标是确定改变人类宿主和引起胃肠道炎症的肠道细菌之间稳态的机制。无论发病年龄如何,严重形式的胃肠道炎症都会使人虚弱和危及生命。其病理生理学尚不清楚。目前,人们认为这些复杂疾病需要遗传和非遗传因素。

[0514] 举个例子,早产儿坏死性小肠结肠炎(NEC)仍然是最可怕和最昂贵的新生儿疾病之一[1]:我们不知道谁会得到它,他们什么时候会得到它,或者他们是否能幸存下来。NEC从轻度腹胀和进食不耐受迅速发展为休克、肠坏死和死亡。其快速进展和不精确的临床表现产生了Bell分期标准,这是基于广泛的床边临床和影像学发现的最常用的分类方案[2,3]:早期称为Bell I期,内科NEC称为Bell II期,外科NEC是贝尔III期(图30,小图A)。然而,Bell分期并非NEC特异的,也不能预测疾病的严重程度。死亡率在30-50%之间[4],它通常与其他致命疾病一起出现,如败血症。幸存者可能出现短肠综合征、神经发育不良、支气管肺发育不良和颅内出血[5-7]。

[0515] 缺乏可靠的肠道炎症分子生物标志物使临床医生感到沮丧,并且是生物医学进步的障碍。X射线照相术(图30,小图B)是当前的金标准,仅检测危及生命的晚期(修改的Bell

II和III期)的NEC,并且仅识别44％的真阳性[8]。此外,尽管NEC的使用频繁且一致,但NEC的个体放射学迹象并不容易与疾病严重程度相关联。更重要的是,医学工具箱中缺少早期、可逆阶段(修改的Bell I期)的生物标志物。相反,使用表型和血清学信息的组合来指导临床直觉。

[0516] 为NEC定义预后生物标志物对科学界和医学界都具有重要意义。它将提供对关键机制的见解,并且对于建立和监测早产儿肠道稳态是必不可少的。在临床水平上,早期生物标志物将减轻坏死肠的手术切除和该疾病的长期慢性影响。我们对70名医生进行了一项调查,我们发现比X射线更早识别NEC的最小显著时间差异是48小时,该差异将允许有益的患者管理。及时管理可将手术需求减少一半[9]:药物治疗通常包括肠道休息、抗生素和支持性护理(白框,图30,小图B)。其次,预后生物标志物对于划分NEC可逆期是必要的。这并非微不足道,因为NEC的时间范围很短,在成人GI疾病中没有医学上的等价物。此外,这种疾病管理的早期窗口对于药物开发和治疗药物临床试验的注册是必要的。

[0517] (b)创新

[0518] 三个独特的方面使该提议与众不同。第一项创新是评估免疫激活级联反应之前的非炎症蛋白作为NEC的生物标志物。不希望受理论束缚,肠道碱性磷酸酶(iAP;[10]),微生物管理中的初始宿主调节剂(图30,小图A),是早产儿早期NEC的生物标志物。肠道炎症的发展取决于细菌共生与通过先天免疫机制的细胞信号传导相伴的程度[11,12]。然而,迄今为止,NEC生物标志物研究[13]主要集中在调节肠道免疫、允许细菌易位的粘膜损伤和宿主炎症的基因产物上(图30,小图A)。不幸的是,这些蛋白质虽然与晚期NEC阶段相关,但不是胃肠道疾病的特异性生物标志物,重要的是,它们还与非胃肠道感染和败血症有关。因此,它们不能作为预后生物标志物,也不是治疗干预的有希望的目标。

[0519] iAP由人类ALPI基因编码,通过抑制下游宿主炎症反应在宿主-微生物群相互作用中发挥关键作用。它是一种在小肠中具有组织特异性表达的金属酶,在粘液层和肠腔中很容易检测到[14,15]。膜锚定在肠细胞中,iAP仅流入肠腔,因此可在粪便中测量,以控制细菌定植[15,16]。它从脂多糖(LPS)中水解磷酸盐,从而降低Toll样受体4(TLR4;图30,小图A)激动剂活性。值得注意的是,TLR4与NEC的发病机制有关[17-20]。因此,iAP已被用作动物模型中小肠毒性损伤的度量[21]。相比之下,我们的提议检查了人类生物样品中的iAP,并在婴儿留在NICU的过程中对其进行了评估。

[0520] 我们的第二个创新方向是开发针对婴儿疾病的诊断方法,而不是利用成熟的成人生物标志物并测试其对儿童的适用性[22]。虽然临床研究是针对所有疾病进行的,但很明显,试验组合在紧迫性或规模方面都不符合公共卫生或社区医疗实践的需求。儿童和成人在生理能力、药代动力学特征和药效学特征方面存在差异;代谢途径、器官功能和代谢率也有很大差异[23-25]。此外,年龄、生长和发育与新生儿、婴儿和儿童的疾病严重程度相关[26,27]。尽管明确认识到儿童不是‘小成人’,但由于侵入性和有害的生物样品获取方法以及临床研究和试验的可用参与者数量相对较少,因此对儿科特定医疗保健解决方案的必要性受挫[28]。针对前一个挑战,本研究评估了弃置尿布中的婴儿粪便,从而将婴儿的风险降至最低,并且是研究招募的有利因素。对于后者,PI和联盟PI是NEC Biorepository的一部分,8家不同的学术中心医院已同意共享NEC婴儿的样品和临床数据[29]。如果该第一次测试合作成功,NEC生物库中的其他医院合作伙伴准备在未来加速NEC的更大规模转化研究

[29]。

[0521] 第三,临床工作流程和测定系统的高级测试使我们能够在较短的研究期内有效地处理数量增加的婴儿。规模扩大所造成的障碍在工程学中很容易理解,但在生物医学研究中仍然相对较新。下面的初步数据证实了我们在多点研究中进行协作的能力。这项工作还提供了对临床现场批次效应的理解,例如实践、文件、患者群体等方面的系统差异。我们投入了大量的时间和精力来使生化和临床数据的分析具有可重复性和再现性。以下数据必须克服患者样品处理、生物样品库、生物样品质量和数据协调方面的挑战[30]。因此,我们拥有如何汇集来自多个来源的数据、确保统一和一致的流程、清理和应用质量控制指标到接受和处理的数据等方面的第一手知识。

[0522] (c)初步数据

[0523] 我们的前瞻性研究评估了来自LSU医学院和华盛顿大学医学院附属新生儿重症监护病房的136名早产儿的2个粪便生物标志物的独立相关性,包括NECDetect(图30,小图B)(1.1±0.5kg;27.6±0.8周胎龄;请参见纳入报告)。总之,我们的数据显示粪便中存在大量iAP蛋白和低iAP酶活性是NEC的生物标志物。实际上,NEC婴儿正在将‘空白射入(shooting blanks)’肠腔以控制异常的微生物发育。iAP生物标志物与败血症或其他非胃肠道感染无关。

[0524] 怀疑患有NEC的婴儿和患有晚期NEC疾病的婴儿将iAP蛋白释放到肠腔中,其水平超过了通常在人类小肠中发现的数量。

[0525] 使用免疫印迹对iAP检测进行基线评估。免疫印迹可以确定复杂生物样品中蛋白质的相对表达。通过数字图像分析开发具有真正可量化线性范围和更大检测限的敏感抗体标记可以比以前可实现的分辨率更高的分辨率探测蛋白质[31]。为了说明我们手中的样品制备、检测方案和标准化方法,我们的阳性对照人类肠道裂解物的校准曲线(图31,小图A)显示了抗人类iAP信号检测的线性部分和我们的工作范围重叠[32]。阳性对照和阴性对照(小牛iAP)来自单个批次,用作我们定量的校准品;两者都加载到带有患者样品的每块凝胶上。每条泳道上样等量的总蛋白。

[0526] 高iAP蛋白水平与NEC诊断和NEC怀疑相关,但与败血症无关。我们建立了基线iAP水平,在未患病婴儿的肠腔中脱落并在粪便中检测到[33]。与人小肠裂解物和小牛iAP对照相比,对照患者粪便具有非常低的iAP量(≤2%;图31,小图B)。我们得出的结论是,当没有即将发生生态失调时,很少有iAP流入肠腔。

[0527] 在临床NEC诊断时发现大量粪便iAP蛋白(红色条,Bell II和III期;图31,小图B)。如果存在细菌诱导炎症的风险,粪便中iAP含量会因释放的载有iAP的膜囊泡而增加[15,16]。我们的数据显示iAP进入肠腔和粪便,其水平相当于或高于人类肠道裂解物样品中发现的水平,是一种优于临床诊断(肠积气的X射线证据)的分子生物标志物。作为NEC生物标志物,粪便iAP含量的敏感性和特异性大于95%(图31,小图C)。

[0528] NEC怀疑或早期NEC也与粪便中高水平的iAP相关(粉红色条,Bell I期;图31,小图B)。在临床上关注晚期NEC的粪便样品中,即使通过X射线检测不到肠积气,iAP蛋白的量也与对照有统计学差异(粉红色条,图31,小图B)。然而,NEC怀疑(粉红色条)和诊断平均值(红色条,图31,小图B)之间没有差异。粪便iAP水平与败血症没有可测量的相关性(蓝条,图31,小图B和小图D)。严重早产儿(<32周)不仅肠道形成不当,而且免疫系统不成熟。他们增加的

败血症风险[34,35]会混淆NEC的诊断,因为它是一种常见的共病,诊断工具有限。我们的初步数据显示iAP蛋白水平与败血症的临床诊断没有统计学相关性。

[0529] 患有晚期NEC疾病的婴儿酶活性极低,而疑似NEC的婴儿具有中等iAP催化活性。

[0530] 评估非NEC婴儿的iAP酶活性。根据蛋白质浓度归一化后,我们发现与接近足月的婴儿(受孕后36-40周或PCA)相比,早产儿粪便中的iAP活性降低。iAP活性与受孕后年龄之间存在很强的正相关关系(图31,小图E)。在比较28-40wksPCA的IAP活性时,进行了单向ANOVA和Tukey多重比较检验,表明样品在统计上分为两组:早产组(PCA≤35wks)和足月组(PCA≥36wks)。将足月婴儿(n=28)的所有粪便样品与早产儿(n=79)的所有样品进行比较,发现后一组具有显著更低iAP活性($p<0.0001$;单尾t检验)。这与在这个发育时间点胎儿和'成人'iAP同工型之间的转换是一致的:IAP同工酶形式的动态转变与胎儿肠道的成熟有关[36]。iAP的胎儿同工型具有低的生化活性,而成人iAP具有强大的催化速率。因此,iAP活性是一种与受孕后年龄直接相关的生物标志物。生物标志物研究的适当设计和分析需要跨不同胎龄的此类规范数据。

[0531] 低iAP活性也与NEC诊断和NEC怀疑有关,但与败血症无关。我们发现在临床NEC诊断的同一天收集的婴儿粪便的iAP活性远低于年龄匹配的对照(红色条,图31,小图F),表明极低的iAP活性与NEC相关。有证据表明,早产儿肠使促炎性LPS去磷酸化的能力降低会增加对细菌定植和NEC发展的过度炎症反应的风险[37]。与iAP的生化测量是NEC生物标志物的想法一致,疑似NEC粪便样品的iAP活性(粉红色条,图31,小图F)也表现出低比率,由于无法控制细菌定植,可能预示着NEC。最后,iAP活性的测量与败血症没有相关性(图31,小图F和小图H)。

[0532] (d)方法

[0533] 具体目标1:iAP多态性是否可以预测NEC易感性?不希望受理论束缚,被诊断患有NEC的婴儿将在肠道碱性磷酸酶基因ALPI中具有单核苷酸多态性(SNP),这降低了它们对有害革兰氏阴性菌的脂多糖依赖性信号传导解毒的催化能力。我们的初步数据表明,单基因产物iAP的酶促能力与NEC疾病发展相关。在具有极端形式的NEC(Bell II和III期)的患者中,酶活性几乎不存在,因此,这些婴儿不能调节依赖于TLR4的IL-8转录(图30,小图A)。在早期NEC(Bell I期)中,iAP的酶活性低于非NEC样Bell II和III期婴儿(图31,小图F)。

[0534] 基本原理。已经研究了TLR信号传导的遗传变异,因为该受体已被证明在疾病中发挥重要作用。基因组中自然发生的单碱基对变化可以改变蛋白质功能和疾病过程,TLR2、TLR4、TLR5、IRAK1和TIRAP基因中的SNP似乎与NEC无关[38-45]。了解机制和因果关系对于确定最早可能的治疗方案和改善长期结果和生活质量将是必不可少的。这项工作将为ALPI筛选单基因疾病和基于ALPI的NEC治疗奠定基础。在NEC患者中发现的这种ALPI多态性将成为Neonatal DDx的基础,Neonatal DDx是出生时婴儿的筛查工具。

[0535] 研究纳入。在这项前瞻性研究中,将纳入LSU医学院和华盛顿大学医学院新生儿重症监护病房(NICU)的早产儿(非NEC和NEC);要求父母同意生物样品收集和基因检测的单一IRB和IBC批准已经办理。低出生体重(LBW)早产儿(<2,500g出生体重和/或<34wks胎龄)的招募和纳入是受我们医院出生婴儿数量限制的过程。我们将在第一年招募至少120(LBW)名婴儿,或每个点每月至少招募5名婴儿(请参阅人类受试者纳入报告1和2)。我们预计25-30将发展NEC Bell II/III期,并且几乎相等的数量将发展NEC Bell I期。

[0536] 临床信息。这项研究是观察性的,不会要求在NICU中从标准的临床护理创造或偏离。将获得以下临床数据:人口统计学、病史、抗生素/抗真菌药/药物、体检、全血细胞计数、血培养、腹部放射片、手术会诊记录和进食史。该研究将按照机构、地方、州和联邦有关PHI使用的规定进行,如健康保险流通和责任法案(Health Insurance Portability and Accountability Act)所定义。

[0537] 标本采集。从面颊拭子或残留的抽血中非侵入性地收集DNA样品。

[0538] 方法。将从(i)使用婴儿脸颊的唾液拭子或(ii)使用QIAamp DNA Blood Mini Kit从外周血细胞或全血中分离基因组DNA。对于基因测序,ALPI变体将通过对从基因组DNA扩增的PCR产物进行Sanger测序来鉴定。我们定期使用Eurofins对人类蛋白质(例如[46])中的突变进行测序。PCR将使用AmpliTaq聚合酶,使用GeneAmp PCR系统进行。用于DNA扩增的引物对是:5'GGACCTTCAGTGGTTCCAGG-3'(f)和5'CCAAGGACCTGGTTCTGGTC-3'(r)。通过测序鉴定的变体列表将成为过滤程序的主题,例如排除人群中的常见变体、低质量变体和同义变化。序列数据可以与各种公共数据库(单核苷酸多态性数据库(dbSNP[47]);1000Genomes Project[48];和Exome Variant Server[49,50])进行比较。比较将寻找在对照中出现频率<1%的罕见变异。最初,NEC患者中继承变体和从头变体将被归类为Neonatal DDx。

[0539] 在iAP抑制剂10mM L-苯丙氨酸存在和不存在的情况下,使用4-甲基伞形酮基磷酸酯(MUP)作为荧光底物测量碱性磷酸酶活性[51,52]。将使用96孔黑色光学底板在样品中测量360/440nm处的相对荧光单位。总AP活性以mU/mg为单位测定,其中U是在pH 10和25℃下每分钟水解1μmol MUP的酶量。粪便上清液中总蛋白的测定使用布拉德福德测定法测定。将使用分子级水作为稀释剂制备蛋白质标准品(牛血清白蛋白)和患者样品。在数据收集的每一天运行标准,并且必须具有大于0.99的r2值才能被接受。

[0540] 结果。不希望受理论束缚,发展NEC的婴儿将具有至少一个具有引起功能丧失表型的非保守多态性的等位基因。缺乏粪便iAP活性(<240U/mg)将证实ALPI突变引起功能丧失表型。DNA序列将识别婴儿ALPI基因中的SNP;其相对氨基酸位置可以使用AP晶体结构的同源模型进行鉴定[53-55]。只需对200名不相关的患者进行测序,可以识别出低至人群5%的疾病基因[56]。不希望受理论束缚,突变将发生在iAP的活性位点和/或二聚化界面[54,57]。

[0541] 鉴定致病多态性的统计策略基于疾病突变的性质[58]。例如,将使用显性模型进行统计分析,将野生型纯合子与组合的杂合子和纯合子罕见等位基因组进行比较。这假设携带至少一个变异等位基因拷贝增加患病风险。主要结果指标包括NEC的存在、疾病的严重程度(Bell II/III期与Bell I期)和NEC相关肠穿孔。

[0542] Hardy-Weinberg平衡将使用卡方检验来确定,以将观察到的基因型频率与在Hardy-Weinberg平衡下预期的频率进行比较。序数逻辑回归将用于比较疾病的严重程度。显著性水平将设置为$p<0.05$。

[0543] 替代方法。序列数据的统计评估可能需要使用隐性模型[56,59]。如果发现与NEC易感性相关的多态性,未来的研究将涉及连锁作图和候选基因分析[60]。对于常染色体显性疾病,通过对大谱系的连锁分析(例如[61,62])确定与定义的疾病间隔的关联。新发显性突变可以通过分析亲子三合一(例如[63])或具有相同新发常染色体显性疾病的无关先证者的杂合变异的交集(例如[64])来识别。

[0544] 尽管早产儿不太常见疾病的样品量适中可能限制检测关联的能力,但此类研究作为为儿童提供有针对性的治疗、发现与疾病风险相关的因素的重要见解以及识别与疾病发病机制相关的网络的初步步骤至关重要。

[0545] 具体目标2:粪便中的肠道碱性磷酸酶蛋白水平是否可作为NEC的预后生物标志物?由于无法在疾病过程的早期检测NEC,新生儿学领域受到阻碍。不希望受理论束缚,NEC中微生物诱导的炎症导致肠腔和粪便中iAP蛋白水平增加。如果无症状或仅表现出非特异性症状,早期NEC婴儿将在NEC诊断之前36-48小时内检测到iAP量。我们的数据表明NEC的预测是可行的。尽管我们的临床重点是疾病诊断时的粪便收集,但25名NEC Bell II/III期患者中的5名和19名NEC Bell I期婴儿中的9名在疾病发作前偶然收集了粪便样品;62名非NEC患者中有19名在31周前收集了中位数4个样品。我们将从每个婴儿的纵向系列中收集粪便样品,每周两次测量样品的iAP含量,并对连续生物标志物NECPredict的预后能力进行建模。

[0546] 统计考虑。为此目标,将遵循目标1中详述的研究纳入和临床信息方案。我们需要150名受试者才能达到目标2的90%效力。这是基于模拟结果,因为现有的用于预后生物标志物的样品量计算[65-67]仅适用于两组之间的差异[68]。我们使用四种不同的组合进行模拟研究(α#,α%)并检查我们检测到这些系数与0之间存在显著差异的概率。对于n=50、100、150或200,我们实现了大于0.8、0.8、0.9和0.95的功效值。此功效分析表明,需要n>100的样品量,并且与n=100相比,n=150可以提供显著的益处。

[0547] 标本采集和制备。使用新型蛋白质生物标志物进行连续监测需要从参与研究到出院期间收集粪便。对患者没有可识别的风险,因为从丢弃的尿布中采集非侵入性样品是无痛的,不会对脆弱的患者造成伤害。粪便标本将每3-4天收集一次[69],直到婴儿达到受孕后37周或出院。婴儿的平均住院时间估计为49天[70]至54天(见初步数据);对于每个婴儿,将从尿布中收集约15个样品。如果在NEC的放射学发现的第一天(Bell II或III期)到NEC管理的最后一天(抗生素给药且没有经口进食)期间收集粪便样品,则称为'NEC'。从2+临床症状的第一天到医疗管理的最后一天,收集的样品被称为'疑似'。如果在未做出NEC诊断的当天获得样品,则该样品为'对照'。

[0548] 粪便储存在4℃标本NICU冰箱中,直到样品送到实验室。收到每个去标识化的患者样品后,将粪便均质化,并在无菌微量离心管中用分子级水制成200mg/mL浆液。涡旋和离心后,收集上清液,等分并储存在-80℃[71]。遵循安全处理(手套、实验室工作服、护目镜)、使用吸水台纸、使用EPA注册的医院消毒剂进行净化以及正确处置生物危害。

[0549] 相对iAP蛋白质含量的测定。重复变性SDS-PAGE凝胶将在粪便上清液上运行,以显示每个泳道中的所有蛋白质并用于iAP的免疫印迹检测。iBlot和iBind将分别用于蛋白质转移和蛋白质印迹。使用Amersham Imager 600量化条带;粪便样品中的相对iAP蛋白是在人类肠道裂解物组织中发现的蛋白质部分。

[0550] 可以说,定量免疫印迹中最大的混淆来源是蛋白质加载和加载对照的作用[72]。免疫印迹样品通常根据总蛋白质制备[73-75],其假设每个细胞的平均蛋白质含量在不同条件下是恒定的。然而,在我们的分析中,粪便样品没有被分馏来裂解细胞:只评估肠腔含量。因此,无法确定总细胞蛋白质,并且必须将输入根据蛋白质加载的一些估计值归一化。我们使用两个加载对照以及总蛋白[76-81]。

[0551] 在图31小图A中,对照实验评估了免疫印迹工作流程的准确性和精度。这样的实验最大限度地减少了对蛋白质丰度真实差异的高估或低估。阳性对照(小肠组织裂解物)和阴性对照(纯化牛iAP)的连续稀释显示了我们的动态范围和定量准确性。确定来自患者样品的60kDaiAP信号;该值与阳性对照和阴性对照测量值之间的差值成比例。

[0552] 结果。不希望受理论束缚,我们将检测0.14±0.10(平均值±SE)的iAP水平,与NEC前7天收集的样品的人类小肠裂解物相比。我们的初步数据为预期的免疫印迹值提供了阈值。在NEC诊断时的粪便样品中,iAP含量比人类小肠裂解物高1.59±0.48。非NEC患者粪便的iAP含量为0.02±0.01。由于这些方案已建立并已由3个不同的运营商成功执行,因此我们预计不会出现技术问题。

[0553] 使用NECPredict,我们将根据3-5天和之前6-8天收集的粪便样品中的iAP含量对患者出现症状或被诊断患有NEC的概率进行建模。在这种连续生物标志物预后能力的测试中,NEC和对照样品之间相对iAP蛋白含量的平均值差异将通过对3-5天前尿布以及之前尿布(6-8天前)中任何给定日期的NEC诊断概率与iAP含量之间的联系建模来测试。

[0554] 具体来说,NEPCredict将使用广义线性混合效应模型[82],以NEC诊断为响应,最后两个收集样品的iAP含量作为预测因子(固定效应),以及患者水平误差项。我们对患者是否有NEC的迹象或诊断为NEC进行建模,如下:$\text{logit}\{P[NEC_{t,i}=1]\}=\alpha_1 D_{t-1,i}+\alpha_2 D_{t-2,i}+\beta+\varepsilon_i$,其中$NEC_{t,i}=0$——如果患者i是在收集尿布时间t时NEC阴性,和1——如果患者有NEC诊断或NEC体征/诊断(单独分析)。$D_{t-1,I}$和$D_{t-2,I}$是最后两个收集的尿布的iAP含量。ε_i是特定于受试者的错误项,它包含NEC诊断和尿布含量对时间和个体的依赖性。我们使用R中的lme4包[83]来分析这个模型。显著的正估计值α_1表明最后一次收集的尿布(大约3天前)的高iAP含量预测了未来的NEC诊断和$\alpha_2>0$表示前一周的高iAP预测未来的NEC诊断。该信息表明iAP可以作为NEC的预后生物标志物。

[0555] 总之,体外结果和临床数据将确定与这些标志物和NEC风险的关联。不希望被理论束缚,ALPI多态性导致低iAP活性,Neonatal DDx可用作生物标志物以确定NEC风险最大的婴儿。其次,以NECPredict的iAP蛋白的存在将具有最强的预后价值,并将在出现症状之前识别NEC的发展。这些研究将是将两个NEC触发因素联系起来的首次生化和生理标志物:微生物组的改变与肠道发育。另一个重要的结果是可以最大限度地减少不加区别地禁止进食和广谱预防性抗生素。因此,这些研究提供了在NICU中将治疗个性化的首个实验室测试。未来的方向可包括补充iAP作为NEC的预防策略,因为酶替代疗法是一种低成本、低风险的用于罕见疾病的方法,其通常是成功的[84]。最后,这些个性化的生物标志物方法不仅限于儿童;iAP作为婴儿肠道炎症的生物标志物与成人疾病(如IBD)相似。

[0556] 本实施例中引用的参考文献

[0557] 1.Hackam,D.和M.Caplan,Necrotizing enterocolitis:pathophysiology from a historical context.SeminPediatr Surg,2018.27(1):p.11-18。

[0558] 2.Bell,M.J.,Neonatal necrotizing enterocolitis.NEngl J Med,1978.298(5):p.281-2。

[0559] 3.Kliegman,R.M.和M.C.Walsh,Neonatal necrotizing enterocolitis:pathogenesis,classification,and spectrum of illness.CurrProblPediatr,1987.17(4):p.213-88。

[0560] 4.Lin,P.W.,T.R.Nasr和B.J.Stoll,Necrotizing enterocolitis:recent scientific advances in pathophysiology and prevention.SeminPerinatol,2008.32(2):p.70-82。

[0561] 5.Hunter,C.J.,et al.,Understanding the susceptibility of the premature infant to necrotizing enterocolitis(NEC).Pediatr Res,2008.63(2):p.117-123。

[0562] 6.Neu,J.和W.A.Walker,Necrotizing enterocolitis.New England Journal of Medicine,2011.364(3):p.255-264。

[0563] 7.Patel,J.C.,et al.,Neonatal necrotizing enterocolitis:The long-term perspective/discussion.Amer Surgeon,1998.64(6):p.575。

[0564] 8.Tam,A.L.,A.Camberos和H.Applebaum,Surgical decision making in necrotizing enterocolitis and focal intestinal perforation:predictive value of radiologic findings.JPediatr Surg,2002.37(12):p.1688-91。

[0565] 9.Lin,P.W.和B.J.Stoll,Necrotisingenterocolitis.Lancet,2006.368(9543):p.1271-83。

[0566] 10.Fawley,J.和D.M.Gourlay,Intestinal alkaline phosphatase:a summary of its role in clinical disease.J Surg Res,2016.202(1):p.225-34。

[0567] 11.Stewart,C.J.,et al.,Preterm gut microbiota and metabolome following discharge fromintensive care.Sci Rep,2015.5:p.17141。

[0568] 12.Stewart,C.J.,et al.,The preterm gut microbiota:changes associated with necrotizing enterocolitis and infection.ActaPaediatr,2012.101(11):p.1121-7。

[0569] 13.Rusconi,B.,M.Good和B.B.Warner,The microbiome and biomarkers for necrotizing enterocolitis:are we any closer to prediction?JPediatr,2017.189:p.40-47e2。

[0570] 14.Goldberg,R.F.,et al.,Intestinal alkaline phosphatase is a gut mucosal defense factor maintained by enteral nutrition.Proc Natl Acad Sci U S A,2008.105(9):p.3551-6。

[0571] 15.Shifrin,D.A.,Jr.,et al.,Enterocyte microvillus-derived vesicles detoxify bacterial products and regulate epithelial-microbial interactions.Curr Biol,2012.22(7):p.627-31。

[0572] 16.Shifrin,D.A.,Jr.和M.J.Tyska,Ready...aim...fire into the lumen:a new role for enterocyte microvilliin gut host defense.Gut Microbes,2012.3(5):p.460-2。

[0573] 17.Jilling,T.,et al.,The roles of bacteria and TLR4 in rat and murine models of necrotizing enterocolitis.J Immunol,2006.177(5):p.3273-82。

[0574] 18.Leaphart,C.L.,et al.,A critical role for TLR4in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis by modulating intestinal injury and repair.J Immunol,2007.179(7):p.4808-20。

[0575] 19.Gribar,S.C.,et al.,Reciprocal expression and signaling of TLR4and TLR9 in the pathogenesis and treatment of necrotizing enterocolitis.J Immunol,2009.182(1):p.636-46。

[0576] 20.Good,M.,et al.,Breast milk protects against the development of necrotizing enterocolitis through inhibition of Toll-like receptor 4in the intestinal epithelium via activation of the epidermal growth factor receptor.Mucosal Immunol,2015.8(5):p.1166-79。

[0577] 21.Thomas,D.W.和D.H.Henton,The use of fecal alkaline phosphatase as an indicator of intestinal damage.Digestion,1985.31(2-3):p.82-8。

[0578] 22.Goldman,J.,et al.,Development of biomarkers to optimize pediatric patient management:what makes children different?Biomark Med,2011.5(6):p.781-94。

[0579] 23.Smith,P.B.,et al.,Safety monitoring of drugs receiving pediatric marketingexclusivity.Pediatrics,2008.122(3):p.e628-33。

[0580] 24.Benjamin,D.K.,Jr.,et al.,Safety and transparency of pediatric drug trials.ArchPediatrAdolesc Med,2009.163(12):p.1080-6。

[0581] 25.Williams,K.,et al.,Standard 6:age groups for pediatric trials.Pediatrics,2012.129(Suppl 3):p.S153-60。

[0582] 26.Laventhal,N.,B.A.Tarini,and J.Lantos,Ethical issues in neonatal and pediatric clinical trials.Pediatr Clin North Am,2012.59(5):p.1205-20。

[0583] 27.Joseph,P.D.,J.C.Craig,and P.H.Caldwell,Clinical trials in children.Br J Clin Pharmacol,2015.79(3):p.357-69。

[0584] 28.Kern,S.E.,Challenges in conducting clinical trials in children: approaches for improving performance.Expert Rev Clin Pharmacol,2009.2(6): p.609-617。

[0585] 29.Institute of Medicine.Envisioning a Transformed Clinical Trials Enterprise in the United States:Establishing An Agenda for 2020:Workshop Summary.2012:Washington(DC);The NationalAcademies Press。

[0586] 30.Lee,J.S.,W.A.Kibbe和R.L.Grossman,Data harmonization for a molecularly driven health system.Cell,2018.174(5):p.1045-1048。

[0587] 31.Janes,K.A.,An analysis of critical factors for quantitative immunoblotting.Sci Signal,2015.8(371):p.rs2。

[0588] 32.Lee,J.W.,et al.,Fit-for-purpose method development and validation for successful biomarker measurement.Pharm Res,2006.23(2):p.312-28。

[0589] 33.Lichtman,J.S.,et al.,Host-centric proteomics of stool:a novel strategy focused on intestinal responses to the gut microbiota.Mol Cell Proteomics,2013.12(11):p.3310-8。

[0590] 34.Arboleya,S.,et al.,Establishment and development of intestinal microbiota in preterm neonates.FEMS Microbiol Ecol,2012.79(3):p.763-72。

[0591] 35.Arboleya,S.,et al.,Intestinal microbiota development in preterm neonates and effect of perinatal antibiotics.JPediatr,2015.166(3):p.538-44。

[0592] 36.Mulivor,R.A.,V.L.Hannig,and H.Harris,Developmental change in human intestinal alkaline phosphatase.Proc Natl Acad Sci U S A,1978.75(8):p.3909-12。

[0593] 37.Milani,C.,et al.,The first microbial colonizers of the human gut: composition,activities,and health implications of the infant gut microbiota.Microbiol Mol Biol Rev,2017.81(4)。

[0594] 38.Cuna,A.,L.George和V.Sampath,Genetic predisposition to necrotizing enterocolitis in premature infants:current knowledge,challenges,and future directions.Semin Fetal Neonatal Med,2018。

[0595] 39.Sampath,V.,et al.,A functional ATG16L1(T300A)variant is associated with necrotizing enterocolitis in premature infants.Pediatr Res,2017.81(4):p.582-588。

[0596] 40.Sampath,V.,et al.,Necrotizing enterocolitis is not associated with sequence variants in antioxidant response genes in premature infants.JPediatr Gastroenterol Nutr,2016.62(3):p.420-3。

[0597] 41.Franklin,A.L.,et al.,Are immune modulating single nucleotide polymorphisms associated with necrotizing enterocolitis?Sci Rep,2015.5:p.18369。

[0598] 42.Sampath,V.,et al.,SIGIRR genetic variants in premature infants with necrotizing enterocolitis.Pediatrics,2015.135(6):p.e1530-4。

[0599] 43.Markel,T.A.,H.Engelstad和B.B.Poindexter,Predicting disease severity of necrotizing enterocolitis:how to identify infants for future novel therapies.J Clin Neonatol,2014.3(1):p.1-9。

[0600] 44.Sampath,V.,et al.,The NFKB1(g.-24519delATTG)variant is associated with necrotizing enterocolitis(NEC)in premature infants.J Surg Res,2011.169(1):p.e51-7。

[0601] 45.Bokodi,G.,et al.,Association of interferon gamma T+874A and interleukin 12p40 promoter CTCTAA/GC polymorphism with the need for respiratory support and perinatal complications in low birthweight neonates.Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed,2007.92(1):p.F25-9。

[0602] 46.Richard,J.,et al.,Allostery wiring map for kinesin energy transduction and its evolution.J Biol Chem,2016.291(40):p.20932-20945。

[0603] 47.Sherry,S.T.,et al.,dbSNP:the NCBI database of genetic variation.Nucleic Acids Res,2001.29(1):p.308-11。

[0604] 48.Genomes Project,C.,et al.,A map of human genome variation from population-scale sequencing.Nature,2010.467(7319):p.1061-73。

[0605] 49.International HapMap,C.,et al.,Integrating common and rare genetic

variation in diverse human populations.Nature,2010.467(7311):p.52-8。

[0606] 50.Cooper,G.M.和J.Shendure,Needles in stacks of needles:finding disease-causal variants in a wealth of genomic data.Nat Rev Genet,2011.12(9):p.628-40。

[0607] 51.Ghosh,N.K.和W.H.Fishman,On the mechanism of inhibition of intestinal alkaline phosphatase by Lphenylalanine.I.Kinetic studies.J Biol Chem,1966.241(11):p.2516-22。

[0608] 52.Ghosh,N.K.和W.H.Fishman,L-phenylalanine inhibiton of rat intestinal alkaline phosphatase:a homostericphenomenon.ArchBiochemBiophys,1968.126(2):p.700-6。

[0609] 53.Le Du,M.H.,et al.,Crystal structure of alkaline phosphatase from human placenta at 1.8A resolution.Implication for a substrate specificity.J Biol Chem,2001.276(12):p.9158-65。

[0610] 54.Hoylaerts,M.F.,et al.,Mammalian alkaline phosphatase catalysis requires active site structure stabilization via the N-terminal amino acid microenvironment.Biochemistry,2006.45(32):p.9756-66。

[0611] 55.Ghosh,K.,et al.,Crystal structure of rat intestinal alkaline phosphatase--role of crown domain in mammalian alkaline phosphatases.J Struct Biol,2013.184(2):p.182-92。

[0612] 56.Zhi,D.和R.Chen,Statistical guidance for experimental design and data analysis of mutation detection in rare monogenic mendelian diseases by exome sequencing.PLoS One,2012.7(2):p.e31358。

[0613] 57.Fosset,M.,D.Chappelet-Tordo和M.Lazdunski,Intestinal alkaline phosphatase.Physical properties and quaternary structure.Biochemistry,1974.13(9):p.1783-8。

[0614] 58.Boycott,K.M.,et al.,Rare-disease genetics in the era of next-generation sequencing:discovery to translation.Nat Rev Genet,2013.14(10):p.681-91。

[0615] 59.Walsh,T.,et al.,Whole exome sequencing and homozygosity mapping identify mutation in the cell polarity protein GPSM2 as the cause of nonsyndromic hearing loss DFNB82.Am J Hum Genet,2010.87(1):p.90-4。

[0616] 60.Sunyaev,S.R.,Inferring causality and functional significance of human coding DNA variants.Hum Mol Genet,2012.21(R1):p.R10-7。

[0617] 61.Ng,S.B.,et al.,Exome sequencing identifies the cause of a mendelian disorder.Nat Genet,2010.42(1):p.30-5。

[0618] 62.Fiskerstrand,T.,et al.,Familial diarrhea syndrome caused by an activating GUCY2C mutation.NEngl J Med,2012.366(17):p.1586-95。

[0619] 63.Gibson,W.T.,et al.,Mutations in EZH2 cause Weaver syndrome.Am J Hum Genet,2012.90(1):p.110-8。

[0620] 64.Hood,R.L.,et al.,Mutations in SRCAP,encoding SNF2-related CREBBP activator protein,cause Floating-Harbor syndrome.Am J Hum Genet,2012.90(2):p.308-13。

[0621] 65.Schmoor,C.,W.Sauerbrei,和M.Schumacher,Sample size considerations for the evaluation of prognostic factors in survival analysis.Stat Med,2000.19(4):p.441-52。

[0622] 66.Tsim,S.,et al.,Diagnostic and prognostic biomarkers in the rational assessment of mesothelioma(DIAPHRAGM)study:protocol of a prospective,multicentre,observational study.BMJ Open,2016.6(11):p.e013324。

[0623] 67.Chen,D.T.,et al.,Strategies for power calculations in predictive biomarker studies in survival data.Oncotarget,2016.7(49):p.80373-80381。

[0624] 68.Dang,Q.,S.Mazumdar和P.R.Houck,Sample size and power calculations based on generalized linear mixed models with correlated binary outcomes.Comput Methods Programs Biomed,2008.91(2):p.122-7。

[0625] 69.Rose,C.,et al.,The characterization of feces and urine:a review of the literature to inform advanced treatment technology.Crit Rev Environ Sci Technol,2015.45(17):p.1827-1879。

[0626] 70.Holman,R.C.,et al.,Necrotising enterocolitis hospitalisations among neonates in the United States.Paediatric and perinatal epidemiology,2006.20(6):p.498-506。

[0627] 71.Flores,R.,et al.,Collection media and delayed freezing effects on microbial composition of human stool.Microbiome,2015.3:p.33。

[0628] 72.Marcus,E.,Credibility and reproducibility.Cell,2014.159(5):p.965-966。

[0629] 73.Olson,B.J.和J.Markwell,Assays for determination of protein concentration.CurrProtoc Protein Sci,2007.第3章:p.Unit 34。

[0630] 74.Bradford,M.M.,A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.AnalBiochem,1976.72:p.248-54。

[0631] 75.Zor,T.和Z.Selinger,Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity:theoretical and experimental studies.AnalBiochem,1996.236(2):p.302-8。

[0632] 76.Jensen,K.J.,et al.,An ERK-p38 subnetwork coordinates host cell apoptosis and necrosis during coxsackievirus B3infection.Cell Host Microbe,2013.13(1):p.67-76。

[0633] 77.Kang,B.H.,et al.,Simultaneous profiling of 194distinct receptor transcripts in human cells.Sci Signal,2013.6(287):p.rs13。

[0634] 78.Bose,A.K.和K.A.Janes,A high-throughput assay for phosphoprotein-specific phosphatase activity in cellular extracts.Mol Cell Proteomics,

2013.12(3):p.797-806。

[0635] 79.Eaton,S.L.,et al.,Total protein analysis as a reliable loading control for quantitative fluorescent Western blotting.PLoS One,2013.8(8):p.e72457。

[0636] 80.Collins,M.A.,et al.,Total protein is an effective loading control for cerebrospinal fluid western blots.JNeurosci Methods,2015.251:p.72-82。

[0637] 81.Moritz,C.P.,Tubulin or Not Tubulin:Heading Toward Total Protein Staining as Loading Control in Western Blots.Proteomics,2017.17(20)。

[0638] 82.Breslow,N.和D.Clayton,Approximate inference in generalized linear mixed models.Journal of the American Statistical Association,1993.88(421):p.9-25。

[0639] 83.Bates,D.,et al.,Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4.Journal ofStatistical Software,2015.67(1):p.1-48。

[0640] 84.Ohashi,T.,Enzyme replacement therapy for lysosomal storage diseases.Pediatr Endocrinol Rev,2012.10(增刊1):p.26-34。

[0641] 预后NEC临床研究的统计设计和功效

[0642] 将使用R(R Core Team,2018.R:A language and environment for statistical computing.R Foundation for Statistical Computing,奥地利维也纳)进行统计分析。显著性检验是在5％显著性水平上进行的双尾检验。将测试统计假设,并在必要时对模型进行适当修改。缺失数据将通过插补和敏感性分析进行处理。如果发现提议的统计分析技术站不住脚,我们将使用替代技术,可能会退回到保证提供适当估计以及非参数可变性度量的策略。

[0643] 目标2的研究设计:该研究将是一项前瞻性观察性研究,其中早产儿在出生时就纳入。将每3-4天收集一次性尿布的粪便样品,直到婴儿达到受孕后37周或出院。将分析具有临床明显NEC的患者的粪便样品以及来自对照患者的粪便样品的随机子集。

[0644] 样品大小:对于目标2,我们需要150个受试者才能达到90％的功效。这是基于模拟结果,因为现有的样品量计算仅适用于两组之间的差异[1]。相比之下,我们的模型需要测试连续生物标志物的预后能力。

[0645] 我们将根据3-5天前收集的粪便样品中iAP含量以及6-8天前收集的粪便样品中iAP含量对患者出现体征或已被诊断为NEC的概率进行建模。我们允许每个患者对NEC具有不同的易感性水平,这在患者的随机效应项中捕获。患者的随机效应与iAP含量效应相结合,并通过一个函数(logit函数的倒数)进行转换,该函数将值限制在0和1之间,使我们能够估计概率。

[0646] 用符号项,我们将患者出现NEC迹象或已被诊断为NEC的概率建模为:

[0647] $\text{logit}\{P[NEC_{t,i}=1]\}=\alpha_1 D_{t-1,i}+\alpha_2 D_{t-2,i}+\beta+\varepsilon_i$

[0648] 其中$NEC_{t,i}=0$——如果患者i在收集尿布时间t时是NEC阴性t,和1——如果患者有NEC迹象(Bell I期)或NEC诊断(Bell II/III期)。$D_{t-1,i}$和$D_{t-2,i}$是最后两个收集的尿布的iAP含量。ε_i是特定于受试者的误差项,它结合了个体内NEC诊断概率的相关性。我们使用R程序lme4,使用广义线性混合模型对上述内容进行建模。为了确定我们应该招募多少患者,

我们进行了一项模拟研究,以确定我们可以基于最后两个收集的尿布从0开始在α4和α8在多大程度上检测到显著差异(最后两个尿布iAP含量对未来NEC发生概率的影响大小),这将显示iAP含量对预测NEC诊断或NEC迹象的预后影响。这些信息可以帮助临床医生预测患者是否处于NEC高风险中。

[0649] 我们使用四种不同的组合(α4,α8)进行模拟研究,并检查我们检测到这些系数的与0之间存在显著差异的概率。这些情形在图32中示出,连同NEC和非NEC患者组平均iAP含量的患者NEC诊断/怀疑的隐含概率,其分别为1.59和0.02。

[0650] 这四种情形代表了iAP尿布含量对NEC诊断概率的不同影响。在情形1和情形2中,只有最后尿布才能预测患者在下一次尿布时是否会出现NEC,因为$\alpha_2=0$。与情形2相比,情形1的高iAP组和低iAP组的NEC概率之间的分离更大。同样,情形3和4对两组具有不同的概率差异。对于情形3和4,$\alpha_2=1$,表明在两个时间点(六到八天)前收集的尿布中发现的iAP含量可预测NEC状态。选择这些值的部分原因是它们导致每种情形下9-12%的患者具有NEC诊断,这与之前看到的NEC诊断发生率相吻合。用简化的假设,我们模拟四个情形中每一个的1,000次重复,样品量为n=50,100,150,或200。

[0651] 对于每位患者,我们假设每两周收集一次尿布进行2个月的随访,每位患者总共收集约16次尿布。我们将在尿布收集3-16天评估NEC状态,以了解最后两个尿布周期的iAP含量如何预测NEC诊断。为了进行模拟,我们首先从概率为.09的伯努利分布中绘制NEC+指标,该概率是所有先前检测的尿布具有NEC的经验概率。对于每个NEC患者,我们从平均向量-3.90、标准偏差1.69和每个观察到的iAP值之间的正相关的多元对数正态分布中生成它们的16个iAP尿布含量值$D_{1,i},\cdots,D_{16,i}$。为了生成多元对数正态样品,我们使用上述均值向量和隐含协方差矩阵生成多元正态分布,然后对这些值取幂。对于未被视为NEC阳性的个体,我们从平均向量-.68、标准偏差1.57以及每个观察到的iAP值之间的正相关的多元对数正态分布中生成了它们的iAP值$D_{1,i},\cdots,D_{16,i}$。选择这些平均值和标准偏差是因为它们是分别使用NEC+和NEC-患者的iAP值对对数正态分布的估计最大似然估计。

[0652] 然后我们为患者生成在时间t=3,…,16的NEC的概率,为$\alpha_1 D_{t-1,i}+\alpha_2 D_{t-2,i}+\beta$,并且NEC状态是从具有此概率的伯努利随机变量中提取的。图33显示每个样品大小的在模拟中的正确声明(correctly declaring)$\alpha_1>0$的概率、正确声明$\alpha_1>0$和$\alpha_2>0$二者的概率。对于情形1和2,这个三元组被列为$(P_1,-,-)$,而对于情形2和3,这个三元组被列为(P_1,P_2,P_3)。

[0653] 根据上面的模拟,我们看到对于n=50,4个情形中没有一个的功效高于.80。对于n=100,我们在每种情形下都达到了.80以上的功效,但仅检测到α_1和α_2两者的显著差异,其中在情形3中概率为.819。对于n=150,对于四种情形中的每一种,我们的功效都高于.9,对于n=200,对于四种情形中的每一种,我们的功效都高于.95。此功效分析表明,样品大小为n≥100是需要的,并且n=150与n=100相比可以提供显著的益处。

[0654] 本实施例中引用的参考文献

[0655] 1.Dang,Q.,S.Mazumdar和P.R.Houck,Sample size and power calculations based on generalized linear mixedmodels with correlated binary outcomes.Comput Methods Programs Biomed,2008.91(2):p.122-7。

[0656] 实施例12

[0657] 人体中有四种不同的组织特异性碱性磷酸酶:肠道碱性磷酸酶、胎盘样碱性磷酸

酶、组织非特异性碱性磷酸酶和生殖细胞碱性磷酸酶。在氨基酸水平上,组织特异性碱性磷酸酶同工酶彼此有86-98％相同,但与组织非特异性碱性磷酸酶相比,有52-56％相同。此外,iAP基因ALPI有403个错义多态性,涵盖整个序列:iAP中超过50％的氨基酸具有至少一个已知突变。

[0658] 我们的创新是使用粪便中排出的肠道碱性磷酸酶(iAP)的两种生化指标作为早产儿NEC的分子生物标志物。iAP作为生物标志物的吸引力在于其在小肠中的组织特异性表达及其分泌到肠腔中的iAP只能在粪便中作为对控制细菌定植的反应进行测量。此外,它可以在健康个体的人类粪便样品中检测到;负责粪便中大部分AP酶活性;并用作动物模型中小肠毒性损伤的量度。

[0659] (A)基于免疫测定的高iAP水平检测是坏死性小肠结肠炎的生物标志物,但不是败血症的生物标志物。我们的前瞻性研究在人类早产儿中对其进行了评估。我们评估了包括NECDetect在内的2个粪便生物标志物在136名早产儿中的独立相关性[平均胎龄＝28.3周;50％女性;64％非裔美国人,32％白人;4％西班牙裔]。大量粪便iAP蛋白与临床NEC诊断相关;这些水平等于或高于在人类小肠肠细胞中发现的水平。如果存在细菌引起的炎症风险,粪便中的iAP含量预计会因释放的载有iAP的膜囊泡而增加。相比之下,未患病的患者粪便中的iAP蛋白含量非常低。因此,当没有即将发生生态失调时,很少有iAP流入肠腔。粪便iAP含量的敏感性和特异性>95％。与其他候选NEC生物标志物不同,粪便iAP水平与其他非胃肠道感染或败血症没有可测量的相关性,败血症是一种常见的合并症,可能会混淆NEC的诊断。

[0660] (B)iAP是唯一可从粪便蛋白质组学中回收的人类碱性磷酸酶,并且有几种候选肽可用于通过质谱法对iAP丰度进行绝对定量测定。液相色谱和串联质谱(LC-MS/MS)的组合为粪便样品中多达数千种蛋白质的同时鉴定和定量提供了一个灵活的动态平台。我们对早产儿粪便样品的最初鸟枪式蛋白质组学分析表明,在肠腔内容物或分泌的宿主蛋白质组中检测到635种人类蛋白质。这与(i)在限菌(gnobiotic)小鼠中鉴定的612种蛋白质和(ii)在成人粪便中鉴定的234种人类蛋白质一致。142我们证实有21种独特的胰蛋白酶iAP肽(图34中显示了一个子集)并且这些肽涵盖了iAP序列的50％。我们的数据与之前的人类蛋白质组图研究一致,但超过了他们报告的32％的蛋白质覆盖率。重要的是,没有从婴儿粪便中回收到其他人类碱性磷酸酶。

[0661] (C)非裔美国人人群中iAP基因的高多态性频率,这可能与较高的疾病发病率相关,可能导致基于亲和力和基于MS的蛋白质测量的虚假结果。来自无关个体的序列信息,以确定iAP多态性的频率分布。仅在非裔美国人人群(n＝12,487)中存在iAP多态性,或大于人群1％的等位基因(图34,小图B)。常见等位基因V20I、R33L、R92C、R144H和T207I的估计频率分别为4.8、2.6、1.9、4.2和3.1％。总群体中的多态性(蓝色圆圈,图34,小图C)通过侧链分子量的变化引起肽质量的变化。在非裔美国人人群中常见的两种多态性(紫色圆圈,图34,小图C)导致胰蛋白酶裂解位点的丢失,进而导致肽质量发生百倍的变化。肽质量的变化,无论大小,都妨碍了对蛋白质的MS鉴定和准确定量。这些数据不仅引起了对将SNP与基于亲和力的蛋白质测量相关联的有效性的担忧,而且还引起了对MS技术的担忧,这些技术可能会在次要等位基因频率接近5％的情况下给出虚假结果。

[0662] 实施例13

[0663] 坏死性小肠结肠炎(NEC)是一种常见的新生儿胃肠(GI)急症,具有高死亡率和长期发病率,包括短肠综合征、营养缺乏和神经发育迟缓。2,3疑似NEC表现为轻微的非特异性症状,其经常以最少的干预解决;没有临床试验是疑似NEC的既定标准。放射学证据,例如肠积气,用于诊断严重或晚期疾病,但敏感性低至44%,4特异性有限,5且在解释上缺乏一致性。6-8

[0664] 已经进行了许多努力来发现NEC的分子诊断生物标志物(图35小图A)。尽管发表了2500多项先前的生物标志物研究,但荟萃分析未能确定常规临床使用的最佳NEC生物标志物。9-11这些研究的设计和能力引起了关注:每十年分析中不到30篇文章被认为适合进行荟萃分析。在这些研究中对炎症和修复蛋白的关注是有问题的(图35小图B)。具有全身炎症损伤的晚期疾病对于生物标志物评估并不理想,因为无法定义疾病可逆期。12此外,炎症相关蛋白质的阳性预测价值有限,因为败血症是35%至60%的NEC病例的合并症。13-17

[0665] 坏死性小肠结肠炎被认为是一些迟发性新生儿败血症(LOS)病例的前因。新生儿,尤其是极低出生体重的婴儿,由于住院时间延长、器械侵入性、先天免疫不发达和免疫反应改变,容易感染败血症。后2种生理状态,加上未成熟的肠道屏障功能,可导致NEC。18,19从流行病学和临床角度来看,败血症可能会混淆炎症蛋白作为NEC生物标志物的使用。败血症和NEC需要仔细的鉴别诊断,因为如果没有得到适当的诊断和治疗,两者都可能是致命的。

[0666] 本研究评估了肠道碱性磷酸酶(IAP)作为NEC诊断生物标志物的用途。最近的研究结果表明,NEC发生在肠道微生物群的变化之前并伴随着该变化(图35小图C),并且它与导致肠道炎症的宿主免疫通路相关。19,20肠道碱性磷酸酶通过裂解无机磷酸盐对有害细菌的表面脂多糖(LPS)进行解毒。LPS是革兰氏阴性细菌细胞壁的组成部分,是通过Toll样受体4发出先天免疫信号的有效诱导剂。强大的IAP功能可以中和LPS信号,防止肠道中不适当的促炎信号级联反应,并有助于有益微生物群的成熟。

[0667] 由于IAP活性先于引发炎症的信号级联反应的启动,因此我们评估了粪便中IAP的丰度和酶活性,分别作为病理生物学需要和维持宿主-微生物群稳态的能力的量度。进行了一项多中心、前瞻性诊断研究,以评估2项IAP生化指标与疾病严重程度的关联。作为人类粪便蛋白质组中常见的核心蛋白,21IAP用于无创检测是理想的。如果存在细菌引起的炎症风险,粪便中IAP的含量预计会因释放的载有IAP的膜囊泡而增加。22,23

[0668] 方法

[0669] 研究设计。在3年期间(2015年5月至2018年11月),在新奥尔良儿童医院(n=29;路易斯安那州新奥尔良)和Touro Infirmary医院(n=68;路易斯安那州新奥尔良)招募了孕龄小于37周、出生体重小于1500克的早产儿。在圣路易斯儿童医院(n=39;密苏里州圣路易斯)招募了小于37周胎龄出生的早产儿。研究参与者的书面知情同意书是从父母或监护人那里获得的。所有婴儿都被要求纳入研究,从而形成连续的抽样系列。

[0670] 去识别化的临床数据。每3个月从医疗记录中提取临床数据,包括胎龄、出生体重、Apgar评分、分娩类型、种族/民族、性别和处置(即死亡、出院或转移到另一家机构)。其中,只有种族/民族是由父母限定的。住院数据包括进食、抗生素治疗、实验室和放射学结果以及手术记录。主治医师对NEC(修改的Bell 1-3期)、败血症和其他确诊的非胃肠道感染的临床发现进行了审查。

[0671] 为了保护机密性和匿名性,为每位招募的患者提供了一个代码,允许进行研究跟

踪并删除任何有关个人身份的线索。每三个月,对患者记录进行评估以确定临床相关性。临床数据从病历中提取到相关临床数据库中。人口统计学信息和初始临床数据包括胎龄、出生体重、Apgar评分、分娩类型、种族、性别和最终结果(死亡、出院或转院)。最后,获得了第二组临床信息:抗生素使用、饮食、血清AP、放射学报告、NICU住院时间、手术和死亡率。人乳暴露计算为从人乳进食的平均百分比,作为受试者在研究中的总天数的函数。对于NEC病例,仅考虑了人乳的事件前暴露。抗生素暴露被综合考虑;抗生素总是由父母亲给予受试者。使用抗生素的年龄天数百分比与受试者在研究中的天数有关。对于NEC病例,抗生素仅考虑事前暴露。

[0672] 疾病定义。已经提出了不同的NEC定义。26-29在本研究中,使用了来自临床文件的2类NEC(e表1)。放射学标志是我们NEC类别的定义标准;腹部体征和临床和实验室检查结果是次要标准。疑似NEC被定义为基于异常临床和实验室检查结果的疾病,而腹部放射片图像上没有肠积气或门静脉积气的证据。严重NEC的定义为肠积气和/或门静脉积气的放射学证据。诊断为自发性肠穿孔(SIP)的患者被排除在研究之外(e表2)。新生儿LOS的诊断需要在出生后至少72小时出现异常临床发现,并且对于细菌为阳性的血培养物不被认为是污染物30,31(e表3)。患有其他确诊的非胃肠道感染的婴儿的临床表现是在血液以外的体液中发现了细菌、病毒或真菌感染。e表4至e表11中提供了NEC、SIP、败血症和非胃肠道感染的组和诊断的汇总。

[0673] NEC诊断、NEC怀疑、败血症和其他确诊的非胃肠道感染的临床发现是通过审查临床文件确定的。NEC的研究定义并不总是与患者的临床诊断一致。对于这项研究,NEC和疑似NEC是医生指导的临床诊断,其中放射学体征是定义标准,腹部体征、临床发现和实验室发现进一步证实了诊断(e表1)。NEC怀疑(e表1)被定义为基于临床和实验室异常而担心早期疾病的婴儿,而放射学检查没有肠积气的证据。相反,疑似NEC的婴儿表现出一种或多种放射学体征,包括轻度肠扩张、轻度肠梗阻、肠壁增厚或肠气稀少/缺乏。除了一项或多项实验室检查结果外,一项或多项临床或腹部体征和症状也是必需的,包括血小板减少、白细胞减少或增加、中性粒细胞绝对计数减少、未成熟中性粒细胞数量增加、血红素阳性粪便、代谢性酸中毒。临床和腹部体征和症状包括胆汁分泌物、呕吐、血便、进食不耐受、进食前胃残留量增加、呼吸暂停和/或心动过缓增加、温度不稳定、嗜睡、全身性临床症状出现、轻度至中度腹胀和腹壁变色。

[0674] 严重NEC(e表1)由肠积气和/或门静脉气体的放射学证据或手术或死后肠道样品的病理结果定义。气腹是由穿孔产生的游离腹腔内空气,当伴有放射片上肠积气的证据以及在确定的NEC中发现的腹部体征时,被认为是NEC。其他体征包括中度至重度腹胀和/或腹部压痛和/或活动减退/无肠鸣音和/或腹壁变色、腹部蜂窝织炎、固定的右下腹腹部肿块和/或腹膜炎体征。NEC诊断由至少一名高级临床医生和另外两名高级研究临床医生根据病例审查、笔记审查、X射线和手术结果进行分类。

[0675] 尽管临床表现和医疗管理与NEC相似,但自发性肠穿孔(SIP)患者被排除在研究之外,其被认为是一种完全不同的疾病(e表2)。区分NEC与SIP的主要区别包括腹部放射片上没有肠积气、症状较早出现、病理标本上局灶性出血肠坏死(而不是NEC的凝固性坏死特征),以及总体上更良性的临床病程,无论是诊断前还是诊断后。SIP和NEC过程的重叠医疗管理包括停止肠内进食、胃减压、静脉抗生素和腹膜引流(如果指示)。S8,S9

[0676] 新生儿败血症的诊断因使用总体低敏感性的生物标志物而变得多变且复杂,例如白细胞计数指数的改变、中性粒细胞绝对计数低、未成熟与总(I:T)中性粒细胞比率高和血清C反应性蛋白水平升高。S10迟发性败血症的3天或以上的阳性血培养物被认为是诊断新生儿败血症的金标准。然而,培养物常常是阴性的,可能与低接种血量有关,这可能不完全代表真正的菌血症,以及暴露于可能抑制细菌生长的产前抗生素。S11-S13

[0677] 在这项研究中,被诊断为败血症的婴儿仅包括那些在七十二小时年龄后得到证实的实验室和临床发现的婴儿(e表3)。实验室检查结果包括血培养物或非培养微生物检测,其证实血液中存在未被视为污染物的细菌。S14,S15用于支持败血症诊断的临床结果包括一系列标准,从温度不稳定和呼吸窘迫到异常灌注、出血问题和不明原因的黄疸。

[0678] 此外,本研究对其他确诊的非胃肠道感染的婴儿和感染阴性的婴儿进行了分类和记录(e表3)。其他确诊的感染是在正常无菌的体液中发现的那些确诊的细菌、病毒或真菌感染。临床发现与诊断为败血症的患者相似。感染阴性分类包括疑似感染但未确诊感染的婴儿和未疑似任何感染但未进行有关感染的实验室检查且无症状的婴儿。疑似感染者的实验室检查结果包括但不限于白细胞增多或白细胞减少、未成熟中性粒细胞计数升高、中性粒细胞绝对计数低以及C反应性蛋白和血清碱性磷酸酯升高。这些婴儿的临床发现与确诊为败血症的婴儿相同。

[0679] 可溶性肠腔内容物的样品收集和提取。开发了一个简单的粪便处理方案,用于评估肠腔内的IAP过程。在获得父母的书面同意后,每两周从婴儿尿布中收集样品,并将其储存在医院地点的4℃标本冰箱中,直到运送到实验室。收到后,准备用于管腔内容物分析的粪便样品,并在无菌微量离心管中用分子级水制备200mg/mL的浆液。在涡旋和离心之后,收集、等分并在-80℃下储存上清液(图35小图E)。

[0680] 在自发排便后,从研究受试者丢弃的尿布中连续收集粪便样品。圣路易斯儿童医院的最初收集是每位患者一个样品,但转变为每位患者每周收集一次。从新奥尔良儿童医院和Touro Infirmary医院,前瞻性地收集了样品。招募婴儿的排便频率与文献报道的相匹配:对于一般儿科人群,平均排便频率大于每周8次,并且在生命的前2年内没有变化。S16根据患者代码和日期的记录,护理人员采集样品后,粪便在医院标本4℃冰箱中短暂储存,直到用冷藏箱运送到实验室。来自NEC和非NEC患者的粪便样品的pH值介于6和7之间(ColorpHast pH 0-14指示条,Sigma),与报告的粪便pH值中值6.64一致。S17

[0681] 来自肠腔的粪便物质的工作流程:不受理论的束缚,特定蛋白质应该以刺激依赖的方式在粪便的不溶性和可溶性级分之间转换,例如腔囊泡从小肠微绒毛上皮释放到腔中。因此,粪便准备是准确定量分析的关键因素。粪便是复杂的基质:不仅存在多种生物材料(来自宿主婴儿肠道的细胞、细菌、粘蛋白、蛋白水解酶等),而且不同类型的生化和细胞结构也没有以等同的化学计量表示。例如,与宿主反应在生物学上最相关的蛋白质不太可能被鉴定,因为宿主来源的肠道蛋白质在总粪便蛋白质组中的预期适度表示,S18肠道运输过程中发生的部分蛋白质水解,以及大的和不明确的微生物蛋白质组。

[0682] 此外,先前的肠道蛋白质组研究S19-S21鉴定或回收的蛋白质比典型的基于细胞或组织的分析少得多。为了应对这些挑战,我们首先将我们的检测方案标准化为同质患者样品的粪便重量,因为它是评估粪便特性的最常用参数。S22-S25称重200mg新鲜粪便,其通常含有75%的水,S17(图35小图E)。添加不含蛋白酶和DNases水(Sigma Aldrich)的无菌去

离子水,制成200mg/mL(粪便重量:体积)的浆液,因为缓冲液成分会显著影响定量免疫印迹和活性测定测量的结果。S26然后,在快速涡旋后,我们应用离心方案(图35小图E),分离完整的自由活细胞、与细胞膜表面相关的复合物和沉淀中的其他大的特殊物质。S27,S28上清液含有分泌在肠腔的蛋白质,这是我们分析的重点。因此,质谱分析证实在上清液中发现了iAP并且很容易检测到(e表16)。我们注意到,细胞裂解条件会对提取的蛋白质产生深远的影响,在本研究中不是一个变量。将上清液等分,在液氮中速冻,并在-80℃下储存直至使用。

[0683] 蛋白质浓度。粪便上清液中的总蛋白质浓度通过布拉德福德测定法(ThermoFisherScientific)测定。总蛋白质用于通过免疫印迹分析标准化生化活性测量和蛋白质负荷,以定量IAP丰度。蛋白质浓度测量在重复和不同操作者之间是可重现和准确的32(图39,e表12)。

[0684] 肠腔中分泌蛋白的生物化学测量。对一份上清液进行三种不同的蛋白质测定(图35小图E):总蛋白质的测定、监测碱性磷酸酶催化的酶活性测定和通过免疫印迹检测肠碱性磷酸酶。肠道碱性磷酸酶对宿主消化酶的肠道降解具有抗性S29,并且具有耐热性。S30对于所有三种测定,定量测量都需要标准曲线,每天在每个平台上重复评估标准曲线。外部供应商每六个月进行一次仪器和移液器校准。

[0685] 蛋白质浓度。在Spectra Max M2e或Spectra Max i3x分光光度计(Molecular Devices)上,通过布拉德福德测定法(考马斯加蛋白质测定试剂,Thermo-Scientific)测定最终粪便上清液中总蛋白质的浓度。将使用分子级水(Millipore)作为稀释剂制备蛋白质标准品(牛血清白蛋白,Pierce)和患者样品。为每一天的测量生成五点标准曲线;每日r^2值≥0.994表示蛋白质丰度测量的线性。分析有效性的第二个量度是所用标准的理想值的平均误差。

[0686] 粪便IAP催化活性。在存在和不存在IAP抑制剂L-苯丙氨酸的情况下,使用4-甲基伞形酮磷酸酯(Abcam)底物测量碱性磷酸酶活性。33,34在360/440nm处的相对荧光单位以多孔格式在Spectra Max M2e或i3x分光光度计(Molecular Devices)上测量。一式三份测量总碱性磷酸酶催化作用和10mM苯丙氨酸抑制的碱性磷酸酶催化作用并取平均值。报告的IAP活性代表这2个平均值之间的差异。我们报告的IAP活性为pH 10.0时粪便上清液中每克总蛋白每分钟1μmol4-甲基伞形酮磷酸酯水解;各个测量值在e表13、e表14和e表15中。肠道碱性磷酸酶活性在使用者之间和不同天是可再现的(图39,e表12)。

[0687] 活性测定是作为时间函数和作为粪便上清液中蛋白质比率的酶催化的量度。可以使用多种不同的底物测量碱性磷酸酶活性。所使用的底物决定了酶促反应的动态范围和敏感性。在iAP抑制剂L-苯丙氨酸存在和不存在的情况下,使用4-甲基伞形酮基磷酸酯(MUP)作为荧光底物(Abcam,ab83371)测量该工作中的AP活性。使用MUP对我们的研究具有技术优势。荧光底物能够以高灵敏度和准确度测量AP的催化活性,这些属性是基础研究和生物技术应用的理想选择。其次,荧光底物的检测范围通常比显色底物大100X-1000X,在四唑盐还原或产生有色重氮化合物后检测到产物沉淀。S314-MUP底物的Km比人样品中发现的其他天然底物低。S32使用4-MUP测定Vmax与pH无关。S33,S34最后,其水解产物不会导致碱性磷酸酶的强烈抑制,S32这种抑制会降低测量范围并限制准确度。

[0688] 使用Spectra Max M2e分光光度计或Spectra Max i3x(Molecular Devices)测量

360nm激发/440nm发射的相对荧光单位(RFU)。使用了九十六孔黑色光学底板(ThermoScientific)。为每次板运行准备标准品和阴性对照。每天使用时,在分子级水中新鲜制备100mM L-苯丙氨酸储备液(纯度>98%;Sigma Aldrich)。10mM Phe的最终测定浓度用于评估iAP特异性活性的抑制。

[0689] 变性凝胶电泳和免疫印迹。我们使用基于亲和力的方法确定了IAP丰度,并报告了相对于在同等蛋白质负载的对照人类小肠裂解物中测量的IAP的丰度。在IAP的免疫印迹检测之前,使用重复的预制变性SDS-PAGE凝胶(ThermoFisher Scientific)来显示蛋白质;每个样品运行5μg总蛋白。为了确认IAP的相对蛋白质丰度35-37,在每个凝胶上运行2个上样对照。阳性对照是单批人小肠裂解物(Abcam)。来自肠粘膜(Sigma)的纯化牛碱性磷酸酶是我们的阴性对照。使用传统方法或iBlot-iBind方法(ThermoFisher Scientific)进行免疫印迹。38-40临床样品中IAP的量报告为相对于在阳性和阴性对照中捕获IAP信号的在固定区域中密度测量像素计数的差异(Amersham Imager 600;GE Healthcare)的在免疫印迹中检测到的蛋白质的百分比。不与其他人碱性磷酸酶或阴性对照蛋白发生交叉反应的单批抗人IAP一抗(图39小图C)和单批辣根过氧化物酶偶联二抗(Abcam)用于所有分析。IAP含量的测定与高达1μg小肠裂解物呈线性关系(图39小图D)。

[0690] 该方法是比较粪便iAP的量,它反映了相对于人类肠上皮标准中的iAP蛋白质在肠腔中的蛋白质的丰度。将粪便样品的上清液与凝胶上样缓冲液(375mM Tris pH 6.8、50%(w/v)甘油、600mM二硫苏糖醇、420mM十二烷基硫酸钠)混合并煮沸5分钟。根据总蛋白制备每条泳道的上样量。S35-S37变性4-12%iBolt Bis-Tris凝胶(Novex,Life Technologies)的每个泳道上样总共5μg的总蛋白。运行重复的凝胶:一个是考马斯染色的以可视化每个泳道中的所有蛋白质,第二个用于免疫印迹。

[0691] 类似于ELISA测量,在我们的免疫印迹中,不止一种参考用于定量粪便样品中的相对iAP含量。这种方法减轻了单变量归一化的危险,长期以来在来自微阵列38和定量PCR的数据中得到认可。S39因此,我们的阳性对照是人类小肠组织裂解物(Abcam)。来自肠粘膜(Sigma Aldrich)的纯化牛碱性磷酸酶用作阴性对照。当针对人小肠裂解物(Abcam;

[0692] ab29276)、纯化的人胎盘碱性磷酸酶(ab114268)、纯化的人组织非特异性碱性磷酸酶(ab114267)和牛肠碱性磷酸酶(Sigma,P5521)评估时,使用的一抗对于人小肠iAP同工型是特异性的(图39小图C)。我们来自单个批次的阳性对照以及单个阴性对照,作为手稿中所有定量的校准品;两者都与患者样品一起加载在各自和每个凝胶上。这两个标准用于定义我们的患者样品的抗iAP信号的线性关系。

[0693] 凝胶基质中的蛋白质转移使用以下两种技术之一进行:(1)半干转移装置(FisherScientific)在恒定5V下持续1小时或(2)iBlot2(ThermoFisher)干印迹系统在20V开始并在25V结束,总共7分钟。使用传统方法S40-S42或使用iBind系统(ThermoFisher)进行蛋白质印迹技术。将膜在50mM Tris-HCl pH 7.5、150mM NaCl和0.1%Tween中的5%(w/v)脱脂奶中连续封闭,或使用iBind溶液试剂盒(ThermoFisher)试剂进行封闭。在室温下,将膜与抗人iAP的兔一抗多克隆抗体(Abcam,ab7322)以1:13,000稀释,洗涤,并与辣根过氧化物酶偶联的山羊抗兔二抗(Abcam,ab6721)以1:20,000稀释进行温育。

[0694] 在Amersham Imager 600(GE Healthcare)上量化条带;其CCD芯片和大光圈FujiIon f/0.8543毫米镜头可在弱光应用中实现更高的灵敏度。阳性对照泳道中的iAP蛋

白是手动限定的。对免疫印迹的每个泳道(包括阴性对照和患者样品)定量等效面积。每个患者样品的所得信号除以阳性对照和阴性对照之间的差异,得到阳性对照标准的最终百分比。为了说明我们手中的样品制备、检测方案和标准化方法,人肠上皮细胞裂解物(图39小图D)(我们的阳性对照)的校准曲线显示抗人iAP信号检测的线性部分与我们的工作范围之间重叠。S43

[0695] 准确度和再现性测量。尽管五个不同的操作员进行了这些测定,但对重复的检查显示出清晰的再现性(图39小图A和图39小图B),表明在这些测定中可以将生物信号与噪声区分开来。

[0696] 评估了用于计算iAP生物标志物敏感性和特异性的每个生化测试的准确性和可靠性(表e16)。为了最大限度地减少批次效应的影响,44三个不同的操作员从八个月的时间里随机选择了每个生化分析中已知分析物浓度的五个独立测量值。通过比较分析物的实验测量值和制造商定义的绝对测量值来评估准确度,并报告为绝对值的百分比(图39小图A和图39小图B)。用于活性测定的每种碱性磷酸酶浓度的绝对值在Tecan Infinite M1000 Pro(来自供应商的个人通讯;Abcam)上测量。分析物的实验测量在SpectraMax i3x(Molecular Devices)上进行,光度范围为0-0.40D,光度分辨率为0.0010D。对于布拉德福德测定,牛血清白蛋白(BSA;43,824M-1)的消光系数和比尔定律方程用于计算用于在SpectraMax i3x上测量的标准曲线的BSA每次稀释的绝对值。使用以下公式计算准确度:准确度=[(绝对值-测量值)/绝对值]x 100%。通过计算标准误差并报告p值来确定可靠性,或分析物的测量值与分析物的绝对值相比的可重复性如何。由于p值指示测量值是否彼此显著偏离,因此它可用于指示校准器的操作员间测量值是统计上相似(p值<0.05)还是不相似(p值>0.05)。对于患者样品的所有测量,进行样品稀释以确保实验测量值落在用于标准曲线的最高和最低分析物浓度之间的线性范围的中间。

[0697] 质谱。在Fusion TribridOrbitrap(Thermo Fisher Dionex,Sunnyvale,CA)中对0.5μg/μL处理过的粪便样品(其随后被还原、烷基化和胰蛋白酶化)进行MS1扫描,分辨率为240,000,随后在Dionex U3000 HPLC系统(Thermo Fisher Dionex,Sunnyvale,CA)上进行液相色谱分离。MS2扫描在Orbitrap中使用30%的高能碰撞解离(HCD)设置和30,000的分辨率进行。对总共三个技术重复,重复此过程。使用Proteome Discoverer 2.2,采用SEQUEST HT评分进行数据分析。Protein FASTA数据库是H.sapiens版本2017-07-05。静态修饰包括半胱氨酸上的氨基甲酰甲基(=57.021)和蛋氨酸氧化的动态修饰(=15.9949)。母离子容差为10ppm,碎片质量容差为0.02Da,最大丢失裂解数设置为2。仅考虑使用1%的错误发现率(FDR)的高评分肽。

[0698] 统计分析。用于计划本研究的样品大小和功效计算基于从早产儿的6个NEC和12个非NEC粪便样品中获得的初步数据。根据对IAP丰度和功能障碍的影响大小的初步评估,确定至少需要12名NEC患者来证明显著差异(即,使用5%CI、2侧、2样品t检验和95%功效)。41假设二分类结果的事件率为10%(即,发生NEC的出生≤1.5kg的早产儿百分比)和10%的自然减员率,我们的目标招募是130名极低出生体重婴儿。

[0699] 评估了炎性疾病(NEC和非胃肠道感染)、新生儿变量和住院病程之间的关联(图36和图37)。当特征或条件被认为是疾病模式的先兆或并发时,使用适合二元疾病结果的逻辑回归模型评估调整后的关联。如果结果是连续的(例如,败血症与住院天数的关联),则通过

线性回归评估调整后的关联;取决于数据正态性的验证,采用方差分析、t检验或Kruskal-Wallis和Wilcoxon检验。对于未调整的比较或非常小的计数,统计显著性通过χ^2或Fisher精确试验确定。所有分析均使用SAS 9.4版(SAS Institute)完成。

[0700] 每种临床模式都被视为适合年龄的对照的二元变量。使用Mann-Whitney U检验测试NEC和对照组之间IAP活性和丰度的中位数差异;在突出分类差异方面,2尾P<0.05被认为具有统计学意义。通过敏感性(真阳性率)和特异性(真阴性率)计算,评估潜在的生物标志物功效。对于每个感兴趣的变量,最初使用简单的基于阈值的分类器获得特异性和敏感性。接受者操作特征曲线分析用于评估生物标志物的敏感性和特异性,以最好区分有无疾病的婴儿样品。使用Wilson-Brown方法确定置信区间。这些统计计算是使用Prism版本8.1.2(GraphPad)进行的。所有数字均在Igor Pro 8.0版(Wavemetric)中生成。

[0701] 结果

[0702] 总共招募了136名婴儿(68名[50.0%]男婴),出生体重中位数(四分位距[IQR])为1050(790-1350)g,孕龄中位数(IQR)为28.4(26.0-30.9)周。总共25名(18.4%)被归类为具有严重NEC,19名(14.0%)被怀疑患有NEC,而92名(66.9%)没有NEC(即对照)(图35小图D)。在患有严重NEC的婴儿中,19例(76.0%)发生在受孕后26至35周(PCA)之间,6例(24.0%)发生在PCA 36至40周或更多周之间。对于分类为疑似NEC的婴儿,16例(84.2%)发生在PCA 26至30周之间,3例(15.8%)发生在PCA 31至35周之间。研究参与者除了NEC外,还有其他形式的确诊感染;26人(19.1%)被诊断为LOS,14人(10.3%)患有非胃肠道感染(图35小图D)。招募了相等数量的男婴和女婴。

[0703] 损耗率为11.0%(即15个婴儿),原因是招募变化、医疗变化或生物样品收集不足(图35小图D)。共有6名(4.4%)患者因在样品收集前撤回父母同意或死亡(与NEC无关的肺或多器官衰竭)而被排除在外。在疑似或严重NEC发作期间,共9名(6.6%)被招募者因诊断为SIP、粪便收集不足或未收集粪便而被剔除。剩余被招募者人数为121。

[0704] 在粪便分析之后回顾人口统计学数据和临床病史(图35小图E)。我们汇编了5400个人口统计学和临床病程特征(图36和图37)。对疾病的潜在混杂变量进行了交叉制表。受孕后年龄和体重是与NEC相关的唯一事件前临床变量(图36),支持将产后疾病发展作为一致的风险因素(第一次NEC发作时的中位[IQR]PCA:重度NEC,33.9[31.0-35.7]周;疑似NEC,29.4[28.4-30.9]周;P=.02;首次NEC发作时的中位[IQR]体重:重度NEC,1620[1110-2050]g;疑似NEC,1015[860-1377]g;P<.001)。18比较而言,出生体重和胎龄与LOS的风险密切相关(中位[IQR]出生体重:LOS,790[670-1010]g;其他非胃肠道感染,830[700-915]g;无其他非胃肠道感染,1165[912.5-1410]g;P<.001;出生时中位[IQR]胎龄:LOS,25.9[25.0-29.7]周;其他非胃肠道感染,26.4[25.0-27.1]周;无其他非胃肠道感染,29.3[26.9-32.2]周;P<.001)(表2)。14

[0705] 严重NEC、疑似NEC和无NEC患者的IAP蛋白的丰度和IAP酶活性。在临床诊断时,患有NEC的婴儿在其粪便样品中具有高的相对IAP含量(图38小图A)。在严重NEC时收集的样品的中值(IQR)IAP含量为99.0%(51.0%-187.8%)(95%CI,54.0%-163.0%),而对照样品的中值(IQR)IAP含量为4.8%(2.4%-9.8%)(95%CI,3.4%-5.9%)。粪便IAP蛋白增加不仅与严重NEC相关,而且与疑似疾病相关。在怀疑NEC时收集的粪便样品具有123.0%(31.0%-224.0%)(95%CI,31.0%-224.0%)的中值(IQR)IAP含量(图38小图A)。

[0706] 与从没有NEC的年龄匹配对照中收集的粪便相比,严重NEC和疑似NEC时粪便中的中位IAP丰度增加了20倍。

[0707] 与来自没有NEC的婴儿的样品相比,在疑似和严重NEC发作期间收集的样品中的IAP活性显著降低(图38小图A)。然而,在疑似和严重NEC患者之间发现了不同程度的IAP酶功能障碍。严重NEC时的样品具有183(56-507)μmol/min/g(95% CI,63-478μmol/min/g)粪便蛋白的中位(IQR)IAP活性。疑似NEC时的样品中位(IQR)IAP活性为355(172-608)μmol/min/g(95%CI,172-608μmol/min/g)粪便蛋白,以及PCA-匹配的对照样品中的IAP活性具有613(210-1465)μmol/min/g(95% CI,386-723μmol/min/g)粪便蛋白的中位(IQR)。因此,与疑似或没有NEC的婴儿相比,患有严重NEC的婴儿调节异常细菌定植的能力仅为其四分之一,表明宿主-微生物串扰功能障碍。

[0708] 粪便IAP测量的灵敏度、特异性和阳性预测值。使用接受者工作特征曲线评估IAP单一生化测量的准确性或曲线下面积,该曲线是一种用于计算临床预测规则的常用工具(图38小图B)。使用IAP含量作为严重NEC标志物的平均(SE)准确度为0.97(0.02)(95%CI,0.93-1.00;P<.001),使用IAP活性作为严重NEC标志物的平均(SE)准确度为0.76(0.06)(95%CI,0.64-0.86;P<.001)。对于疑似NEC,获得IAP含量的相似平均(SE)准确度值为0.97(0.02)(95%CI,0.93-1.00;P<.001),IAP活性的为0.62(0.07)(95%CI,0.48-0.77;P=.13)。

[0709] 相比之下,IAP含量和活性在败血症和其他非胃肠道感染的诊断中缺乏准确性(图38小图C)。在以下情况收集的粪便中落入的IAP可忽略不计:临床定义的败血症时(中位数[IQR],6.5%[2.2%-23.1%];95%CI,2.2%-19.8%),其他非胃肠道感染(中位数[IQR],3.1%[0.8%-10.9%];95%CI,0.6%-15.2%)和对照(中位数[IQR],6.2%[2.7%-40.0%];95%CI,4.6%-11.0%)。IAP的酶促能力在从这3个群组收集的样品之间没有统计学差异(图38小图C);败血症的中位(IQR)活性为575(338-1122)μmol/min/g(95%CI,355-1073μmol/min/g)粪便蛋白,用于其他非胃肠道感染,为319(207-961)μmol/min/g(95%CI,172-1193μmol/min/g)的粪便蛋白,以及对照组为519(180-1243)μmol/min/g(95%CI,350-695μmol/min/g)粪便蛋白。接受者操作特征曲线下面积显示,使用粪便IAP含量或活性将对于这些炎症状况随机将培养确认的细菌性败血症和其他非胃肠道感染指定为阳性或阴性(图38小图D)。IAP含量的平均(SE)准确度分数在败血症时为0.52(0.07)(95%CI,0.38-0.66;P=.75)和在其他非胃肠道感染时为0.58(0.08)(95%CI,0.42-0.75;P=.06)。IAP活性的平均(SE)准确度分数在败血症时为0.52(0.07)(95%CI,0.39-0.67;P=.68)和在其他非胃肠道感染时为0.57(0.08)(95%CI,0.39-0.69;P=.66)。

[0710] 新生儿坏死性小肠结肠炎和LOS夸大了炎症反应和许多共同属性。鉴别诊断因其重叠的表现、敏感性有限的诊断工具,甚至其不断演变的定义而变得复杂。42,43当前的标准是用于NEC的腹部放射片和用于败血症的阳性血培养物。然而,这两个标准都存在灵敏度低的问题,并且有可能因过度辐射暴露或采血而造成伤害。最后,结果报告是有问题的:对细微放射学发现的解释是主观的,可能会有所不同,而培养结果可能需要长达48到72小时。

[0711] 已经有许多尝试来确定将NEC与其他炎症状况区分开来的肠道损伤候选标志物。44-48动物NEC模型表明,与严重NEC相关的免疫失调和微生物失调是由于响应细菌LPS的过度Toll样受体4信号传导导致的串联宿主—细菌失误。19,49-52大多数候选NEC生物标志物

是初始宿主信号传导步骤进一步下游的蛋白质。血浆中血小板激活因子3,53、间α抑制蛋白54、钙卫蛋白、密蛋白48、肠道脂肪酸结合蛋白55和C反应性蛋白56的升高与NEC发病有关。总之,目前的文献表明晚期NEC的诊断是晚期病理过程的临床描述29,57,表明NEC生物标志物可能总是被败血症混淆。

[0712] 这项研究挑战了这些理论。生物标志物,如钙卫蛋白,通常是肠道炎症的可靠指标,但无法了解在患者肠粘膜中起作用的主要炎症途径。我们的研究需要前瞻性纳入患有NEC的婴儿,并同时在新生儿重症监护病房中测试具有多种炎症的健康和不健康对照。在这些现实条件下,生物标志物可靠性的估计更准确地反映了临床应用中的潜在性能。检查参与微生物群稳态和反应的器官特异性调节的蛋白质将NEC与其他形式的炎症区分开来。因此,IAP是第一个候选诊断生物标志物,其独特之处在于其对NEC的高阳性预测值。重要的是,IAP与NEC相关,而与败血症或其他非GI感染无关。

[0713] 使用由LPS诱导的炎症前因的蛋白质作为生物标志物得到了先前研究的支持。肠道生态失调中有几种IAP激活模型:外泌体、肠道通透性增加和/或肠上皮损伤。目前尚不清楚可引起LOS的跨肠道上皮的细菌易位是肠道上皮通透性改变的天然结果还是肠道屏障恶化的结果。我们的IAP研究未解决NEC或败血症中肠道内皮是否恶化。然而,在NEC发作期间在我们的粪便样品中检测到如此高丰度的IAP表明,在活动性NEC疾病期间,脂质囊泡分泌到肠腔中存在积极调节;在LOS期间,在粪便中检测不到这种IAP分泌。该调查不支持NEC与新生儿败血症具有相同病理生物学机制的观点。

[0714] IAP生物标志物与疾病严重程度相关;IAP生物化学可将晚期NEC(由门静脉积气或肠积气标记)与通过放射学没有可靠观察到的迹象的疑似疾病区分开来。我们的结果还表明,这种对NEC怀疑的分类被支持为明确的疾病状态。我们的方法不同于其他候选生物标志物研究。这项工作的不同之处不仅在于感兴趣的目标蛋白,还在于我们使用的疾病严重程度目录、生物样本选择和分子检测方法。我们能够将NEC怀疑与NEC严重病例分开。已经付出了巨大努力来确定定义严重NEC的临床标准的共性。由于缺乏分子诊断测试和定义共识,很少有关于NEC怀疑的报告发表。该研究表明,疑似和严重NEC与婴儿粪便中IAP的主动释放有关。它还表明,这2种疾病类别的IAP功能存在明显差异。晚期NEC与宿主IAP的严重生化功能障碍有关,而疑似NEC仅部分丧失IAP酶活性。相比之下,C反应性蛋白和其他生物标志物与Bell分期无关,11,并且重要的是,这些值在疑似NEC和严重NEC之间没有显著差异。

[0715] 本实施例中讨论的结果与其他评估IAP作为NEC生物标志物的研究不同。我们的研究报告使用的不是1项而是2项措施来评估患者样品中的IAP生物化学,如下:(1)免疫印迹法,以量化其与人类小肠中发现的IAP量相比的相对丰度,和(2)酶活性,以确定是否该蛋白质具有功能性并且能够调节微生物失调。这两种方法都是区分疾病途径和个体差异所必需的。碱性磷酸酶作为NEC生物标志物的血清学检测58报道,与对照组相比,NEC婴儿血液中的IAP量增加,表明IAP可在NEC发病机制中发挥作用。血清不是理想的采样来源,因为存在4种不同的碱性磷酸酶,并且已知它们在血清中的相对水平在妊娠期间会发生变化59(图39和图40)。尽管先前得出的结论58支持我们的发现,但仅使用变性蛋白凝胶不能提供等同的证据证明IAP已被鉴定,也不能总体上量化碱性磷酸酶的量。

[0716] 总之,这项研究的结果表明,粪便中IAP功能障碍的测量是NEC的生物标志物,其敏感性和特异性优于之前文献中报道的其他候选物。尽管有希望,但应考虑将粪便IAP作为生

物标志物用于确定严重NEC的诊断、监测疾病进展和监测高危婴儿群体。未来生物标志物研究的适当设计和分析需要不同PCA的规范数据,以确定粪便IAP是否可以作为分子水平的诊断代理。这种非侵入性工具的临床潜力在于它能够识别最可能有发生NEC风险的婴儿,促进进食和抗生素方案的管理,并监测对治疗的反应。

[0717] 本实施例中引用的参考文献

[0718] 1.Lin PW,Stoll BJ.Necrotising enterocolitis.Lancet.2006;368(9543):1271-1283.doi:10.1016/S0140-6736(06)69525-1

[0719] 2.Yee WH,Soraisham AS,Shah VS,Aziz K,YoonW,Lee SK;Canadian Neonatal Network.Incidence and timing of presentation of necrotizing enterocolitis in preterm infants.Pediatrics.2012;129(2):e298-e304.doi:10.1542/peds.2011-2022

[0720] 3.Young C,Sharma R,Handfield M,Mai V,Neu J.Biomarkers for infants at risk for necrotizing enterocolitis:clues to prevention?Pediatr Res.2009;65(5 Pt 2):91R-97R.doi:10.1203/PDR.0b013e31819dba7d

[0721] 4.Tam AL,Camberos A,Applebaum H.Surgical decision making in necrotizing enterocolitis and focal intestinal perforation:predictive value of radiologic findings.JPediatr Surg.2002;37(12):1688-1691.doi:10.1053/jpsu.2002.36696

[0722] 5.Hoehn T,Stover B,Buhrer C.Colonic pneumatosis intestinalis in preterm infants:different to necrotizing enterocolitis with a more benign course?Eur J Pediatr.2001;160(6):369-371.doi:10.1007/s004310100757

[0723] 6.Mata AG,RosengartRM.Interobserver variability in the radiographic diagnosis of necrotizing enterocolitis.Pediatrics.1980;66(1):68-71。

[0724] 7.Rehan VK,Seshia MM,Johnston B,Reed M,Wilmot D,Cook V.Observer variability in interpretation of abdominal radiographs of infants with suspected necrotizing enterocolitis.ClinPediatr(Phila).1999;38(11):637-643.doi:10.1177/000992289903801102

[0725] 8.Di Napoli A,Di Lallo D,Perucci CA,et al.Inter-observer reliability of radiological signs of necrotising enterocolitis in a population of high-risk newborns.Paediatr Perinat Epidemiol.2004;18(1):80-87.doi:10.1111/j.1365-3016.2003.00517.x

[0726] 9.Evennett NJ,PetrovMS,Mittal A,Windsor JA.Systematic review and pooled estimates for the diagnostic accuracy of serological markers for intestinal ischemia.World J Surg.2009;33(7):1374-1383.doi:10.1007/s00268-009-0074-7

[0727] 10.Terrin G,Stronati L,Cucchiara S,De Curtis M.Serum markers of necrotizing enterocolitis:a systematic review.JPediatr Gastroenterol Nutr.2017;65(6):e120-e132.doi:10.1097/MPG.0000000000001588

[0728] 11.Rusconi B,Good M,WarnerBB.The microbiome and biomarkers for necrotizing enterocolitis:are we any closer to prediction?J Pediatr.2017;189:

40-47.e2。

[0729] 12.Garg BD,Sharma D,Bansal A.Biomarkers of necrotizing enterocolitis: a review of literature.JMatern Fetal Neonatal Med.2018;31(22):3051-3064.doi: 10.1080/14767058.2017.1361925

[0730] 13.Uauy RD,Fanaroff AA,Korones SB,Phillips EA,Phillips JB,Wright LL; National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network.Necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants: biodemographic and clinical correlates.J Pediatr.1991;119(4):630-638.doi: 10.1016/S0022-3476(05)82418-7

[0731] 14.Stoll BJ,Hansen N,Fanaroff AA,et al.Late-onset sepsis in very low birth weight neonates:the experience of the NICHD Neonatal Research Network.Pediatrics.2002;110(2 Pt 1):285-291.doi:10.1542/peds.110.2.285

[0732] 15.Kaufman D,Fairchild KD.Clinical microbiology of bacterial and fungal sepsis in very-low-birth-weight infants.Clin Microbiol Rev.2004;17(3): 638-680.doi:10.1128/CMR.17.3.638-680.2004

[0733] 16.Sharma R,Tepas JJ III,Hudak ML,et al.Neonatal gut injury and infection rate:impact of surgical debridement on outcome.Pediatr Surg Int.2005;21(12):977-982.doi:10.1007/s00383-005-1539-x

[0734] 17.Cole CR,Hansen NI,Higgins RD,et al;Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development's Neonatal Research Network.Bloodstream infections in very low birth weight infants with intestinal failure.J Pediatr.2012;160(1):54-9.e2。

[0735] 18.Neu J,WalkerWA.Necrotizingenterocolitis.NEngl J Med.2011;364(3): 255-264.doi:10.1056/NEJMra1005408

[0736] 19.Nanthakumar N,Meng D,Goldstein AM,et al.The mechanism of excessive intestinal inflammation in necrotizing enterocolitis:an immature innate immune response.PLoS One.2011;6(3):e17776.doi:10.1371/journal.pone.0017776

[0737] 20.Mai V,Young CM,Ukhanova M,et al.Fecal microbiota in premature infants prior to necrotizing enterocolitis.PLoS One.2011;6(6):e20647.doi: 10.1371/journal.pone.0020647

[0738] 21.Lichtman JS,Marcobal A,Sonnenburg JL,Elias JE.Host-centric proteomics of stool:a novel strategy focused on intestinal responses to the gut microbiota.Mol Cell Proteomics.2013;12(11):3310-3318.doi:10.1074/ mcp.M113.029967

[0739] 22.Shifrin DA Jr,McConnell RE,Nambiar R,Higginbotham JN,Coffey RJ, TyskaMJ.Enterocyte microvillus-derived vesicles detoxify bacterial products and regulate epithelial-microbial interactions.Curr Biol.2012;22(7):627-631.doi:10.1016/j.cub.2012.02.022

[0740] 23.Shifrin DA Jr,TyskaMJ.Ready…aim…fire into the lumen:a new role

for enterocyte microvilli in gut host defense.Gut Microbes.2012;3(5):460-462.doi:10.4161/gmic.21247

[0741] 24.Cohen JF,Korevaar DA,Altman DG,et al.STARD 2015 guidelines for reporting diagnostic accuracy studies:explanation and elaboration.BMJ Open.2016;6(11):e012799.doi:10.1136/bmjopen-2016-012799

[0742] 25.Bossuyt PM,Cohen JF,Gatsonis CA,Korevaar DA;STARD group.STARD2015: updated reporting guidelines for all diagnostic accuracy studies.AnnTransl Med.2016;4(4):85。

[0743] 26.Bell MJ.Neonatal necrotizing enterocolitis.NEngl J Med.1978;298 (5):281-282.doi:10.1056/NEJM197802022980519

[0744] 27.Gephart SM,Spitzer AR,Effken JA,Dodd E,Halpern M,McGrath JM.Discrimination of GutCheck(NEC):a clinical risk index for necrotizing enterocolitis.J Perinatol.2014;34(6):468-475.doi:10.1038/jp.2014.37

[0745] 28.Battersby C,Longford N,Costeloe K,Modi N;UK Neonatal Collaborative Necrotising Enterocolitis Study Group.Development of a gestational age-specific case definition for neonatal necrotizing enterocolitis.JAMAPediatr.2017;171(3):256-263.doi:10.1001/jamapediatrics.2016.3633

[0746] 29.Gephart SM,Gordon PV,Penn AH,et al.Changing the paradigm of defining,detecting,and diagnosing NEC:perspectives on Bell's stages and biomarkers for NEC.SeminPediatr Surg.2018;27(1):3-10.doi:10.1053/j.sempedsurg.2017.11.002

[0747] 30.Buhimschi CS,Bhandari V,Hamar BD,et al.Proteomic profiling of the amniotic fluid to detect inflammation,infection,and neonatal sepsis.PLoS Med.2007;4(1):e18.doi:10.1371/journal.pmed.0040018

[0748] 31.Buhimschi CS,Buhimschi IA,Abdel-Razeq S,et al.Proteomic biomarkers of intra-amniotic inflammation:relationship with funisitis and early-onset sepsis in the premature neonate.Pediatr Res.2007;61(3):318-324.doi:10.1203/01.pdr.0000252439.48564.37

[0749] 32.Marcus E.Credibility and reproducibility.Cell.2014;159(5):965-966.doi:10.1016/j.cell.2014.11.016

[0750] 33.Fishman WH,Green S,Inglis NI.L-phenylalanine:an organ specific, stereospecific inhibitor of human intestinal alkaline phosphatase.Nature.1963;198:685-686.doi:10.1038/198685b0

[0751] 34.Fernley HN,WalkerPG.Inhibition of alkaline phosphatase by L-phenylalanine.Biochem J.1970;116(3):543-544.doi:10.1042/bj1160543

[0752] 35.Jensen KJ,Garmaroudi FS,Zhang J,et al.An ERK-p38 subnetwork coordinates host cell apoptosis and necrosis during coxsackievirus B3infection.Cell Host Microbe.2013;13(1):67-76.doi:10.1016/j.chom.2012.11.009

[0753] 36.Kang BH,Jensen KJ,Hatch JA,Janes KA.Simultaneous profiling of 194 distinct receptor transcripts in human cells.Sci Signal.2013;6(287):rs13.doi:10.1126/scisignal.2003624

[0754] 37.Bose AK,Janes KA.A high-throughput assay for phosphoprotein-specific phosphatase activity in cellular extracts.Mol Cell Proteomics.2013;12(3):797-806.doi:10.1074/mcp.O112.024059

[0755] 38.Towbin H,Staehelin T,Gordon J.Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets:procedure and some applications.Proc Natl Acad Sci U S A.1979;76(9):4350-4354.doi:10.1073/pnas.76.9.4350

[0756] 39.Burnette WN.“Western blotting”:electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A.Anal Biochem.1981;112(2):195-203.doi:10.1016/0003-2697(81)90281-5

[0757] 40.Spinola SM,Cannon JG.Different blocking agents cause variation in the immunologic detection of proteins transferred to nitrocellulose membranes.J Immunol Methods.1985;81(1):161-165.doi:10.1016/0022-1759(85)90132-2

[0758] 41.Dang Q,Mazumdar S,Houck PR.Sample size and power calculations based on generalized linear mixed models with correlated binary outcomes.Comput Methods Programs Biomed.2008;91(2):122-127.doi:10.1016/j.cmpb.2008.03.001

[0759] 42.Wynn JL.Defining neonatal sepsis.CurrOpin Pediatr.2016;28(2):135-140.doi:10.1097/MOP.0000000000000315

[0760] 43.Marik PE,TaebAM.SIRS,qSOFA and new sepsis definition.JThorac Dis.2017;9(4):943-945.doi:10.21037/jtd.2017.03.125

[0761] 44.Hintz SR,Kendrick DE,Stoll BJ,et al;NICHD Neonatal Research Network.Neurodevelopmental and growth outcomes of extremely low birth weight infants after necrotizing enterocolitis.Pediatrics.2005;115(3):696-703.doi:10.1542/peds.2004-0569

[0762] 45.Derikx JP,Evennett NJ,Degraeuwe PL,et al.Urine based detection of intestinal mucosal cell damage in neonates with suspected necrotisingenterocolitis.Gut.2007;56(10):1473-1475.doi:10.1136/gut.2007.128934

[0763] 46.Guthmann F,Borchers T,WolfrumC,Wustrack T,Bartholomaus S,Spener F.Plasma concentration of intestinal-and liver-FABP in neonates suffering from necrotizing enterocolitis and in healthy preterm neonates.Mol Cell Biochem.2002;239(1-2):227-234.doi:10.1023/A:1020508420058

[0764] 47.Sylvester KG,Ling XB,Liu GY,et al.A novel urine peptide biomarker-based algorithm for the prognosis of necrotising enterocolitis in human

infants.Gut.2014;63(8):1284-1292.doi:10.1136/gutjnl-2013-305130

[0765] 48.Thuijls G,Derikx JP,van Wijck K,et al.Non-invasive markers for early diagnosis and determination of the severity of necrotizing enterocolitis.Ann Surg.2010;251(6):1174-1180.doi:10.1097/SLA.0b013e3181d778c4

[0766] 49.Afrazi A,Sodhi CP,RichardsonW,et al.New insights into the pathogenesis and treatment of necrotizing enterocolitis:Toll-like receptors and beyond.Pediatr Res.2011;69(3):183-188.doi:10.1203/PDR.0b013e3182093280

[0767] 50.Morowitz MJ,Poroyko V,Caplan M,Alverdy J,Liu DC.Redefining the role of intestinal microbes in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis.Pediatrics.2010;125(4):777-785.doi:10.1542/peds.2009-3149

[0768] 51.Sodhi CP,Neal MD,Siggers R,et al.Intestinal epithelial Toll-like receptor 4 regulates goblet cell development and is required for necrotizing enterocolitis in mice.Gastroenterology.2012;143(3):708-718.e5,e705。

[0769] 52.Nanthakumar NN,Fusunyan RD,Sanderson I,WalkerWA.Inflammation in the developing human intestine:a possible pathophysiologic contribution to necrotizing enterocolitis.Proc Natl Acad Sci US A.2000;97(11):6043-6048.doi:10.1073/pnas.97.11.6043

[0770] 53.Rabinowitz SS,Dzakpasu P,Piecuch S,Leblanc P,Valencia G,Kornecki E.Platelet-activating factor in infants at risk for necrotizing enterocolitis.J Pediatr.2001;138(1):81-86.doi:10.1067/mpd.2001.110132

[0771] 54.Chaaban H,Shin M,Sirya E,Lim YP,Caplan M,Padbury JF.Inter-alpha inhibitor protein level in neonates predicts necrotizing enterocolitis.J Pediatr.2010;157(5):757-761.doi:10.1016/j.jpeds.2010.04.075

[0772] 55.Evennett NJ,Hall NJ,Pierro A,Eaton S.Urinary intestinal fatty acid-binding protein concentration predicts extent of disease in necrotizing enterocolitis.JPediatr Surg.2010;45(4):735-740.doi:10.1016/j.jpedsurg.2009.09.024

[0773] 56.Pourcyrous M,Korones SB,YangW,Boulden TF,Bada HS.C-reactive protein in the diagnosis,management,and prognosis of neonatal necrotizing enterocolitis.Pediatrics.2005;116(5):1064-1069.doi:10.1542/peds.2004-1806

[0774] 57.Gordon P,Christensen R,Weitkamp JH,Maheshwari A.Mapping the new world of necrotizing enterocolitis(NEC):review and opinion.EJNeonatol Res.2012;2(4):145-172。

[0775] 58.Kampanatkosol R,Thomson T,Habeeb O,et al.The relationship between reticulated platelets,intestinal alkaline phosphatase,and necrotizing enterocolitis.JPediatr Surg.2014;49(2):273-276.doi:10.1016/j.jpedsurg.2013.11.037

[0776] 59.McLachlan R,Coakley J,Murton L,Campbell N.Plasma intestinal alkaline phosphatase isoenzymes in neonates with bowel necrosis.J Clin

Pathol.1993;46(7):654-659.doi:10.1136/jcp.46.7.654

[0777] 补充(S)参考文献

[0778] S1.Gupta A,Paria A.Etiology and medical management of NEC.Early Hum Dev.2016;97:17-23。

[0779] S2.Gephart SM,Gordon PV,Penn AH,et al.Changing the paradigm of defining,detecting,and diagnosing NEC:Perspectives on Bell's stages and biomarkers for NEC.SeminPediatr Surg.2018;27(1):3-10。

[0780] S3.Center for Disease Control and Prevention.CDC/NHSN surveillance definitions for specific types of infections.In2018 NHSN Patient Safety Component Manual.USDepartment of Health and Human Services National Healthcare SafetyNetwork,2018edition:17.11-17.30。

[0781] S4.Singer M,Deutschman CS,Seymour CW,et al.The third international consensus definitions for sepsis and septic shock(Sepsis-3).JAMA.2016;315(8):801-810。

[0782] S5.Henthorn PS,Raducha M,Edwards YH,et al.Nucleotide and amino acid sequences of human intestinal alkaline phosphatase:close homology to placental alkaline phosphatase.Proc Natl Acad Sci U S A.1987;84(5):1234-1238。

[0783] S6.Henthorn PS,Raducha M,Kadesch T,Weiss MJ,Harris H.Sequence and characterization of the human intestinal alkaline phosphatase gene.J Biol Chem.1988;263(24):12011-12019。

[0784] S7.Miki K,Suzuki H,Iino S,Oda T,Hirano K,Sugiura M.Human fetal intestinal alkaline phosphatase.ClinChim Acta.1977;79(1):21-30。

[0785] S8.Shah J,Singhal N,da Silva O,et al.Intestinal perforation in very preterm neonates:risk factors and outcomes.J Perinatol.2015;35(8):595-600。

[0786] S9.Attridge JT,Herman AC,Gurka MJ,Griffin MP,McGahren ED,Gordon PV.Discharge outcomes of extremely low birth weight infants with spontaneous intestinal perforations.J Perinatol.2006;26(1):49-54。

[0787] S10.Hornik CP,Benjamin DK,Becker KC,et al.Use of the complete blood cell count in late-onset neonatal sepsis.Pediatr Infect Dis J.2012;31(8):803-807。

[0788] S11.Wynn JL.Defining neonatal sepsis.CurrOpin Pediatr.2016;28(2):135-140。

[0789] S12.Marik PE,TaebAM.SIRS,qSOFA and new sepsis definition.JThorac Dis.2017;9(4):943-945。

[0790] S13.Wynn JL,PolinRA.Progress in the management of neonatal sepsis:the importance of a consensus definition.Pediatr Res.2018;83(1-1):13-15。

[0791] S14.Buhimschi CS,Bhandari V,Hamar BD,et al.Proteomic profiling of the amniotic fluid to detect inflammation,infection,and neonatal sepsis.PLoS Med.2007;4(1):e18。

[0792] S15.Buhimschi CS,Buhimschi IA,Abdel-Razeq S,et al.Proteomic biomarkers of intra-amniotic inflammation:relationship with funisitis and early-onset sepsis in the premature neonate.Pediatr Res.2007;61(3):318-324。

[0793] S16.Corazziari E,Staiano A,Miele E,Greco L,Italian Society of Pediatric Gastroenterology H,Nutrition.Bowel frequency and defecatory patterns in children:a prospective nationwide survey.Clin Gastroenterol Hepatol.2005;3(11):1101-1106。

[0794] S17.Rose C,Parker A,Jefferson B,Cartmell E.The characterization of feces and urine:a review of the literature to inform advanced treatment technology.Crit Rev Environ Sci Technol.2015;45(17):1827-1879。

[0795] S18.Consortium U.Reorganizing the protein space at the Universal Protein Resource(UniProt).Nucleic Acids Res.2012;40(Database issue):D71-75。

[0796] S19.Verberkmoes NC,Russell AL,Shah M,et al.Shotgun metaproteomics of the human distal gut microbiota.ISME J.2009;3(2):179-189。

[0797] S20.Mahowald MA,Rey FE,Seedorf H,et al.Characterizing a model human gut microbiota composed of members of its two dominant bacterial phyla.Proc Natl Acad Sci U SA.2009;106(14):5859-5864。

[0798] S21.Erickson AR,Cantarel BL,Lamendella R,et al.Integrated metagenomics/metaproteomics reveals human host-microbiota signatures of Crohn's disease.PLoS One.2012;7(11):e49138。

[0799] S22.Flynn MA,Gehrke C,Maier BR,Tsutakawa RK,HentgesDJ.Effect of diet on fecal nutrients.J Am Diet Assoc.1977;71(5):521-526。

[0800] S23.Beyer PL,Flynn MA.Effects of high-and low-fiber diets on human feces.J Am Diet Assoc.1978;72(3):271-277。

[0801] S24.Cummings JH,Branch W,Jenkins DJ,Southgate DA,Houston H,James WP.Colonic response to dietary fibre from carrot,cabbage,apple,bran.Lancet.1978;1(8054):5-9。

[0802] S25.Stephen AM,Wiggins HS,Cummings JH.Effect of changing transit time on colonic microbial metabolismin man.Gut.1987;28(5):601-609。

[0803] S26.Janes KA.An analysis of critical factors for quantitative immunoblotting.Sci Signal.2015;8(371):rs2。

[0804] S27.Peterson BW,Sharma PK,van der Mei HC,BusscherHJ.Bacterial cell surface damage due to centrifugal compaction.Appl Environ Microbiol.2012;78(1):120-125。

[0805] S28.Livshits MA,Khomyakova E,Evtushenko EG,et al.Isolation of exosomes by differential centrifugation:Theoretical analysis of a commonly used protocol.Sci Rep.2015;5:17319。

[0806] S29.Goldberg RF,Austen WG,Jr.,Zhang X,et al.Intestinal alkaline phosphatase is a gut mucosal defense factor maintained by enteral

nutrition.Proc Natl Acad Sci U S A.2008;105(9):3551-3556。

[0807] S30.PetitClerc C.Quantitative fractionation of alkaline phosphatase isoenzymes according to their thermostability.Clin Chem.1976;22(1):42-48。

[0808] S31.O'Brien PJ,Herschlag D.Alkaline phosphatase revisited:hydrolysis of alkyl phosphates.Biochemistry.2002;41(9):3207-3225。

[0809] S32.Bale JR,Chock PB,Huang CY.The nature of negative cooperativity in alkaline phosphatase:kinetic patterns contrary to the flip-flop model.J Biol Chem.1980;255(18):8424-8430。

[0810] S33.Fernley HN,Walker PG.Kineticbehaviour of calf-intestinal alkaline phosphatase with 4-methylumbelliferyl phosphate.Biochem J.1965;97(1):95-103。

[0811] S34.Levine MN,Raines RT.Sensitive fluorogenic substrate for alkaline phosphatase.Anal Biochem.2011;418(2):247-252。

[0812] S35.Olson BJ,Markwell J.Assays for determination of protein concentration.CurrProtoc Protein Sci.2007;第3章:单元34。

[0813] S36.Bradford MM.A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.Anal Biochem.1976;72:248-254。

[0814] S37.Zor T,Selinger Z.Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity:theoretical and experimental studies.Anal Biochem.1996;236(2):302-308。

[0815] S38.Brody JP,Williams BA,Wold BJ,Quake SR.Significance and statistical errors in the analysis of DNA microarray data.Proc Natl Acad Sci U S A.2002;99(20):12975-12978。

[0816] S39.Tricarico C,Pinzani P,Bianchi S,et al.Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction:normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies.Anal Biochem.2002;309(2):293-300。

[0817] S40.Towbin H,Staehelin T,Gordon J.Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets:procedure and some applications.Proc Natl Acad Sci U S A.1979;76(9):4350-4354。

[0818] S41.Burnette WN."Western blotting":electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A.Anal Biochem.1981;112(2):195-203。

[0819] S42.Spinola SM,Cannon JG.Different blocking agents cause variation in the immunologic detection of proteins transferred to nitrocellulose membranes.J Immunol Methods.1985;81(1):161-165。

[0820] S43.Lee JW,Devanarayan V,Barrett YC,et al.Fit-for-purpose method development and validation for successful biomarker measurement.Pharm

Res.2006;23(2):312-328。

[0821] S44.Leek JT,Scharpf RB,Bravo HC,et al.Tackling the widespread and critical impact of batch effects in high-throughput data.Nat Rev Genet.2010;11(10):733-739。

[0822] e表1.用于分类新生儿坏死性小肠结肠炎的诊断和疑似的研究标准

[0823] 研究分类源自疾病严重性定义的最小共同要求。1,2满足的研究标准排序是(1)放射学体征,(2)腹部体征,(3)临床发现,和(4)实验室发现;对于分类为NEC的每位患者,识别了一种放射学体征和一种来自其他组的标准。

[0824]

研究分类	放射学体征	腹部体征	临床发现	实验室发现
严重NEC 放射性学确认的疾病	肠积气、门静脉积气、腹腔积气、肠穿孔	中度到重度腹部腹胀、压痛、和/或变色、腹部蜂窝织炎、活动减退或无肠鸣音、固定的右下腹腹部肿块、腹膜炎体征	胆汁分泌物、呕吐、血便、进食不耐受、进食前胃残留量增加、呼吸暂停和/或心动过缓增加、温度不稳定、嗜睡、全身性临床症状出现、全身性不稳定(严重呼吸暂停、心动过缓增加、休克、DIC、低血压、呼吸障碍)	凝血病、血小板减少、白细胞增多或白细胞减少、中性粒细胞减少、杆状核粒细胞增多症、血红素阳性粪便、代谢性酸中毒
疑似NEC 放射性学未确认的疾病	无肠积气、轻度肠扩张、轻度肠梗阻、肠壁增厚、肠气稀少/缺乏	中度到重度腹部腹胀	同上面NEC诊断的临床发现标准	血小板减少、白细胞增多或白细胞减少、中性粒细胞减少、杆状核粒细胞增多症、血红素阳性粪便、代谢性酸中毒

[0825] e表2.用于局灶性或自发性肠穿孔的研究标准

[0826] 满足的研究标准的排序是(1)放射性学体征,(2)腹部体征,(3)临床发现,和(4)实验室发现

[0827]

分类研究	放射性学体征	腹部体征	临床发现	实验室发现
局灶性或自发性肠穿孔	肠穿孔、腹腔积气、无肠积气	腹胀、腹壁变色	无症状的、低血压	白细胞增多

[0828] e表3.用于定义胃肠道外病原性感染的研究标准

[0829] 分类研究遵循美国疾病控制中心/美国国家健康安全网络(CDC/NHSN)的感染定义。满足的研究标准的排序为(1)实验室发现和(2)临床发现。四种类型的感染被排除并且在本研究中不汇报:(i)早期发作败血症(72小时胎龄钱),因为在全部三个医院中心都给出

生时的婴儿预防性施用了抗生素;(ii)被鉴定为另一感染部位的附属的血流感染;(iii)与使用中枢线相关的感染;和(iv)实验室检测到芽生菌属、组织胞浆菌属、球孢子菌属、副球孢子菌属、隐球菌属和肺囊虫属,它们通常引起社区相关感染并且很少已知引起健康相关感染。

[0830]

研究分类	实验室发现	临床发现
新生儿败血症，迟发作	胎龄七十二小时后，在1个或更多血液或血清样本中确认的在NBSN通用列表中未包括的细菌、病毒或真菌病原，通过培养或非培养微生物测试法获得确认，识别的生物与另一部位感染无关	非特异性，包括但不限于：体温不规律、呼吸窘迫、低血压、进食不耐受、葡萄糖不耐受、神经系统变化(无精打采/易怒、发作、张力减退)、腹部灌注、进食问题、无法解释的黄疸
其他确诊的非GI感染	在无菌体液例如脑脊液(CSF)、气管吸出物、尿液和/或关节液中确认细菌、病毒或真菌病原	同上面败血症的临床发现标准
阴性感染 *疑似感染*	白细胞增多或白细胞减少、未成熟中性粒细胞计数升高、中性粒细胞绝对计数低以及C反应性蛋白和血清碱性磷酸酯升高	同上面败血症的临床发现标准
无感染担忧	没有做实验室测试	无症状

[0831] e表4.不同临床点的NEC组的汇总

[0832] 按医院点提供临床上定为NEC疑似或严重NEC的招募婴儿数量。显示的组值是每个点招募的受试者总数,按胎龄(GA)框和需要手术干预(腹水引流或剖腹手术)的病例数分组。斜体和在括号中的百分数涉及按组和出生时孕龄的病例数除以所有受试者。NEC病例和疑似的数量按出生时<27周或≥27周GA分层。斜体和括号中的中位数和相随的四分点值用于识别组的孕后龄和天数以及出生时孕龄。提供了与坏死性肠结肠炎相关的死亡数。缩写:surg inter,手术干预;CH,路易斯安那州新奥尔良儿童医院;TI,路易斯安那州新奥尔良Touro Infirmary;WU,密苏里圣路易斯华盛顿大学。

[0833]

组				疑似NEC				严重NEC			
地点	GA (wks)	# 风险婴儿	# surg inter	# 婴儿	初始发作时间			# 婴儿	初始发作时间		
					PCA (wks)	天龄	体重 (g)		PCA (wks)	天龄	体重 (g)
CH	< 27	14*	2 (14%)	1 (7%)	29.3	37	901	2 (14%)	32.6 (31.8-33.4)	49 (47-50)	1463 (1274-1651)
	≥ 27	15	2 (13%)	5 (33%)	33.6 (30.9-35.4)	27 (23-29)	1464 (1130-1600)	3 (20%)	33.1 (32.1-33.7)	31 (19-32)	1620 (1390-1705)
	总计	29	3 (14%)	6 (21%)	32.2 (29.7-35.0)	28 (24-35)	1297 (958-1566)	5 (17%)	33.1 (31.0-34.1)	33 (31-45)	1620 (1159-1790)
TI	< 27	22	0	1 (4%)	26.9	13	553	2 (9%)	34.7	66	1913
	≥ 27	46	3 (7%)	9 (20%)	29.9 (29-30.7)	9 (5-12)	1043 (994-1105)	4 (9%)	32.4 (30.7-34.6)	13 (9-16)	1310 (1165-1480)
	总计	68	3 (4%)	10 (15%)	29.9 (28.6-30.7)	9 (5-12)	1043 (894-1104)	6 (9%)	33.8 (31.7-35.0)	17 (11-49)	1516 (1250-1623)
WU	< 27	17	4 (24%)	3 (18%)	26.9 (26.9-27.9)	19 (16-20)	820 (765-860)	8 (47%)	27.1 (26.9-34.0)	21 (16-59)	1075 (704-1491)
	≥ 27	22**	0	0	-	-	-	6 (27%)	37.7 (35.6-40.1)	17 (9-41)	2310 (2093-2565)
	总计	39	4 (10%)	3 (8%)	26.9 (26.9-27.9)	19 (16-20)	820 (765-860)	14 (36%)	35 (27.0-37.5)	21 (10-46)	1705 (1040-2255)
全部	< 27	53	6 (11%)	5 (9%)	26.9 (26.9-28.4)	19 (13-21)	820 (710-880)	12 (22%)	32.4 (27.1-34.3)	49 (20-62)	1265 (960-1739)
	≥ 27	83	5 (6%)	14 (17%)	30.7 (29.1-32.9)	12 (5-26)	1103 (999-1421)	13 (16%)	34.3 (33.1-37.0)	16 (9-31)	1650 (1430-2220)
	总计	136	11 (8%)	19 (14%)	29.4 (28.6-30.9)	13 (8-25)	1015 (873-1254)	25 (18%)	33.9 (31.0-35.7)	21 (10-52)	1620 (1110-2050)

[0834] *在婴儿监护权转移至国家看护后从研究中移除一个被招募者的记录和样品

[0835] **两个婴儿在父母请求下在PCA第32周中断参与研究:不包括PCA第32周后的数据(疾病、手术、死亡等)。没有婴儿具有NEC、败血症、确认的非GI部位感染或sIP。

[0836] e表5.25个放射性学确认的招募的坏死性小肠结肠炎(严重)病例列表

[0837] 定义严重NEC的标准示于表e1;主要标准通过放射性学证据确认。父母种族/种族渊源自认的缩写:B=非裔美国人;W=白人;H=西班牙裔。其他缩写:GA=孕龄;M=男性;F=女性;C=剖腹产;V=自然生产

[0838]

受试者 ID	GA (wks)	出生体重 (g)	性别	种族/种族渊源	出生方式	初始NEC诊断时间			Bell 分期	死亡于 NICU
						PCA (wks)	生命天数	体重 (g)		
C1	29.9	700	F	B	C	34.3	31	1159	2 A	否
C2	24.6	650	F	B	C	31.0	45	1085	2 B	否
C3	26.9	991	M	B	V	34.1	52	1840	2 A	否
C4	28.4	1013	F	B	V	33.1	33	1790	2 B	否
C5	30.1	1620	M	B	V	31.0	7	1620	3 B	否
T1	30.0	1240	M	W	C	31.0	7	1190	2 B	否
T2	28.7	1010	F	H	C	29.9	9	1090	2 B	否
T3	32.4	1440	F	B	V	33.9	16	1430	3 B	否
T4	25.3	815	M	B	C	33.7	59	1602	2 A	否
T5*	25.0	855	M	B	C	35.7	73	2234	2 A	否
T6	34.6	1380	M	H	C	37.0	17	1630	3 B	否
W1	34.0	2360	F	W	C	35.1	9	2050	2 A	否
W2	24.3	700	F	B	C	25.1	7	720	2 B	否
W3	31.1	1190	F	W	C	34.3	24	1650	2 B	否
W4	26.0	480	M	W	C	33.7	55	1420	2 B	是
W5	36.7	2565	M	W	V	43.1	46	2620	2 B	否
W6	36.3	2330	F	W	C	37.0	6	2220	2 B	否
W7	24.3	750	M	W	C	27.1	21	1110	3 B	否
W8	24.3	650	F	W	C	27.1	21	1040	3 A	是
W9	24.7	640	M	W	C	27.1	18	630	2 B	否
W10*	24.6	630	F	W	C	25.9	10	655	3 A	是
W11	27.6	790	M	W	C	40.7	93	2700	3 B	是
W12*	37.1	2530	F	W	C	38.4	10	2400	2 A	否
W13*	25.0	760	M	B	C	34.9	69	2255	2 A	否
W14*	23.6	430	M	W	C	37.6	99	1705	2 B	否

[0839] *在NEC时间未获得样品。如果在放射性学和临床定义的NEC期间未获得样品,则来自婴儿的所有样品从横截面分析中排除

[0840] *由于招募时孕龄>37周排除研究受试者

[0841] e表6.招募的19名疑似坏死性小肠结肠炎病例的列表

[0842] 定义疑似NEC的标准示于表e1;这些病例不能通过放射性学证据确认。示出了通过参与肿瘤学家在医疗记录中记录的Bell期,其不同于我们的手写标准。父母种族/种族渊源自认的缩写:B=非裔美国人;W=白人;H=西班牙裔。其他缩写:GA=孕龄;M=男性;F=女性;C=剖腹产;V=自然生产

受试者 ID	GA (wk)	出生体重 (g)	性别	种族/种族渊源	出生方式	NEC疑似诊断时间			Bell 分期	死亡于 NICU
						PCA (wks)	生命天数	体重 (g)		
C6	28.0	810	M	B	V	28.9	8	885	1	否
C7	29.4	1340	M	B	V	33.6	29	1740	1	否
C8*	29.4	1130	F	W	C	35.4	42	1600	1	否
C9	24.0	715	M	B	V	29.3	37	901	1	否
C10	32.7	1170	F	B	C	36.0	23	1464	1	否
C11*	27.0	850	M	B	C	30.9	27	1130	1	否
T7*	30.0	1200	F	W	C	30.7	6	1105	1	否
T8	28.7	1120	M	B	C	29.4	5	1070	1	否
T9	29.1	1485	M	B	C	30.7	11	1435	1	否
T10	32.3	1420	M	B	C	35.0	2	1377	1	否
T11	29.6	1170	M	B	C	30.3	5	994	1	否
T12*	28.9	1190	F	W	V	30.6	12	1100	1	否
T13	25.0	560	F	B	V	26.9	13	553	1	否
T14	26.7	531	F	B	C	27.7	7	490	1	否
T15	26.7	860	M	B	C	28.4	12	860	1	否
T16	26.9	940	M	W	C	29.0	29	1015	1	否
W15**	24.3	700	M	W	C	26.9	19	900	3 B	是
W16	26.0	830	F	B	C	28.9	21	710	1	否
W17	25.1	790	M	B	C	26.9	13	820	1	否

[0843] *在NEC时间未获得样品。如果在放射性学和临床定义的NEC期间未获得样品,则来自婴儿的所有样品从横截面分析中排除

[0844] **多个评估没有肠积气、门静脉气或腹腔积气的腹部放射学证据和腹部超声证据

[0845] e表7.具有自发性肠穿孔(SIP)和坏死性小肠结肠炎的3名招募的婴儿的列表

[0846] 父母种族/种族渊源自认的缩写:B=非裔美国人;W=白人;H=西班牙裔。其他缩写:GA=出生时孕龄;M=男性;F=女性;C=剖腹产;V=自然生产;NA=不适用

[0847]

受试者 ID	GA (wk)	出生体重 (g)	性别	种族	SIP诊断时间			NEC诊断或疑似时间					
					PCA (wks)	生命天数	体重 (g)	SIP后天数	PCA (wks)	生命天数	体重 (g)	研究分类	Bell 分期
C1	29.9	700	F	B	30.4	5	800	26	34.3	31	1159	诊断	2A
C7	29.4	1340	M	B	30.4	7	1360	22	33.6	29	1740	疑似	1
W11	27.6	790	M	W	28.4	7	940	86	40.7	93	2700	诊断	3B

[0848] e表8.既不是临床诊断有也不是疑似有坏死性小肠结肠炎的86名招募婴儿列表

[0849] 父母种族/种族渊源自认的缩写:B=非裔美国人;W=白人;H=西班牙裔。其他缩写:GA=孕龄;M=男性;F=女性;C=剖腹产;V=自然生产

[0850]

受试者 ID	GA (wks)	出生体重 (g)	性别	种族/种族渊源	分娩方式	死亡于 NICU
C13	25.0	710	F	B	C	否
C14	24.4	710	F	B	C	否
C15	24.6	715	M	B	C	否
C16	27.1	915	F	B	V	否
C17	23.9	490	F	B	V	否
C18	26.0	855	M	B	C	否
C19	27.0	950	F	H	C	否
C20	31.7	1289	M	W	C	否
C21	30.9	1390	M	B	C	否
C22	24.1	630	M	W	C	否
C23	27.0	1075	F	H	C	否
C24	30.0	1489	M	B	V	否
C25	26.0	589	F	B	C	否
C26	31.6	1435	F	W	C	否
T17	24.6	655	M	B	V	否
T18	25.9	845	M	B	V	否
T19	25.1	680	M	W	V	否
T20	29.7	1035	M	B	C	否
T21	29.9	1075	F	B	C	否
T22	30.0	790	F	W	C	否
T23	25.3	540	F	B	C	否
T24	23.6	540	M	B	C	否
T25	27.4	1500	F	B	V	否
T26	28.7	1100	M	B	C	否
T27	26.9	800	F	W	C	否
T28	25.6	805	F	B	C	否
T29	24.6	655	M	W	V	否
T30	26.9	1025	F	B	C	是
T31	35.3	1240	F	B	C	否
T32	30.0	850	M	H	C	否
T33	30.0	1330	M	B	C	否
T34	34.1	2450	F	B	C	否
T35	34.1	2520	F	B	C	否
T36	30.9	1390	M	B	C	否
T37	26.4	910	F	B	V	否
T38	26.0	915	F	B	C	否

[0851] e表8(续).既不是临床诊断有也不是疑似有坏死性小肠结肠炎的86名招募婴儿列表

[0852] 父母种族/种族渊源自认的缩写:B＝非裔美国人;W＝白人;H＝西班牙裔。其他缩写:GA＝孕龄;M＝男性;F＝女性;C＝剖腹产;V＝自然生产

[0853]

受试者 ID	GA (wks)	出生体重 (g)	性别	种族/种族渊源	分娩方式	死亡于 NICU
T39	25.0	625	M	B	C	否
T40	26.9	1000	M	W	C	否
T41	26.4	985	M	B	V	否
T42	37.0	2703	F	B	V	否
T43	28.1	1050	M	B	C	否
T44	29.1	1310	F	B	C	否
T45	29.1	1265	M	B	C	否
T46	29.7	1350	M	B	V	否
T47	26.4	845	F	B	C	否
T48	28.4	1135	M	B	C	否
T49	29.6	1291	M	W	C	否
T50	29.3	1270	M	B	C	否
T51	30.3	1150	M	B	C	否
T52	32.1	1450	M	B	V	否
T53	30.3	1020	F	B	C	否
T54	32.4	1050	F	B	V	否
T55	32.6	1525	F	B	C	否
T56	32.6	1490	F	B	C	否
T57	32.4	1220	F	B	C	否
T58	32.3	1140	F	B	C	否
T59	31.1	1335	F	B	C	否
T60	32.4	1160	F	B	C	否
T61	32.3	1770	M	W	C	否
T62	34.1	1470	F	B	C	否
T63	34.3	1230	M	B	C	否
T64	35.6	1210	M	B	C	否
T65	37.1	2320	M	B	C	否
T66	32.3	1380	M	B	C	否
W18	26.7	930	F	W	C	是
W19	29.9	1700	F	W	V	否
W20	25.0	670	F	B	C	否
W21	26.4	790	F	B	V	否
W22	29.4	1150	F	W	C	否
W23	29.3	1400	M	W	V	否
W24	27.3	1160	M	W	C	否

[0854] e表8(续).既不是临床诊断有也不是疑似有坏死性小肠结肠炎的86名招募婴儿列表

[0855] 父母种族/种族渊源自认的缩写:B＝非裔美国人;W＝白人;H＝西班牙裔。其他缩写:GA＝孕龄;M＝男性;F＝女性;C＝剖腹产;V＝自然生产

[0856]

受试者 ID	GA (wks)	出生体重 (g)	性别	种族/种族渊源	分娩方式	死亡于 NICU
W25	27.3	1060	M	W	C	
W26	29.3	1580	F	W	C	否
W27	31.9	2200	M	W	V	否
W28	27.4	1110	F	W	V	否
W29	31.9	1565	F	B	V	否
W30	26.0	1030	F	B	V	否
W31	29.1	1400	M	W	V	否
W32	29.1	1370	F	W	V	否
W33	26.6	890	F	B	V	否
W34	29.6	1515	F	W	V	否
W35	28.1	1200	M	W	C	否
W36	27.9	1050	M	B	V	否
W37	27.9	1140	F	B	V	否
W38	25.4	630	F	B	C	否
W39	36.4	3161	M	W	C	否

[0857] e表9.在不同临床地点的败血症和其他非胃肠道感染组的汇总

[0858] 按医院点提供临床上定为有败血症或其他非胃肠道感染的招募婴儿数量。3,4显示的组值是每个点招募的受试者总数,按胎龄(GA)框分组。斜体和在括号中的百分数涉及按组和出生时孕龄的病例数除以所有受试者。斜体和括号中的中位数和相随的四分点值用于识别孕后龄、天数以及出生时体重。缩写:GA,出生时孕龄;CH,路易斯安那州新奥尔良儿童医院;TI,路易斯安那州新奥尔良Touro Infirmary;WU,密苏里圣路易斯华盛顿大学。

[0859]

组			其他非胃肠道感染				败血症			
地点	GA (wks)	# 风险婴儿	# 婴儿	最接近NEC的发作			# 婴儿	最接近NEC的发作		
				PCA (wks)	天龄	体重 (g)		PCA (wks)	天龄	体重 (g)
CH	< 27	14	4 (21%)	28.4 (26.9-30.4)	17 (12-38)	900 (780-1130)	4 (29%)	31.6 (27.8-35.9)	46 (13-80)	1375 (978-1725)
	≥ 27	15	4 (27%)	31.6 (30.9-32)	32 (25-34)	1154 (1061-1198)	0	0	0	0
	总计	29	8 (28%)	31.6 (28.6-32)	31 (12-37)	1030 (878-1219)	4 (14%)	31.6 (27.8-35.9)	46 (13-80)	1375 (978-1725)
TI	< 27	22	5 (23%)	29 (28.6-29.6)	26 (26-28)	960 (955-1030)	6 (27%)	28.3 (27.3-28.9)	16 (9-27)	820 (623-926)
	≥ 27	46	2 (4%)	32.2	29	2045	6 (13%)	32.3 (31.8-33)	17 (13-22)	1303 (1200-1407)
	总计	68	7 (10%)	29.6 (28.8-32.2)	26 (25-33)	1030 (958-1565)	12 (18%)	30.6 (28.4-32.1)	17 (10-24)	1140 (830-1266)
WU	< 27	17	1 (6%)	25.3	8	720	8 (47%)	30 (26.6-33.6)	41 (24-56)	1070 (958-1310)
	≥ 27	22	0	0	0	0	2 (9%)	35.6 (34.8-36.3)	19 (13-24)	2150 (2115-2185)
	总计	39	1 (3%)	25.3	8	720	10 (26%)	32 (28.7-35.4)	32 (22-51)	1108 (980-2034)
全部	< 27	53	7 (13%)	28.4 (26.4-28.8)	23 (13-26)	900 (708-958)	18 (34%)	28.8 (28-32)	27 (15-51)	1000 (810-1194)
	≥ 27	83	6 (7%)	31.6 (31.6-32.6)	32 (23-37)	1219 (1142-1575)	8 (10%)	33 (31.8-34.8)	17 (12-24)	1397 (1220-2115)
	总计	136	15 (11%)	29 (28.4-31.7)	26 (17-32)	960 (855-1260)	26 (19%)	31.1 (28.5-33.8)	22 (13-45)	1108 (951-1630)

[0860] e表10.所有26名招募的迟发作新生儿败血症病例的列表

[0861] 败血症事件在时间上最接近NEC发作或是在研究纳入后。缩写:GA＝出生时孕龄;M＝男性;F＝女性;B＝非裔美国人;W＝白人;H＝西班牙裔;C＝剖腹产;V＝自然生产;NA＝不适用

[0862]

受试者 ID	GA (wk)	出生体重 (g)	性别	种族/种族渊源	分娩方式	败血症的时间		接受抗生素的总天数(占住NICU的%)	NEC Bell分期(如果适用)	死亡于 NICU
						PCA (wks)	生命天数			
C3*	26.9	991	M	B	V	28	8	19 (25%)	2 A	否
C13	25.0	710	F	B	C	27.1	15	28 (30%)	NA	否
C14	24.4	710	F	B	C	35.3	76	31 (20%)	NA	否
C15	24.6	715	M	B	C	37.6	91	61 (33%)	NA	否
T2	28.7	1010	F	H	C	29.9	9	23 (12%)	2 B	否
T4	25.3	815	M	B	C	28.4	22	20 (23%)	2 A	否
T6	34.6	1380	M	H	C	41.1	46	44 (17%)	3 B	否
T7	30.0	1200	F	W	C	31.9	13	30 (5%)	1	否
T13	25.0	560	F	B	V	29.0	28	19 (22%)	1	否
T14	26.7	531	F	B	C	28.1	10	32 (39%)	1	否
T17	24.6	655	M	B	V	25.6	7	30 (16%)	NA	否
T18	25.9	845	M	B	V	27.0	8	18 (19%)	NA	否
T19*	25.1	680	M	W/B	V	31.3	43	47 (29%)	NA	否
T20	29.7	1305	M	B	C	32.7	21	6 (12%)	NA	否
T21	29.9	1075	F	B	C	31.7	13	10 (27%)	NA	否
T22	30.0	790	F	W	C	33.1	22	17 (30%)	NA	否
W2*	24.3	700	F	B	C	29.1	34	20 (20%)	2 B	否
W4*	26.0	480	M	W	C	32.9	48	36 (46%)	2 B	是
W6	36.3	2330	F	W	C	37.1	7	8 (57%)	2 B	否
W8	24.3	650	F	W	C	27.1	21	10 (48%)	3 A	是
W14*	23.6	430	M	W	C	31.0	52	49 (31%)	2 B	否
W17*	25.1	790	M	B	C	35.9	75	14 (14%)	1 B	否
W18*	26.7	930	F	W	C	36.0	66	17 (23%)	NA	是
W19*	29.9	1700	F	W	V	34.0	30	10 (20%)	NA	否
W20*	25.0	670	F	B	C	25.0	1	25 (19%)	NA	否
W21*	26.4	790	F	B	V	28.6	16	31 (22%)	NA	否

[0863] **在败血症期间未获得样品。如果在疾病期间未获得样品,则来自婴儿的所有样品从败血症横截面分析中排除

[0864] e表11.尿液、固或气管中确认的非胃肠道感染的所有14个病例的列表

[0865] 缩写:GA=出生时孕龄;PCA=孕后龄;M=男性;F=女性;C=剖腹产;V=自然生产;T=气管;B=骨;U=尿液;S=皮肤

[0866]

受试者ID	GA (wk)	出生体重 (g)	性别	种族/种族渊源	分娩方式	感染的时间		接受抗生素的总天数(占住NICU的%)	NEC Bell分期(如果适用)	感染部位
						PCA (wks)	生命天数			
C6	28.0	810	M	B	V	28.7	5	13 (11%)	1	T
C11	27.0	850	M	B	C	32.9	41	18 (18%)	1	T
C16	27.1	915	F	B	V	31.6	31	25 (19%)	1	B,T
C17	23.9	490	F	B	V	32.3	59	36 (27%)	NA	T
C18	26.0	855	M	B	C	28.4	17	30 (19%)	NA	T
C19	27.0	950	F	H	C	31.7	32	7 (10%)	NA	T
T5	25.0	855	M	B	C	28.6	23	13 (15%)	2 A	T
T23	25.3	540	F	B	C	29.0	26	15 (18%)	NA	T
T24*	23.6	540	M	B	C	27.3	26	30 (18%)	NA	T
T25*	27.4	1500	F	B	V	32.9	38	8 (16%)	NA	S
T26*	28.7	1100	M	B	C	31.6	20	18 (21%)	NA	T
T27	26.9	800	F	W	C	34.3	52	8 (8%)	NA	U
T28	25.6	805	F	B	C	29.6	28	10 (13%)	NA	S
W2*	24.3	700	F	B	C	25.3	8	20 (10%)	2 B	T

[0867] *在非胃肠道感染期间未获得样品。如果在感染期间未获得样品,则来自婴儿的所有样品从败血症横截面分析中排除

[0868] e表12.肠腔内容物的体外测量的准确度和重复性

[0869] 总蛋白浓度的参考标准是牛血清白蛋白;使用牛血清白蛋白的消光系数(43,824M-1cm-1)和比尔定律确定预期的吸光度(ABS)校准标准。生化活性的参考标准是4-甲基伞形酮基磷酸酯;试剂盒制造商提供预期的相对荧光单位。显示了每个分析物的中位实验测量值、重复性和准确度。P值≥0.05表示测量之间没有显著差异。缩写:ABS=吸光度;RFU=相对荧光单位;SE=标准误差;SI=小肠;ND=未确定

[0870]

测定法	原始数据			重复性		准确度	
粪便上清液中总蛋白浓度 *(布拉德福德测定)*	参考标准 (mg/ml)	预期的 $ABS_{595\ nm}$	中位实验 $ABS_{595\ nm}$	操作者之间 SE	p-值	与绝对值的偏差%	p-值
	0.750	0.166	0.176	0.010	0.52	4	0.52
	0.500	0.111	0.123	0.007	0.43	1	0.81
	0.250	0.055	0.055	0.003	0.52	10	0.18
	0.125	0.027	0.220	0.002	0.72	28	0.0003
	0.025	0.004	0.002	0.001	0.10	70	<0.0001
	0.000	0.000	0.001	0.001	0.22	50	0.0002

iAP 生化活性 *(MUP 测定)*	参考标准 (nmol)	预期的 RFU	中位实验 RFU	操作者之间 SE	p-值	与绝对值的偏差%	p-值
	0.5	20,957,775	19,915,897	1,685,719	0.28	5	0.55
	0.4	16,951,461	16,448,436	839,613	0.45	2	0.72
	0.3	12,945,147	12,900,112	757,993	0.27	1	0.90
	0.2	8,938,833	8,419,157	630,068	0.47	3	0.70
	0.1	4,932,519	4,555,401	298,513	0.34	0	0.99
	0	926,205	85,588	2,049	0.88	91	0.008

iAP 丰度 *(免疫印迹)*	参考标准	预期浓度 (μg)	中位实验 RFU	操作者之间 SE	p-值	与绝对值的偏差%	p-值
	人SI裂解物	3.75	207,055	31,862	0.72	ND	ND
	纯化的牛 iAP	3.00	703	113	0.11	ND	ND

[0871] e表13.在严重坏死性小肠结肠炎时的20个粪便样品的IAP测量值

[0872]

受试者 ID	收集样品时PCA (wk)	收集样品时体重 (g)	iAP活性 (μmol min⁻¹ g⁻¹ 粪便蛋白)	相对iAP含量 (%人SI)
C1	34.3	1159	575	95.5
C2	31.0	1085	441	132.7
C3	34.3	1840	2195	30.8
C4	43.3	2825	70	162.8
C5	31.0	1620	217	50.0
T1	31.0	1190	222	103.4
T2	29.9	1090	648	10.2
T3	33.9	1430	135	71.0
T4	34.0	1641	478	216.3
T6	38.6	2580	54	213.2
W1	35.1	2050	23	242.2
W2	26.1	900	48	153.8
W3	34.3	1650	127	48.7
W4	34.6	1300	517	68.7
W5	43.9	3040	18	79.0
W6	37.1	2220	29	196.1
W7	27.7	1330	63	144.6
W8	27.1	1040	519	32.9
W9	39.6	2400	284	54.0
W11	40.9	2700	148	326.0

[0873] e表14.在疑似坏死性小肠结肠炎时的15个粪便样品的IAP测量值

[0874]

受试者 ID	收集样品时PCA (wk)	收集样品时体重 (g)	iAP活性 (μmol min⁻¹ g⁻¹ 粪便蛋白)	相对iAP含量 (%人SI)
C6	29.1	855	6	317.8
C7	33.6	1740	227	129.5
C9	29.6	920	272	39.5
C10	36.0	1464	172	123.0
T8	29.4	1070	424	30.9
T9	30.7	1435	2075	366.9
T10	35.1	1378	520	212.9
T11	30.3	970	127	223.8
T13	26.9	553	460	28.3
T14	28.1	495	355	85.5
T15	28.7	870	608	158.3
T16	29.1	1005	970	14.7
W15	29.1	1305	2	584.5
W16	30.4	860	2307	117.7
W17	26.9	820	268	19.8

[0875] e表15.既不是临床上诊断有又不是怀疑有坏死性小肠结肠炎的86名招募婴儿的IAP测量值

[0876]

受试者 ID	收集样品时PCA (wk)	收集样品时体重 (g)	iAP活性 ($\mu mol\ min^{-1} g^{-1}$ 粪便蛋白)	相对iAP含量 (%人SI)
C13	31.3	1580	1231	0.1
C14	39.0	2560	723	2.8
C15	40.1	2170	3195	10.7
C16	40.4	2950	1872	7.6
C17	35.1	1440	9752	0.9
C18	27.0	810	463	5.6
C19	34.1	1210	622	2.5
C20	33.6	1370	805	3.7
C21	28.9	780	786	7.4
C22	29.7	1090	784	4.4
C23	37.9	2725	1848	2.4
C24	30.7	1296	2695	9.5
C25	38.1	2270	7495	1.2
C26	39.3	2390	1243	0.7
T17	25.4	595	554	26.3
T18	26.9	840	470	27.9
T19	42.7	2660	6922	2.7
T20	30.4	1040	175	4.5
T21	30.7	1025	995	5.0
T22	31.9	900	1477	2.6
T23	26.7	600	405	5.9
T24	32.0	1705	2787	2.1
T25	31.3	1960	875	2.4
T26	37.3	1513	7393	4.6
T27	27.7	650	884	1.9
T28	27.0	790	344	0.3
T29	25.6	500	144	14.2
T30	28.0	990	386	4.2
T31	38.4	1660	2268	3.2
T32	30.0	850	83	2.6
T33	32.6	1727	669	3.4
T34	35.0	2285	1608	5.3
T35	34.7	2415	2303	6.3
T36	32.7	1476	61	3.8
T37	26.4	910	714	6.8
T38	26.7	750	354	11.0
T39	29.7	990	409	5.7

[0877] e表15(续).既不是临床上诊断有又不是怀疑有坏死性小肠结肠炎的86名招募婴儿的IAP测量值

[0878]

受试者 ID	收集样品时PCA (wk)	收集样品时体重 (g)	iAP活性 (μmol min⁻¹ g⁻¹ 粪便蛋白)	相对iAP含量 (%人SI)
T40	31.3	1450	1219	26.5
T41	34.0	2160	723	0.9
T42	37.0	2703	170	4.6
T43	29.0	965	63	11.6
T44	29.6	1165	305	6.2
T45	34.0	2084	2244	6.5
T46	32.0	1450	350	1.0
T47	28.0	850	148	51.1
T48	35.9	2428	6904	0.8
T49	31.3	1270	603	3.2
T50	30.7	1215	660	11.0
T51	31.7	1180	180	2.9
T52	35.0	1790	337	2.1
T53	32.4	1122	117	2.5
T54	34.0	1114	1461	4.1
T55	38.6	2269	291	3.5
T56	33.9	1478	1898	1.5
T57	35.9	1809	2618	1.1
T58	33.1	1230	6310	15.6
T59	36.0	1837	80	7.9
T60	34.1	1299	654	2.7
T61	36.4	2357	383	1.0
T62	35.3	2040	7386	4.6
T63	35.4	1277	136	5.4
T64	37.9	1423	211	1.0
T65	37.7	2836	544	17.2
T66	34.9	1550	1527	22.6
W18	29.9	1240	40	4.9
W19	31.6	1600	132	17.8
W20	28.3	960	176	12.7
W21	30.0	1090	919	7.5
W22	33.4	1680	39	49.1
W23	31.4	1520	97	6.1
W24	31.0	1560	714	140.6

[0879] e表15(续).既不是临床上诊断有又不是怀疑有坏死性小肠结肠炎的86名招募婴儿的IAP测量值

[0880]

受试者 ID	收集样品时PCA (wk)	收集样品时体重 (g)	iAP活性 (μmol min⁻¹ g⁻¹ 粪便蛋白)	相对iAP含量 (%人SI)
W25	31.0	1460	357	46.3
W26	35.6	2550	656	5.1
W27	31.4	2040	214	3.2
W28	29.0	970	695	15.7
W29	33.4	1670	239	5.2
W30	26.6	960	376	12.7
W31	33.7	2070	76	6.0
W32	33.7	1924	172	6.6
W33	33.9	1875	40	7.4
W34	40.4	3720	2275	0.5
W35	28.6	1150	474	14.3
W36	30.7	1320	547	0.4
W37	28.7	1095	170	2.4
W38	26.1	565	205	209.0
W39	36.9	3260	916	0.3

[0881] e表16.在早产儿肠腔中鉴定的蛋白质(N=635)

[0882] 从孕后龄32.57周和体重1000g的非NEC婴儿收集后,通过蛋白质全谱分析粪便样品。通过sumPEP分数对蛋白质排序。示出了MS sumPEP分数为1400至96的蛋白质的描述和Uniprot ID。

[0883]

UniProt ID	描述
Q9Y6R7	IgGFc-结合蛋白
P02768	血清白蛋白
P02787	血清转铁蛋白
P01024	补体C3
P00450	天蓝胞浆素
P14410	蔗糖-异麦芽糖，小肠
P98088	黏蛋白-5AC
P01009	α-1-抗胰蛋白酶
P15144	氨基肽酶N
Q9HC84	黏蛋白-5B
P02751	纤连蛋白
P01011	α-1-抗凝乳蛋白酶
P01008	抗凝血酶 III
P0DOX5	免疫球蛋白γ-1重链
A8K7I4	钙激活CI通道调节剂1
P12821	血管紧张素转化酶
P02788	乳酸转铁蛋白
Q9UGM3	在恶性脑瘤1蛋白中缺失
Q02817	黏蛋白-2
Q16819	安眠蛋白A亚基α
P01859	免疫球蛋白重链恒定γ2
P01023	α-2-巨球蛋白
P25311	锌-2-糖蛋白
P00747	血浆酶原
Q6UWV6	膜外核苷酸焦磷酸酯酶-磷酸二酯酶家族成员7
P09923	肠型碱性磷酸酯酶
O43895	Xaa-Pro 氨基肽酶2
P0DOX7	免疫球蛋白κ轻链
P27487	二肽基肽酶4
P08473	脑啡肽酶[OS-智人]
P04264	角蛋白，II型细胞骨架1
Q8TDL5	含BPI折叠家族B成员1
P01834	免疫球蛋白κ恒定
P01860	免疫球蛋白重链恒定γ3
P55259	胰腺分泌微粒膜主要糖蛋白GP2
P02760	蛋白AMBP
P07911	尿调蛋白
P13646	角蛋白，I型细胞骨架13
P02766	甲状腺素运载蛋白
P35237	丝酶抑制蛋白B6
Q08380	半乳糖凝集素-3-结合蛋白
P0C0L4	补体C4-A
P60174	磷酸丙糖异构酶
P47989	黄嘌呤脱氢酶/氧化酶

UniProt ID	描述
P02538	角蛋白，II型细胞骨架6A
P19835	胆汁盐激活的脂酶
P48668	角蛋白，II型细胞骨架6C
Q9BYF1	血管紧张素转化酶2
P28838	胞液氨基肽酶
P30740	白细胞弹性蛋白酶抑制剂
P13645	角蛋白，I型细胞骨架10
P00738	结合珠蛋白
P04259	角蛋白，II型细胞骨架6B
P02763	α-1-酸糖蛋白1
P01861	免疫球蛋白重链恒定γ4
A8K2U0	α-2-巨球蛋白样蛋白1
P29508	丝酶抑制蛋白B3
P02790	血液结合素
P35527	角蛋白，I型细胞骨架9
P06702	蛋白质S100-A9
P01833	聚合免疫球蛋白受体
P15085	羧基肽酶A1
Q9H3R2	黏蛋白-13
Q9BYE9	钙粘着蛋白相关家族成员2
P05543	甲状腺素结合蛋白
P20742	妊娠带蛋白
P04217	α-1B-糖蛋白
Q13228	硒结合蛋白1
P09848	乳糖酶-根皮甙水解酶
P01031	补体C5
P01876	免疫球蛋白重链恒定α1
P08779	角蛋白，I型细胞骨架16
Q6UX06	唤介蛋白-4
P27216	腺联蛋白A13
P02533	角蛋白，I型细胞骨架14
P16444	二肽酶1
P09525	膜联蛋白A4
P02771	α-胎蛋白
O75882	attractin
P19652	α-1-酸糖蛋白2
Q04609	谷氨酸羧基肽酶2
P08697	α-2-抗纤维蛋白酶
P51884	光蛋白聚糖
P15086	羧基肽酶B
P69892	血红蛋白亚基γ-2
P29622	入源性激肽释放酶结合蛋白
P06748	核仁磷酸蛋白
P13647	角蛋白，II型细胞骨架5

[0884] e表16(续).在早产儿肠腔中鉴定的蛋白质(N=635)示出了MS sumPEP分数为95.0至47.9的蛋白质的描述和Uniprot ID。

[0885]

UniProt ID	描述
P05155	血浆蛋白酶C1抑制剂
P02753	视网醇结合蛋白质4
P06733	α烯醇酶
P0DOX8	免疫球蛋白λ-1轻链
P0DOX2	免疫球蛋白α-2重链
P69891	血红蛋白亚基γ-1
P0DOY2	免疫球蛋白λ恒定2
P07148	脂肪酸结合蛋白，肝
Q9BXP8	pappalysin-2
P04406	甘油醛-3-磷酸脂脱氢酶
P15586	N-乙酰糖胺-6-硫酸酯酶
P12830	钙粘着蛋白-1
Q12864	钙粘着蛋白-17
P05120	血浆酶原激活剂抑制剂2
P62158	钙调蛋白
P19440	谷胱甘肽水解酶1酶原
P08185	皮质类固醇结合球蛋白
P17931	半乳糖凝集素-3
P19013	角蛋白，II型细胞骨架4
P60709	肌动蛋白，细胞质1
P07858	组织蛋白酶B
P19801	阿米洛利敏感性胺氧化酶
P49747	软骨寡聚基质蛋白
P07477	胰蛋白酶-1
P07478	胰蛋白酶-2
P35908	角蛋白，II型细胞骨架2表皮的
O95497	泛酰巯基乙胺酶
O14983	肌浆/ER钙ATP酶1
P05090	载脂蛋白D
P07998	胰腺核糖核酸酶
P07686	β-己糖胺酶亚基β
P54802	α-N-乙酰糖胺酶
P41222	前列腺素-H2 D-异构酶
Q15493	钙调素
P02749	β-2-糖蛋白1
P02748	补体组分C9
P07093	神经胶质源连接蛋白
P07996	凝血栓蛋白-1
Q9Y2T3	鸟嘌呤脱氨酶
P48052	羧基肽酶2
P05787	角蛋白，II型细胞骨架8
P05109	蛋白质S100-A8
Q12805	含EGF微管蛋白样胞外基质蛋白1
P04118	辅脂肪酶

UniProt ID	描述
Q2M2H8	可能的麦芽糖酶葡糖淀粉酶2
P04083	膜联蛋白A1
P62736	肌动蛋白，主动脉平滑肌
P02675	纤维蛋白原β链
P08582	黑素转铁蛋白
P10643	补体组分C7
P62979	泛素化-40S核糖体蛋白S27a
Q13867	博莱霉素水解酶
P15941	粘蛋白-1
P09622	线粒体二氢硫辛酸脱氢酶
Q9UBG3	cornulin
Q8NFJ5	视黄酸诱导蛋白3
P09093	胰凝乳蛋白酶样弹性蛋白3A
Q9NQ84	G-蛋白偶联受体家族C组5成员C
Q07075	谷氨酰氨基肽酶
Q07654	三叶因子3
Q07837	中性和碱性氨基酸运输蛋白rBAT
Q03154	氨基乙酰酶-1
Q10588	ADP-核糖基环化酶/环状ADP-核糖酶水解酶2
Q9Y646	羧基肽酶Q
P01042	激肽原-1
P04179	线粒体超氧化物歧化酶[Mn]
P13727	骨髓蛋白聚糖
Q6UXC1	顶点核内体糖蛋白
P17538	胰凝乳蛋白酶原
P04114	载脂蛋白B-100
P00390	线粒体谷胱甘肽还原酶
Q6FI13	组蛋白H2A型2-A
O75369	细丝蛋白-B
Q04695	角蛋白，I型细胞骨架17
P00338	L-乳酸脱氢酶A链
O43451	肠的麦芽糖酶-葡糖胺酶
O14818	蛋白酶体亚基α7型
P12955	Xaa-Pro二肽酶
Q9ULA0	门冬氨酸氨基肽酶
Q99895	胰凝乳蛋白酶-C
P50995	膜联蛋白A11
P04040	催化酶
P04196	富含组氨酸糖蛋白
P15311	埃兹蛋白
P35555	肌原纤维蛋白-1
P07225	维生素K依赖性蛋白S
Q12929	表皮生长因子受体激酶底物8
O43707	α-辅肌动蛋白-4

[0886] e表16(续).在早产儿肠腔中鉴定的蛋白质(N＝635)示出了MS sumPEP分数为47.6至13.0的蛋白质的描述和UniprotID。

[0887]

UniProt ID	描述
P05154	血浆丝氨酸蛋白酶抑制剂
Q9HBB8	钙粘着蛋白相关家族成员5
P13929	β-烯醇酶
P04908	组蛋白H2A型1-B/E
O43280	海藻糖酶
A0A0C4DH31	免疫球蛋白重链可变1-18
P02750	富含亮氨酸α-2糖蛋白
Q14624	α-胰蛋白酶间抑制剂重链H4
P07093	神经胶质源连接蛋白
P20933	N(4)-(β-N-乙酰葡氨基)-L-天冬氨酸酶
Q9H6S3	表皮生长因子受体激酶底物8样蛋白2
P08727	角蛋白，I型细胞骨架19
Q92820	γ-谷氨酰基水解酶
P23142	纤蛋白-1
P12532	线粒体的肌酸激酶U型
P61916	附睾分泌蛋白E1
Q01546	角蛋白，II型细胞骨架2口腔
Q92485	酸神经鞘磷脂酶样磷酸二酯酶3B
P08861	膜外胰蛋白酶样弹性蛋白酶家族成员3B
P31151	蛋白质 S100-A7
Q03403	三叶因子2
P24855	脱氧核糖核酸酶
P04004	玻连蛋白
Q96DA0	酶原颗粒蛋白16同源物
P31025	脂运载蛋白-I
Q9UGM5	胎球蛋白-B
Q13822	膜外核苷酸焦磷酸酯酶-磷酸二酯酶家族成员2
P08236	β-葡糖苷酸酶
P02774	维生素D结合蛋白
P04278	性激素结合球蛋白
Q9UHL4	二肽基肽酶2
P13866-1	钠/葡萄糖协同转运蛋白1
P00441	超氧化物歧化酶
P63104	14-3-3 蛋白质 zeta/delta
P80188	中性粒细胞凝胶酶相关脂质运载蛋白
Q9H3G5	可能的丝氨酸羧基肽酶

UniProt ID	描述
P40199	癌胚抗原相关细胞粘着分子6
Q08188	蛋白质-谷氨酰胺γ谷氨酰转移酶E
P00751	补体因子B
P21589	5' 核苷酸酶
P69905	红细胞亚基α
P27105	红细胞7带整合膜蛋白
P01871	免疫球蛋白重链恒定μ
P06744	葡萄糖-6-磷酸酯异构酶
P28799	颗粒体蛋白
P00734	凝血酶原
P16930	延胡索乙酰乙酸酯酶
P12429	膜联蛋白A3
P04054	磷酸脂酶A2
Q99828	钙和整合蛋白结合蛋白1
Q9UQQ1	N-乙酰化-α-连接酸性二肽酶样蛋白质
P43652	afamin
Q14520	玻尿酸结合蛋白2
P07339	组织蛋白酶D
P12273	催乳素可诱导的蛋白质
P02765	阿尔法-2-HS-糖蛋白
A0A0B4J1X5	免疫球蛋白重链可变3-74
P16422	上皮细胞粘着分子
Q53GD3	胆碱转运蛋白样蛋白质4
P04432	免疫球蛋白κ可变1D-39
O00391	巯基氧化酶1
Q96KP4	胞质非特异性二肽酶
P08253	72 kDa IV型胶原酶
A0A0C4DH29	免疫球蛋白重链可变1-3
Q03591	补体因子H相关蛋白1
P05556	整合蛋白β-1
Q9H0W9	酯水解酶 C11orf54
Q9NR71	中性神经酰胺酶
P40925	胞质苹果酸酯脱氢酶
Q13162	过氧化物氧还酶
Q6EMK4	vasorin
P06731	癌胚抗原相关细胞粘着分子5

[0888] e表16(续).在早产儿肠腔中鉴定的蛋白质(N＝635)示出了MS sumPEP分数为30.8至21.3的蛋白质的描述和UniprotID。

[0889]

UniProt ID	描述
Q06830	过氧化物氧还酶
P06865	β-己糖胺酶亚基α
P09211	谷胱甘肽S-转移酶
P04745	α-淀粉酶1
Q695T7	钠依赖性中性氨基酸转运蛋白A链
P02489	α-晶体蛋白A链
Q6UWP2	脱氢酶/还原酶SDR家族成员11
P36980	补体因子H相关蛋白2
P03973	抗白细胞蛋白酶
O60494	cubilin
Q6P1J6	膜相关的磷酸脂酶B1
Q9HAT2	唾液酸酯O-乙酰酯酶
P01780	免疫球蛋白重链可变3-7
P01824	免疫球蛋白重链可变4-39
O14745	Na(+)/H(+)交换调节辅因子NHE-RF1
P25789	蛋白酶体亚基α4型
P05546	肝素辅因子2
P17900	神经节甘脂GM2活化剂
P60900	蛋白酶体亚基α6型
Q5T2W1	Na/H交换调节辅因子
P02679	凝血因子γ链
P12882	肌球蛋白-1
P07358	补体组分C8β链
P19827	α胰蛋白酶间抑制剂重链H1
A0A0B4J1Y9	免疫球蛋白重链可变3-72
Q14508	WAP四二硫键核心域蛋白2
P01782	免疫球蛋白κ可变3-9
P22352	谷胱甘肽过氧化酶3
O14638	膜外核苷酸焦磷酸酯酶-磷酸二酯酶家族成员3
Q8N4F0	含BPI折叠家长B成员2
P13688	癌胚抗原相关细胞粘着分子1
Q99715	胶原α-1(XII)链
Q8TE67	上皮生长因子受体激酶底物8样蛋白3
P12111	胶原α-3(VI)链
P01019	血管紧张素原
P07195	L-乳酸脱氢酶B链

UniProt ID	描述
Q8WUM4	程序性细胞死亡6相互作用蛋白
Q14315	细丝蛋白C
P29377	蛋白质 S100-G
P04066	组织α-L-岩藻糖苷酶
P08174	补体衰退加速因子
P61626	溶菌酶C
P36222	几丁质酶-3-样蛋白1
Q86SQ4	粘着G蛋白偶联受体
Q14002	癌胚抗原相关细胞粘着分子7
P09972	果糖-双磷酸酯醛缩酶C
P01743	免疫球蛋白重链可变1-46
Q01518	腺苷环化酶相关蛋白1
P25788	蛋白酶体亚基α3型
O43490	prominin-1
P98160	基底膜特异性肝素硫酸酯蛋白糖苷核心蛋白
Q9NP55	含BPI折叠家长B成员1
P26038	膜突蛋白
P53990	IST1同系物
P01614	免疫球蛋白κ可变2D-40
P28066	蛋白酶体亚基α5型
P62937	肽基脯氨酰基顺反异构酶A
Q99497	蛋白质/核酸去糖化酶DJ-1
P11047	层连蛋白亚基γ-1
A0A0C4DH38	免疫球蛋白重链可变5-51
P01624	免疫球蛋白κ可变3-15
Q8TE67	上皮生长因子受体激酶底物8样蛋白3
P62258	14-3-3蛋白质epsilon
O00754	溶酶体α-甘露糖苷酶
P16233	胰腺三乙酰甘油脂酶
A0A087WSY6	免疫球蛋白κ可变3D-15
Q01459	二-N-乙酰几丁质酶
P01591	免疫球蛋白J链
A0A0C4DH73	免疫球蛋白κ可变1-12
A0A0B4J1X8	免疫球蛋白重链可变3-43
P20618	蛋白酶体亚基β1型
P01764	免疫球蛋白重链可变3-23

[0890] e表16(续).在早产儿肠腔中鉴定的蛋白质(N=635)示出了MS sumPEP分数为21.2至13.1的蛋白质的描述和Uniprot ID。

[0891]

UniProt ID	描述
A0A0C4DH67	免疫球蛋白κ可变1-8
A0A0B4J1V2	免疫球蛋白重链可变2-26
P01619	免疫球蛋白重链可变3-20
O75830	丝氨酸蛋白酶抑制剂I2
P61224	Ras-相关蛋白 Rap-1b
P06576	ATP合酶亚基β
P01594	免疫球蛋白κ可变1-33
P11678	嗜酸红细胞过氧化物酶
A0A0C4DH25	免疫球蛋白κ可变3D-20
Q16651	prostasin
P62805	组蛋白H4
O60635	四次跨膜蛋白-1
P29992	鸟嘌呤核苷酸结合蛋白亚基α-11
P78324	酪氨酸-蛋白质磷酸酯酶非受体型底物1
P00915	碳酸酐酶
P0DOX6	免疫球蛋白μ重链
Q15113	原胶原C-内肽酶增强剂1
Q9NZH0	G蛋白偶联受体家族C组5成员B
Q6YHK3	CD109抗原
P01766	免疫球蛋白重链可变3-13
A0A0A0MRZ8	免疫球蛋白κ可变3D-11
P53634	二肽基肽酶1
A0A0B4J1V0	免疫球蛋白重链可变3-15
P01040	胱抑素-A
Q6W4X9	粘蛋白-6
P23083	免疫球蛋白重链可变1-2
Q15848	脂肪连接蛋白
Q15274	烟酸酯-核苷酸焦磷酸酶
A0A0A0MS15	免疫球蛋白重链可变3-49
P05156	补体因子1
A0A0J9YXX1	免疫球蛋白重链可变5-10-1
P13671	补体组分c6
P05121	血纤维蛋白溶酶原活化剂抑制剂1
Q13219	pappalysin-1
P31947	14-3-3蛋白质 sigma
Q9H4M9	含EH结构域的蛋白质1
P08294	胞外过氧化酶歧化酶
P01599	免疫球蛋白κ可变1-17
P31949	蛋白质 S100-A11
P04155	三叶因子1
Q96A32	肌球蛋白调节剂轻链2，骨骼肌

UniProt ID	描述
P12814	α-肌动蛋白-1
P27482	钙调蛋白样蛋白3
Q13277	突触蛋白
P61981	14-3-3蛋白质γ
P09327	绒毛蛋白
P08962	CD63抗原
O43653	前列腺干细胞抗原
O00584	核糖切割酶T2
A0A075B6S6	免疫球蛋白κ可变2D-30
Q6UXY8	跨膜通道样蛋白5
Q8WWA0	intelectin-1
Q9HD89	抗素
P45880	电压依赖性阴离子选择性通道蛋白2
P21796	电压依赖性阴离子选择性通道蛋白1
P17050	α-N-乙酰半乳糖酰胺酶
Q53R12	跨膜4
P11279	溶酶体相关膜糖蛋白1
Q86VB7	富含清道夫受体半胱氨酸1型蛋白
Q9Y624	连接粘着分子A
A0A075B6S2	免疫球蛋白κ可变2D-29
Q14533	角蛋白，II型角质层Hb1
P00505	天冬氨酰氨基转移酶
P01700	免疫球蛋白λ可变1-47
P11142	热休克蛋白同源71 kDa蛋白
P62070	Ras-related蛋白质 R-Ras2
P43251	生物素酶
P80748	免疫球蛋白λ可变3-21
Q9Y5Y7	淋巴血管内皮玻尿酸受体1
P06396	凝结蛋白
Q96NY7	氯化物胞内通道蛋白6
P01034	胱抑素-C
P12277	肌酸激酶B型
Q14393	生长抑制特异性蛋白6
P01704	免疫球蛋白λ可变2-14
P04632	钙蛋白酶小亚基1
P55287	钙粘着蛋白-11
Q14CN2	Ca激活氯化物通道调节剂
O75131	copine-3
P28070	蛋白酶体亚基β4型
P25786	蛋白酶体亚基α1型
Q9UK41	液泡蛋白分类相关蛋白

[0892] e表16(续).在早产儿肠腔中鉴定的蛋白质(N=635)示出了MS sumPEP分数为13.0至8.1的蛋白质的描述和Uniprot ID。

[0893]

UniProt ID	描述
P0C0S5	组蛋白 H2A.Z
P06312	免疫球蛋白κ可变4-1
O94760	N(G),N(G)-二甲基精氨酸二甲基氨基水解酶1
P36957	二氢硫辛酸赖氨酸残基琥珀酸转移酶
A0A0B4J2H0	免疫球蛋白重链可变1-69D
Q99102	黏蛋白-4
P12235	ADP/ATP 转位酶1
P25774	组织蛋白酶S
Q8WXI7	黏蛋白-16
P31946	14-3-3 蛋白质β/α
Q9UBC5	非常规肌球蛋白-1a
Q9Y376	钙结合蛋白39
P10909	簇集蛋白
Q6P4A8	磷酸脂酶B样1
Q9Y6N9	安宁
P61604	10 kDa HSP,线粒体的
P07357	补体组分C8α链
Q9HCY8	蛋白质 S100-A14
Q92824	前蛋白转化酶枯草杆菌蛋白酶
P62873	鸟嘌呤核苷酸结合蛋白 G(I)/G(S)/G(T) 亚基β-1
Q14CN4	角蛋白，II型细胞骨架72
P09960	白三烯A-4水解酶
P51688	N-硫葡糖胺硫水解酶
P00813	腺苷脱氨酶
P78417	谷胱甘肽S-转移酶Ω-1
Q5JS37	含NHL重复的蛋白3
P07602	钠脂激活蛋白原
Q01970	1-磷脂酰肌醇4,5-双磷酸酯减少的跨膜
A0A0C4DH68	免疫球蛋白κ可变2-24
Q01628	干扰素诱导的跨膜蛋白3
Q96JP2	非常规肌球蛋白-XVB
P32119	过氧化氧还蛋白-2
P16671	血小板糖蛋白4
P21980	蛋白质-谷氨酰胺γ谷氨基转移酶2
P50395	Rab GDP 分解抑制剂β
A0A0A0MT36	免疫球蛋白κ可变6D-21
P23528	肌动蛋白素
A0A0C4DH24	免疫球蛋白κ可变6-21
Q14766	潜在转化生长因子β结合蛋白1
P51148	Ras- 相关蛋白质 Rab-5C

UniProt ID	描述
P10619	溶酶体保护蛋白
P01701	免疫球蛋白κ可变1-51
Q92484	酸神经鞘磷脂酶样磷酸二脂酶3a
P22735	蛋白质-谷酰胺γ谷氨基转移酶K
Q8NCR9	clarin-3
P09466	生殖糖蛋白
P37837	转醛醇酶
P55058	磷脂转移蛋白
P08603	补体因子H
P07360	补体组分C8γ链
P14618	丙酮酸激酶
P06732	肌酸激酶M型
P60953	细胞分裂控制蛋白42
P30048	硫氧还蛋白依赖性过氧化物还原酶，线粒体
P29401	转酮醇酶
Q8IWL2	肺表面活性剂关联蛋白
O75367	核心组蛋白巨-H2A 1
Q969X1	蛋白护卫3
O15551	连接蛋白-3
Q92484	酸神经鞘磷脂酶样磷酸二脂酶3a
Q16891	MICOS 复合亚基Mic60
P09668	前组织蛋白酶H
P43234	组织蛋白酶O
P00558	磷酸甘油酸激酶1
Q8TBG9	突触足蛋白
P56199	整合蛋白α-1
P02452	胶原α-1(I)链
P13284	γ-干扰素可诱导的溶酶体硫醇还原酶
P05783	角蛋白，I型细胞骨架18
P43353	醛脱氢酶家族3成员B1
Q6P5W5	锌运载蛋白ZIP4
P07098-3	胃三乙酰甘油脂酶
P13798	乙酰氨基-酸-释放酶
P08833	胰岛素样生长因子结合蛋白
P07237	蛋白质二硫化物异构酶
P18206	纽带蛋白
P06870	人源性激肽释放酶结合蛋白
Q9H190	内居蛋白
Q13126	S-甲基-5'-硫代腺苷磷酸酶
P29972	水通道蛋白

[0894] e表16(续).在早产儿肠腔中鉴定的蛋白质(N＝635)示出了MS sumPEP分数为8.1至5.4的蛋白质的描述和Uniprot ID。

[0895]

UniProt ID	描述
P11234	Ras-相关蛋白质... Ral-B
O75340	程序性细胞死亡蛋白6
P35247	肺表面活性剂关联蛋白D
Q14651	丝束蛋白-1
O15484	钙蛋白酶-5
P05062	果糖-双磷酸酯醛缩酶B
Q9H444	带电荷的多囊泡体蛋白4b
P01714	免疫球蛋白κ可变3-19
Q2WGJ9	fer-1-l样蛋白质6
P55290	钙粘着蛋白-13
Q8WTV0	清道夫受体B类成员1
P27701	CD82抗原
Q16769	谷酰氨基-肽环状转移酶
Q9HC38	含乙二醛酶结构域的蛋白
P52565	rho GDP-α分解抑制剂1
P14618	丙酮酸激酶
P36955	着色上皮细胞来源因子
O00560	内居蛋白
P0DOX3	免疫球蛋白delta重链
P07108	乙酰-CoA-结合蛋白
P27169	血清对氧磷酶/芳基酯酶1
Q14112	巢蛋白-2
Q9UBI6	鸟嘌呤核苷酸结合蛋白g(i)/g(s)/g(o)亚基γ-12
A0A075B6K0	免疫球蛋白κ可变3-16
P01706	免疫球蛋白κ可变2-21
Q8WW52	蛋白质 FAM151A
Q9NQ38	丝氨酸蛋白酶抑制剂Kazal 5型
P02647	载脂蛋白A-1
P07988	肺表面活性剂关联蛋白B
P12931	原癌基因酪氨酸蛋白激酶Src
Q9UGT4	含寿司结构域的蛋白2
Q9UBP4	dickkopf-相关蛋白质3
P11217	糖原磷酸酶，肌肉形式
P04080	胱抑素-B
P28072	蛋白酶体亚基β6型
Q9BRF8	丝氨酸/苏氨酸-蛋白磷酸酯酶
P56470	半乳糖凝集素-4
Q86XR7	含TIR结构域的衔接子分子2
Q86UP6	含CUB和透明带样结构域的蛋白1
O75298	reticulon-2

UniProt ID	描述
P14384	羧基肽酶M
P08238	热休克蛋白HSP 90β
Q13443	含崩解蛋白和金属蛋白酶结构域的蛋白9
P04216	thy-1膜糖蛋白
A0A0C4DH34	免疫球蛋白重链可变4-28
P32926	桥粒芯蛋白-3
P63000	Ras相关C3肉毒毒素底物1
Q96RF0	分类连接蛋白-18
P00918	碳酸酐酶2
Q08722	白细胞表面抗原CD47
P05451	胰石蛋白-I-α
P09467	果糖-1,6-双磷酸酶1
P16278	β-半乳糖苷酶
A0A0C4DH33	免疫球蛋白κ可变1-24
P29218	肌醇单磷酸酯酶1
P35606	衣体素亚基β
Q16706	α-甘露糖苷酶2
Q16820	安眠蛋白A亚基β
Q14126	桥粒芯蛋白-2
P84243	组蛋白 H3.3
P22304	艾杜糖醛酸酯-2-硫酸酯酶
P01703	免疫球蛋白κ可变1-40
O95967	含EGF纤蛋白样胞外基质蛋白2
P22079	乳酸过氧化酶
P32189	甘油激酶
P06753	原肌球蛋白α-3链
O00161	突触体关联蛋白23
P28074	蛋白酶体亚基β5型
P16083	核糖基二氢烟酸酰胺脱氢酶
Q1EHB4	钠偶联单羧酸酯运载蛋白2
O95274	含ly6/PLAUR结构域的蛋白
P35556	原纤维蛋白-2
Q6PIF6	非常规肌球蛋白-VIIb
Q02505	黏蛋白-3A
Q5SRE5	核孔素NUP188同系物
P01215	糖蛋白激素α链
Q15323	角蛋白，I型角质层Ha1
P11021	78 kDa 葡萄糖调节蛋白
Q12841	卵泡抑素相关蛋白1
P02511	α-晶体蛋白B链

[0896] e表16(续).在早产儿肠腔中鉴定的蛋白质(N＝635)示出了MS sumPEP分数为5.4至2.9的蛋白质的描述和Uniprot ID。

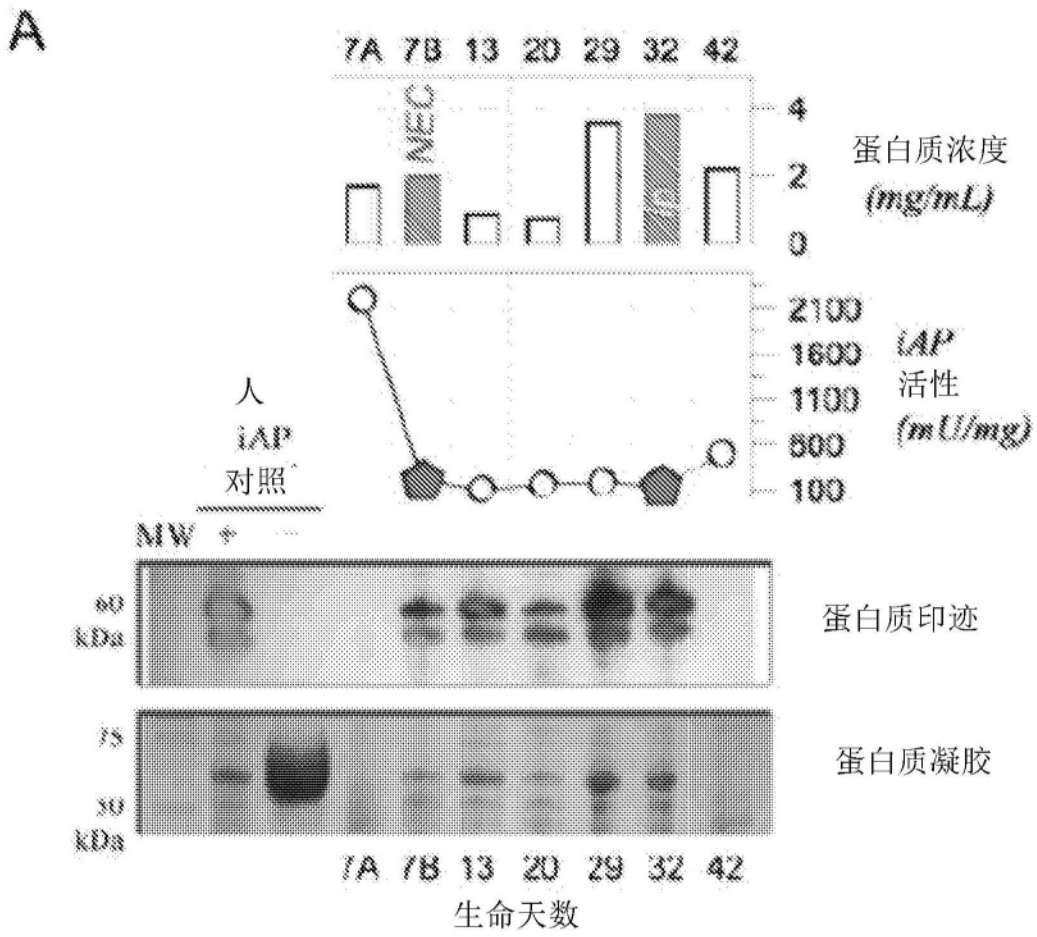
[0897]

UniProt ID	描述
P02792	铁蛋白轻链
P59665	嗜中性粒细胞防御蛋白1
Q9Y6W3	钙蛋白酶-7
P35243	恢复蛋白
B0FP48	尿路斑块蛋白-3b样蛋白1
P63098	钙神经素亚基B型1
P04075	果糖-双磷酸酯醛缩酶A
A0A075B6H9	免疫球蛋白κ可变4-69
O75351	液泡蛋白分类关联蛋白4B
P15924	桥粒芯蛋白
P40926	线粒体的苹果酸酯脱氢酶
Q7Z404	跨膜通道样蛋白
P06681	补体C2
Q9UM44	HERV-H LTR-关联蛋白2
A5D6W6	脂肪存储诱导跨膜蛋白1
Q96C23	醛糖1-表异构酶
P29279	结缔组织生长因子
O95436	钠依赖性磷酸酯运载蛋白2B
Q8NCW5	NAD(P)H-水合物表异构酶
P35080	抑制蛋白-2
O00462	β-甘露糖苷酶
Q16787	层连蛋白亚基α-3
P01709	免疫球蛋白κ可变2-8
P08670	波形纤维蛋白
P06703	蛋白质 S100-A6
O75015	低亲和力免疫球蛋白γFc区受体III-B
Q9BXD5	N-乙酰神经氨化物裂解物
P08134	rho相关GTP结合蛋白RhoC
P54727	UV剪切修复蛋白RAD23同系物B
Q5QNW6	组蛋白H2B型2-F
P27449	V型质子ATP酶16kDa脂蛋白亚基
O15145	肌动蛋白相关蛋白2/3复合亚基3
Q9UKN1	衔蛋白-12
O60235	跨膜蛋白酶丝氨酸11D
O75629	蛋白质CREG1
P99999	细胞色素C

UniProt ID	描述
Q8N5I2	含抑制蛋白结构域的蛋白1
P19021	肽基甘氨酸α酰胺化单氧合酶
P80370	蛋白质delta同系物1
Q16881	胞质的硫代氧还蛋白还原酶
Q96P63	丝氨酸蛋白酶抑制剂B12
P05164	髓过氧化物酶
O94832	非常规肌球蛋白-1
Q9Y6E0	丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶24
P50120	视黄醇结合蛋白2
P23109	AMP 脱氨酶1
P01033	金属蛋白酶抑制剂1
Q7L5L3	溶血磷脂酶D GDPD3
Q02487	桥粒芯蛋白-2
Q6UXV4	MICOS复合亚基MIC27
Q9H1C7	富含脯氨酸和含跨膜结构域的蛋白1
Q99816	肿瘤易感基因101蛋白
O00115	脱氧核糖核酸酶-2-α
P13473	溶酶体关联膜糖蛋白2
A0A0J9YX35	免疫球蛋白重链可变3-64D
P61204	ADP-核糖化因子3
O96009	napsin-A
P50443	硫酸酯运载蛋白
P55064	水通道蛋白-5
A0A0A0MS14	免疫球蛋白重链可变1-45
Q99436	蛋白酶体亚基β类型-7
P11717	阳离子依赖性甘露糖-6-磷酸酯受体
P48637	谷胱甘肽合成酶
Q9H0E2	Toll-相互作用蛋白质
P52758	2-亚氨基丁酸酯/2-亚氨基丙酸酯脱氨酶
Q9UBC9	富含小脯氨酸蛋白3
A0A075B6J9	免疫球蛋白κ可变2-18
P46459	囊泡融合ATP酶
P62330	ADP-核糖化因子6
A0A075B6I0	免疫球蛋白κ可变8-61
P17948	血管内皮细胞生长因子受体1

[0898] 等同物

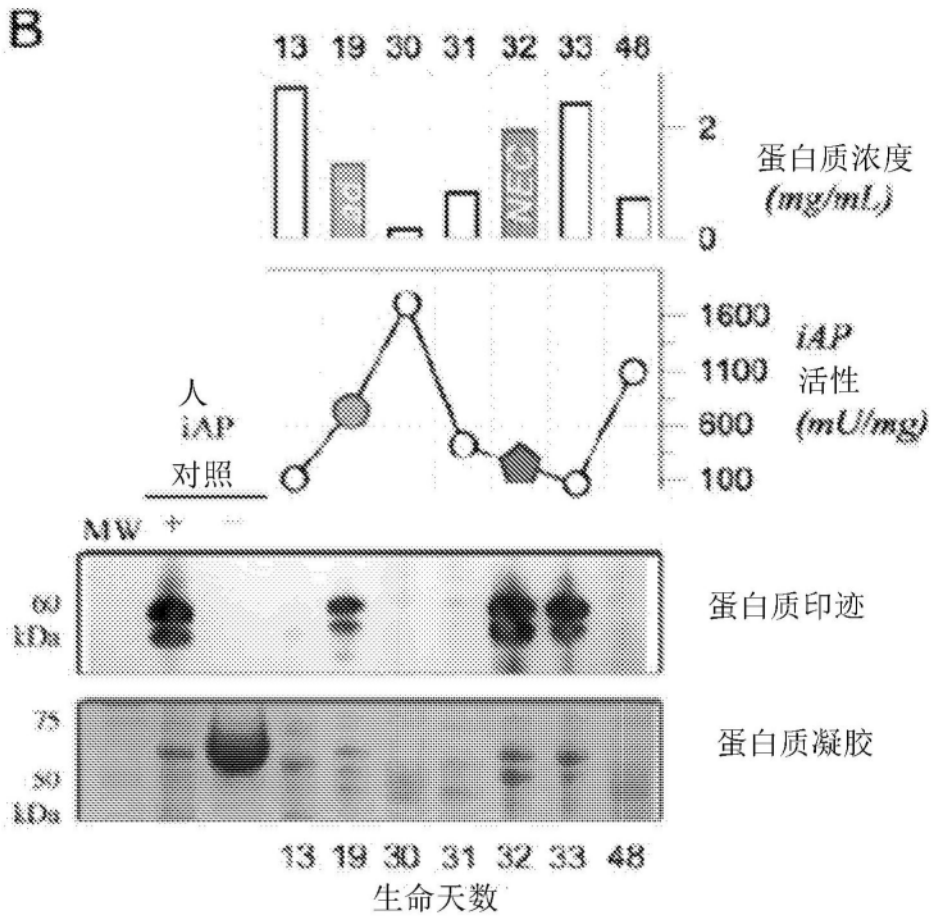
[0899] 本领域技术人员将认识到或能够仅使用常规实验来确定本文所述的特定物质和程序的许多等同物。这样的等同物被认为在本发明的范围内,并且被以下权利要求覆盖。



生命天数

分类器	7A	7B	13	20	29	32	42
蛋白质	+	+	−	−	+	+	+
iAP 活性	−	+	+	+	+	+	+
蛋白质印迹	−	+	+	+	+	+	−

图1



分类器	生命天数 13	19	30	31	32	33	48
蛋白质	+	-	-	-	+	+	-
iAP 活性	+	+	-	+	+	+	-
蛋白质印迹	-	+	-	+	+	+	-

图1续

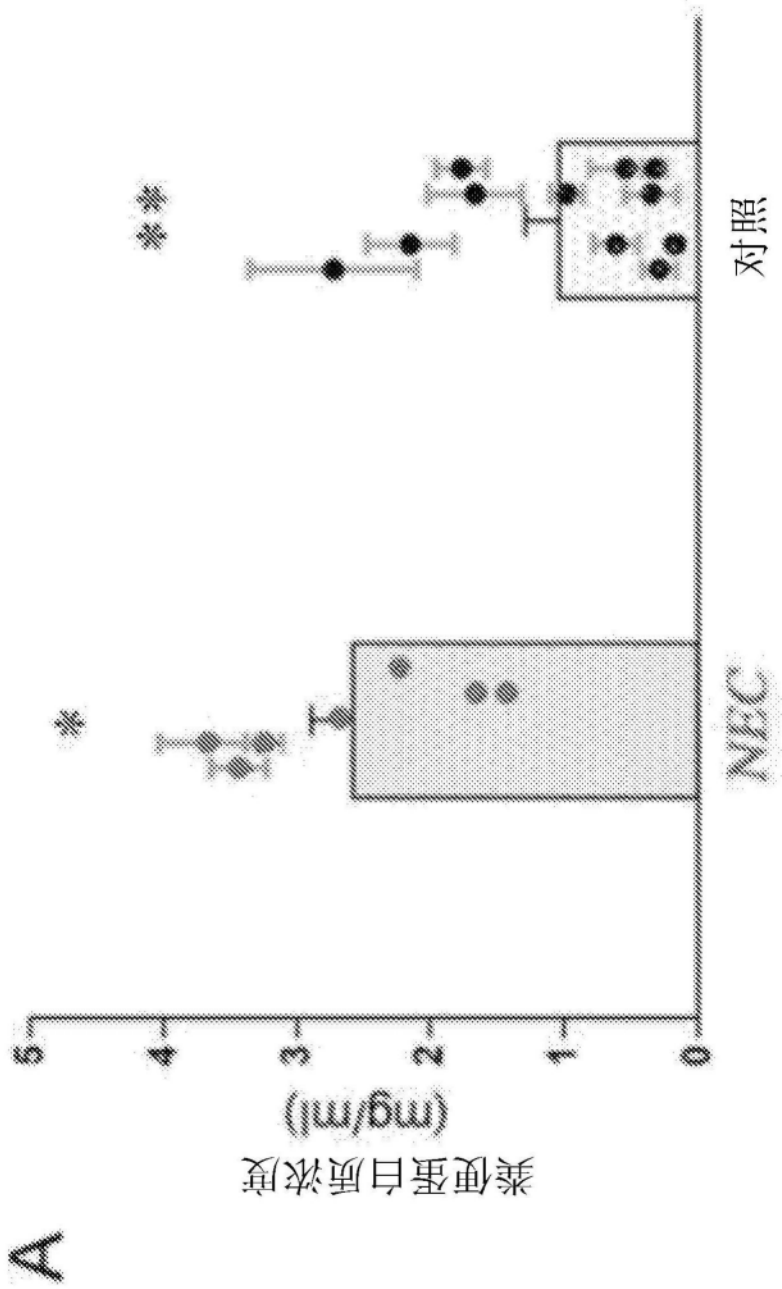


图2

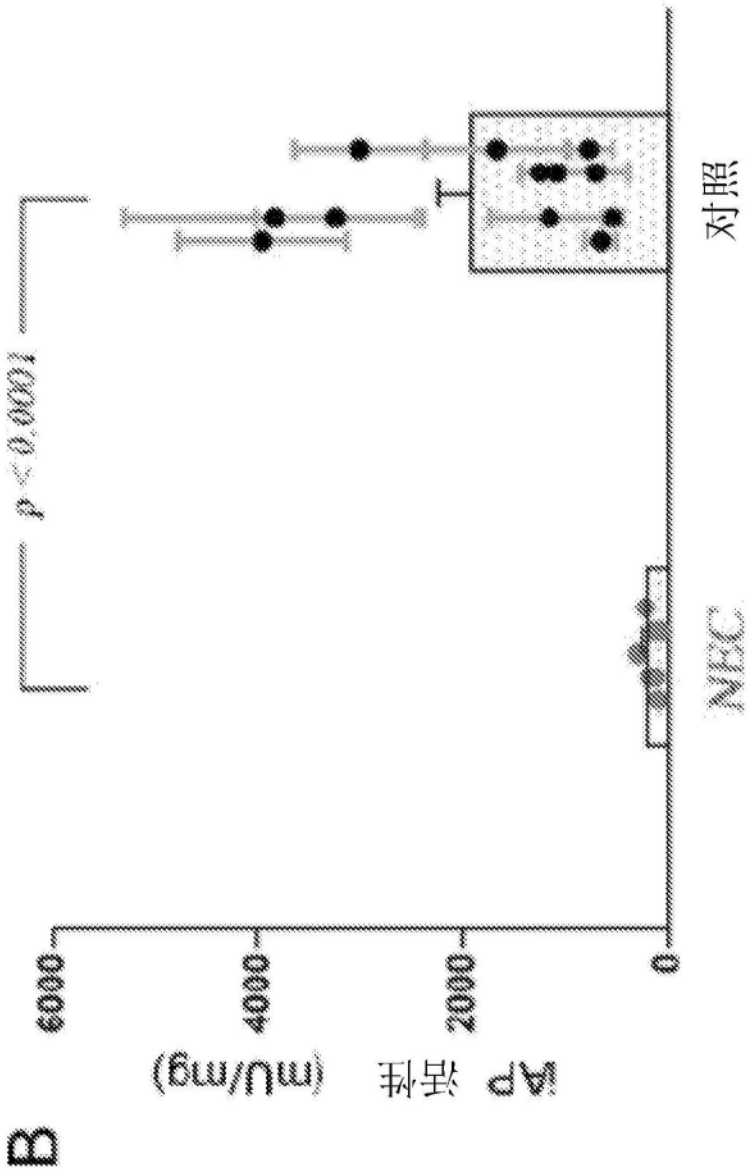


图2续

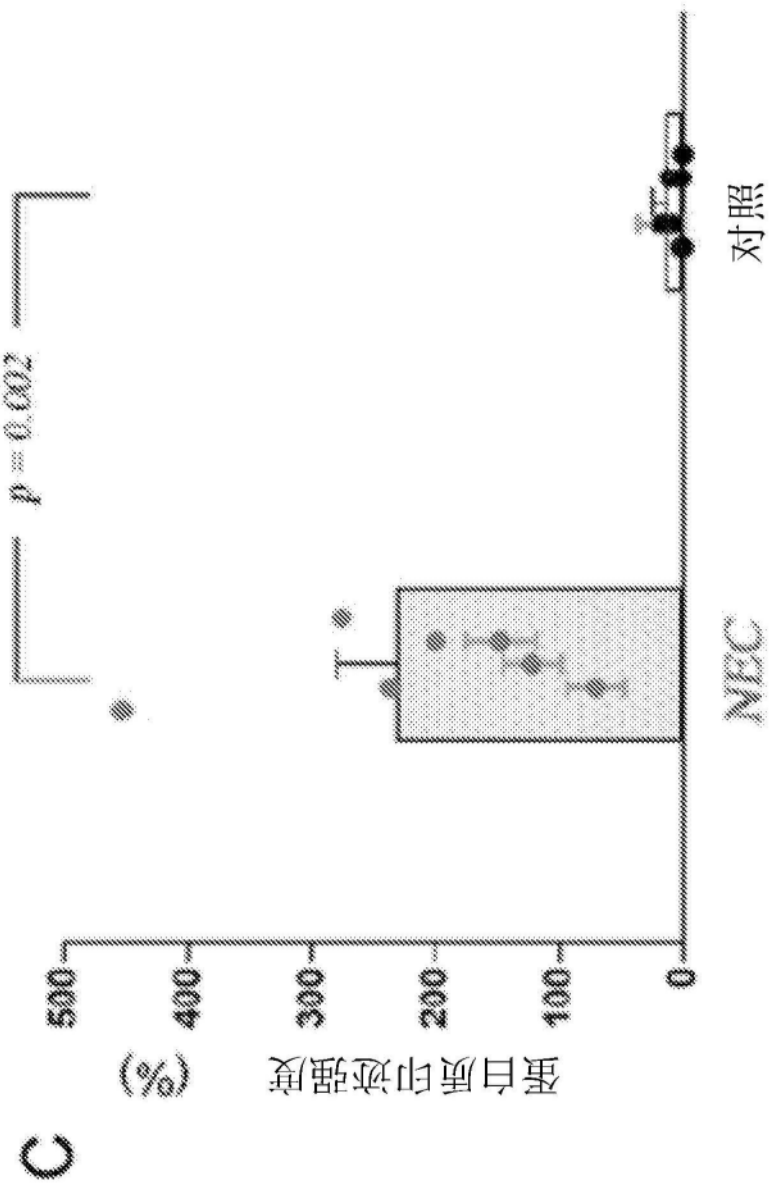


图2续

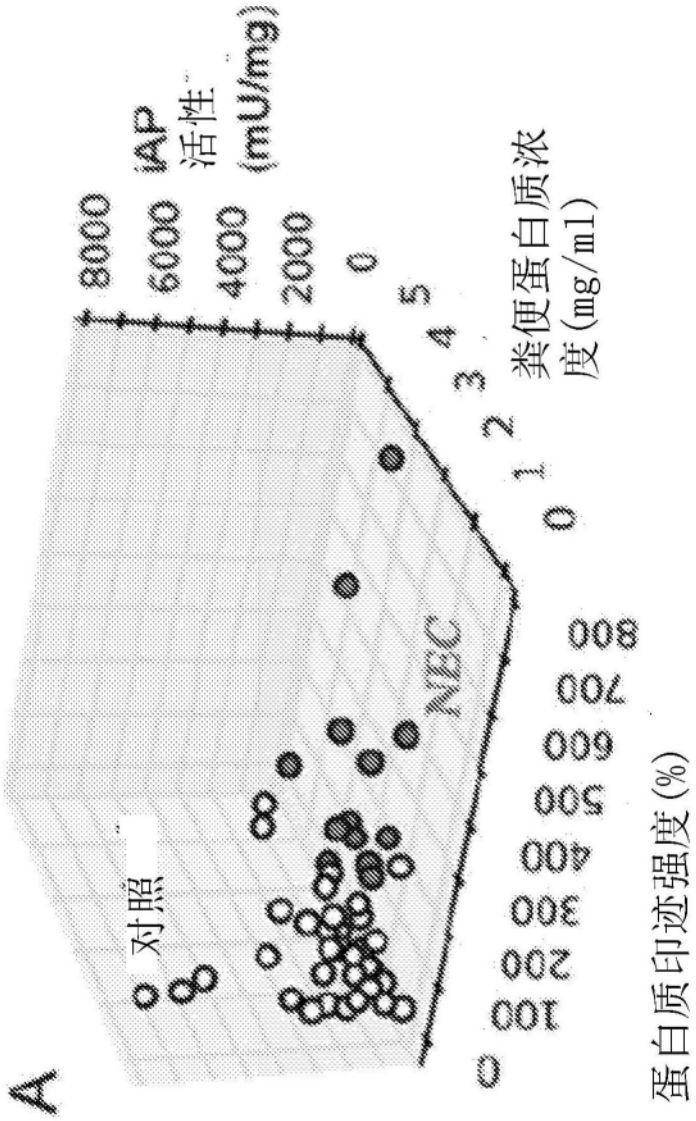

A
对照
NEC
iAP 活性 (mU/mg)
8000
6000
4000
2000
0
粪便蛋白质浓度 (mg/ml)
5
4
3
2
1
0
蛋白质印迹强度 (%)
800
700
600
500
400
300
200
100
0

图3

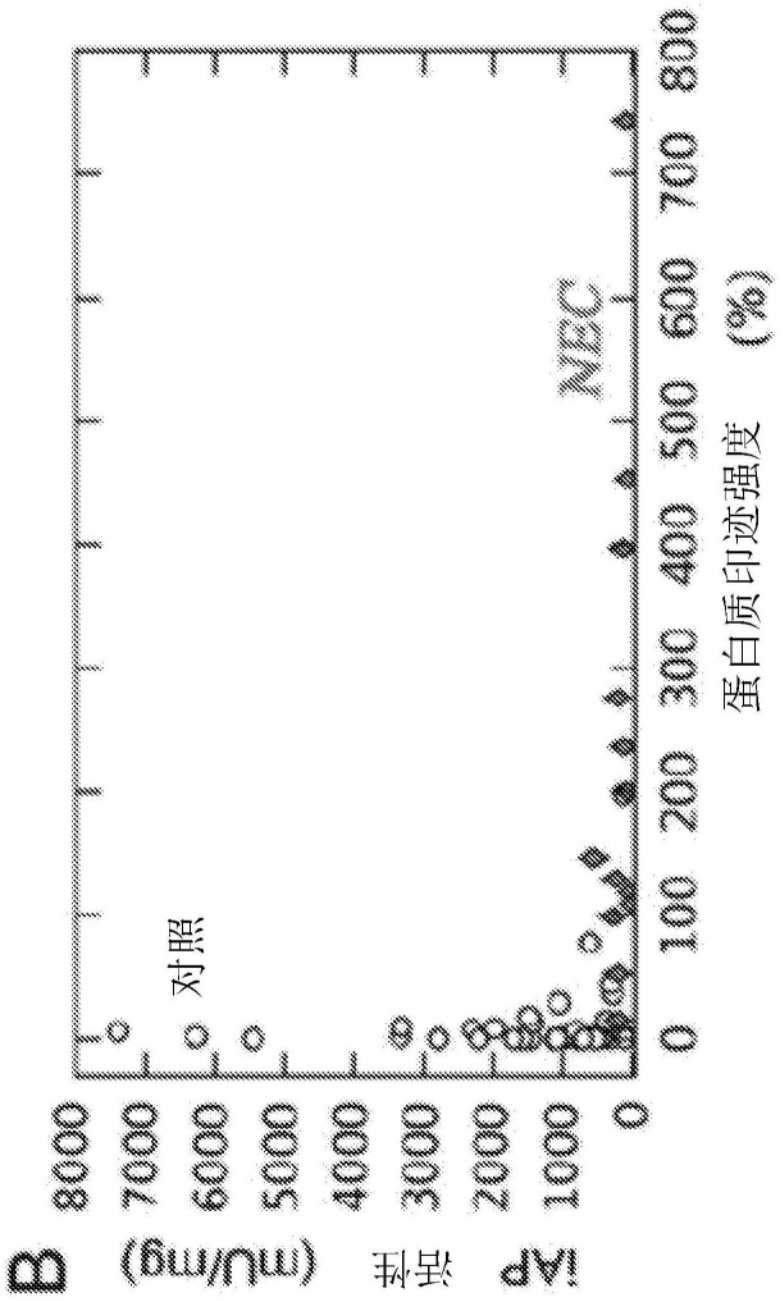

B
iAP 活性 (mU/mg)
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
对照
0
100
200
300
400
500
600
700
800
NEC
蛋白质印迹强度 (%)

图3续

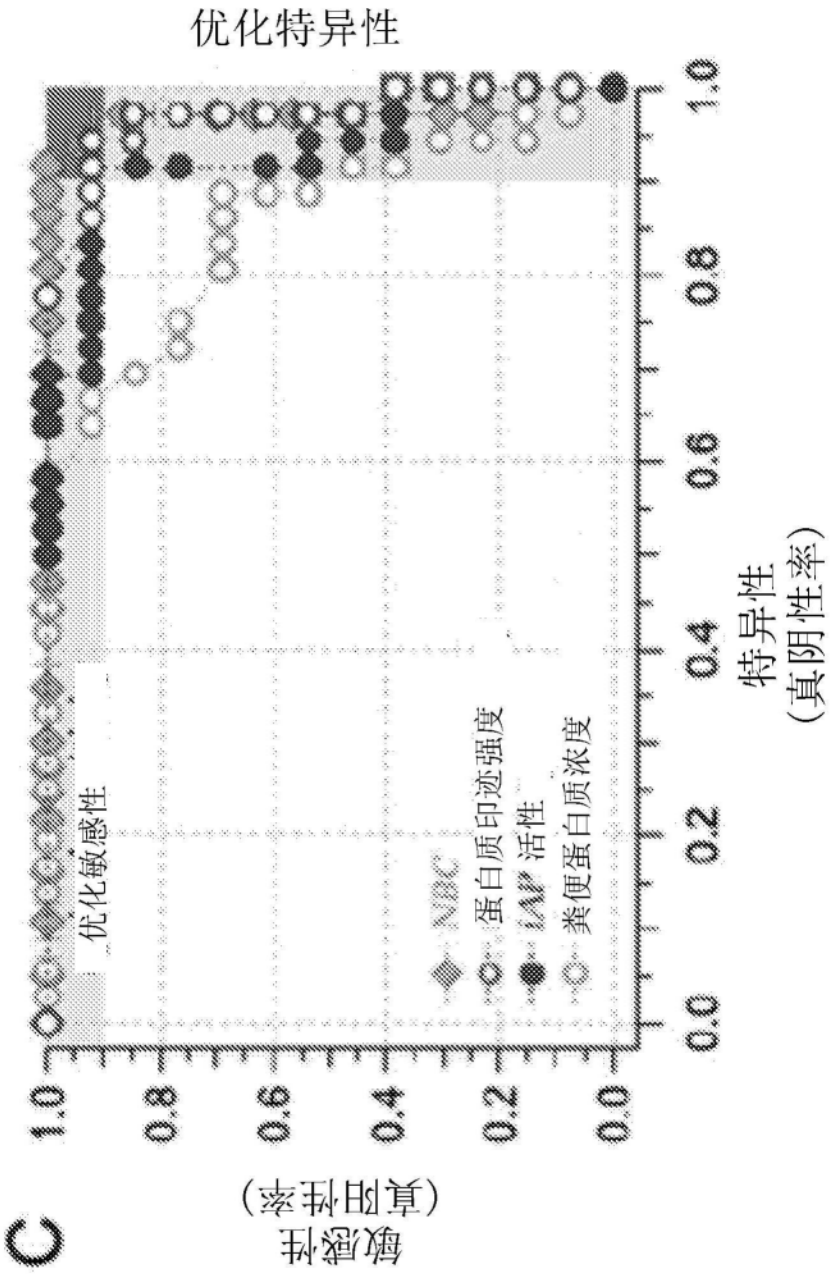
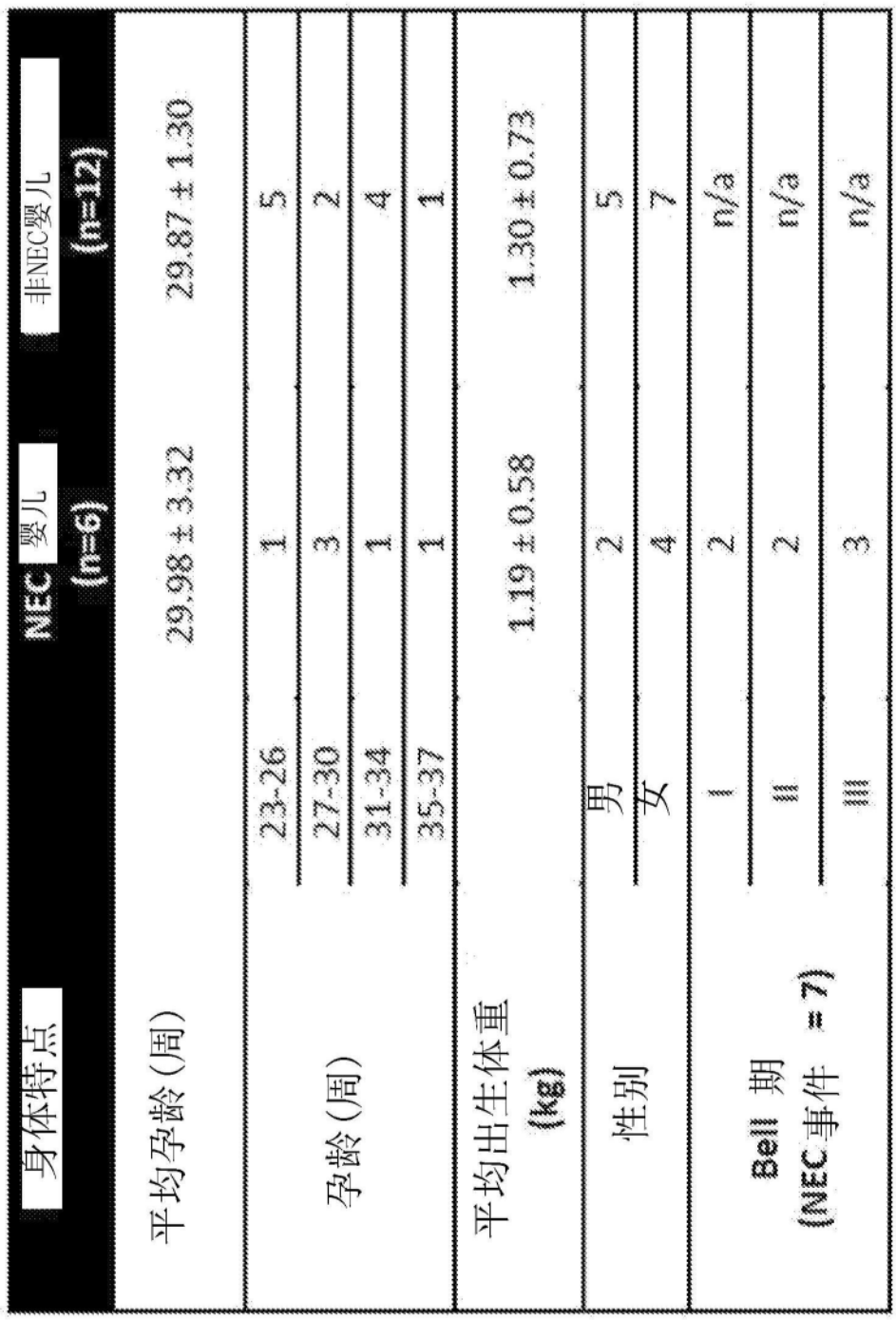

优化特异性
优化敏感性
NBC
蛋白质印迹强度
IAP 活性
粪便蛋白质浓度
敏感性
(真阳性率)
特异性
(真阴性率)
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
C

图3续



身体特点	NEC 婴儿 (n=6)	非NEC婴儿 (n=12)
平均孕龄(周)	29.98 ± 3.32	29.87 ± 1.30
孕龄(周) 23-26	1	5
孕龄(周) 27-30	3	2
孕龄(周) 31-34	1	4
孕龄(周) 35-37	1	1
平均出生体重 (kg)	1.19 ± 0.58	1.30 ± 0.73
性别 男	2	5
性别 女	4	7
Bell 期 (NEC事件 = 7) I	2	n/a
Bell 期 (NEC事件 = 7) II	2	n/a
Bell 期 (NEC事件 = 7) III	3	n/a

图4

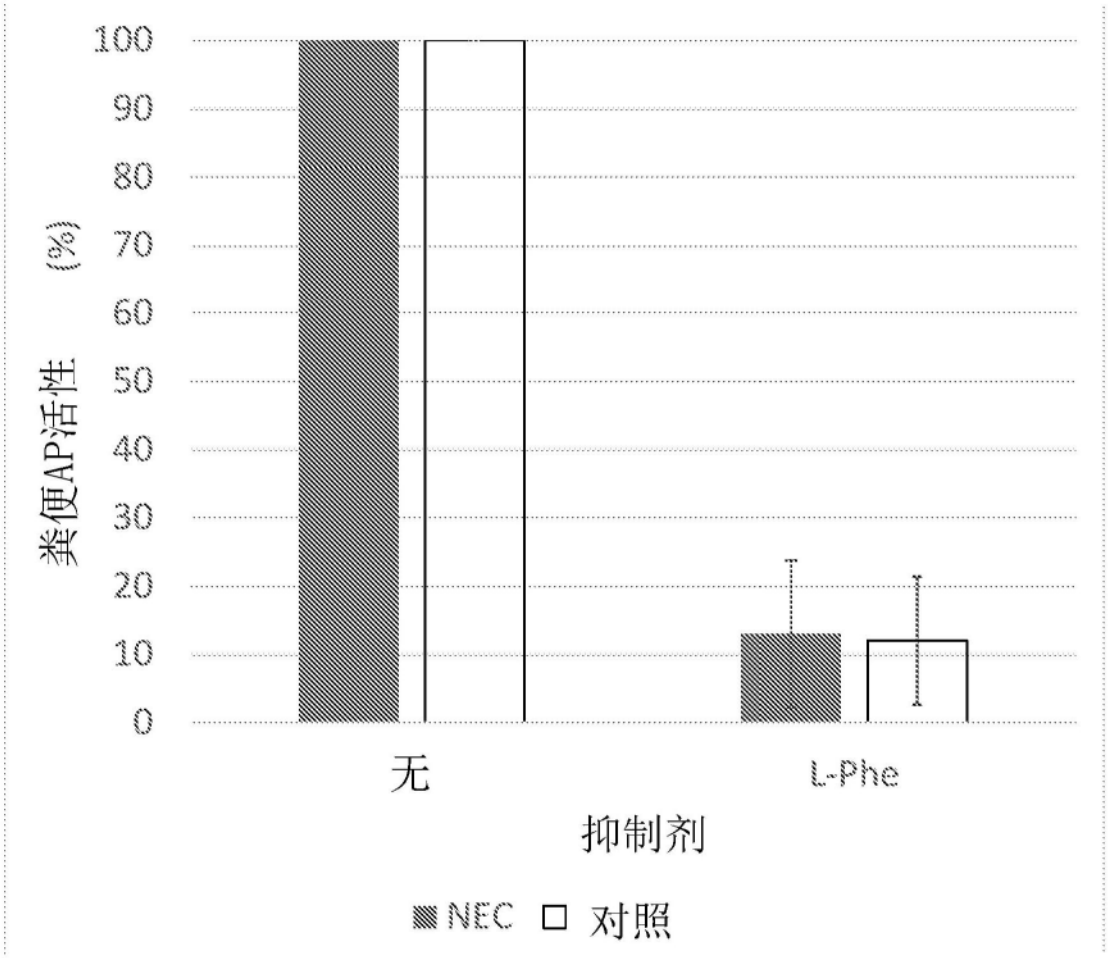


图5

表1.研究中招募的患者的人口统计数据

身体特点		NEC 婴儿 (n=6)	非NEC 婴儿 (n=12)
Bell 期 (NEC 事件 = 7)	I	2	n/a
	II	2	n/a
	III	3	n/a
孕龄 (WGA)	23-26	1	5
	27-30	3	2
	31-34	1	4
	35-38	1	1
平均出生体重(kg)		1.19 ± 0.58	1.30 ± 0.73
性别	男	2	5
	女	4	7

图6

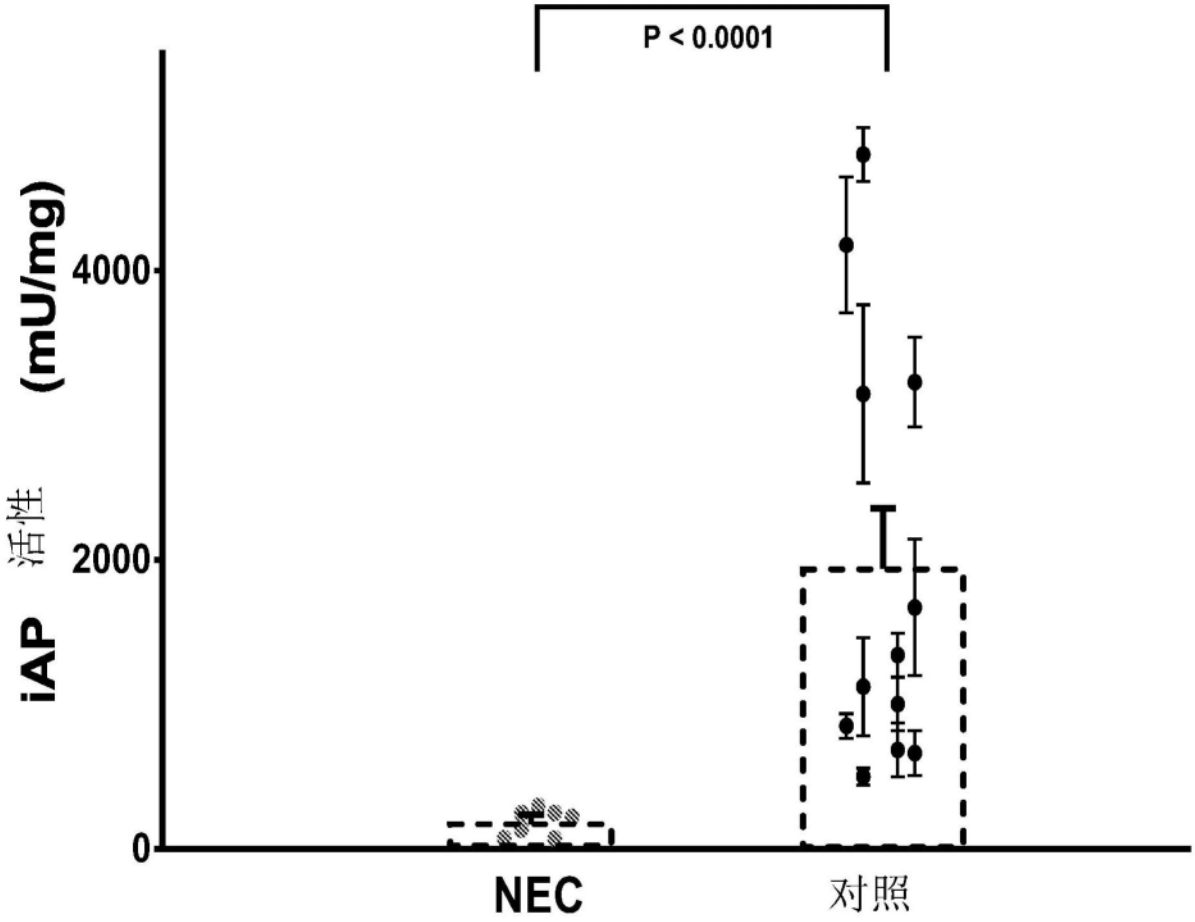


图7

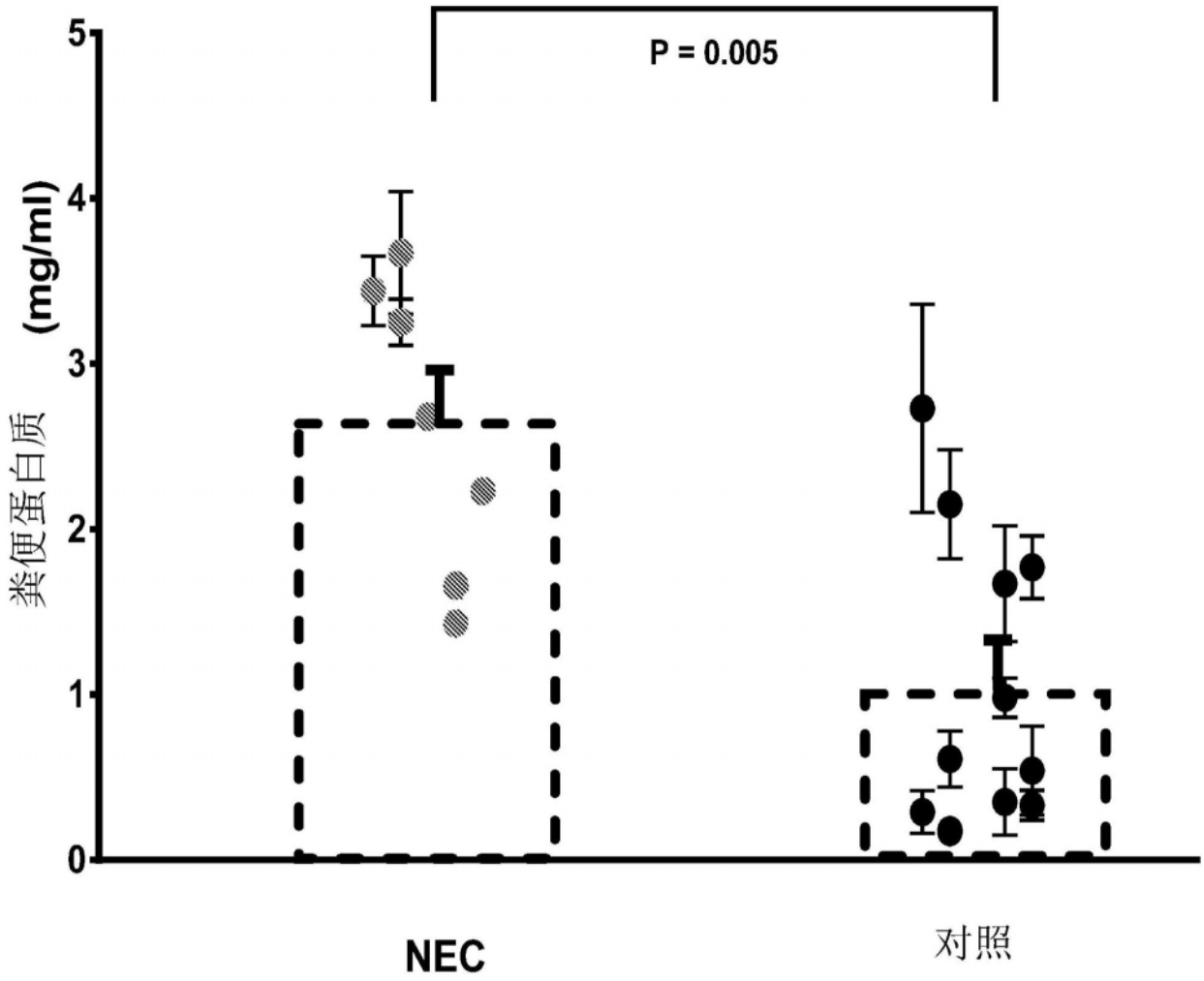


图8

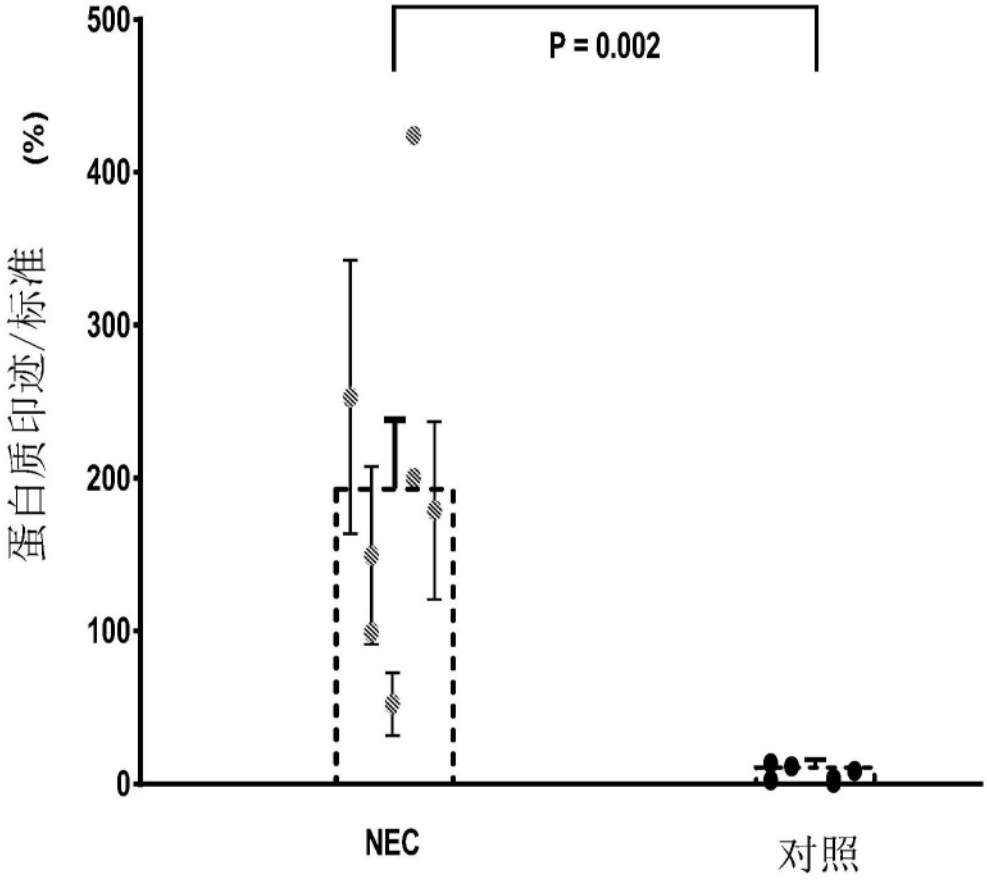


图9

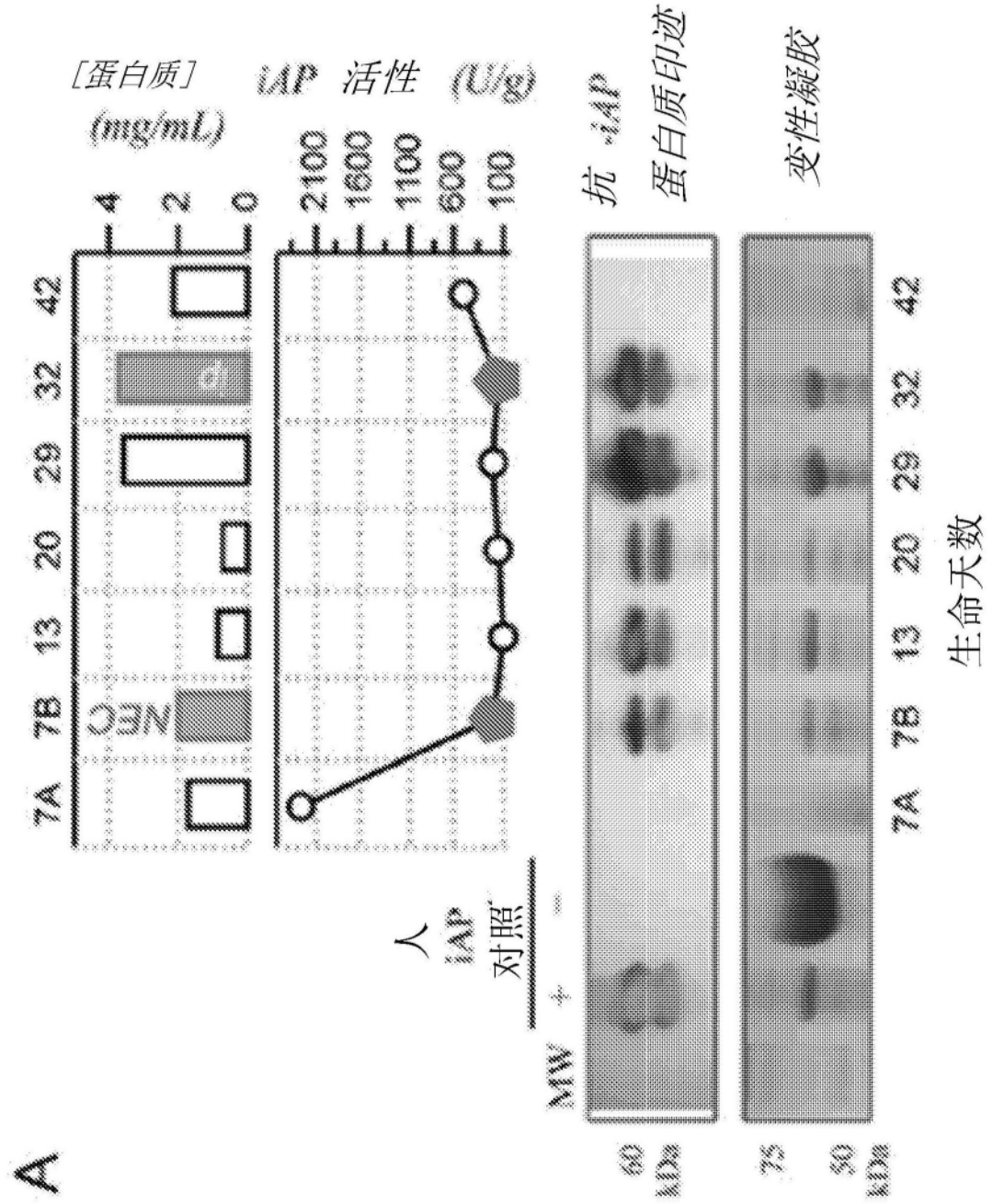

A
[蛋白质] (mg/mL)
iAP 活性 (U/g)
4
2
0
2100
1600
1100
600
100
7A
7B
13
20
29
32
42
NEC
d
人 iAP
对照
MW
+
-
抗-iAP
蛋白质印迹
变性凝胶
60 kDa
75
90 kDa
生命天数

图10

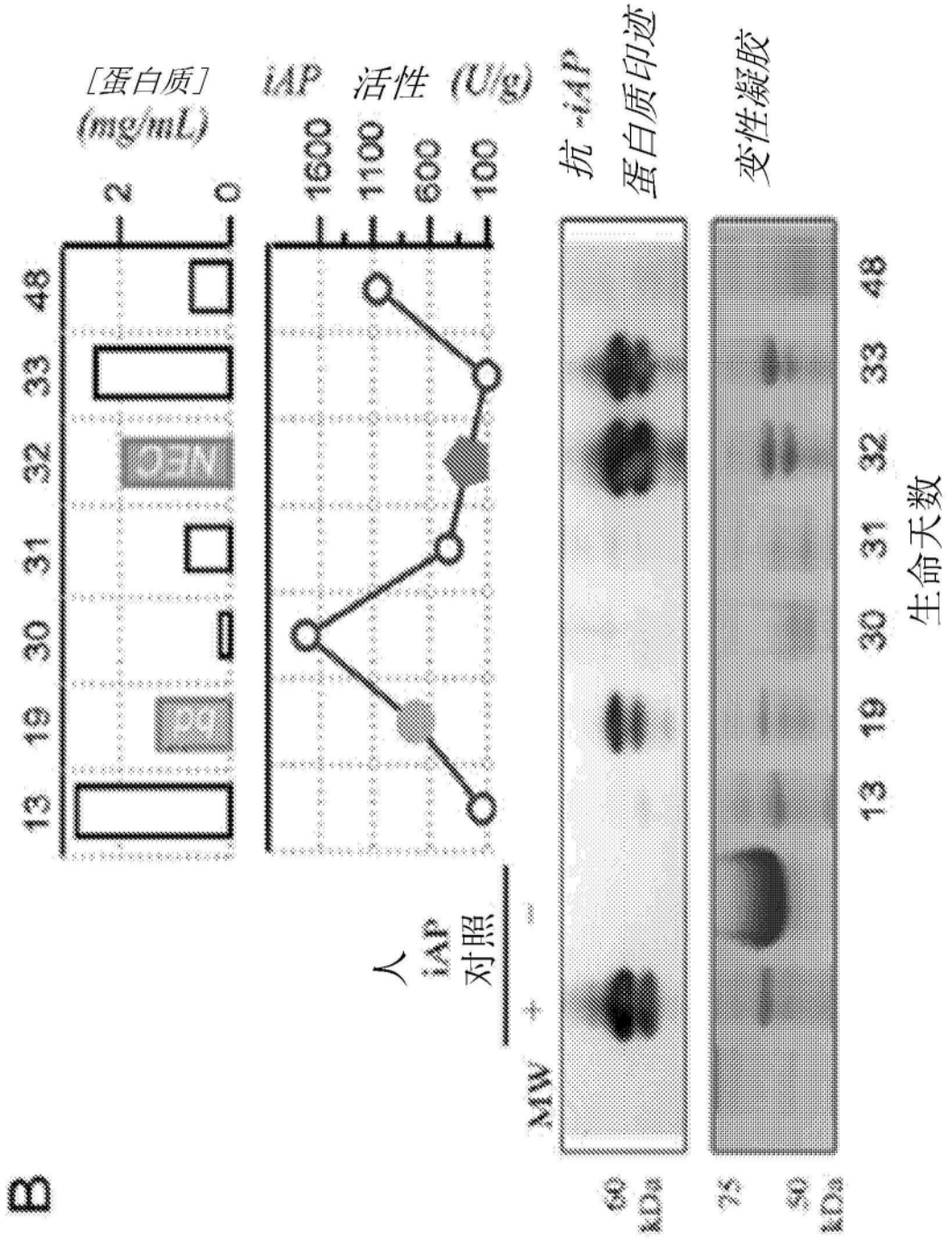

B
[蛋白质] (mg/mL)
2
0
iAP 活性 (U/g)
1600
1100
600
100
13
19
30
31
32
33
48
OBN
BC
抗-iAP 蛋白质印迹
变性凝胶
人 iAP
对照
MW
+
-
90 kDa
75
90 kDa
生命天数

图10续

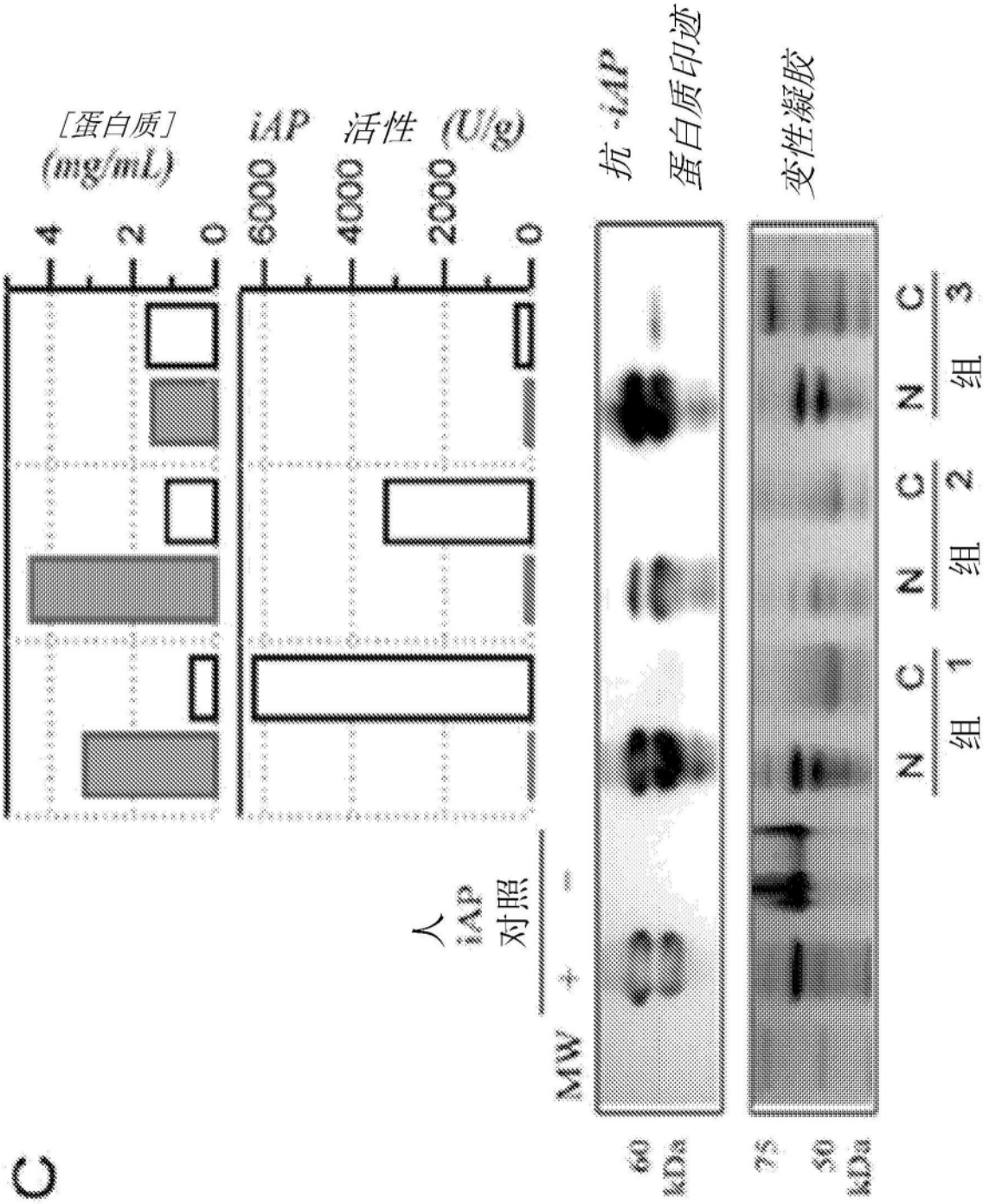

C
[蛋白质]
(mg/mL)
4
2
0
iAP 活性 (U/g)
6000
4000
2000
0
抗-iAP
蛋白质印迹
变性凝胶
人
iAP
对照
MW
+
-
N C N C N C
组 1 组 2 组 3
60
kDa
75
50
kDa

图10续

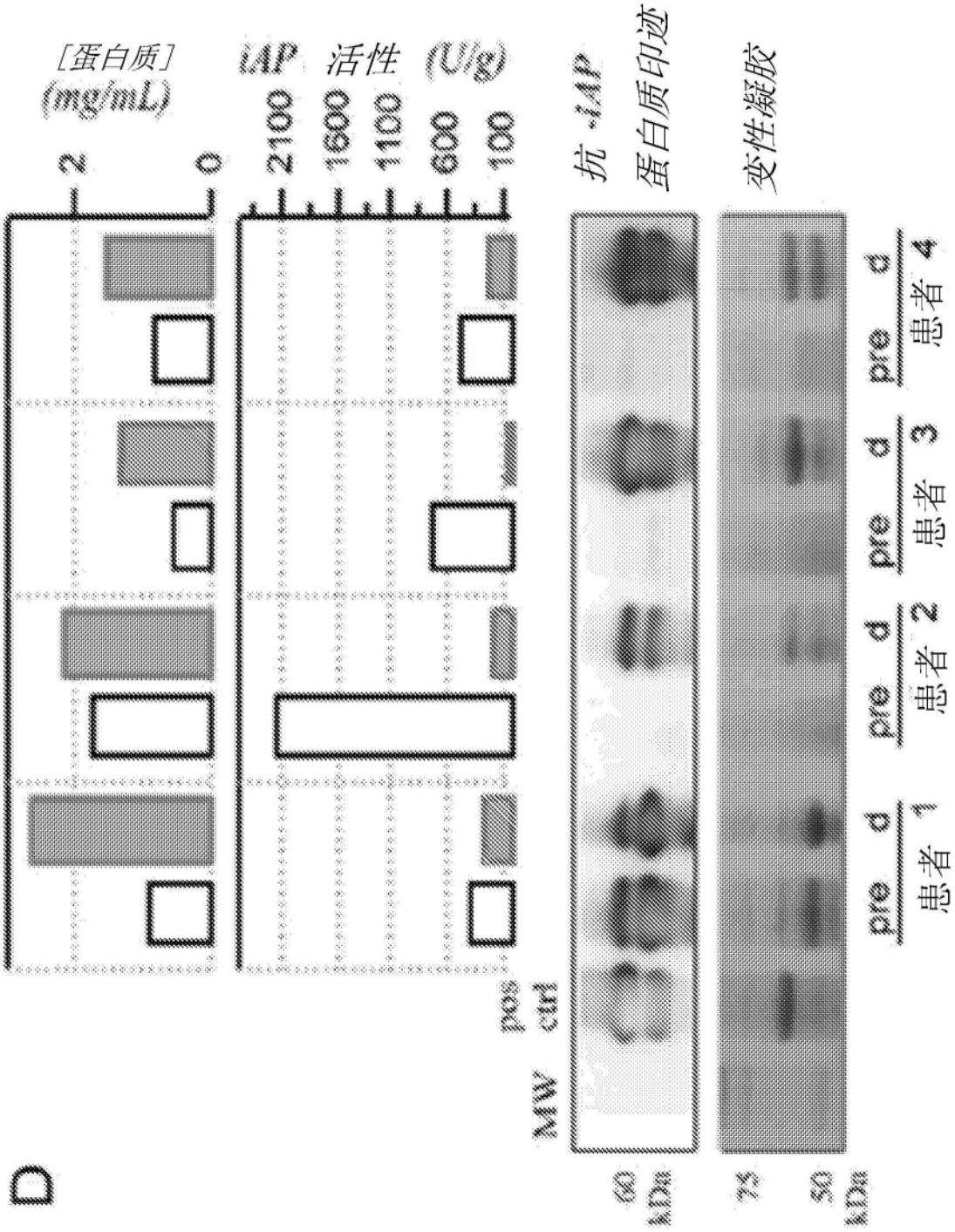

D
[蛋白质] (mg/mL)
2
0
iAP 活性 (U/g)
2100
1600
1100
600
100
MW
ctrl
pos
抗-iAP 蛋白质印迹
变性凝胶
pre d 患者 1
pre d 患者 2
pre d 患者 3
pre d 患者 4
60 kDa
75
50 kDa

图10续

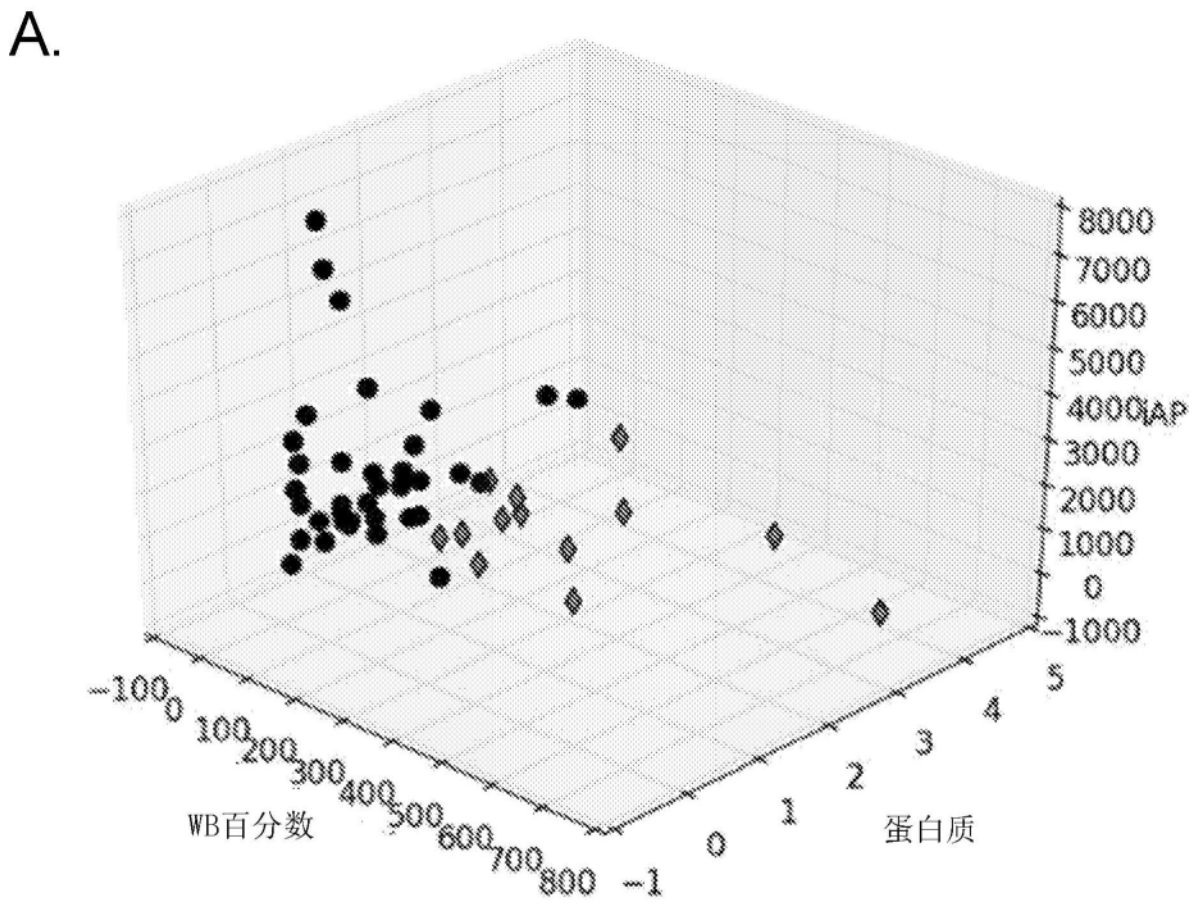

A.
8000
7000
6000
5000
4000
AP
3000
2000
1000
0
-1000
-100
0
100
200
300
400
500
600
700
800
WB百分数
-1
0
1
2
3
4
5
蛋白质

图11

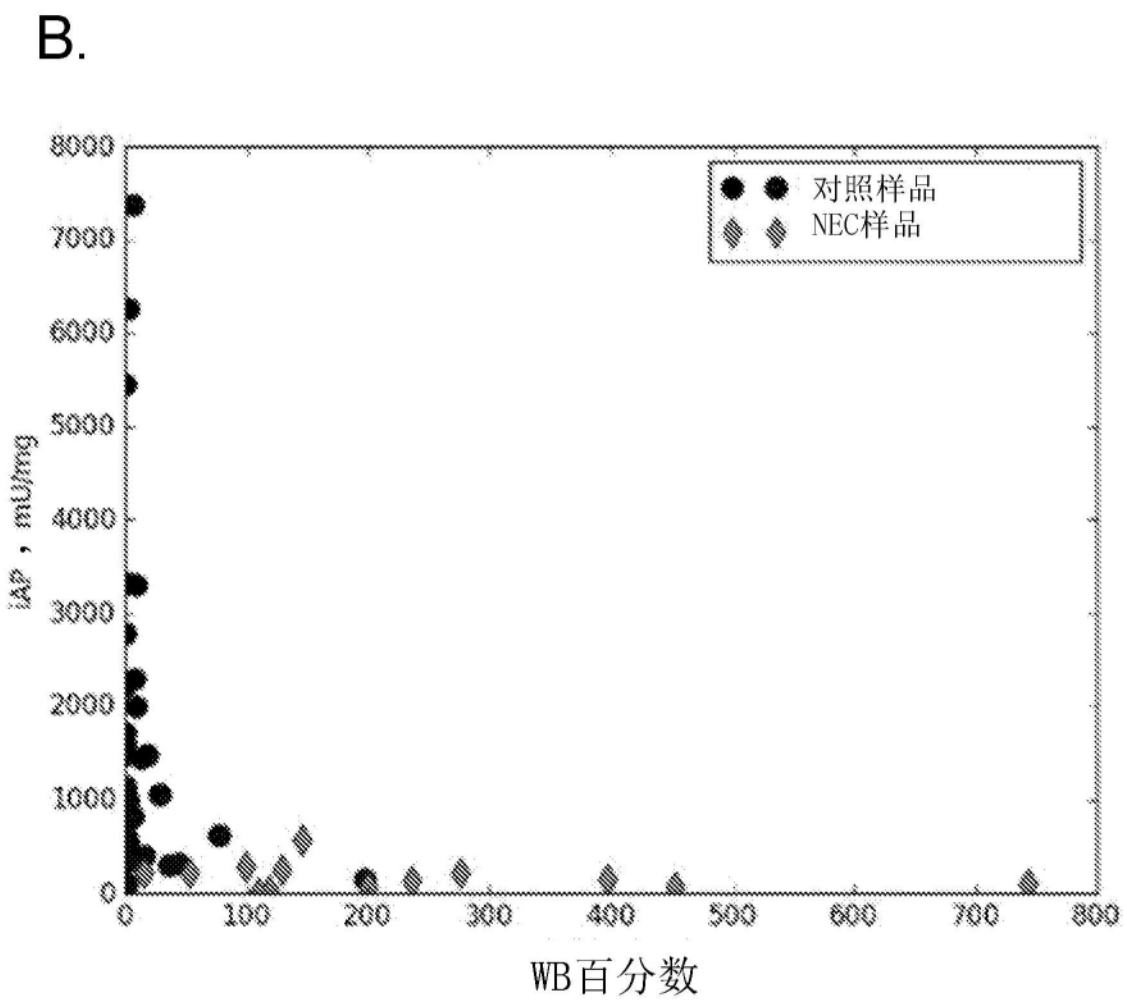

B.
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
IAP，mU/mg
0
100
200
300
400
500
600
700
800
WB百分数
对照样品
NEC样品

图11续

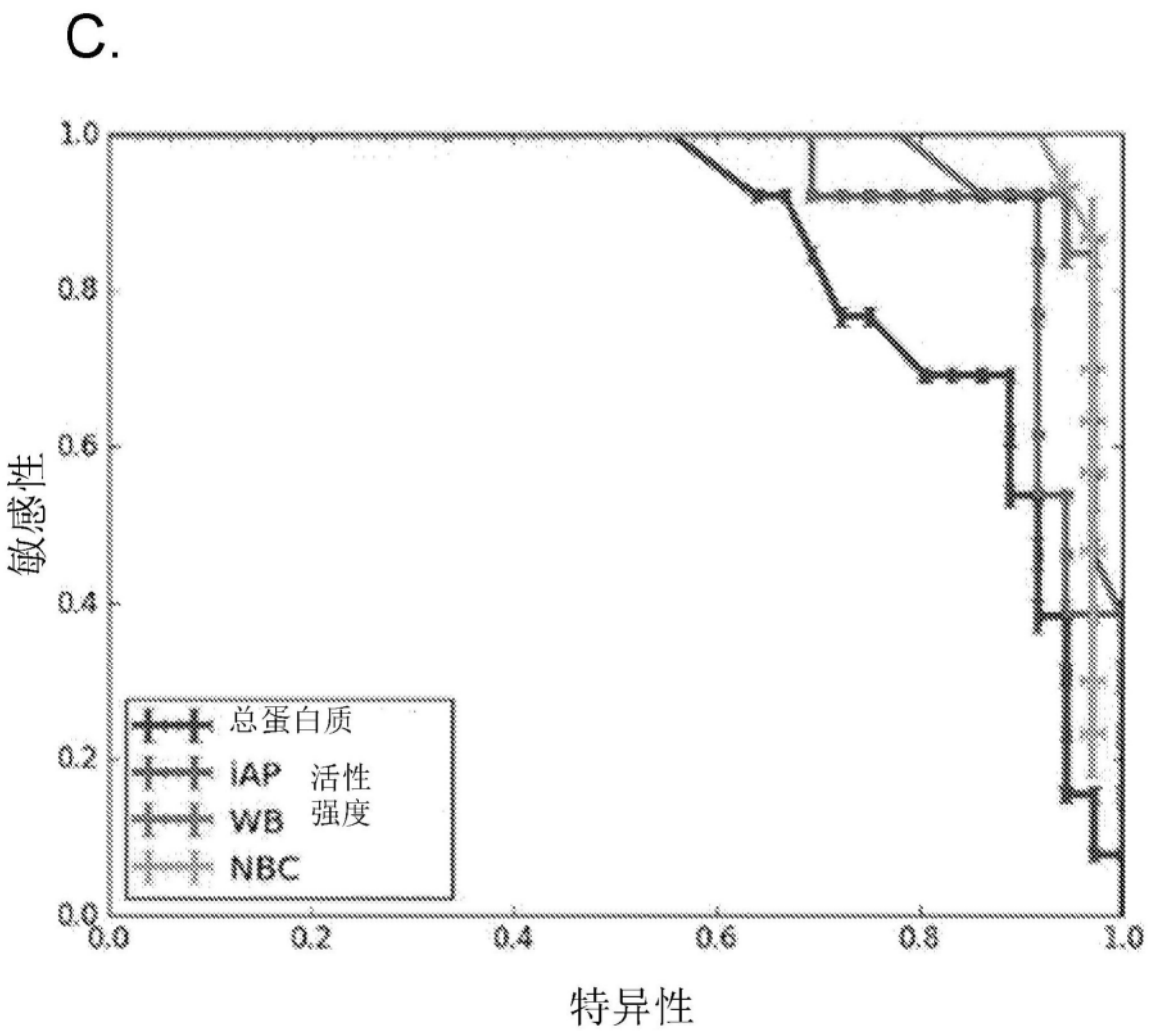


图11续

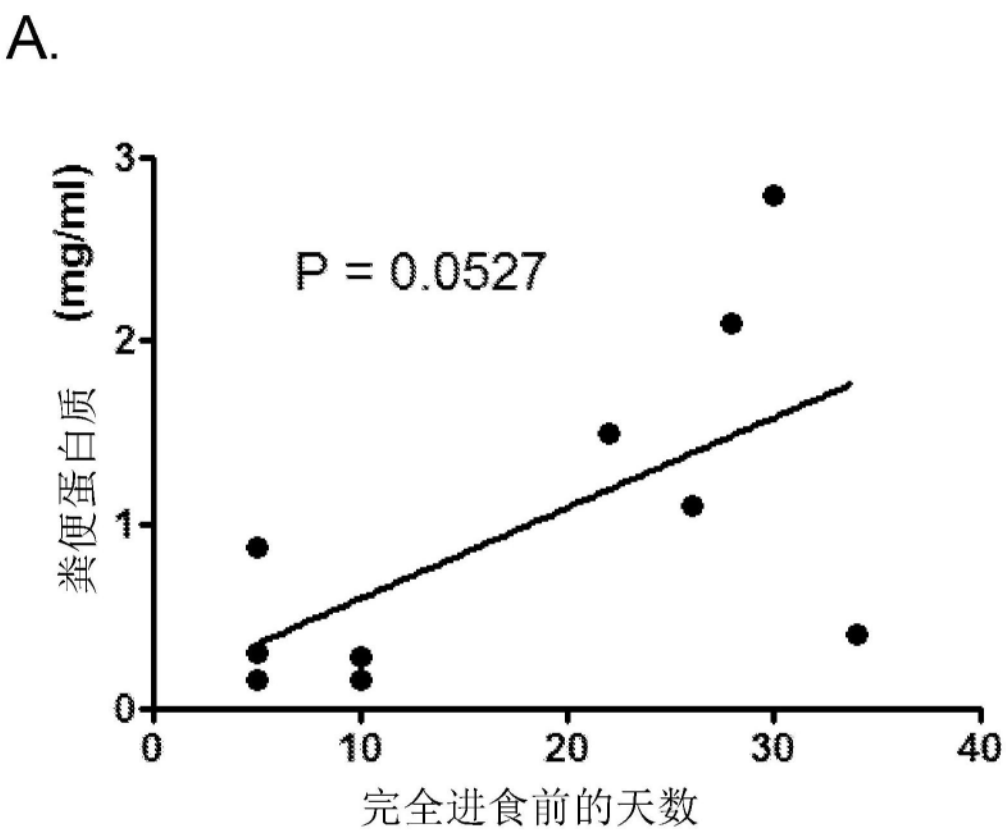


图12

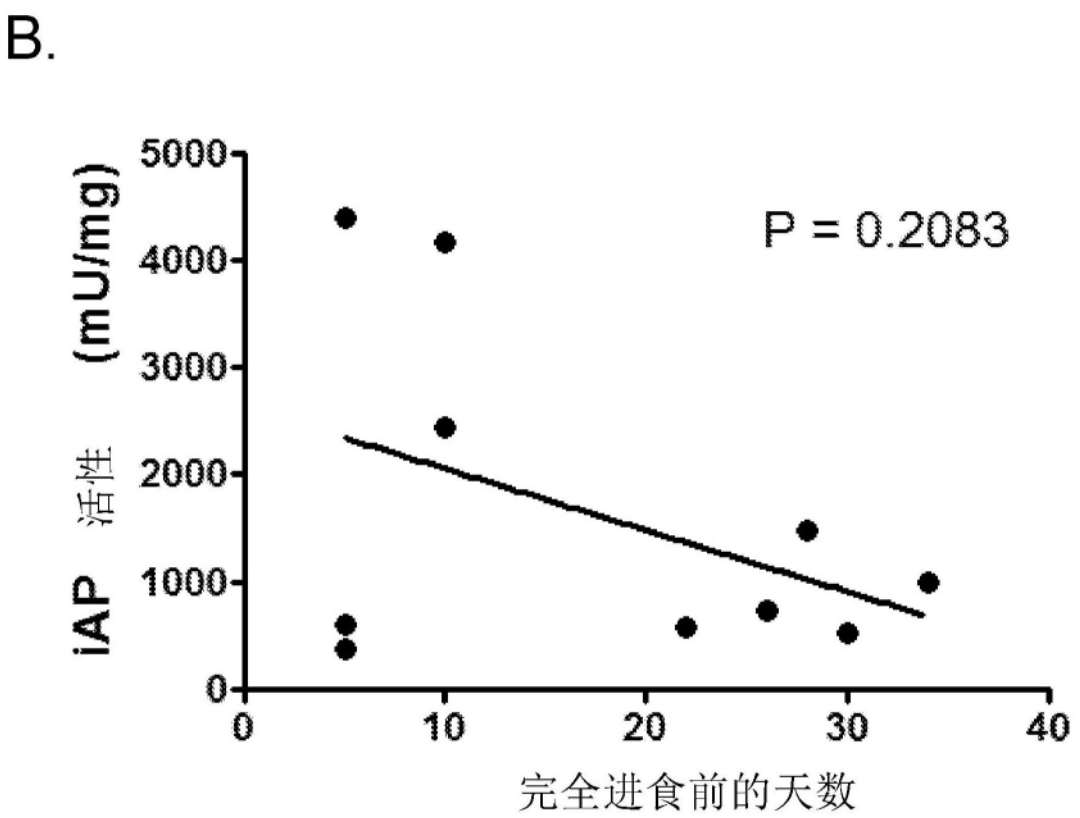

B.
iAP 活性 (mU/mg)
5000
4000
3000
2000
1000
0
0
10
20
30
40
P = 0.2083
完全进食前的天数

图12续

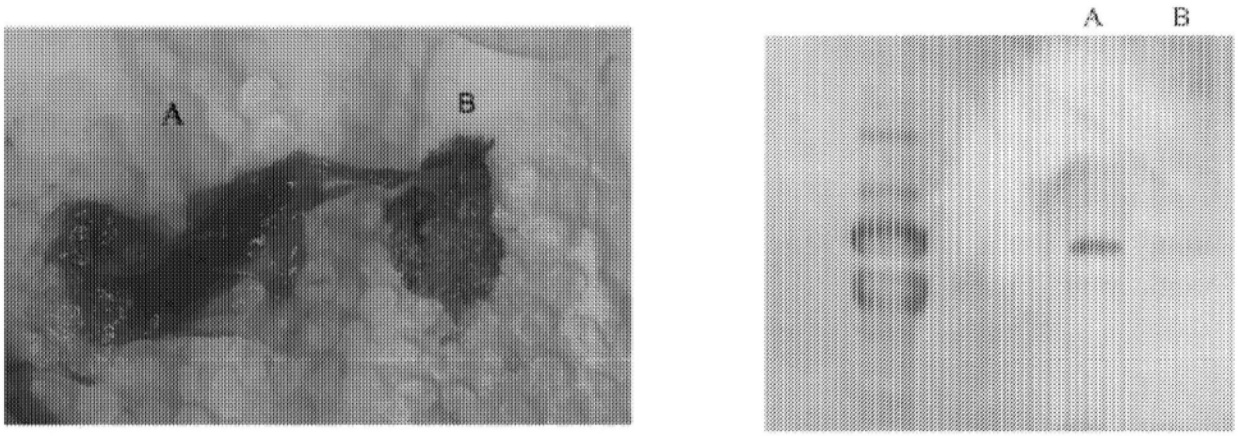

A
B
A
B

图13

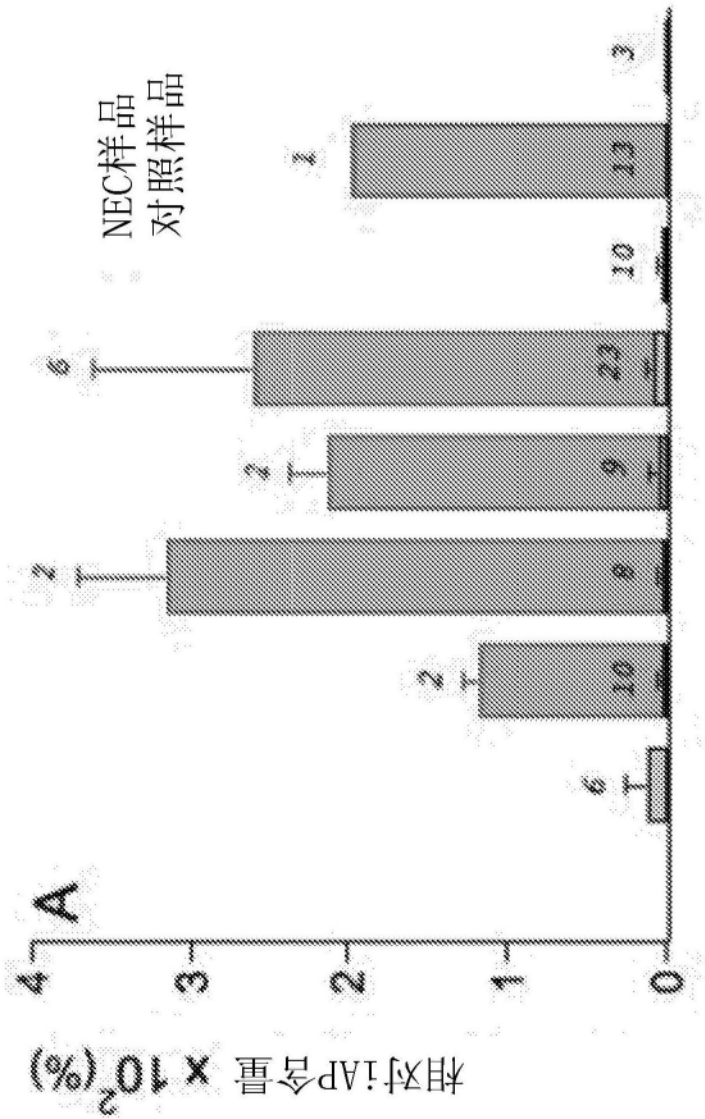


图14

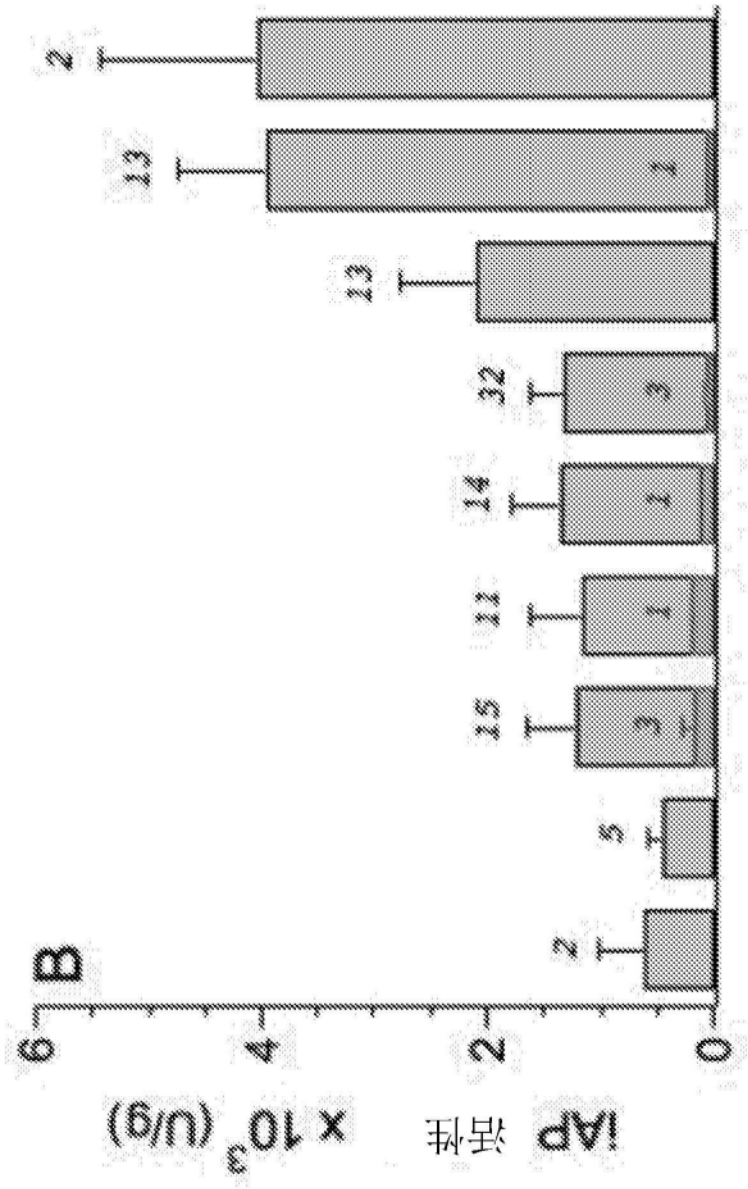


图14续

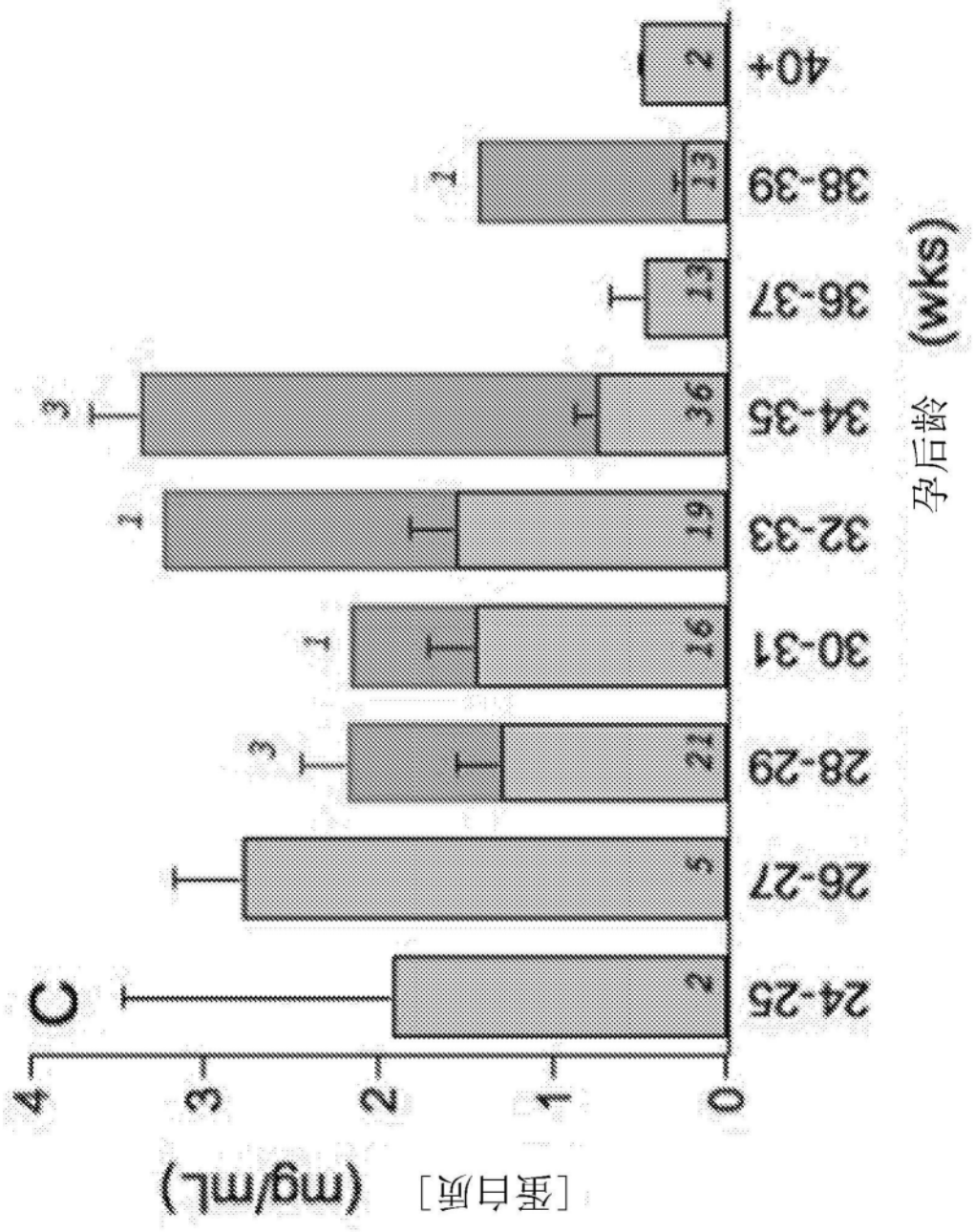

C
[蛋白质] (mg/mL)
0
1
2
3
4
24-25
26-27
28-29
30-31
32-33
34-35
36-37
38-39
40+
孕后龄 (wks)

图14续

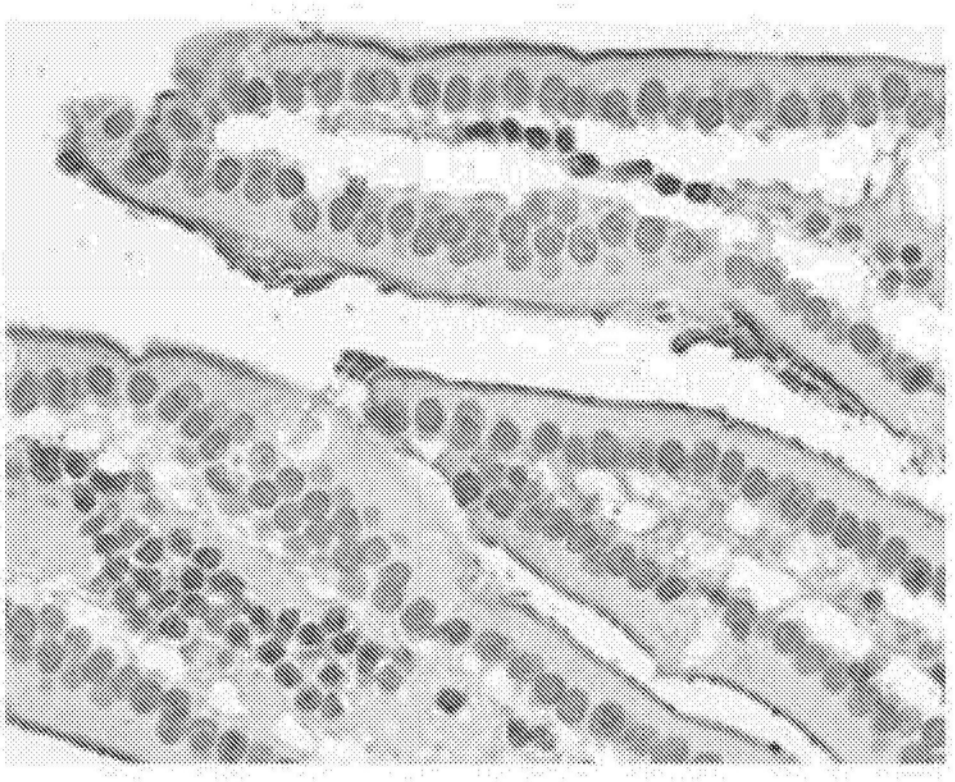


图15

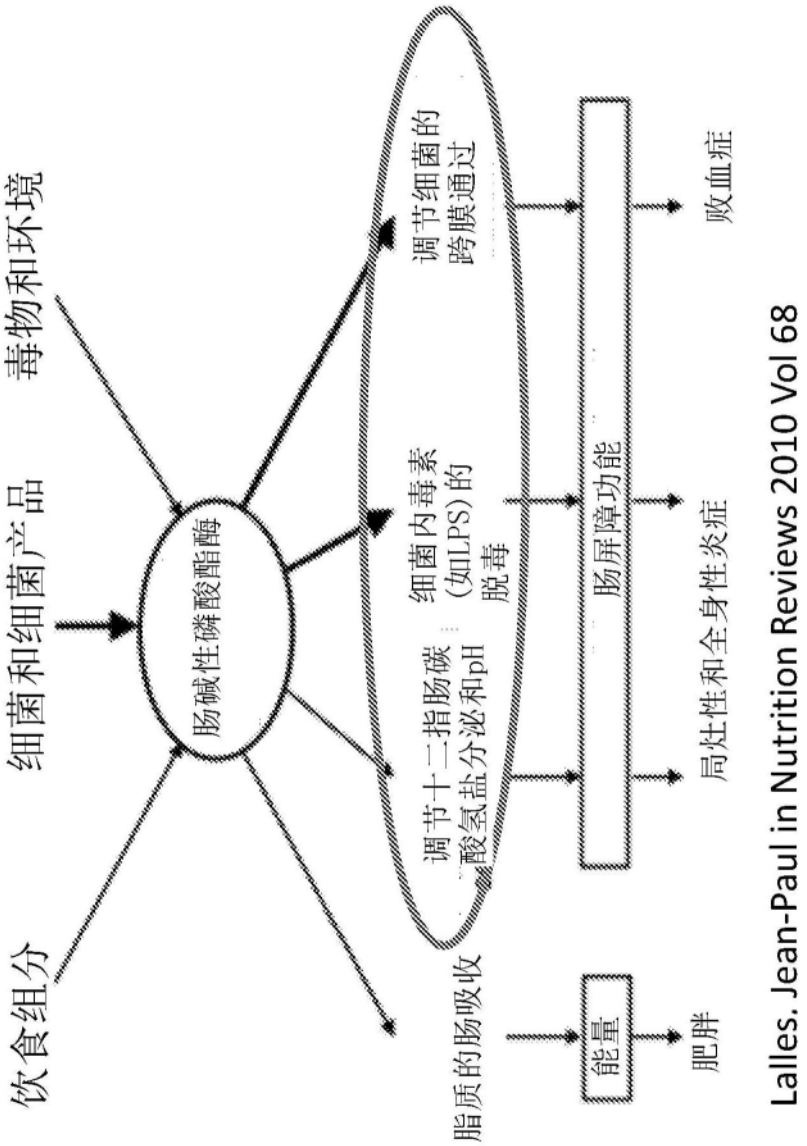

饮食组分
细菌和细菌产品
毒物和环境
肠碱性磷酸酯酶
调节十二指肠碳酸氢盐分泌和pH
细菌内毒素(如LPS)的脱毒
调节细菌的跨膜通过
脂质的肠吸收
能量
肥胖
肠屏障功能
局灶性和全身性炎症
败血症
Lalles. Jean-Paul in Nutrition Reviews 2010 Vol 68

图16

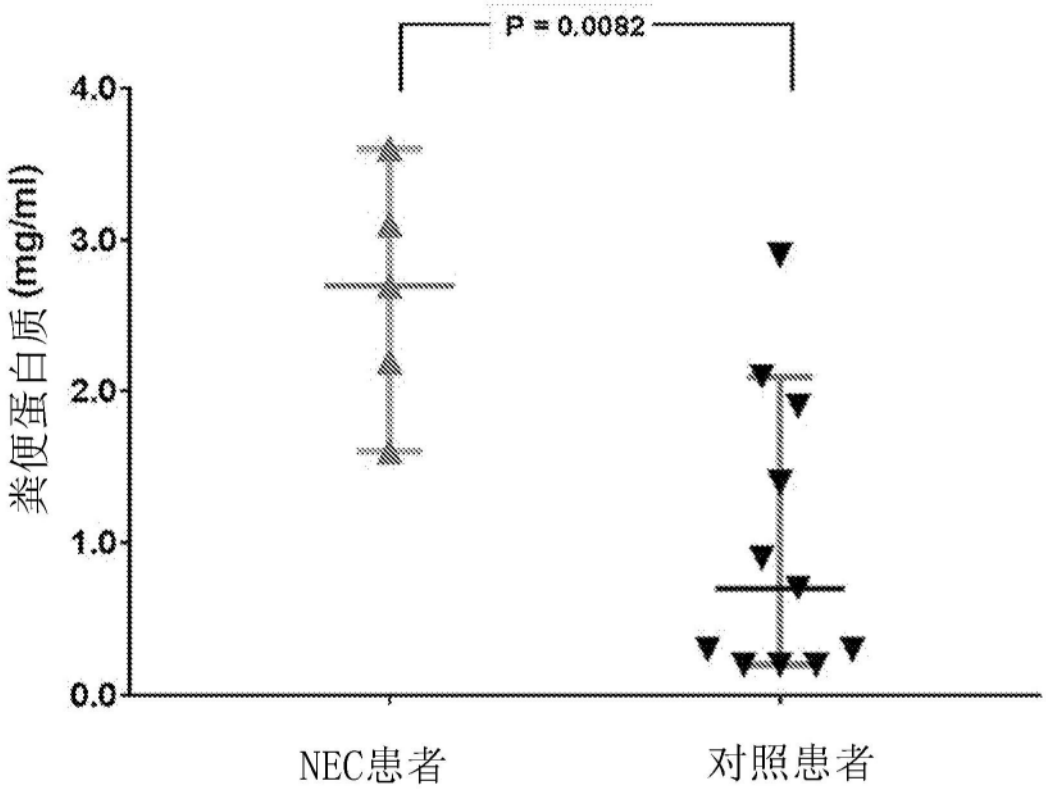

P = 0.0082
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
粪便蛋白质 (mg/ml)
NEC患者
对照患者

图17

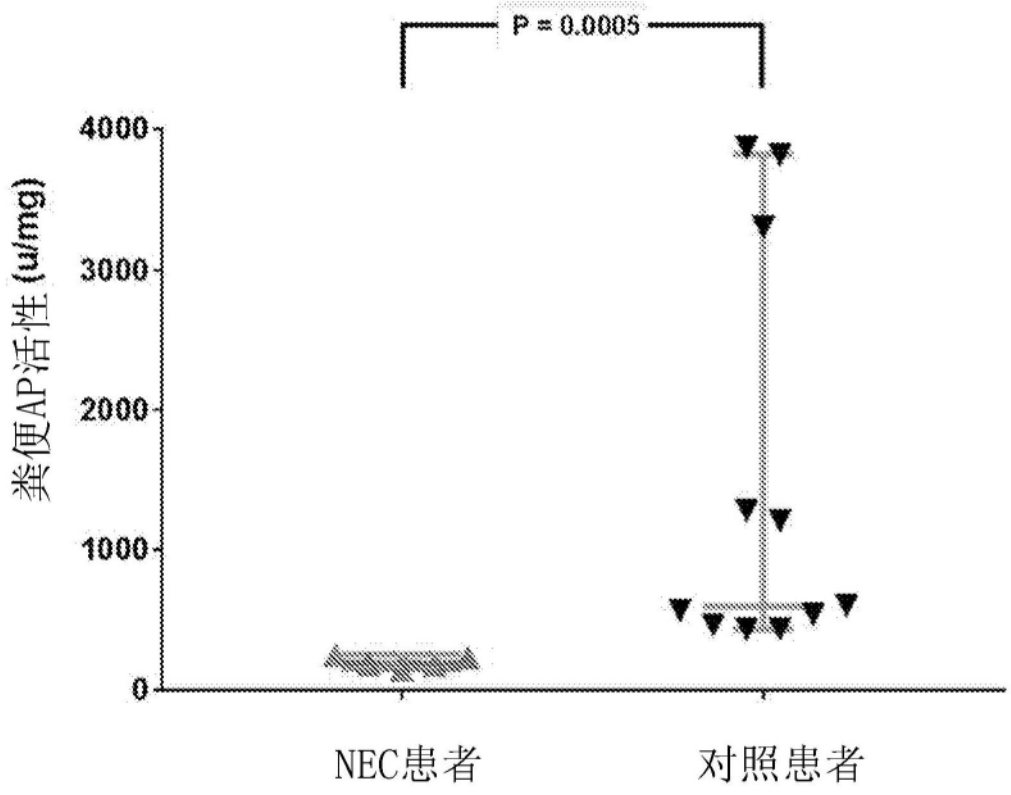

P = 0.0005
4000
3000
2000
1000
0
粪便AP活性 (u/mg)
NEC患者
对照患者

图18

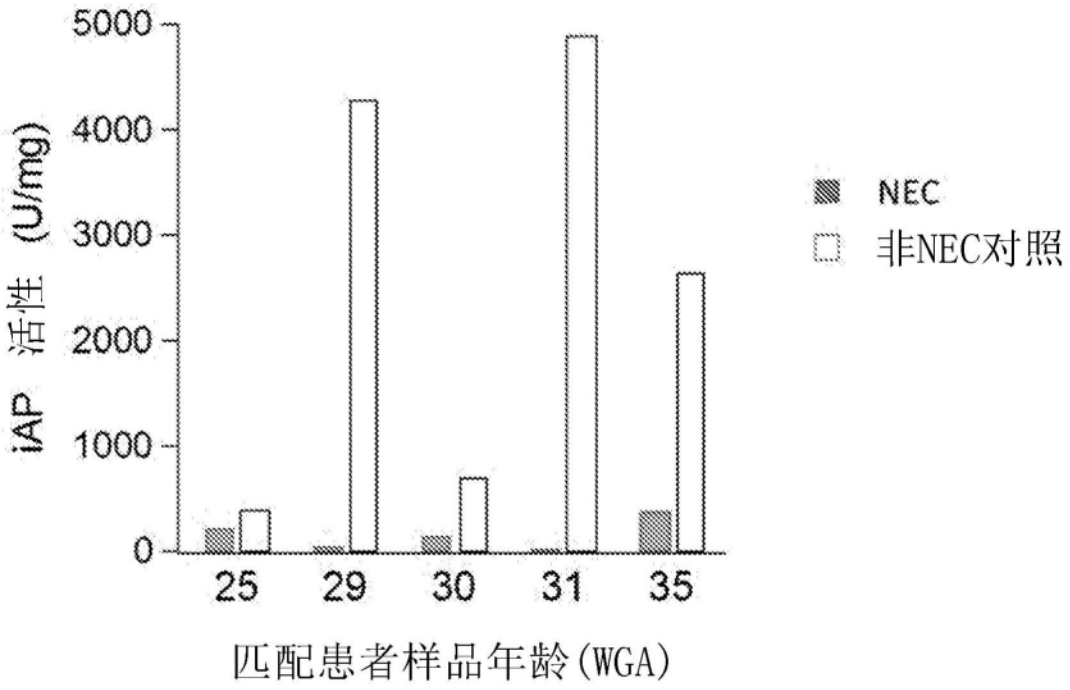

5000
4000
3000
2000
1000
0
iAP 活性 (U/mg)
25
29
30
31
35
匹配患者样品年龄(WGA)
NEC
非NEC对照

图19

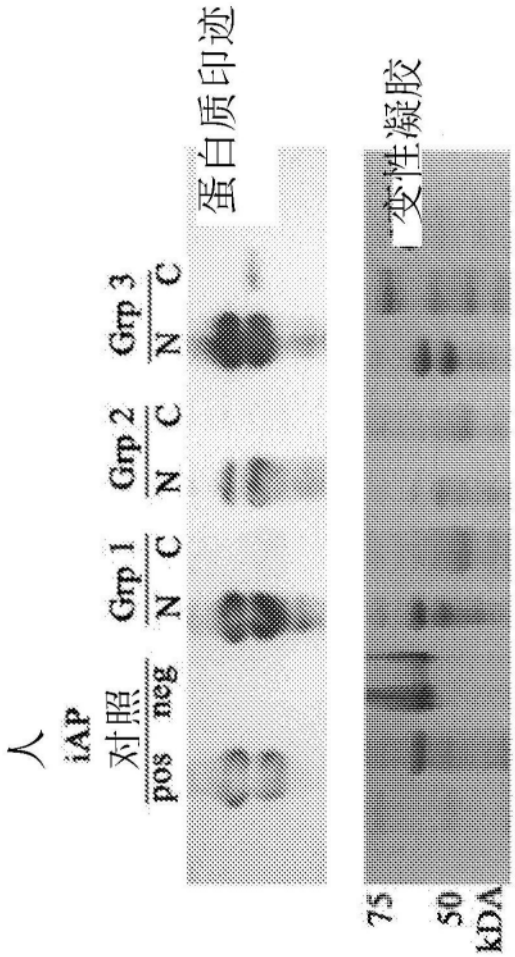


图20

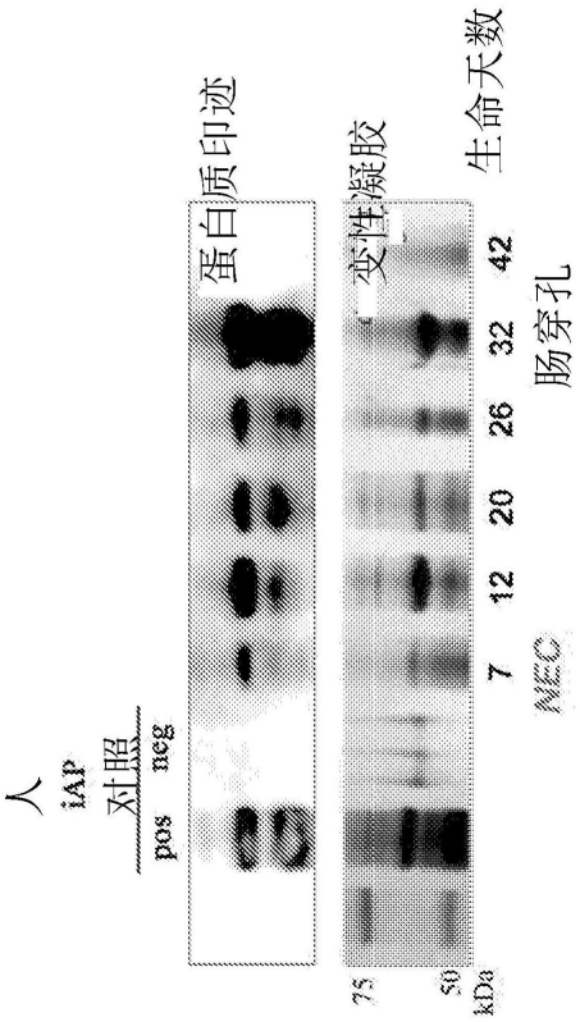


图21

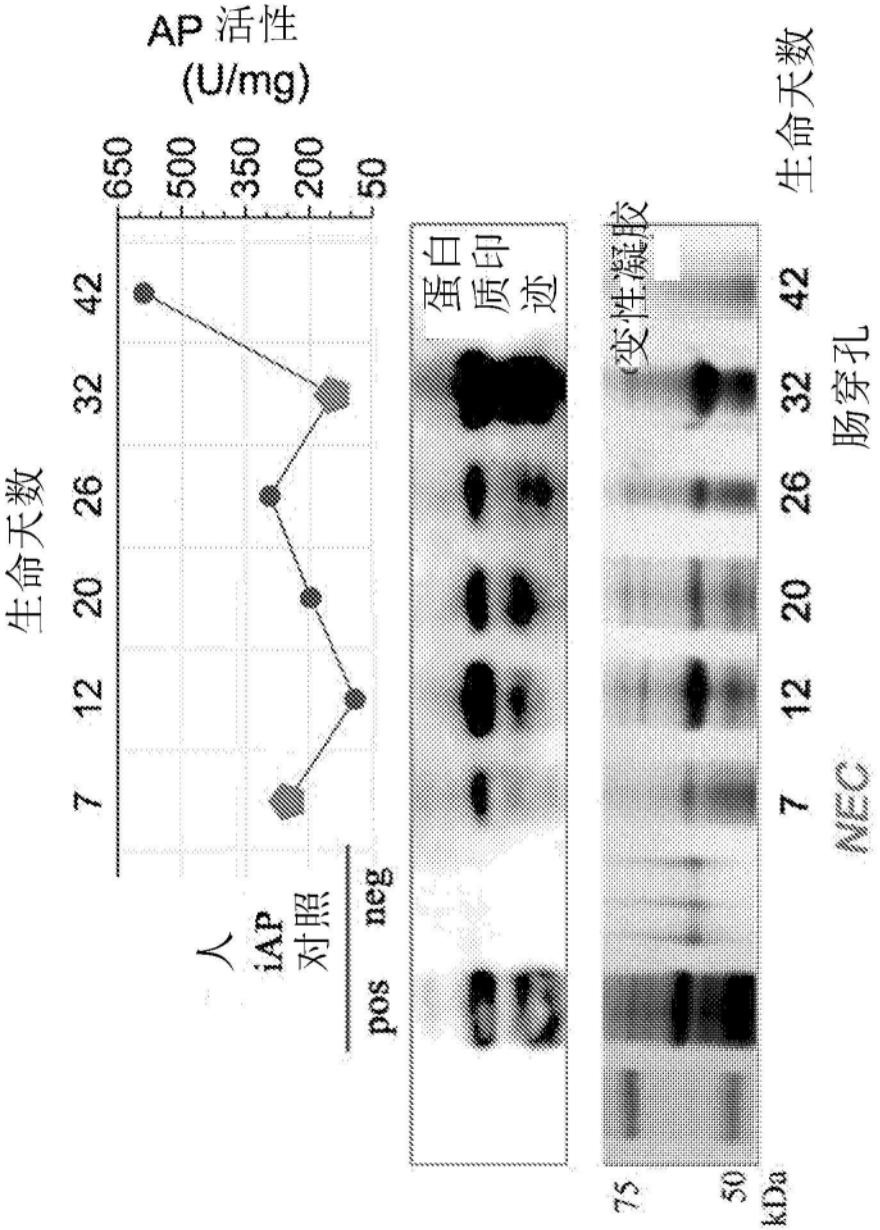

AP 活性
(U/mg)
650
500
350
200
50
生命天数
7
12
20
26
32
42
人
iAP
对照
pos
neg
蛋白
质印
迹
变性凝胶
生命天数
肠穿孔
MEC
75
50
kDa

图22

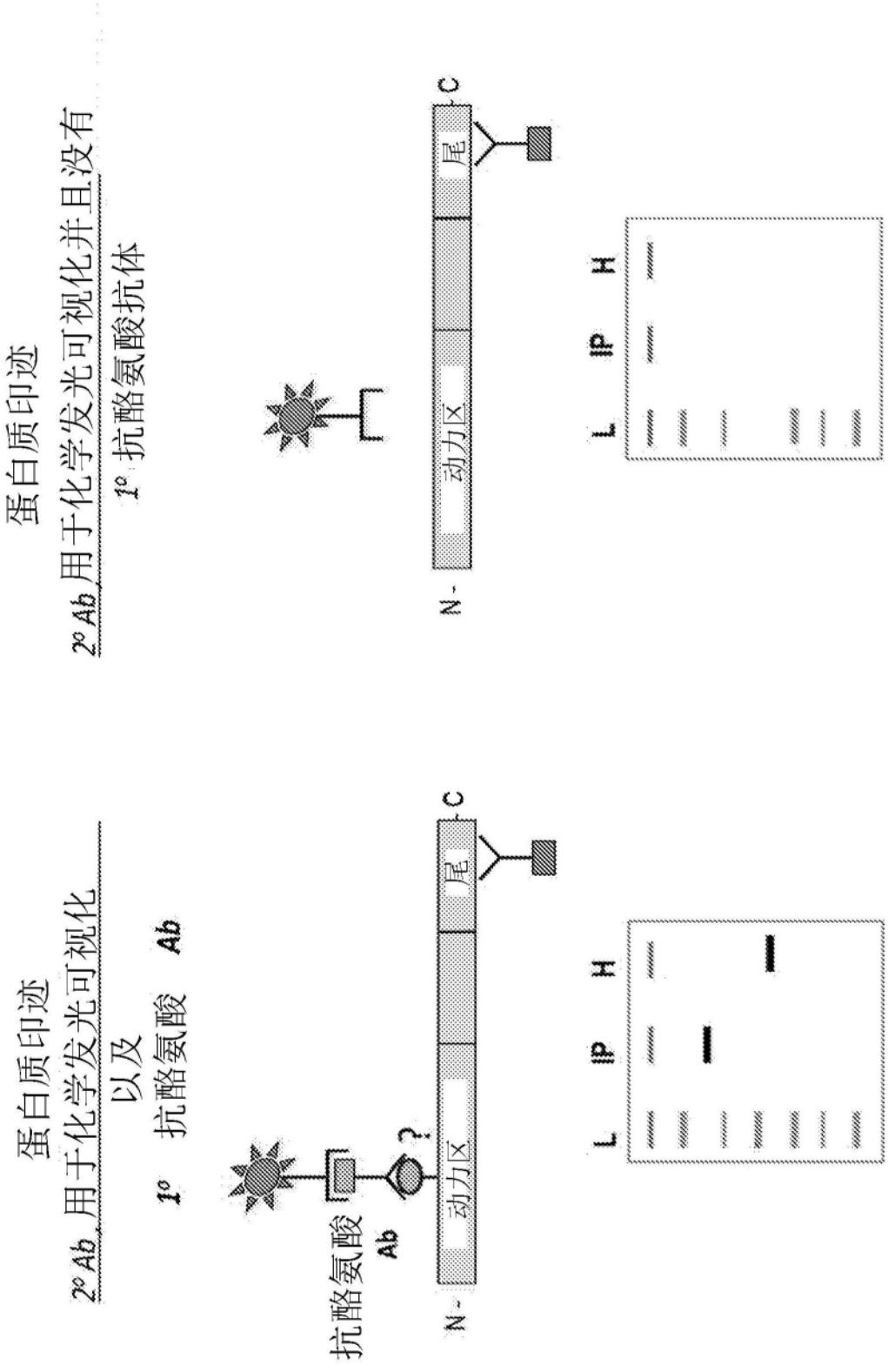

蛋白质印迹
2° Ab 用于化学发光可视化并且没有
1° 抗酪氨酸抗体
N-
动力区
尾
C
L
IP
H
蛋白质印迹
2° Ab 用于化学发光可视化
以及
1° 抗酪氨酸 Ab
抗酪氨酸
Ab
?
N-
动力区
尾
C
L
IP
H

图23

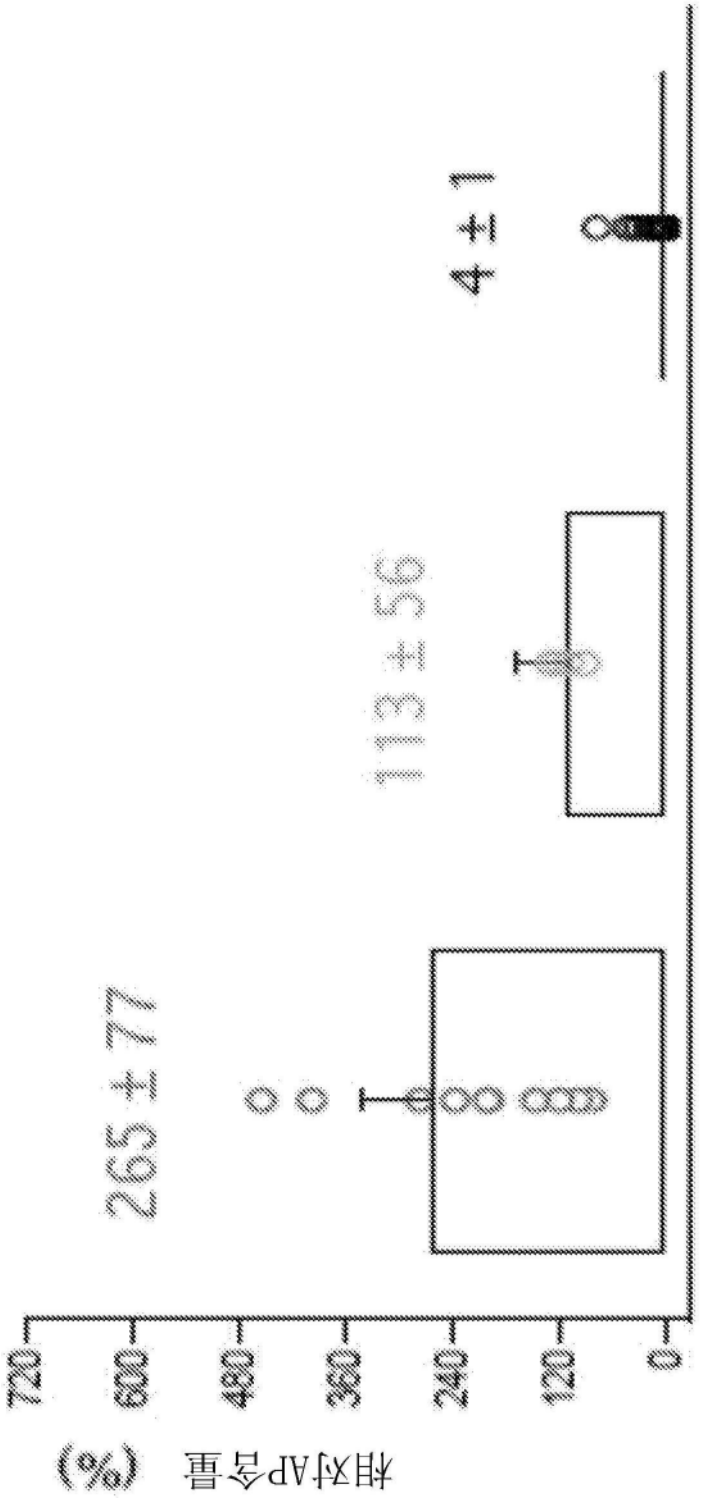


图24

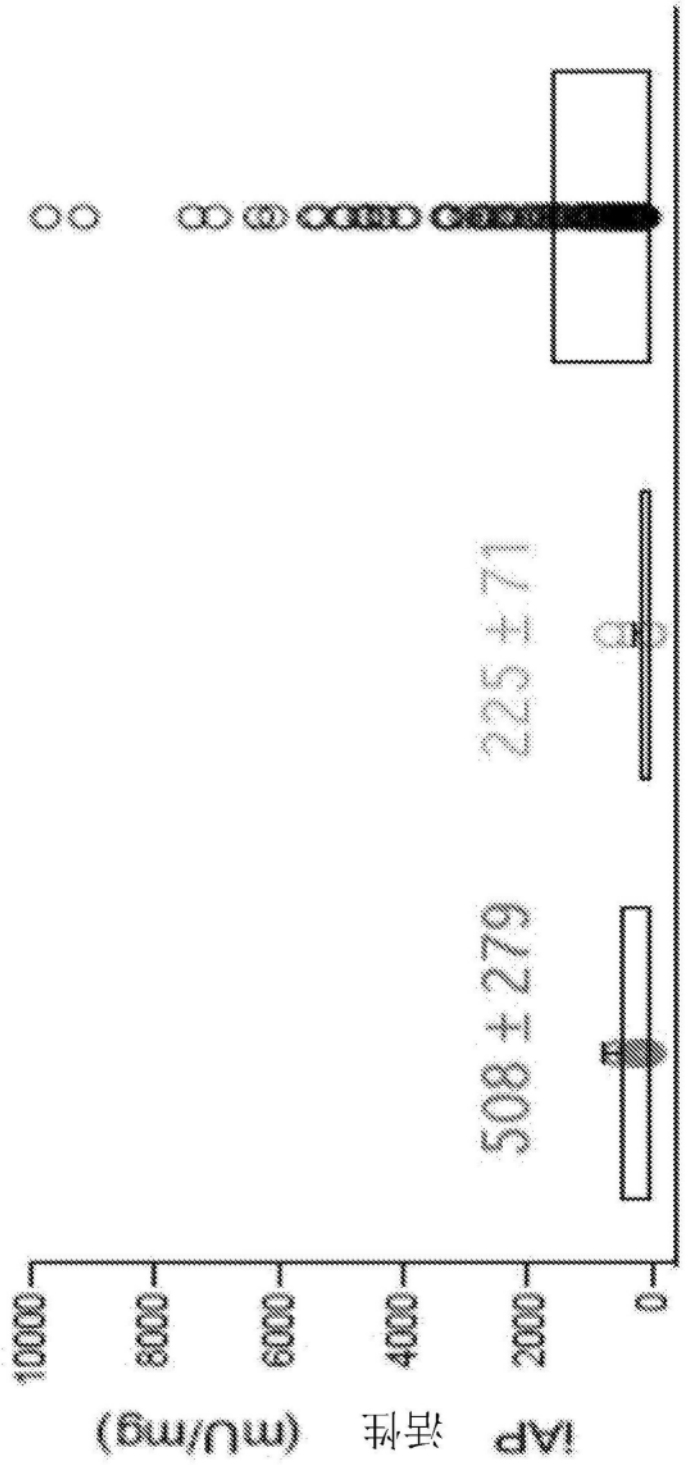


图24续

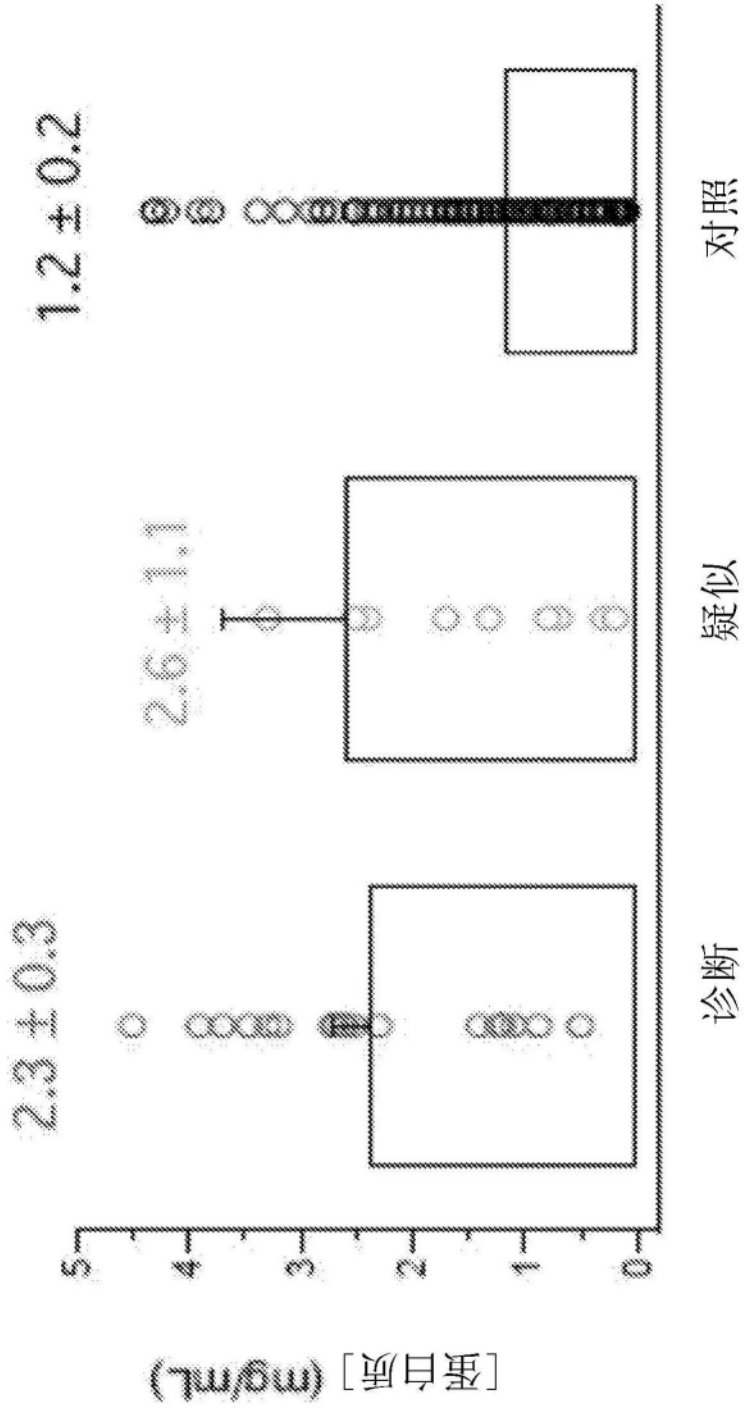


图24续

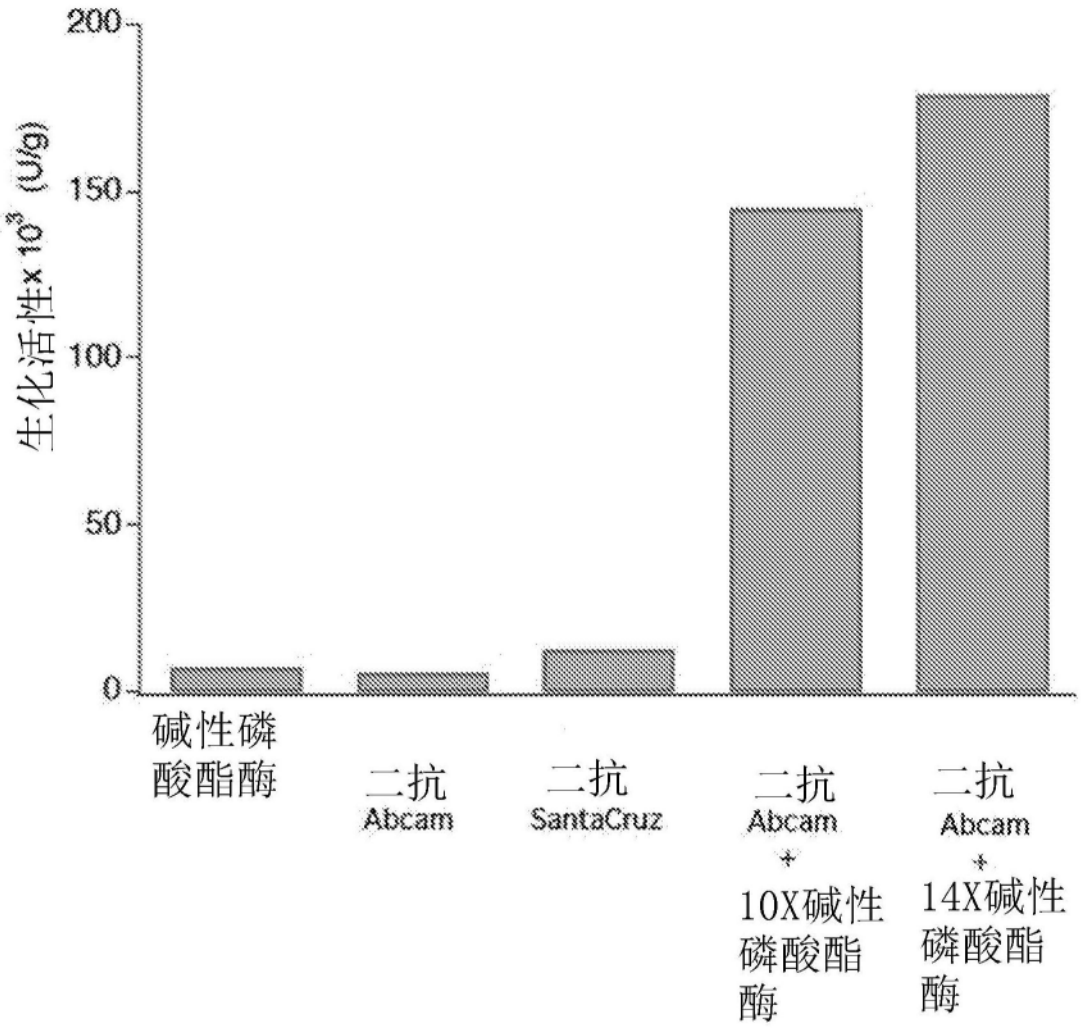

200
150
100
50
0
生化活性x 10³ (U/g)
碱性磷酸酯酶
二抗 Abcam
二抗 SantaCruz
二抗 Abcam + 10X碱性磷酸酯酶
二抗 Abcam + 14X碱性磷酸酯酶

图25

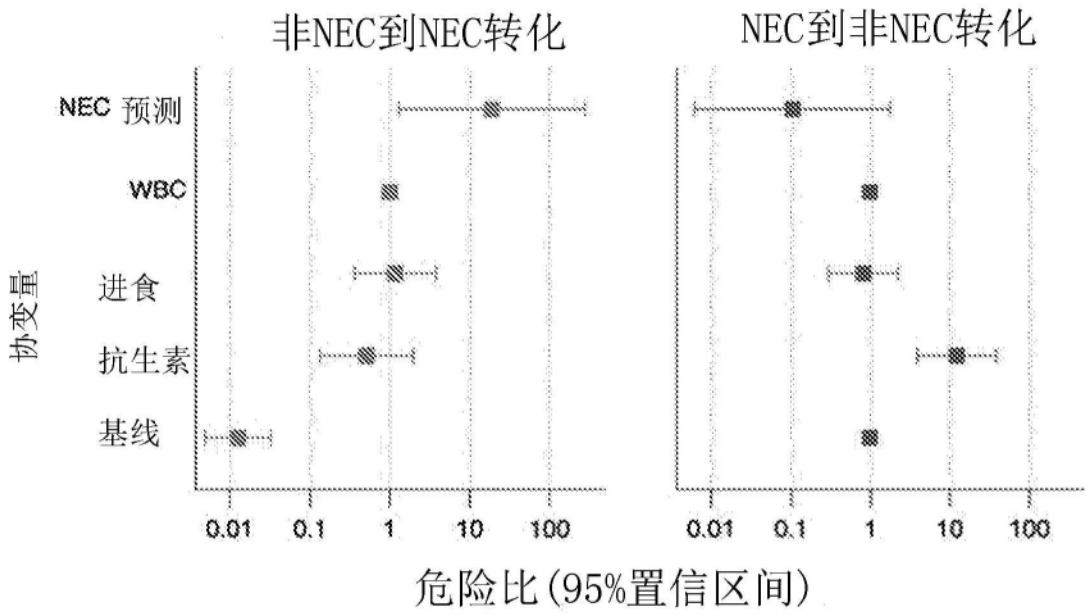

非NEC到NEC转化
NEC到非NEC转化
NEC 预测
WBC
进食
抗生素
基线
协变量
0.01
0.1
1
10
100
危险比(95%置信区间)

图26

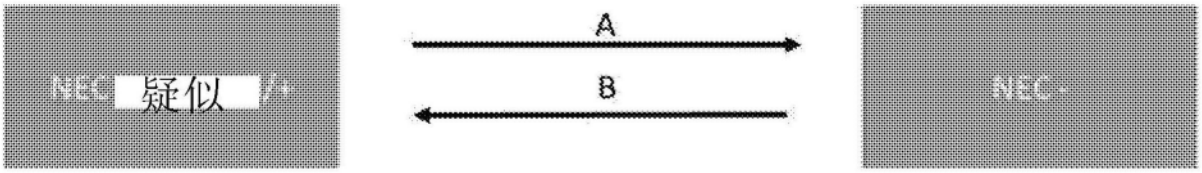

疑似
A
B

图27

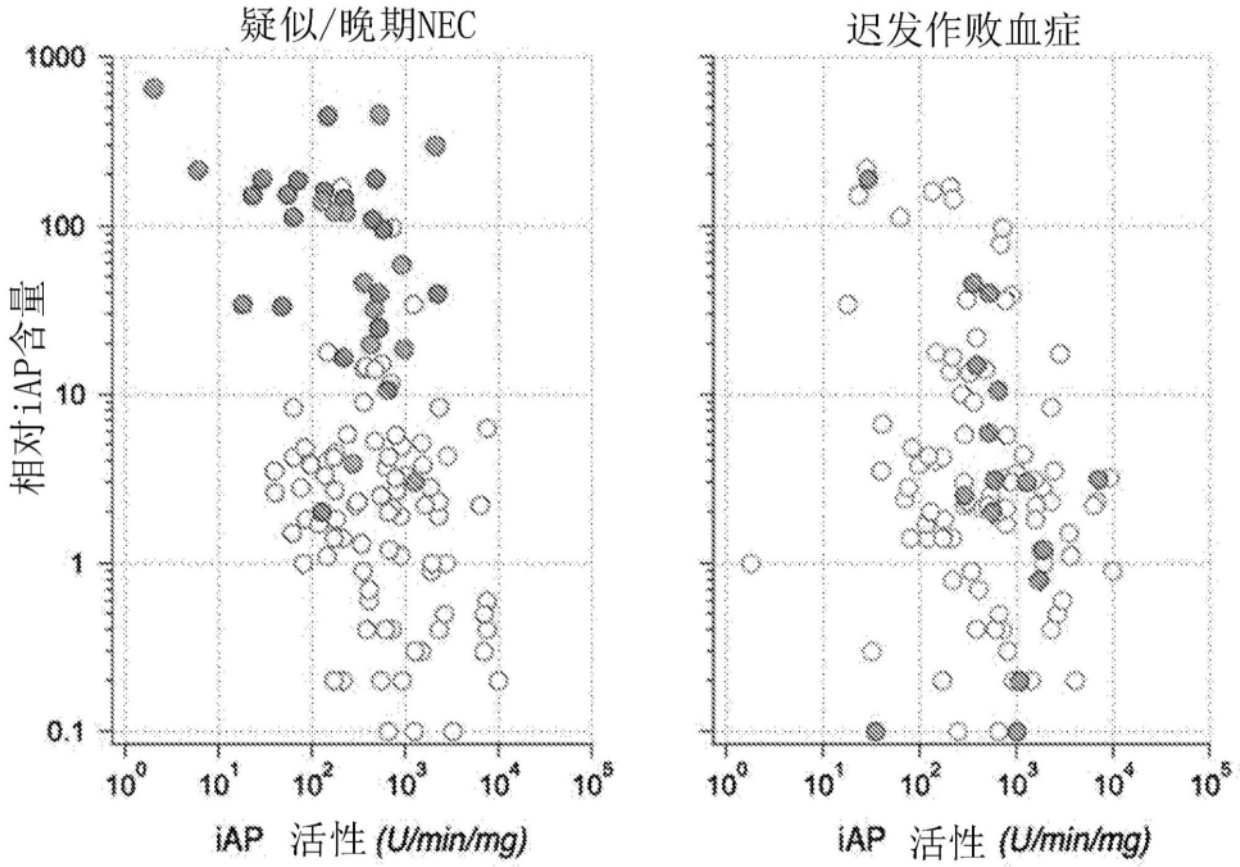

疑似/晚期NEC
迟发作败血症
相对iAP含量
1000
100
10
1
0.1
10^0 10^1 10^2 10^3 10^4 10^5
iAP 活性 (U/min/mg)

图28

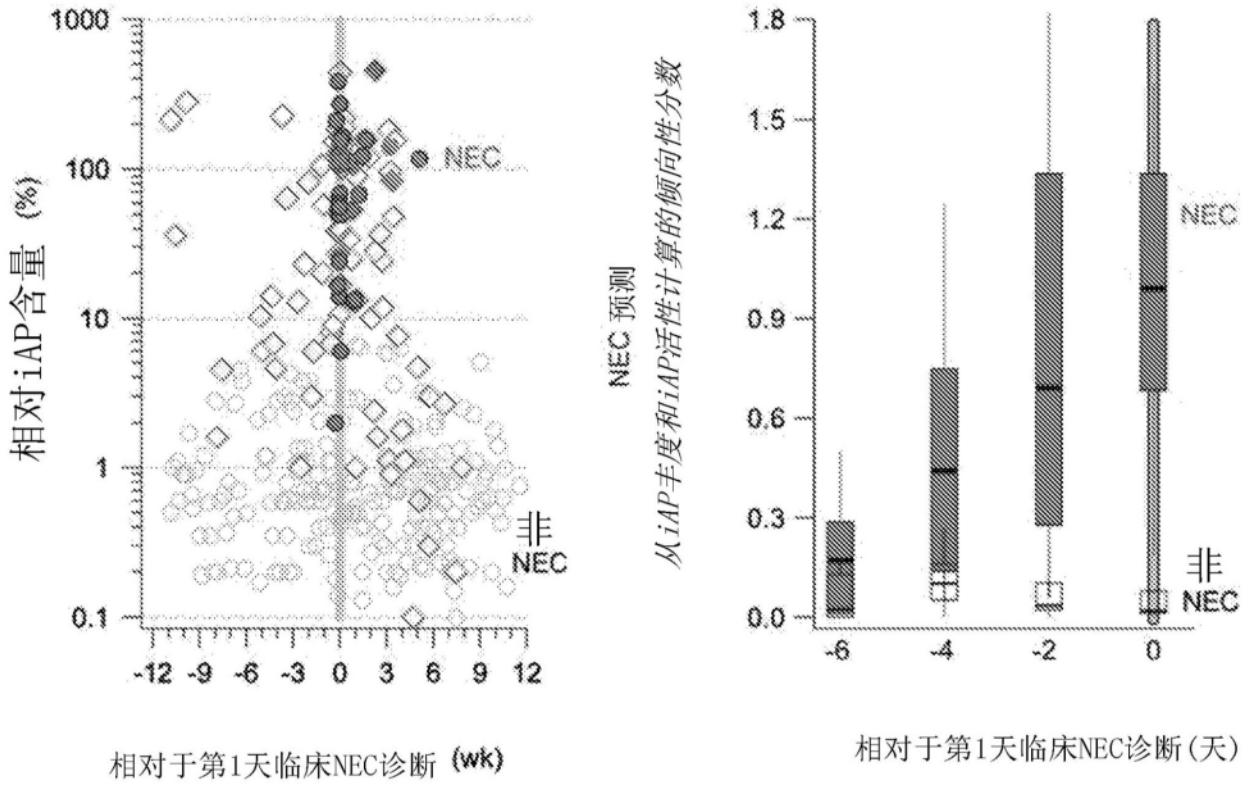

1000
100
10
1
0.1
相对iAP含量 (%)
NEC
非
NEC
-12 -9 -6 -3 0 3 6 9 12
相对于第1天临床NEC诊断 (wk)
NEC 预测
从iAP丰度和iAP活性计算的倾向性分数
1.8
1.5
1.2
0.9
0.6
0.3
0.0
NEC
非
NEC
-6 -4 -2 0
相对于第1天临床NEC诊断(天)

图29

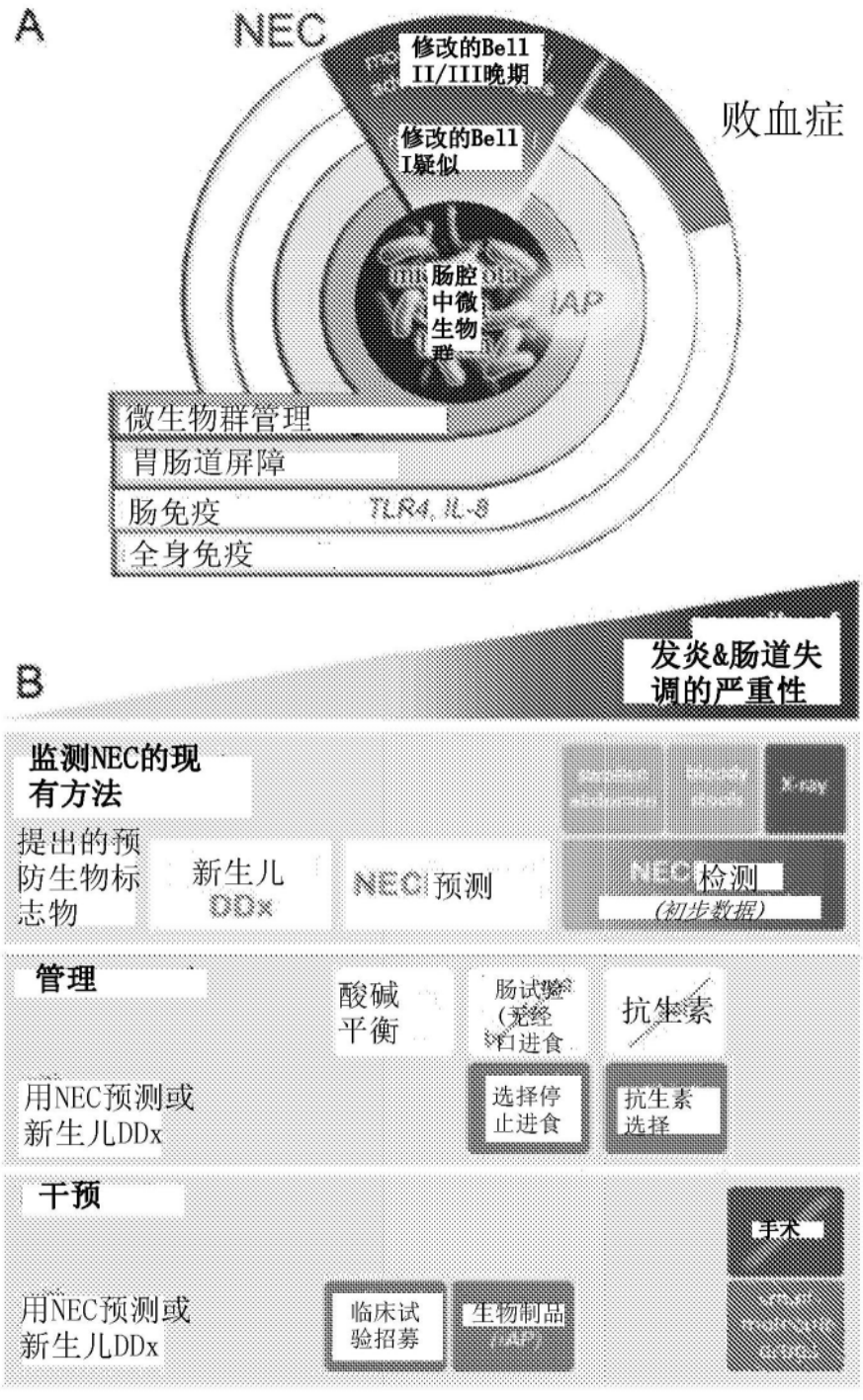

A
NEC
修改的Bell II/III晚期
修改的Bell I疑似
败血症
肠腔中微生物群
IAP
微生物群管理
胃肠道屏障
肠免疫
TLR4, IL-8
全身免疫
B
发炎&肠道失调的严重性
监测NEC的现有方法
提出的预防生物标志物
新生儿DDx
NEC预测
X-ray
NEC检测
(初步数据)
管理
酸碱平衡
肠试验(无经口进食
抗生素
用NEC预测或新生儿DDx
选择停止进食
抗生素选择
干预
手术
用NEC预测或新生儿DDx
临床试验招募
生物制品

图30

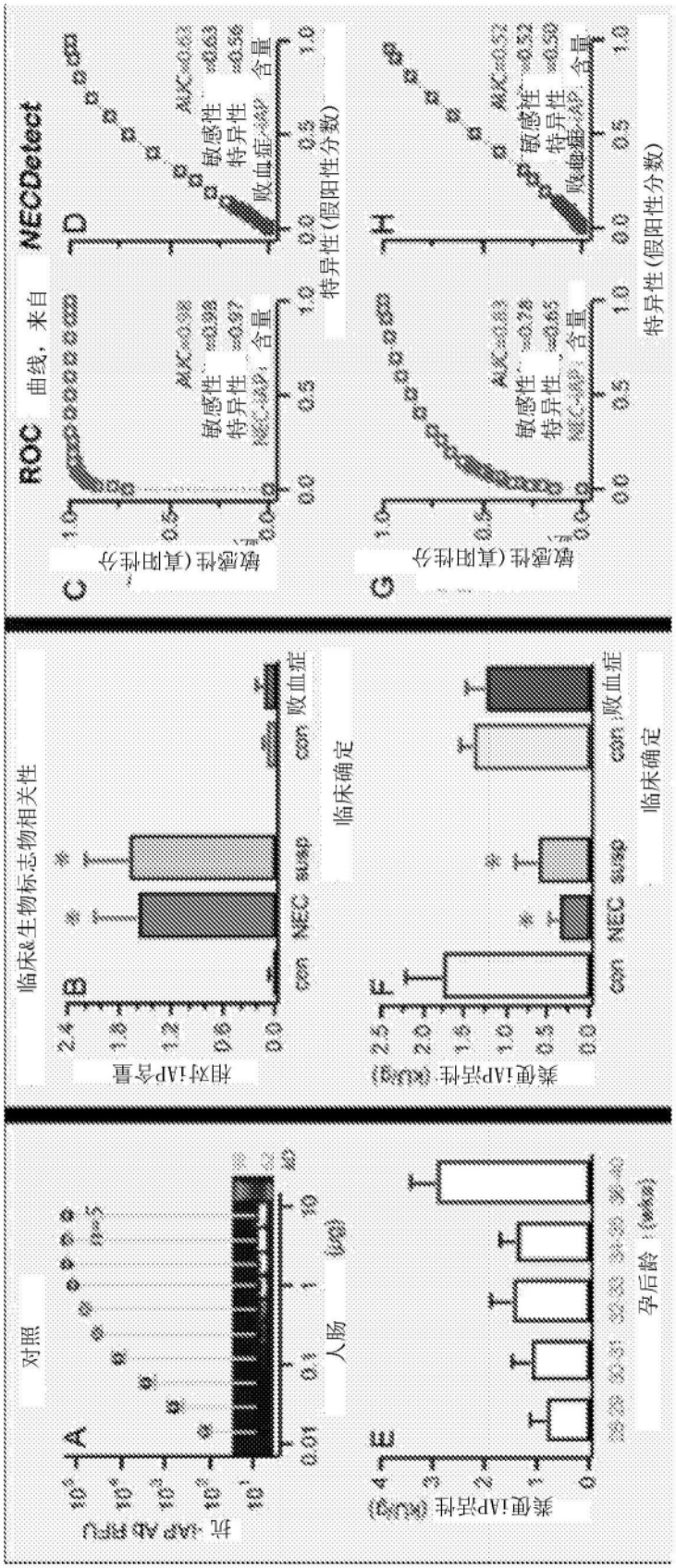

NECDetect
ROC 曲线，来自
临床&生物标志物相关性
对照
人肠
临床确定
孕后龄
特异性(假阳性分数)
敏感性(真阳性分
敏感性
特异性
含量
败血症
NEC
con

图31

为样品大小正当性考虑的模拟情形			
情形	$(\beta,\alpha_1,\alpha_2)$	$P[NEC=1\|iAP=159,\theta]$ (NEC概率作为NEC患者组的iAP含量的函数)	$P[NEC=1\|iAP=2,\theta]$ (NEC概率作为非NEC患者组的iAP含量的函数)
1	(-8.5, 5, 0)	0.370	0.002
2	(-8.5, 6, 0)	0.738	0.002
3	(-8.5, 5,1)	0.933	0.002
4	(-8.5,6,1)	0.739	0.0002

图32

不同效应大小的功效分析结果				
情形 $(\beta,\alpha_1,\alpha_2)$	$n=50$	$n=100$	$n=150$	$n=200$
1: (-8.5, 5, 0)	(.697, –, –)	(.865, –, –)	(.931, –, –)	(.969, –, –)
2: (-8.5, 6, 0)	(.741, –, –)	(.890, –, –)	(.964, –, –)	(.974, –, –)
3: (-8.5, 5,1)	(.714, .457, .448)	(.908, .822, .819)	(.972, .929, .927)	(.989, .987, .987)
4: (-8.5,6,1)	(.767, .437, .432)	(.925, .837, .833)	(.978, .958, .953)	(.987, .982, .982)

图33

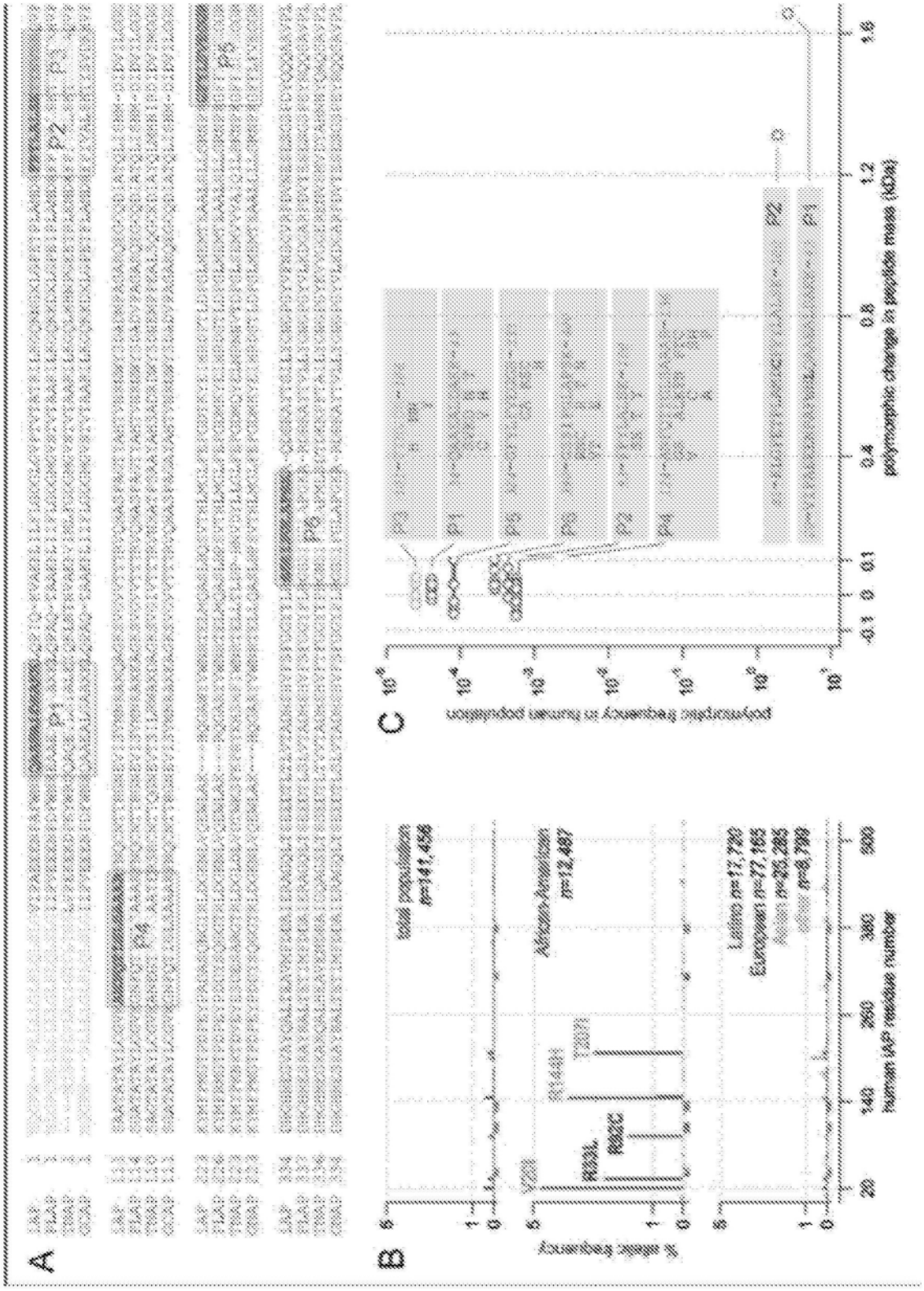

A
B
C
P1
P2
P3
P4
P5
P6
Total population
n=141,456
African American
n=12,487
Latino n=17,720
European n=77,165
Asian n=20,285
Other n=8,799
% allele frequency
human IAP residue number
polymorphic frequency in human population
polymorphic change in peptide mass (kDa)

图34

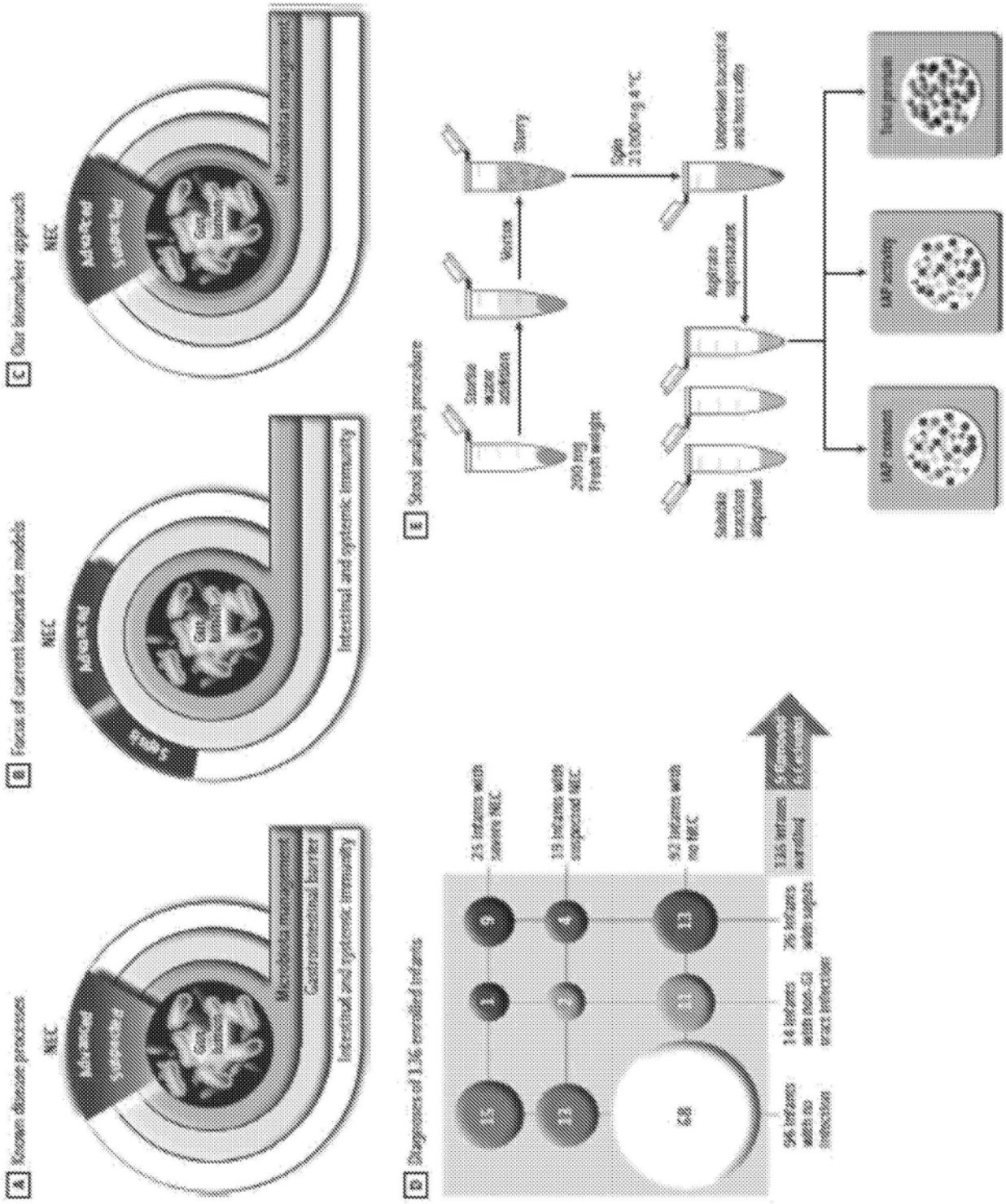


图35

特点	数量(%)			P 值 a
	严重 NEC (n = 25)	疑似 NEC (n = 19)	无 NEC (n = 82)	
出生体重，中位数(IQR)，g	855 (700-1380)	940 (790-1190)	1100 (845-1380)	.28
出生时孕龄，中位数(IQR)，wk	27.6 (24.7-31.1)	28.0 (26.0-29.4)	28.7 (26.4-31.6)	.48
性别				
男	13 (52)	12 (63)	42 (65)	.39
女	12 (48)	7 (37)	40 (54)	
种族/种族渊源				
非裔美国人	10 (40)	14 (74)	53 (65)	.08
白人	13 (52)	5 (26)	24 (29)	
西班牙裔美国人	2 (8)	0	2 (2)	
其他[a]	0	0	2 (2)	
Cesarean delivery	20 (80)	14 (74)	62 (76)	.51
Apgar scores，中位数(IQR)				
1 min	5 (3-7)	5 (1-8)	5.5 (3-8)	.75
5 min	7 (5-9)	8 (6-8)	8 (6-9)	.28
First NEC 发作，中位数(IQR)				
PCA，wk	33.9 (31.0-35.7)	29.4 (28.4-30.9)	NA	.02
生命天数，d	21 (10-52)	13 (7-27)	NA	.004
体重，g	1620 (1110-2056)	1015 (860-1377)	NA	<.001
Repeated NEC episodes	3 (12)	6 (32)	NA	.14
PCA at first stool analysis，中位数(IQR)，wk	28.9 (27.8-34.3)	28.1 (27.3-30.7)	31.4 (28.0-33.7)	.09
出院前死亡	3 (12)	1 (5)	5 (5.5)	.64
败血症 bacteremia				
诊断	9 (35)	4 (21)	13 (14)	.24
疑似	2 (8)	2 (10)	10 (11)	
抗生素治疗时长，中位数(IQR)，% of d in NICU	17 (9-25)	12 (7-20)	7 (1-8)	.006
Narcotic exposure	5 (20)	3 (16)	11 (12)	.53
Stool analyses，中位数(IQR)，No.				
严重 NEC	1 (0-4)	1 (0-3)	NA	.77
总计	5 (2-11)	5 (1-6)	0 (0-3)	<.001
NPO，中位数(IQR)，d	10 (8-24)	7 (4-13)	2 (1-4)	<.001
Exposure to human milk，%				
0	4 (16)	3 (16)	8 (9)	.31
>0 to <10	4 (16)	0	10 (12)	
10-50	4 (16)	2 (11)	19 (23)	
51-99	3 (12)	6 (32)	27 (33)	
100	10 (40)	8 (42)	27 (33)	

图36

特点	数量（%） 迟发作新生儿败血症（n = 26）	其他非GI道感染（n = 14）	无其他感染（n = 96）	P 值 a
出生体重，中位数(IQR)，g	790 (670-1010)	830 (780-915)	1165 (912.5-1410)	<.001
出生时孕龄，中位数(IQR)，wk	25.9 (25-29.7)	26.4 (25-27.1)	29.3 (26.9-32.2)	<.001
性别				
男	11 (42.3)	6 (42.9)	50 (52.1)	.63
女	15 (57.7)	8 (57.1)	46 (47.9)	
种族/种族渊源				
非裔美国人	15 (57.7)	12 (85.7)	61 (63.5)	.06
白人	8 (30.8)	1 (7.1)	33 (34.4)	
西班牙裔美国人	2 (7.7)	1 (7.1)	2 (2.1)	
其他[a]	1 (3.8)	0	1 (1.0)	
Cesarean delivery	19 (73.1)	10 (71.4)	68 (70.8)	>.99
Apgar score，中位数(IQR)				
1 min	5 (2-7)	3 (2-4)	6 (3-8)	.04
5 min	7 (5-8)	6 (5-7)	8 (7-9)	.002
感染发作（days in the NICU），中位数(IQR)				
PCA，wk	31.1 (28.6-34.0)	30.6 (28.7-32.3)	NA	.35
生命天数，d	22 (13-46)	29.5 (23-38)	NA	.43
体重，g	1140 (950-1700)	1130 (955-1360)	NA	.78
Repeated infection episodes	19 (73.1)	9 (64.2)	NA	.72
PCA at first used enteral motion (IQR)，wk	29.8 (27.6-31.9)	29.5 (27-31.6)	31 (28.7-33.9)	.06
出院前死亡	3 (11.5)	0	6 (6.3)	.53
NEC comorbidity				
严重 NEC	9 (34.6)	2 (14.3)	15 (15.6)	.24
疑似 NEC	4 (15.4)	3 (14.3)	13 (13.5)	
抗生素治疗时长，中位数(IQR)，% of d in NICU	23 (16.7-30)	17 (11-19)	6 (0-14)	<.001
Inotrope exposure	4 (15.4)	6 (42.9)	9 (9.4)	.007
Blood transfusions，中位数(IQR)，No.	5 (2-12)	6.5 (3-11)	0 (0-2.5)	<.001
NPO days，中位数 (IQR)，No.	8.5 (6-20)	8.5 (4-13)	2.5 (1-7)	<.001
Exposure to human milk，%				
0	1 (3.8)	2 (14.3)	12 (12.5)	.20
>0 to <10	3 (11.5)	3 (21.4)	8 (8.2)	
10-50	4 (15.4)	0	21 (21.9)	
51-99	9 (35.5)	6 (42.8)	22 (22.9)	
100	9 (35.5)	3 (21.4)	33 (34.4)	

图37

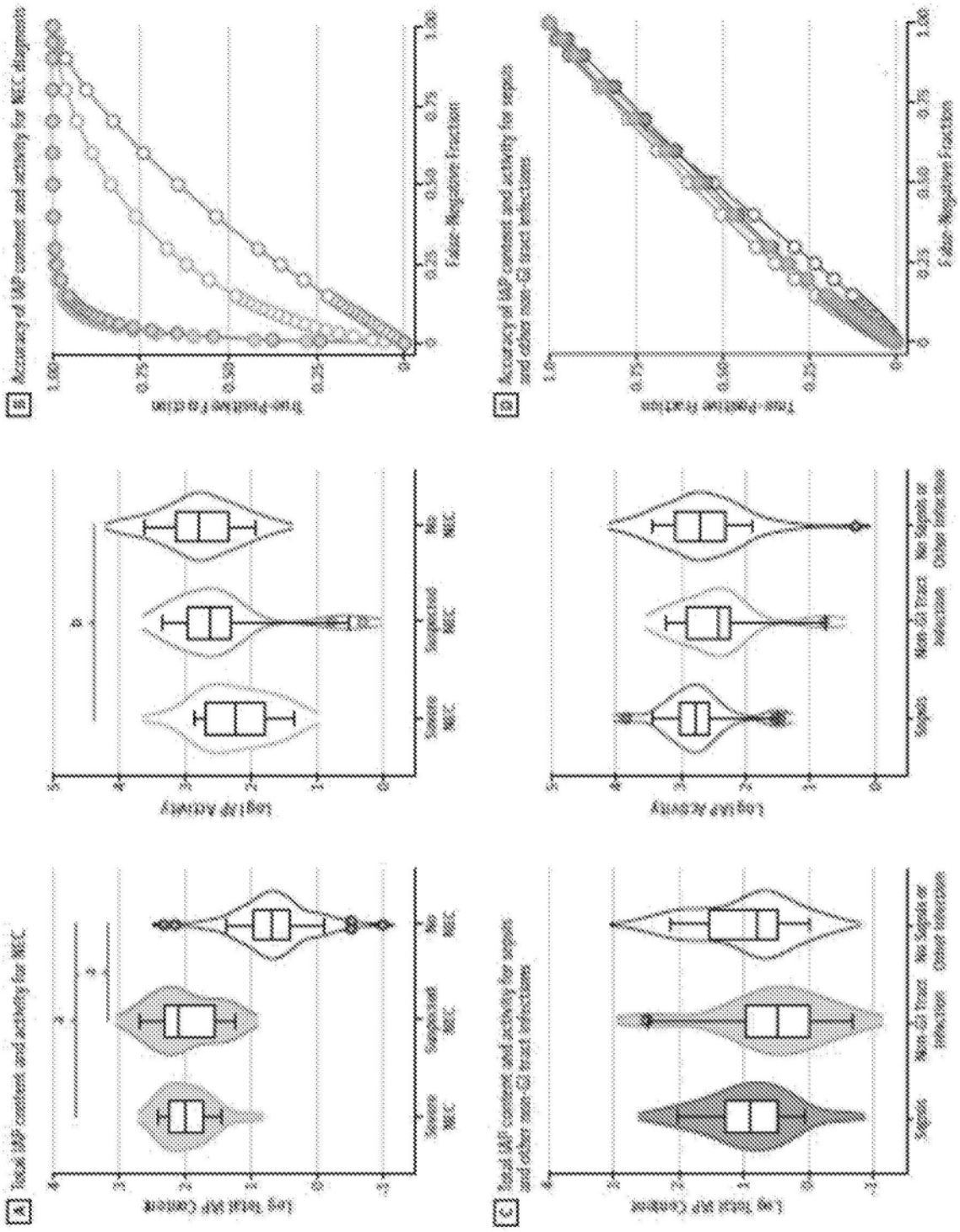


图38

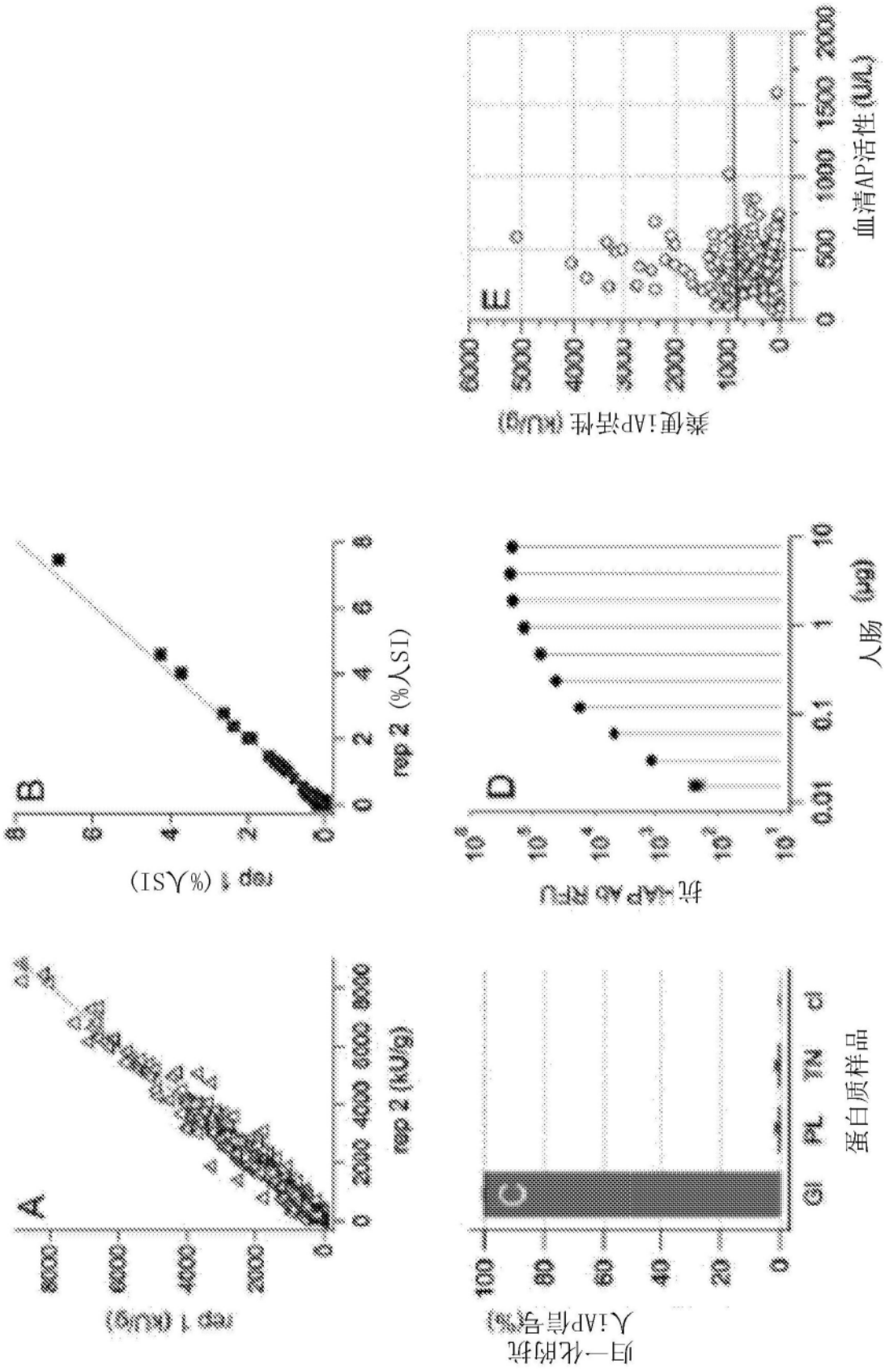

A
rep 1 (KU/g)
rep 2 (KU/g)
B
rep 1 (%人SI)
rep 2 (%人SI)
C
归一化的抗
人iAP信号(%)
GI
PL
TN
cl
蛋白质样品
D
抗-iAP Ab RFU
人肠 (μg)
E
粪便iAP活性 (KU/g)
血清AP活性 (U/L)

图39

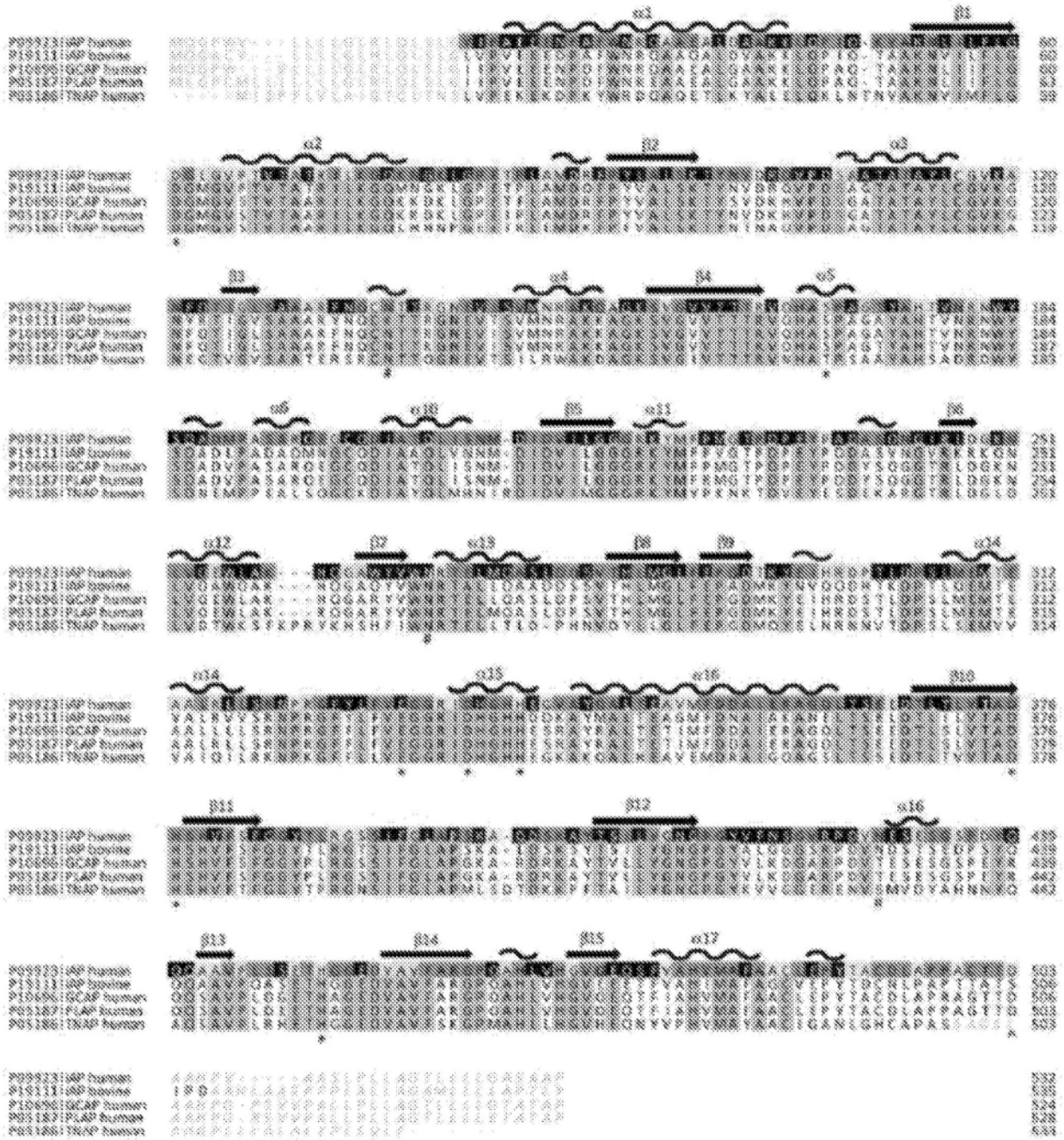


图40