



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102081101 B

(45) 授权公告日 2014. 08. 20

(21) 申请号 201010510497. 3

(22) 申请日 2010. 10. 13

(30) 优先权数据

09012947. 9 2009. 10. 13 EP

(73) 专利权人 B. R. A. H. M. S 有限公司

地址 德国亨尼希斯多夫

(72) 发明人 安德烈亚斯·贝格曼

奥利弗·哈特曼 弗劳克·海因
比特·穆勒

(74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限
责任公司 11219

代理人 张颖 樊卫民

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006. 01)

C12Q 1/04 (2006. 01)

(56) 对比文件

EP 2032992 B1, 2009. 08. 26, 权利要求
13-16, 说明书第 6 页第 45 行至第 8 页第 35 行, 表
1.

CN 101029897 A, 2007. 09. 05, 权利要求 4、
7.

WO 2009/066075 A2, 2009. 05. 28, 说明书第

4 页第 3-19 行, 实施例 1.

WO 2009/000784 A1, 2008. 12. 31, 权利要求
17.

US 2005/0170443 A1, 2005. 08. 04,

US 5993811 A, 1999. 11. 30, 全文.

T. Molnar, et al. Deficient leucocyte
antisedimentation is related to post-stroke
infections and outcome. 《J. Clin.
Pathol. 》. 2008, 第 61 卷

陈跃瑜等. 降钙素原的克隆、表达及多抗制
备. 《热带医学杂志》. 2007, 第 07 卷 (第 03 期),

Nils G. Morgenthaler, et al. Sensitive
immunoluminometric assay for the
detection of procalcitonin. 《Clinical
Chemistry 》. 2002, 第 48 卷 (第 5 期),

审查员 许珊萍

权利要求书1页 说明书11页

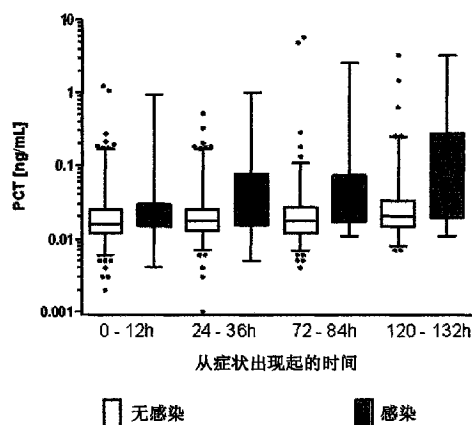
序列表2页 附图1页

(54) 发明名称

用于在急性中风或暂时性缺血性发作的患者
中诊断细菌感染和指导抗生素治疗的降钙素原

(57) 摘要

本发明涉及用于在急性中风或暂时性缺血性
发作的患者中诊断细菌感染和指导抗生素治疗的
降钙素原, 以及在患有急性缺血性或出血性中风
的患者中进行细菌感染的诊断和治疗指导的体外
方法, 所述方法包括在来自所述患者的体液样品
中测定降钙素原 (PCT) 或其具有至少 12 个氨基酸
残基的片段的水平, 以及将测定到的水平与所述
患者中细菌感染的诊断相关联。



1. 针对降钙素原的抗体在制备用于在患有急性中风或暂时性缺血性发作的患者中诊断细菌感染的试剂盒中的应用, 诊断细菌感染的方法包括下列步骤:

(i) 提供来自患有急性中风或暂时性缺血性发作的患者的样品, 其中在急性中风或暂时性缺血性发作症状出现后早于 72 小时从所述患者获取样品;

(ii) 使用功能性分析灵敏度在 0.06ng/mL 以下的降钙素原检测分析, 在所述样品中测定降钙素原的水平; 以及

(iii) 通过将测定到的降钙素原水平与预定的阈值水平相比较, 确定所述患者是否有细菌感染, 其中当所述测定到的降钙素原水平高于预定的阈值水平时, 所述患者有细菌感染, 其中降钙素原是指跨越降钙素原的 1-116 位、2-116 位或 3-116 位氨基酸残基的肽, 并且降钙素原 1-116 的氨基酸序列由 SEQ ID NO:1 示出。

2. 权利要求 1 的应用, 其中在急性中风或暂时性缺血性发作症状出现后早于 48 小时, 从所述患者获取样品。

3. 权利要求 1 的应用, 其中在急性中风或暂时性缺血性发作症状出现后最多 24 小时, 从所述患者获取样品。

4. 权利要求 1 的应用, 其中在急性中风或暂时性缺血性发作症状出现后最多 12 小时, 从所述患者获取样品。

5. 权利要求 1 到 4 任一项的应用, 其中所述样品是体液。

6. 权利要求 1 到 4 任一项的应用, 其中所述样品是血液、血清、血浆、脑脊液、尿液、唾液或胸膜腔积液。

7. 权利要求 1 到 4 任一项的应用, 其中急性中风是缺血性或出血性中风。

8. 权利要求 1 到 4 任一项的应用, 其中预定的阈值水平在 0.02ng/mL 到 0.5ng/mL 之间。

9. 权利要求 1 到 4 任一项的应用, 其中预定的阈值水平在 0.02ng/mL 到 0.25ng/mL 之间。

10. 权利要求 1 到 4 任一项的应用, 其中预定的阈值水平在 0.02ng/mL 到 0.1ng/mL 之间。

11. 权利要求 1 到 4 任一项的应用, 其中预定的阈值水平在 0.02ng/mL 到 0.06ng/mL 之间。

12. 权利要求 1 到 4 任一项的应用, 其中预定的阈值水平在 0.02ng/mL 到 0.05ng/mL 之间。

13. 权利要求 1 到 4 任一项的应用, 其中所述细菌感染能用抗生素治疗。

14. 权利要求 1 到 4 任一项的应用, 其中所述细菌感染是肺炎。

15. 权利要求 1 到 4 任一项的应用, 其中所述细菌感染没有细菌感染的临床症状。

16. 权利要求 1 到 4 任一项的应用, 诊断细菌感染的方法还包括下列步骤:

测定 C-反应性蛋白、新蝶呤、白细胞计数、体温、中性粒细胞、红细胞沉降速率中的至少一种的水平。

用于在急性中风或暂时性缺血性发作的患者中诊断细菌感染和指导抗生素治疗的降钙素原

发明领域

[0001] 本发明属于临床诊断学领域。具体来说,本发明涉及在急性中风或暂时性缺血性发作后测定源自对象体液的样品中降钙素原(PCT)的水平。

[0002] 发明背景

[0003] 中风被定义为由脑血管疾病引起的急性局灶性神经功能缺损。中风的两种主要类型是缺血性和出血性中风,分别占约85%和15%(Hickey 2003. 神经和神经外科护理的临床实践(第5版)(The clinical practice of neurological and neurosurgical nursing(5th ed.)), Philadelphia:Lippincott, Williams & Wilkins)。当发生缺血性中风时,向脑的血液供应中断,脑细胞缺乏葡萄糖和氧气。约45%的缺血性中风由小或大动脉血栓引起,20%是栓塞源性的,其他的原因未知(Hickey 2003. 神经和神经外科护理的临床实践(第5版)(The clinical practice of neurological and neurosurgical nursing(5th ed.)), Philadelphia:Lippincott, Williams & Wilkins)。

[0004] 暂时性缺血性发作(TIA)(也称为“小中风”)在基于组织特征的基础上被定义为由局灶性脑、脊髓或视网膜缺血引起的神经功能障碍的短暂发作,没有急性梗塞(Easton等,2009. Stroke 40:2276-93)。TIA的另一个特征是神经症状的突然发生,所述神经症状在24小时内完全消失。据报道TIA可能在0.5%到8%的老年人群中发生(Bots等,1997. Stroke 28(4):768-73)。患有TIA的患者处于随后发生不良事件的高风险中。中风的90天风险据报道高于10%,最高风险发生在前两天内(Johnston等,2003. Neurology 60:1429-34)。

[0005] 中风是最重要的血管疾病之一。中风仍然是世界范围内死亡的第二大主因,在欧洲是成年人失能和过早丧失劳动能力的主要原因之一(Murray和Lopez,1997. Lancet 349:1269-76;Murray和Lopez 1997. Lancet 349:1498-504)。在美国,每年有超过700000人患有中风,其中550,000人是第一次中风(Thom等,2006. Circulation 113:85-151)。因此,它是一个重要的公共卫生问题,并且对于健康护理提供者和整个社区来说是一个负担,因为在卫生护理的计划和提供中不得不投入大量的努力。

[0006] 在我们的社会中,中风的发病率随着年龄增加而显著增加(Modan和Wagener,1992. Stroke 23:1230-36)。大多数缺血性中风发生在71到80岁之间,而大多数出血性中风出现在60到70岁之间(Colombo等,1989. Rivista de Neurologia 59:1-7)。

[0007] 在确定时间间隔后中风患者的结果预后可以是功能性的,或与个体存活率相关。对于功能性结果预后来说,使用计分系统例如“修改的评级量表(modified Ranking Scale)”(mRS;Bonita和Beaglehole,1988. Stroke 19:1497-1500)或“国立卫生研究院中风量表(National Institutes of Health Stroke Scale)”(NIHSS;Adams等,1999. Neurology 53:126-31)来确定预定时间后患者的死亡率。NIHSS目前被认为是“黄金标准”。功能性结果也可以根据对护理的需要或根据日常生活活动(ADL)、例如根据Barthel指数和评级量表(Collin等,1988. International Disability Study 10:61-3;Bonita和

Beaglehole,1988. Stroke19 :1497-1500) 来表达。

[0008] 中风的预后主要取决于并发症的发生 (Davenport 等,1996. Stroke27 :415-20 ; Johnston 等,1998. Stroke 29 :447-53)。感染、特别是肺炎,是第三常见的中风并发症 (Langhorne 等 2000, Stroke 31 :1223-9 ;Katzan 等,2003. Neurology 60 :620-5),并被认为是在中风患者中不良结果和死亡的最常见原因 (Henon 等,1995. Stroke 26 :392-8 ;Hilker 等,2003. Stroke 34 :975-81 ;Heuschmann 等,2004. Arch Intern Med 164 :1761-8)。与医院或健康护理相关的感染发生在所有患者的平均 7-10% 中 (Bucher 等,2000. Tidsskr Nor Laegeforen 120 :472-5) 和约 3% 的手术后患者中 (Smyth 和 Emmerson 2000. J Hosp Infect 45 :173-84) 相比,在急性中风患者中感染的频率非常高 :21-65% 患有急性中风的患者发生感染,10-22% 发生肺炎 (Castillo 等,1998. Stroke 29 :2455-60 ;Davenport 等,1996. Stroke 27 :415-20 ;Georgilis 等,1999. J Int Med 246 :203-9 ;Grau 等,1999. J Neurol Sci 171 :115-20 ;Johnston 等,1998. Stroke29 :447-53 ;Langhorne 等,2000. Stroke 31 :1223-9)。已显示,在中风后第一和第二天中风的急性状态中,感染的风险最高 (Grau 等,1999. J Neurol Sci 171 :115-20 ;Kong 等,1998. Arch Phys Med Rehabil 79 :1535-9)。中风患者中感染的高发病率可能是免疫功能受损的结果 (Livingston 等,1988. Arch Surg 123 :1309-12 ;Woiciechowsky 等,1998. Nat Med 4 :808-13 ;Dirnagl 等,2007. Stroke 38 :770-3)。在诱导缺血后几小时内可以检测到中风后的免疫抑制,并可以持续几周 (Dirnagl 等,2007. Stroke 38 :770-3)。有几种风险因子造成中风患者对感染增加的易感性 :由于瞌睡而引起的吸气,延髓反射受损,吞咽困难和卧床患者中的血液坠积,以及对侵入性医疗程序的需要 (Perry 和 Love2001. Dysphagia 16 :7-18)。

[0009] 中风、例如急性缺血性和出血性中风后的感染也能感染患有 TIA 的患者,并最可能与不良的短期结果相关 (Kwan 和 Hand 2007. ActaNeurol Scand 115 :331-8)。

[0010] 众所周知,中风产生炎性反应,并伴有外周血中白细胞 (WBC) 计数 (Kazmierski 等,2001. Wiad Lek 54 :143-51) 以及体中心温度 (Boysen 和 Christensen 2001. Stroke 32 :413-7)、脑部温度 (Schwab 等,1997. Neurology 48 :762-7) 和 C 反应性蛋白 (CRP) 的增加 (Idicula 等,2009. BMC Neurology 9 :18)。但是,中风后的系统性炎性反应更可能来自于对坏死组织本身的反应而不是来自感染。坏死组织被细胞、体液和代谢机制消除,它们都是炎性反应的一部分 (Kogure 等,1996. Acta Neurochir Suppl (Wien) 66 :40-3)。体温增加在事件的 24 小时内开始,但是由感染引起的发烧似乎出现更晚 (Boysen 和 Christensen 2001. Stroke 32 :413-7 ;Davalos 等,1997. Cerebrovasc Dis 7 :64-9 ;Castillo 等,1999. Cerebrovasc Dis 9 :22-7 ;Castillo 等,1998. Stroke 29 :2455-60)。在具有感染迹象的缺血性中风患者中,体温和 WBC 以及 CRP 的升高与病灶的体积和最初中风的严重性显著相关 (Audebert 等,2004. Stroke35 :2128-2133)。此外,已经显示,成功的血栓溶解疗法减弱了系统性炎性反应。因此,诱导的脑组织援救可能是通过避免脑坏死而降低了系统性炎症的结果。

[0011] 降钙素原 (PCT) 已成为用于诊断脓毒症的已确立的生物标志物。PCT 反映了细菌感染的严重性,并具体用于监控向脓毒症、严重脓毒症或脓毒性休克的进展。有可能使用 PCT 测量系统性炎性反应的活性、控制疗法的成功和估计预后 (Assicot 等,1993. Lancet 341 :515-8 ;Clec' hC 等,2004. Crit Care Med 32 :1166-9 ;Lee 等,2004. Yonsei Med J45 :

29-37;Meisner等,2005.Curr Opin Crit Care 11:473-480;Wunder等,2004.Inflamm Res 53:158-163)。患有脓毒症的患者中 PCT 水平的增加与死亡率相关 (Oberhoffer 等,1999.Clin Chem Lab Med37:363-368)。

[0012] PCT 已被用于抗生素的治疗指导,但在急性中风之后。在急诊室就诊的具有下呼吸道感染症状的患者中测量 PCT,只有 PCT 浓度 $> 0.25\text{ng/mL}$ 或 $> 0.5\text{ng/mL}$ 的患者用抗生素进行治疗 (Christ-Crain 等,2004.Lancet 363:600-7)。在患有社区获得性肺炎 (CAP) 的患者中,根据血清 PCT 浓度进行抗生素治疗 (PCT 浓度 $< 0.1\text{ng/mL}$ 时强烈不鼓励;PCT 浓度 $< 0.25\text{ng/mL}$ 时不鼓励;PCT 浓度 $> 0.25\text{ng/mL}$ 时鼓励,PCT 浓度大于 $> 0.5\text{ng/mL}$ 时强烈鼓励) (Christ-Crain 等,2006.Am JResp Crit Care Med 174:84-93)。PCT 指导显著减少了 CAP 中抗生素的使用,没有使患者的结果变坏。类似地,使用与上述相同的决定阈值的 PCT 指导的疗法,对于基础护理中的急性呼吸道感染来说也显著减少了抗生素的使用,对患者的结果没有损害 (Briel 等,2008.Arch InternMed 168:2000-7)。

[0013] 目前关于急性中风的指导方针建议避免预防性施用抗生素 (Hacke 等,2003.Cerebrovasc Dis 16:311-37)。此外,抗生素预防的随机临床试验最近为这种推荐意见提供了基于证据的支持,因为显示在患有急性中风的患者中静脉内施用左氧氟沙星与安慰剂相比,没有更好地预防感染 (Chamorro 等,2005.Stroke 36:1495-500)。相比之下,在患有急性重症中风 ($\text{mRS} > 3$) 的患者中,施用美洛西林加舒巴坦降低了感染率,并可能伴有更好的临床结果 (Schwarz 等,2008.Stroke39:1220-7)。但是,对于对抗生素的可能抗性的发生以及抗生素诱导的副作用来说,对患有急性中风的患者的预防性治疗被认为是不合适的,目前关于急性中风的指导方针建议避免预防性施用抗生素 (Hacke 等,2003.Cerebrovasc Dis 16:311-37;Ringleb 等,2008.Cerebrovasc Dis 25:457-507)。

[0014] 在一方面中风患者中免疫功能受损,另一方面中风后系统性炎症反应的背景下,在患有中风后感染的患者中 PCT 浓度是否变化完全不清楚。

[0015] 对患有急性中风的患者中血清 PCT 水平的研究,在入院当天和第 7 天之间没有显示出明显区别 (Miyakis 等,2004.Clin Chim Acta 350:437-9)。在该项研究中没有发现 PCT 水平与死亡率或神经功能结果之间的关联性。Molnar 及同事测量了患有急性缺血性中风和 TIA 的患者血清中的 PCT (Molnar 等,2008.J Clin Pathol 61:1209-13)。尽管连续测量了 PCT,作者在中风后不同时间点处没有发现测量到的 PCT 水平的任何差别,除了在标为随后的中风后感染的 72 小时处 PCT 略微增加之外。两项研究的结果可以归因于使用的相应的 PCT 测试系统,即在 Miyakis 等中具有 0.08ng/mL 的功能性分析灵敏度 (FAS) 的 PCTLIA,以及在 Molnar 等中具有 0.06ng/mL 的 FAS 的 PCT Kryptor。

[0016] Vogelgesang 等测量了患有中风的患者在入院后第 7 和 14 天时血清中的 PCT 值,使用 $> 0.5\text{ng/mL}$ 的 PCT 截止值作为感染的三个判断标准之一 (Vogelgesang 等,2008.Stroke 39:237-41)。

[0017] 在 EP 0 80 702B1 中描述了通过测定 PCT 的浓度来确定炎症过程的病因学并从肽的存在与否来确定炎症是感染性的还是非感染性的诊断方法。

[0018] 在 EP 08167512.6 和 EP 08168671.9 中描述了通过测定 PCT 水平,对已患有中风或暂时性缺血性发作的患者进行结果预后或风险评估的方法。

[0019] 在 EP 07015271.5 中描述了通过测定 PCT 水平并将 PCT 水平与患者患有其他还没

有明显表象和 / 或还没有出现症状的疾病或医学病症相关联,对患有原发非感染性疾病的患者预后的方法。

[0020] 对于中风后感染的高发病率及其与患有中风后 /TIA 后感染的中风或 TIA 患者较差结果的关联性,应该密切监控这些患者的感染情况。

[0021] 因此,本发明的发明人调查了来自患有急性缺血性或出血性中风或暂时性缺血性发作的患者的体液样品中降钙素原水平的测量值是否能够用于在这些患者中中风后 /TIA 后细菌感染进行诊断和治疗指导。

发明内容

[0022] 本发明涉及用于在患有急性中风或暂时性缺血性发作的患者中诊断或鉴定细菌感染的方法。所述方法包括下列步骤:

[0023] (i) 提供来自患有急性中风或暂时性缺血性发作的患者的样品;

[0024] (ii) 使用功能性分析灵敏度在 0.06ng/mL 以下、更优选 0.04ng/mL 或以下、更优选 0.03ng/mL 或以下、最优选 0.01ng/mL 或以下的 PCT 检测分析,在所述样品中测定降钙素原 (PCT) 或其长度为至少 12 个氨基酸、优选长度 50 以上个氨基酸、更优选长度 110 以上个氨基酸的片段的水平;以及

[0025] (iii) 通过将所述测定到的 PCT 水平与预定的阈值水平相比较,确定所述患者是否有细菌感染。

[0026] 本发明还涉及使用这种方法为患有急性中风或暂时性缺血性发作的患者提供施用抗生素的治疗指导以及监控抗生素治疗。

[0027] 由于 PCT 水平检测的高灵敏度,本发明允许在患有急性中风或暂时性缺血性发作的患者中更早检测到细菌感染并随后对所述细菌感染进行更早治疗,从而允许改善患者的结果。因此,方法特别适用于来自在医疗机构例如医院中处于重症监护的患者的样品。人们应该想到,由于细菌感染的早期鉴定和早期抗生素治疗使有利结果即使只获得 5% 的绝对提高也是值得的,因为即使是少量结果改善也具有重要的公共卫生意义 (Lees 等,2003. Lancet Neurology 2:54-61)。因此,对需要的患者进行早期治疗是极为重要的。

[0028] 发明详述

[0029] 本发明涉及一种方法、特别是一种体外方法,用于在患有急性中风或暂时性缺血性发作 (TIA) 的患者中诊断或鉴定细菌感染。所述方法包括下列步骤:

[0030] (i) 提供来自患有急性中风或暂时性缺血性发作的患者的样品;

[0031] (ii) 使用功能性分析灵敏度在 0.06ng/mL 以下、更优选 0.04ng/mL 或以下、更优选 0.03ng/mL 或以下、最优选 0.01ng/mL 或以下的 PCT 检测分析,在所述样品中测定降钙素原 (PCT) 或其长度为至少 12 个氨基酸、优选长度 50 以上个氨基酸、更优选长度 110 以上个氨基酸的片段的水平;以及

[0032] (iii) 通过将所述测定到的 PCT 水平与预定的阈值水平相比较,确定所述患者是否有细菌感染。

[0033] PCT 检测分析的功能性分析灵敏度优选在 0.06ng/mL 以下、更优选 0.04ng/mL 或以下、更优选 0.03ng/mL 或以下、最优选 0.01ng/mL 或以下。功能性分析灵敏度 (FAS) 被定义为分析在使用 20% 的测定间变异系数 (CV) 时所能测量到的最低浓度 (Spencer CA. 1989. J

ClinImmunoassay 12:82-9)。这种低的功能性分析灵敏度允许将急性中风或 TIA 后的 PCT 水平与患中风或 TIA 后几天患者发生细菌感染的可能性相关联。

[0034] 大多数中风后感染是在中风后获得的,并在中风后 7 天内出现。因此,本发明在中风后获得的细菌感染的诊断或鉴定中特别有用。这意味着方法对于在中风前没有感染的中风后患者特别有用。中风后获得性感染可能作为中风治疗、使用侵入性医疗程序(例如由于瞌睡而进行的吸气、延髓反射受损和吞咽困难、在不能移动的患者中的导管插入术)的结果而发生(Perry 和 Love 2001. Dysphagia 16:7-18)。10-22%的中风在前 7 天内伴有肺炎发生。Indredavik 等 2008 显示,中风后患者的感染率可能进一步增加,直到中风后 12 周(Indredavik 等,2008. Stroke 39:414-20)。使用功能性分析灵敏度在 0.06ng/mL 以下的超灵敏性 PCT 分析,能够在非常早的时间点鉴定感染,因此能够进行早期抗生素治疗。因此,考虑早期使用超灵敏性 PCT 分析诊断和监控中风后患者,可以改进结果和功能性结果。

[0035] 因此,推荐将监控进行长达 7 天、优选长达 12 周、更优选长达 6 个月、最优选长达 1 年。

[0036] 在本发明的一个实施方案中,细菌感染在患有急性中风或暂时性缺血性发作(TIA)的患者中是无症状的(例如还没有显示出临床症状的细菌感染)。

[0037] 在本发明的上下文中,术语“水平”涉及从对象获取的样品中 PCT(或片段/前体)的浓度(优选表示成重量/体积;w/v)。

[0038] 本文中使用的术语“患者”是指由于疾病而接受医疗护理或应该接受医疗护理的活人类或非人类生物体。这包括患有正对其病征进行研究的未确诊疾病的人。因此,本文描述的方法和分析适用于人类和兽医疾病。

[0039] 优选情况下,样品在急性中风或 TIA 症状出现后早于 72 小时从患者获取。此外,优选情况下,样品在急性中风或 TIA 症状出现后不晚于 60 小时、48 小时、24 小时、18 小时、12 小时或 6 小时,最优选不晚于 3 小时从患者获取。按照本发明的方法,可以诊断中风后感染包括与医院或健康护理相关的感染。

[0040] 本文中使用的术语“中风后感染”是指在急性中风或 TIA 症状出现后发生的细菌感染。如果感染作为在医院或健康护理机构治疗的结果首次出现在入院后 48 小时以后或出院后 30 天内,该感染被认为是与医院或健康护理相关的。术语“与健康护理相关的感染”(HAI)被定义在 Horan 等的文献中(Horan 等,2008. Am J Infect Control 36:309-32)。

[0041] 因此,本发明的主题是用于在患有急性中风或暂时性缺血性发作的患者中诊断细菌感染的方法,所述方法包括下列步骤:

[0042] (i) 提供来自患有急性中风或暂时性缺血性发作的患者的样品,其中在急性中风或暂时性缺血性发作症状出现后早于 72 小时从所述患者获取样品;

[0043] (ii) 使用功能性分析灵敏度在 0.06ng/mL 以下的 PCT 检测分析,在所述样品中测定降钙素原(PCT)或其长度为至少 12 个氨基酸的片段的水平;以及

[0044] (iii) 通过将所述测定到的 PCT 水平与预定的阈值水平相比较,确定所述患者是否有细菌感染。

[0045] 本文中使用的术语“样品”是指出于对目标对象例如患者进行诊断、预后或评估的目的而获取的体液样品。优选的测试样品包括血液、血清、血浆、脑脊液、尿液、唾液、痰液和胸膜腔积液。此外,本领域技术人员将会认识到,某些测试样品在分级或纯化步骤后,例如

将全血分离成血清或血浆组分后,将会更容易分析。

[0046] 因此,在本发明的优选实施方案中,样品选自血液样品、血清样品、血浆样品、脑脊液样品、唾液样品和尿液样品,或任何上面提到的样品的提取物。优选情况下,样品是血液样品,最优选是血清样品或血浆样品。

[0047] 本文中使用的术语急性中风是指缺血性和出血性中风两者。

[0048] 当在本文中在蛋白或肽的语境中提到时,术语“片段”是指可以来自较大的蛋白或肽的较小的蛋白或肽,因此其包含较大蛋白或肽的部分序列。所述片段可以通过较大蛋白或肽的一个或多个肽键的皂化作用衍生自较大的蛋白或肽。

[0049] 在本发明的文本中,降钙素原优选涉及跨越 1-116 位、2-116 位或 3-116 位氨基酸残基的肽或其片段。因此,降钙素原片段的长度为至少 12 个氨基酸,优选 50 个氨基酸以上,更优选 110 个氨基酸以上。PCT 可以包括翻译后修饰例如糖基化、脂基化 (liposidation) 或衍生化。PCT 本身是降钙素和下钙素 (katalcalcin) 的前体。SEQ ID NO:1 中给出了 PCT 1-116 的氨基酸序列。

[0050] 按照本发明的方法,当所述测定到的 PCT 水平高于预定阈值时,患者被诊断为患有潜伏的细菌感染。优选情况下,预定阈值水平在 0.02ng/mL 到 0.5ng/mL 之间,更优选在 0.02ng/mL 到 0.25ng/mL 之间,更优选在 0.02ng/mL 到 0.1ng/mL 之间,更优选在 0.02ng/mL 到 0.06ng/mL 之间,最优选在 0.02ng/mL 到 (低于)0.05ng/mL 之间。

[0051] 本文中 PCT 或其片段或其前体或其片段的水平的测定,使用检测方法和 / 或诊断分析来进行。

[0052] 本文中提到的“分析”或“诊断分析”可以为在诊断学领域中使用的任何类型的分析。这样的分析可以基于待检测被分析物与具有一定亲和性的一种或多种捕获探针的结合。对于捕获分子与靶分子或目标分子之间的相互作用来说,亲和常数优选大于 10^8M^{-1} 。

[0053] 在本发明的文本中,“捕获分子”是可用于结合来自样品的靶分子或目标分子、即被分析物 (即在本发明的情况下是心血管肽 (类)) 的分子。因此,捕获分子必须在空间上和表面特征例如表面电荷、疏水性、亲水性、是否存在路易斯供体和 / 或受体方面进行充分成型,以特异性结合靶分子或目标分子。因此,结合可以例如由捕获分子与靶分子或目标分子之间的离子、范德华、 $\pi-\pi$ 、 $\sigma-\pi$ 、疏水或氢键相互作用或两种或多种上面提到的相互作用的组合来介导。在本发明的情况下,捕获分子可以选自例如核酸分子、糖类分子、RNA 分子、蛋白质、抗体、肽或糖蛋白。优选情况下,捕获分子是抗体,包括其与靶或目标分子具有足够亲和性的片段,并包括重组抗体或重组抗体片段,以及所述抗体的化学和 / 或生物化学修饰的衍生物或其源自于变体链的长度为至少 12 个氨基酸的片段。

[0054] 优选的检测方法包括各种不同格式的免疫分析,例如放射免疫分析 (RIA)、化学发光和荧光免疫分析、酶联免疫分析 (ELISA)、基于 Luminex 的珠子阵列、蛋白微阵列分析,以及快速试验格式例如免疫层析条样试验。

[0055] 分析可以是均相或非均相分析、竞争性或非竞争性分析。在特别优选的实施方案中,分析采用夹心分析的形式,这是一种非竞争性免疫分析,其中待检测和 / 或定量的分子与第一抗体并与第二抗体结合。第一抗体可以与固相例如珠子、孔或其他容器的表面、芯片或条板结合,第二抗体是例如用染料、放射性同位素或反应性或催化活性部分标记的抗体。然后通过合适的方法测量与被分析物结合的标记抗体的量。涉及“夹心分析”的通用

组合物和步骤是已确立的,并为本领域技术人员所知(免疫分析手册(The Immunoassay Handbook), David Wild 主编, Elsevier LTD, Oxford; 第三版(2005 年 5 月), ISBN-13: 978-0080445267; Hultschig C 等, Curr Opin Chem Biol. 2006 Feb; 10(1): 4-10. PMID: 16376134, 在此引为参考)。

[0056] 在特别优选的实施方案中,分析包含两种捕获分子,优选为都作为分散体系存在于液体反应混合物中,其中第一标记组分与第一捕获分子结合,其中所述第一标记组分是基于荧光或化学发光淬灭或扩增的标记系统的一部分,所述标记系统的第二标记组分与第二捕获分子结合,使得当两种捕获分子与被分析物结合后产生了可测量信号,允许检测包含样品的溶液中形成的夹心复合物。

[0057] 在更优选情况下,所述标记系统包含稀土穴状化合物或稀土螯合物与荧光染料或化学发光染料、特别是花青类型的染料的组合。

[0058] 在本发明的情况下,基于荧光的分析包含染料的使用,染料可以选自例如 FAM(5- 或 6- 羧基荧光素)、VIC、NED、荧光素、荧光素异硫氰酸酯(FITC)、IRD-700/800、花青染料例如 CY3、CY5、CY3.5、CY5.5、Cy7、占吨(Xanthene)、6- 羧基-2',4',7',4,7- 六氯荧光素(HEX)、TET、6- 羧基-4',5'-二氯-2',7'-二甲氧基荧光素(JOE)、N,N,N',N'-四甲基-6- 羧基罗丹明(TAMRA)、6- 羧基-X-罗丹明(ROX)、5- 羧基罗丹明-6G(R6G5)、6- 羧基罗丹明-6G(RG6)、罗丹明、罗丹明绿、罗丹明红、罗丹明 110、BODIPY 染料例如 BODIPY TMR、俄勒冈绿、香豆素类例如伞形酮、苯甲亚胺例如 Hoechst 33258; 菲啉类例如德克萨斯红、雅吉瓦黄、Alexa Fluor、PET、溴乙锭、吖啶染料、吡啶染料、吩噻嗪染料、卟啉染料、聚甲炔染料等。在本发明的情况下,基于化学发光的分析包含使用基于化学发光材料的物理原理的染料,所述原理描述在 Kirk-Othmer 的《化学技术百科全书》(Encyclopedia of chemical technology) 第四版, J. I. Kroschwitz 执行主编, M. Howe-Grant 主编, John Wiley & Sons, 1993, vol. 15, p. 518-562 中,在此引为参考,包括在 551-562 页上的引用资料。优选的化学发光染料是吖啶酯。

[0059] 最优选情况下,在本发明的方法中使用在 Morgenthaler 等的文献(Morgenthaler 等, 2002. Clin Chem 48:788-790) 中描述的功能性分析灵敏度为 0.007ng/mL 的可商用 PCT 测试系统。

[0060] 可以使用本发明的方法诊断的细菌感染可以用本领域技术人员已知的适合的抗生素治疗。可能的抗生素类型选自青霉素类(例如氟氯西林、阿莫西林、氨苄青霉素、美洛西林)、头孢菌素类(例如头孢唑啉、头孢呋辛、头孢噻肟、头孢克洛、头孢氨苄)、 β -内酰胺酶抑制剂(例如舒巴坦、他唑巴坦)、四环素类(例如多西环素、米诺环素、四环素、土霉素)、氨基糖苷类(例如庆大霉素、新霉素、链霉素)、大环内酯类抗生素(例如阿奇霉素、克拉霉素、红霉素、罗红霉素、螺旋霉素、氯林可霉素)、林可胺类(例如林可霉素)、旋转酶抑制剂(例如环丙沙星、氧氟沙星、诺氟沙星)、磺胺类、甲氧苄啶、糖肽类抗生素(例如万古霉素)、多肽类抗生素(例如粘菌素、多粘菌素)和酰胺醇(amphenicol)(例如氯霉素)。

[0061] 本发明的方法可以进一步包含在患者显示出细菌感染的临床症状之前向患者施用抗生素的步骤。

[0062] 当细菌感染是呼吸道感染包括肺炎和气管支气管炎、尿道感染或脓毒症时,本发明的方法尤其适合。正如本领域技术人员所知,肺炎可以由广泛的不同生物体引起。因此,

优选使用向患者施用以防止细菌感染显示出临床症状的广谱抗生素氯霉素、四环素、链霉素、阿莫西林、左氧氟沙星、加替沙星、莫西沙星。

[0063] 可以测定其他标志物以诊断或鉴定无症状的细菌感染。这些标志物可以选自：C- 反应性蛋白 (CRP)、新蝶呤、白细胞 (WBC) 计数、体温、中性粒细胞、红细胞沉降速率 (ESR)。

[0064] 另一方面，本发明涉及使用描述的方法为患有急性中风或暂时性缺血性发作的患者提供施用抗生素的治疗指导。

[0065] 另一方面，本发明涉及使用描述的方法，用抗生素对患有急性中风或暂时性缺血性发作的患者进行预防性治疗。

[0066] 此外，本发明涉及使用包含针对 PCT 或其片段或针对 PCT 前体或其片段的一种或多种抗体的试剂盒，用于在已患急性缺血性或出血性中风或 TIA 的患者中诊断中风后细菌感染。

附图说明

[0067] 图 1：在具有或没有感染的急性中风和 TIA 患者（入院治疗，并在急性中风或 TIA 症状出现后 12 小时内第一次抽血）中 PCT 浓度随时间的变化。

[0068] 图 2：在具有或没有感染的急性中风和 TIA 患者（入院治疗，并在急性中风或 TIA 症状出现后 24 小时内第一次抽血）中 PCT 浓度随时间的变化。

实施例

[0069] 实施例 1：临床研究描述

[0070] 研究在巴塞尔大学医院 (University Hospital of Basel) 的急诊部和神经与神经外科门诊部进行。研究中包含了在急诊部入院的所有在最近 3 天内症状出现符合世界卫生组织判断标准的缺血性或出血性中风或暂时性缺血性发作 (TIA) 的续诊患者 (consecutive patients)。排除了没有知情同意书的患者。

[0071] 在患者中收集的基线数据包括：

[0072] a) 年龄，

[0073] b) 性别，

[0074] c) 体重指数 (BMI)，

[0075] d) 病史项：入院前的真实病史；患有暂时性缺血性发作的患者中的 ABCD 分值 (Rothwell 等, 2005. Lancet 366 :29-36)；家族史；也通过 charlson 指数 (Goldstein 等, 2004. Stroke 35 :1941-5) 评估了相关并发症（即高血压、以前的中风、以前的 TIA、缺血性心脏病、心房纤颤、糖尿病、肾和肝功能障碍、充血性心力衰竭、血脂异常）；具有低钠血症风险的并发症（严重的甲状腺功能减退、糖皮质激素不足、肿瘤、HIV 感染）；吸烟史（每年包数）和状态（每天包数）；正在使用的药物；饮酒量（每天杯数和克数）；从症状出现到入院的时间。

[0076] e) 居住地点：即独立生活，被定义为住在家里或在养老院中，具有或不具有家庭圈和 / 或专业护理的支持（家庭圈由配偶和 / 或其他与患者一起生活的重要成员组成）；依从性生活，被定义为在疗养院长期部门、其他医院生活。

[0077] f) 临床项 : 身体检查包括神经学状态、NIHSS (用于评估中风的严重性) 和格拉斯哥昏迷评分 (Glasgow Coma scale) (GCS ; Adams 等, 1999. Neurology 53 :126-31)、血压、脉搏率、体重、容量状态 (包括皮肤肿胀、颈静脉扩张、听诊、如果可获得的话流体摄入和失去的流程表)、体温 ; 如果在常规临床管理中进行的话在神经外科患者中的脑内压。

[0078] g) 在神经学患者中, 在入院时和钠不平衡的情况下评估低钠血症的临床症状。在经历颅内手术的患者中, 我们将每日评估临床症状。具体来说, 我们监控头痛、厌食、恶心、呕吐、肌肉痉挛和疼痛、抽搐、混乱、感觉迟钝或昏睡发展的出现。

[0079] h) 常规 / 标准实验室化验 : 常规采血包括 : 血细胞比容、血尿素氮、碳酸氢盐、总蛋白、白蛋白、尿酸血清和尿液电解质、尿液和血清重量克分子渗透压浓度、肌酸酐、脂类、TSH、fT4、T3 和基底皮质醇。如果可行, 所有采血在摄取任何食物或吸烟之前进行。或者, 对影响因素进行监控。

[0080] i) 成像 : 脑颅的计算机断层扫描或 MRI (T1、T2、扩散加权成像序列, 使用或不使用造影), 如果指明, 使用磁共振血管造影术或常规脑血管造影术。我们记录了施加造影剂的时间点。

[0081] 也在缺血性病灶的血管区域性的基础上将中风患者分类如下 : 完全前循环综合征 (TACS), 部分前循环综合征 (PACS), 腔隙性循环综合征 (LACS), 后循环综合征 (POCS)。

[0082] j) 其他调查 : 中风患者有神经声像图、超声心动图、标准的 12 根导线的心电图和 24 小时心电图检查, 然后按照急性治疗中的 Org 10172 审判 (TOAST) 中风亚型分类由中风的病因学进行分类, 所述急性治疗中的 Org 10172 审判 (TOAST) 中风亚型分类区分大动脉粥样硬化、心源性脑栓塞、小动脉阻塞、其他病因学和未确定病因学。

[0083] 研究得到巴塞尔伦理委员会 (Ethikkommission beider Basel) 的批准。这是一项探索性和观察性的研究 ; 与研究相关的唯一干预是声明在常规进行的采血过程中获得的 7.5ml 血浆。因此, 患者提供了他们同意将其数据用于科学目的的书面知情同意书。在由于急性 CNS 病变 (这是被包含在研究内的先决条件) 的后遗症而不可能“知情同意”的患者中, 患者的最近亲属签署了认可书以声明患者的假定意愿。在不容易找到最近亲属的情况下, 没有参与本研究的主治医生证明了从他的观点来看不反对包含在本研究中。只有在这些知情同意书程序后, 患者才被包含在本研究中。

[0084] 在整个试验过程中参与者的管理 :

[0085] 步骤 1. 将所有急诊部或神经科病房中的合格患者包含在本研究中。

[0086] 步骤 2. 收集所有基线数据。

[0087] 步骤 3. 在住院过程中, 通过图表回顾评估临床项目包括体重、血压、脉搏率、容积状态和体温, 直到出院。

[0088] - 流体治疗和药物

[0089] - 潜在的低钠血症症状, 即头痛、恶心、呕吐、肌肉痉挛和疼痛、厌食、意识受损、抽搐。

[0090] - 在病房进行日常采血的时间点处取样进行日常实验室化验 (化学图、血糖、血清重量克分子渗透压浓度、尿液重量克分子渗透压浓度、尿液中的钠、血细胞比容)。

[0091] 步骤 4. 在所有患者中, 在入院第 5 天, 使用 NIHSS、Barthel 指数和排序量表进行临床检查 (Collin 等, 1988. International Disability Study 10 :61-3 ; Bonita 和

Beaglehole. 1988. Stroke 19 :1497-1500)。

[0092] 评估了未来居住地（即依从性生活对比独立生活）。

[0093] 步骤 5. 在患有缺血性中风的患者中，在 3 个月后获得了关于发病和死亡（通过 Barthel 指数和排序量表进行评估）的电话随访。不利结果被定义为 Barthel 指数 < 85 或修改的排序量表为 3 到 6。

[0094] 实施例 2：降钙素原的测量

[0095] 使用在 Morgenthaler 等的文献 (Morgenthaler 等, 2002. Clin Chem 48 :788-790) 中描述的功能性分析灵敏度为 0.007ng/mL 的超灵敏性可商购测试系统测量 PCT。简单来说，针对 PCT 的降钙素部分产生了绵羊抗体，针对 PCT 的下钙素部分产生了小鼠单克隆抗体。将试管用抗下钙素抗体包被。将抗降钙素抗体用 MACN 吡啶酯 (InVent GmbH, Hennigsdorf, Germany) 标记并用作示踪剂。使用重组 PCT 在正常马血清中的稀释液作为校正物。将 100 μ L 样品或标准品在包被的管中温育 30 分钟，加入 200 μ L 示踪剂。在继续温育 2 小时后，将试管用 1mL LIA 清洗液 (BRAHMS AG, Hennigsdorf, Germany) 清洗 4 次，使用 LB952T 照度计 (Berthold, Wildbad, Germany) 测量结合的化学发光。

[0096] 结果

[0097] 在已诊断患有中风（缺血性或出血性）或暂时性缺血性发作的患者的血样中测定了降钙素原的水平。在第一种方法中，在分析中包含了在急性中风或 TIA 症状出现前后 12 小时内入院的患者 ($n = 376$)。在基线（入院时）和入院后第 1 天 (24-36 小时)、第 3 天 (72-84 小时) 和第 5 天 (120 到 132 小时) 时，测定了降钙素原的浓度。在这 376 位患者中有 24 位在中风 /TIA 出现后发生了细菌感染（例如肺炎、尿道感染）。具有或没有细菌感染的患者（在急性中风或 TIA 症状出现后 12 小时内入院治疗）的 PCT 浓度随时间的变化显示在图 1 中。逻辑回归分析显示出 PCT 浓度增加与出现细菌感染之间的关联性（在入院时 (0-12h) $p = 0.12$ ；在第 1 天 (24-36h) $p = 0.067$ ；第 3 天 (72-84h) $p = 0.0042$ ，第 5 天 (120-132h) $p = 0.011$ 。使用不同截止值来确定相应的灵敏度和特异性（表 1）。在 PCT 截止值为 0.06ng/mL 时，对在急性中风 /TIA 症状出现后 12 小时内入院的患者灵敏度和特异性分别为 9.1 和 94.1%。如果将该截止值减半到 0.03ng/mL，灵敏度提高一倍以上 (22.7%)，特异性中度下降 (85.7%)。如果在症状出现后 24 到 36 小时内测量 PCT，在 PCT 截止值为 0.06ng/mL 时，灵敏度和特异性分别为 28.2 和 94.6%，而 PCT 截止值为 0.03ng/mL 时，灵敏度增加到高达 33.3%，特异性为 82.9%。

[0098] 在第二种方法中，在分析中包含了在症状出现前后 24 小时内入院的患者 ($n = 432$)。在基线（入院时）和入院后第 1 天 (24-48 小时)、第 3 天 (72-96 小时) 和第 5 天 (120 到 144 小时) 时，测定了降钙素原的浓度。在这 432 位患者中有 26 位在中风 /TIA 出现后发生了细菌感染（例如肺炎、尿道感染）。具有或没有细菌感染的患者的 PCT 浓度随时间的变化显示在图 2 中。逻辑回归分析显示出 PCT 浓度增加与出现细菌感染之间的关联性（在入院时 (0-24h) $p = 0.035$ ；在第 1 天 (24-48h) $p = 0.029$ ；第 3 天 (72-96h) $p = 0.0005$ ，第 5 天 (120-144h) $p = 0.01$ 。使用不同截止值来确定相应的灵敏度和特异性（表 2）。在 PCT 截止值为 0.06ng/mL 时，对在急性中风 /TIA 症状出现后 24 小时内入院的患者灵敏度和特异性分别为 16.7 和 94.4%。如果将该截止值减半到 0.03ng/mL，灵敏度几乎加倍 (29.2%)，特异性中度下降 (85.3%)。如果在症状出现后 24 到 48 小时内测量 PCT，在 PCT

截止值为 0.06ng/mL 时,灵敏度和特异性分别为 31.8 和 93.5%,而 PCT 截止值为 0.03ng/mL 时,灵敏度增加到高达 40.9%,特异性为 81.5%。

[0099] 为了考察高质量的降钙素原,必须考虑到按照标准判据执行本研究中的中风后感染的诊断:温度>37.5℃,白细胞计数>11000/mL 或<4000/mL,胸部 x-射线有肺浸润,或病原体培养阳性。这种感染的黄金标准诊断在很大程度上低估了感染的真实数量,导致相当大数量的假阴性(意味着具有真实细菌感染的急性中风或 TIA 患者可能被错误地划分到非感染性亚类中)。使用本发明中描述的用于降钙素原超灵敏检测的测试系统,那些假阴性可以被正确诊断为有细菌感染,从而可以用抗生素充分治疗。

[0100] 序列

[0101] SEQ ID NO:1(PCT 的氨基酸序列):

[0102] 1 APFRSALESS PADPATLSED EARLLLAALV QDYVQMKASE LEQEQEREGRS

[0103] 51 SLDSPRSKRC GNLSTCMLGT YTQDFNKFHT FPQTAIGVGA PGKKRDMSSD

[0104] 101 LERDHRPHVS MPQNN

[0105] 表 1:对于在症状出现后 12 小时内入院的急性中风和 TIA 患者来说,在不同测量时间点处对不同 PCT 截止值的灵敏度和特异性(用%表示):

[0106]	PCT 截	0-12h		24-36h		72-84h		120-132h	
[0107]	止值	灵敏度	特异	灵敏度	特异性	灵敏度	特异	灵敏度	特异性
[0108]	(ng/ml)	(%)	性(%)	(%)	(%)	(%)	性(%)	(%)	(%)
[0109]	0.03	22.7	85.7	33.3	82.9	46.7	81.6	56.3	71.9
[0110]	0.045	13.6	92.2	28.6	91.1	46.7	89.3	56.3	84.8
[0111]	0.06	9.1	94.1	28.2	94.6	40.0	92.7	31.3	93.3
[0112]	0.1	9.1	96.1	9.5	96.2	13.3	97.0	31.3	96.4

[0113] 表 2:对于在症状出现后 24 小时内入院的急性中风和 TIA 患者来说,在不同测量时间点处对不同 PCT 截止值的灵敏度和特异性(用%表示):

[0114]	PCT 截	0-24h		24-48h		72-96h		120-144h	
[0115]	止值	灵敏度	特异性	灵敏度	特异性	灵敏度	特异性	灵敏度	特异性
[0116]	(ng/ml)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
[0117]	0.03	29.2	85.3	40.9	81.5	52.9	81.8	55.6	72.9
[0118]	0.045	20.8	91.7	31.8	90.5	52.9	89.1	55.6	85.4
[0119]	0.06	16.7	94.4	31.8	93.5	47.1	92.3	33.3	92.7
[0120]	0.1	12.5	96.1	13.7	9.58	17.7	96.8	33.3	96.0

[0001]

序列表

<110> B. R. A. H. M. S 有限公司

<120> 用于在急性中风或暂时性缺血性发作的患者中诊断细菌感染和指导抗生素治疗的降钙素原

<130> SPI104437-80

<150> EP 09012947.9

<151> 2009-10-13

<160> 1

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 116

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Ala Pro Phe Arg Ser Ala Leu Glu Ser Ser Pro Ala Asp Pro Ala Thr
1 5 10 15

Leu Ser Glu Asp Glu Ala Arg Leu Leu Leu Ala Ala Leu Val Gln Asp
20 25 30

Tyr Val Gln Met Lys Ala Ser Glu Leu Glu Gln Glu Gln Glu Arg Glu
35 40 45

Gly Ser Ser Leu Asp Ser Pro Arg Ser Lys Arg Cys Gly Asn Leu Ser
50 55 60

Thr Cys Met Leu Gly Thr Tyr Thr Gln Asp Phe Asn Lys Phe His Thr
65 70 75 80

[0002]

Phe	Pro	Gln	Thr	Ala	Ile	Gly	Val	Gly	Ala	Pro	Gly	Lys	Lys	Arg	Asp
				85					90					95	

Met	Ser	Ser	Asp	Leu	Glu	Arg	Asp	His	Arg	Pro	His	Val	Ser	Met	Pro
				100				105					110		

Gln	Asn	Ala	Asn
			115

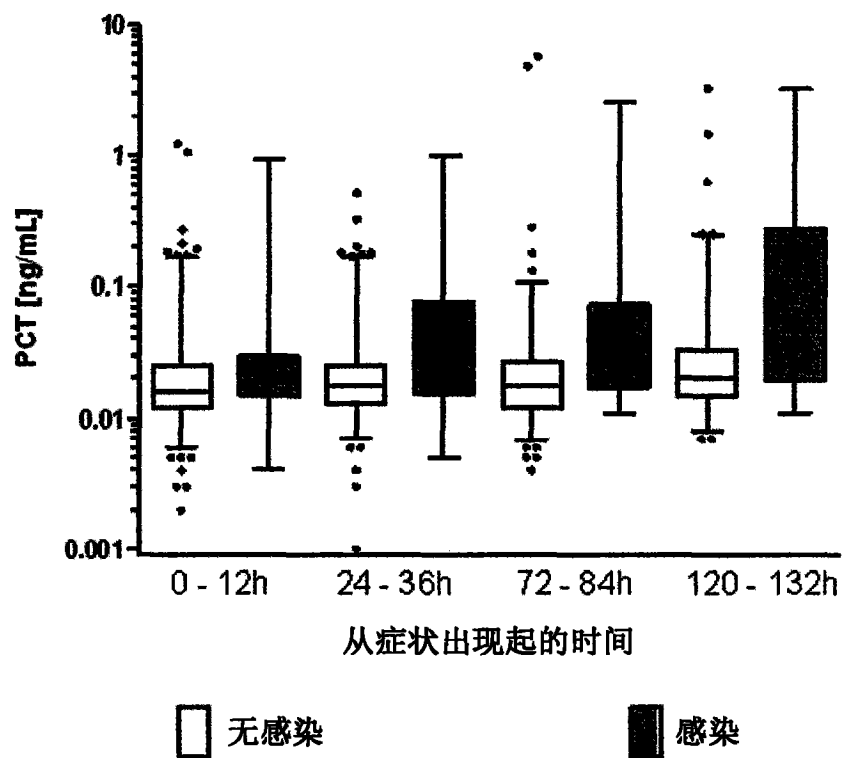


图 1

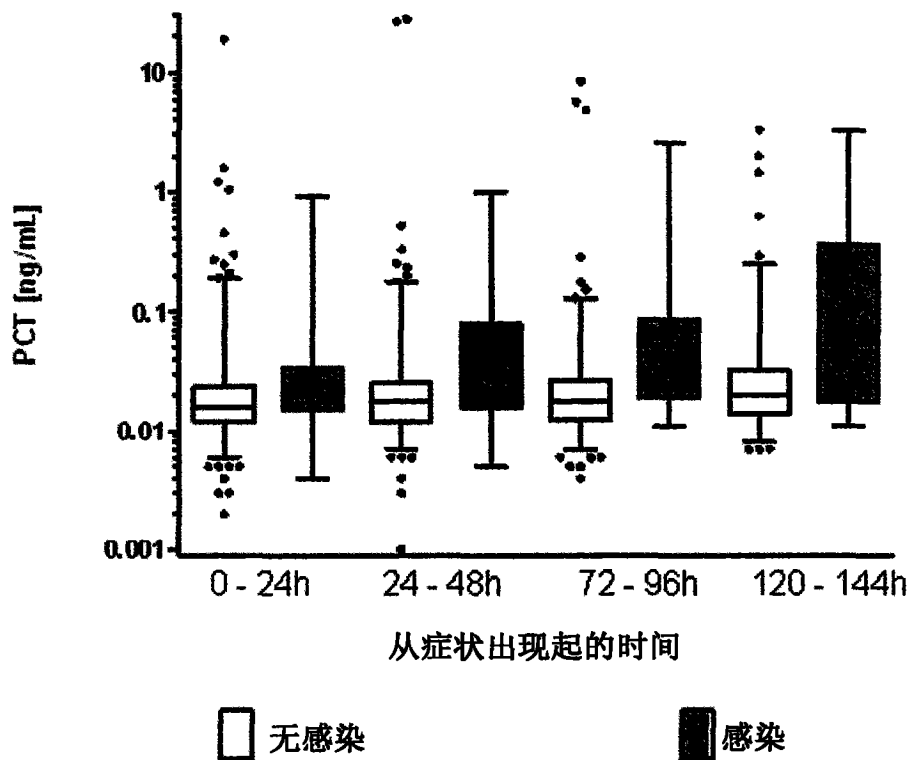


图 2