



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104272107 B

(45)授权公告日 2017.05.17

(21)申请号 201380012753.8

(22)申请日 2013.01.07

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104272107 A

(43)申请公布日 2015.01.07

(30)优先权数据

13/414,061 2012.03.07 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2014.09.05

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/020496 2013.01.07

(87)PCT国际申请的公布数据

W02013/133904 EN 2013.09.12

(73)专利权人 威斯康星校友研究基金会

地址 美国威斯康星州

(72)发明人 哈米德·R·埃格巴尔尼亚

马克·E·库克

瓦伦·保罗·波特

丹尼尔·埃尔默·布茨

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

代理人 郑斌 彭鲲鹏

(51)Int.Cl.

G01N 33/497(2006.01)

A61B 5/00(2006.01)

(56)对比文件

US 5912178 A, 1999.06.15,

CN 102027344 A, 2011.04.20,

CN 102176863 A, 2011.09.07,

US 2007123791 A1, 2007.05.31,

审查员 于园园

权利要求书3页 说明书15页 附图5页

(54)发明名称

通过监测同位素比来检测代谢途径之系统性振荡的速率变化

(57)摘要

本发明描述的方法基于可用于鉴定生物体(例如人)中“不健康”状态的目的之呼吸同位素比数据的振荡的观测。本文描述的是通过鉴定呼吸同位素比数据中的振荡模态来确定个体健康状况(例如从健康转变至受感染)的方法。将所述振荡模态在频率和/或振幅上的变化与所述个体的健康相关联。所述方法可在比之前方法更短的时间段内有利地用来提供关于个体健康的信息。

1. 表示个体的呼吸中第一同位素与第二同位素的相对量的数据在开发用于通过以下方法确定所述个体是否正从健康状态转变至不健康状态的系统中的应用,所述方法包括:

在总时间段($t_{\text{总}}$)内对所述个体的呼吸进行监测并且对其中第一同位素与第二同位素的相对量进行测量,其中所述个体在时间段 $t_{0-\text{健康}}$ 期间是健康的,其中 t_0 是时间段 $t_{\text{总}}$ 开始的时间点,并且 $t_{\text{健康}}$ 是 $t_{\text{总}}$ 期间所述个体健康的时间点,

在时间段 $t_{0-\text{健康}}$ 期间对所述第一同位素与所述第二同位素的相对量的健康功能振荡模式进行鉴定,

在 $t_{\text{总}}$ 内的测试时间段 $t_{\text{测试}}$ 对所述第一同位素与所述第二同位素的相对量的测试功能振荡模式进行鉴定,其中 $t_{\text{测试}}$ 与 $t_{0-\text{健康}}$ 不重叠,以及

当所述健康功能振荡模式与所述测试功能振荡模式在振荡周期、振荡/单位时间、和/或振荡周期的变异度不同时,确定所述个体正从健康状态转变至不健康状态,

其中所述第一同位素与第二同位素选自 ^{13}C 和 ^{12}C 对、 ^{15}N 和 ^{14}N 对、 ^{17}O 和 ^{16}O 对、以及硫同位素对。

2. 权利要求1所述的应用,其中所述方法还包括通过测定所述第一同位素与所述第二同位素的相对量的变化来测定斜率在时间周期 $t_{\text{总}}$ 内从时间 t_0 至时间 t_x 的变化。

3. 权利要求1所述的应用,其中所述健康功能振荡模式独立于所述个体的饮食。

4. 权利要求1所述的应用,其中所述第一同位素与所述第二同位素是 ^{13}C 和 ^{12}C 对。

5. 权利要求1所述的应用,其中所述监测步骤使用光腔衰荡光谱来测定所述第一同位素与所述第二同位素的相对量的变化。

6. 权利要求1所述的应用,其中当所述个体从健康状态转变至不健康状态时,所述健康功能振荡模式的振荡周期、振荡/单位时间、和/或振荡周期和/或振荡/单位时间的变异度与所述测试功能振荡模式的差别大于10%。

7. 权利要求1所述的应用,其中所述时间段 $t_{\text{总}}$ 为至少5分钟并且包含至少一个来自健康状态的时间段和至少一个来自不健康状态的时间段。

8. 权利要求1所述的应用,其中在时间段 $t_{\text{总}}$ 内对所述第一同位素与所述第二同位素的相对量进行的测量包括在时间段 $t_{\text{总}}$ 内连续测量或在离散时间段(t_i)内的测量。

9. 权利要求1所述的应用,其中所述第一同位素与所述第二同位素的相对量的健康功能振荡模式具有6至7分钟的振荡周期以及8.5至10次振荡/小时。

10. 权利要求1所述的应用,其中在时间段 $t_{0-\text{健康}}$ 内对所述第一同位素与所述第二同位素的相对量的健康功能振荡模式进行的鉴定,包括分解时间段 $t_{0-\text{健康}}$ 内所述第一同位素与所述第二同位素的相对量以产生有限数目的固有模态,其中第一主导振荡模态是所述固有模态之一。

11. 权利要求10所述的应用,其中所述方法还包括使用模态分解对高频振荡模态进行鉴定,并且对来自时间段 $t_{0-\text{健康}}$ 内所述第一同位素与所述第二同位素之相对量的高频振荡模态进行滤波。

12. 权利要求1所述的应用,其中所述方法还包括对时间周期($t_{0-\text{健康}}$)内所述第一同位素与所述第二同位素的相对量的第二健康功能振荡周期进行鉴定。

13. 权利要求1所述的应用,其中所述个体是同位素非富集个体。

14. 权利要求1所述的应用,其中所述个体是经插管的。

15. 表示个体的呼吸中第一同位素与第二同位素的相对量的数据在开发用于通过以下方法确定所述个体是否处于不健康状态的系统中的应用,所述方法包括:

在总时间段($t_{\text{总}}$)内对所述个体的呼吸进行监测并且对其中第一同位素与第二同位素的相对量进行测量,其中所述个体在时间段 $t_{0-\text{不健康}}$ 期间是不健康的,其中 t_0 是时间段 $t_{\text{总}}$ 开始的时间点,并且 $t_{\text{不健康}}$ 是 $t_{\text{总}}$ 期间所述个体不健康的时间点,

在时间段 $t_{0-\text{不健康}}$ 期间对所述第一同位素与所述第二同位素的相对量的不健康功能振荡模式进行鉴定,

在 $t_{\text{总}}$ 内的测试时间段 $t_{\text{测试}}$ 对所述第一同位素与所述第二同位素的相对量的测试功能振荡模式进行鉴定,其中 $t_{\text{测试}}$ 与 $t_{0-\text{不健康}}$ 不重叠,以及

当所述不健康功能振荡模式与所述测试功能振荡模式在振荡周期、振荡/单位时间、和/或振荡周期的变异度不同时,确定所述个体正从不健康状态转变至健康状态,

其中所述第一同位素与所述第二同位素选自 ^{13}C 和 ^{12}C 对、 ^{15}N 和 ^{14}N 对、 ^{17}O 和 ^{16}O 对、以及硫同位素对。

16. 权利要求15所述的应用,其中所述方法还包括通过测定所述第一同位素与所述第二同位素的相对量的变化来测定斜率在时间周期 $t_{\text{总}}$ 内从时间 t_0 至时间 t_x 的变化。

17. 权利要求15所述的应用,其中所述不健康功能振荡模式独立于所述个体的饮食。

18. 权利要求15所述的应用,其中所述第一同位素与所述第二同位素是 ^{13}C 和 ^{12}C 对。

19. 权利要求15所述的应用,其中所述监测步骤使用光腔衰荡光谱来测定所述相对量的变化。

20. 权利要求15所述的应用,其中当所述个体从健康状态转变至不健康状态时,所述健康功能振荡模式的振荡周期、振荡/单位时间、和/或振荡周期和/或振荡/单位时间的变异度与所述测试功能振荡模式的差别大于10%。

21. 权利要求15所述的应用,其中所述时间段 $t_{\text{总}}$ 为至少5分钟。

22. 权利要求15所述的应用,其中在时间段 $t_{\text{总}}$ 内对所述第一同位素与所述第二同位素的相对量进行的测量包括在时间段 $t_{\text{总}}$ 内连续测量或在离散时间段(t_i)内的测量。

23. 表示个体的呼吸中第一同位素与第二同位素的相对量的数据在开发用于通过以下方法确定所述个体感染之严重程度的系统中的应用,所述方法包括:

在时间周期(t)内对所述个体的呼吸进行监测并且对其中第一同位素与第二同位素的相对量进行测量,其中所述第一同位素与所述第二同位素选自 ^{13}C 和 ^{12}C 对、 ^{15}N 和 ^{14}N 对、 ^{17}O 和 ^{16}O 对、以及硫同位素对;

对所述个体在时间周期(t)内所述第一同位素与所述第二同位素的相对量的功能振荡模式进行鉴定,以及

测定所述个体的所述功能振荡模式与健康的和/或受感染的参考群体的平均功能振荡模式之间相比的任何差别,

其中所述个体的所述功能振荡模式与所述参考群体的所述平均功能振荡模式之间的差别程度确定了感染的严重程度。

24. 权利要求23所述的应用,其中所述个体的所述功能振荡模式独立于所述个体的饮食。

25. 权利要求23所述的应用,其中所述第一同位素与所述第二同位素是 ^{13}C 和 ^{12}C 对。

26. 权利要求23所述的应用,其中所述监测步骤使用光腔衰荡光谱来测定所述相对量的变化。

27. 权利要求23所述的应用,其中所述时间周期为至少5分钟。

28. 权利要求23所述的应用,其中在时间周期(t)内对所述第一同位素与所述第二同位素的相对量进行的测量包括在时间周期(t)内连续测量或在离散时间段(t_i)内的测量。

29. 表示个体的呼吸中第一同位素与第二同位素的相对量的数据在开发用于通过以下方法确定所述个体是否处于不健康状态的系统中的应用,所述方法包括:

在时间段($t_{\text{总}}$)内对所述个体的呼吸进行监测并且对其中第一同位素与第二同位素的相对量进行测量,其中所述第一同位素与所述第二同位素选自 ^{13}C 和 ^{12}C 对、 ^{15}N 和 ^{14}N 对、 ^{17}O 和 ^{16}O 对、以及硫同位素对;

在时间周期($t_{\text{总}}$)内对其中所述第一同位素与所述第二同位素的相对量的功能振荡模式进行鉴定,并且将所述个体的所述功能振荡模式与已知健康/或不健康的参考群体内的平均功能振荡模式进行比较,以及

当所述个体的所述功能振荡模式与所述健康和/或受感染的参考群体的所述平均功能振荡模式在频率和/或振幅上不同时,确定所述个体处于不健康状态。

通过监测同位素比来检测代谢途径之系统性振荡的速率变化

[0001] 联邦资助声明

[0002] 本发明在国立卫生研究院授予的LM008992的政府支持下完成。政府享有本发明的某些权利。

[0003] 本公开内容的技术领域

[0004] 本公开内容涉及人和生物体中分解代谢状态的检测,其通过检测呼出气体中的同位素比(例如碳同位素比),特别地通过测定碳同位素比的系统性振荡速率。

背景技术

[0005] 分解代谢指将分子(例如多糖、核酸、脂类和蛋白质)分解成更小单位的代谢途径,而合成代谢指由更小单位构建分子的代谢途径。分解代谢产生能量,而合成代谢需要能量。分解代谢状态指这样的情况:其中身体利用存储的碳水化合物、氨基酸或脂肪作为用于维持的能量来源,从而产生尿氮和在呼吸中的CO₂。这些变化将在尿和呼吸中迅速显现出来。身体碳水化合物、氨基酸和脂肪也是合成防御产物(例如,免疫球蛋白和急性期蛋白)的营养物来源,所述防御产物可以是分解代谢状态的函数。因此,即使在总体为分解代谢状态的期间,生物体中也可以伴随发生合成代谢过程。分解代谢状态可由感染、疾病、外部病原体、毒性化学物质暴露、营养不良或其他原因诱导。作为严重疾病的指标,分解代谢状态发生的早期检测在人和动物的健康方面具有广泛的应用。仅就脓毒症而言,通过更早期的检测和介入就可使44%的死亡率(在报道的750,000例病例中)减半。

[0006] 在已授权的美国专利No.5,912,178('178专利)中描述了通过检测呼吸中呼出的CO₂中的同位素变化来辨别分解代谢状态之发生的非侵入性、非掺杂(non-doping)、快速稳定的同位素方法。通过将生物体中的采样比(C¹³:C¹²)与基线比进行比较来确定所述生物体的相对健康,例如通过在质谱仪中测试呼吸样品。'178专利中公开的方法允许对发生改变的器官功能或营养物摄入缺陷的生物体的净分解代谢过程进行非入侵性测定。'178专利中所公开方法的一个缺点是需要比较标本来确定对其呼吸样品进行测量的生物体是否处于分解代谢状态。

[0007] 类似地,在美国专利No.7,465,276('276专利)中,随时间测量第一呼吸同位素与第二呼吸同位素的相对量以确定生物体是否正经历病毒或细菌感染。'276专利方法的优点是可以监测同位素非富集生物体之呼吸样品的同位素比随时间的变化以确定所述生物体是否正经历细菌或病毒感染。所述方法的缺点是优选来自健康对象的基线测量值从而可测量相对于基线的变化,该变化指示感染。此外,通常建议经过数小时或者甚至数天获得测量值使得可以测定同位素比相对于基线比的变化。因此,在短期感染时期内(例如30分钟至2小时)不太可能测定从健康向受感染生物体的转变,因为在该时间段内斜率的变化是不可测量的。

[0008] 需要另外的方法以利用呼吸中同位素比的变化来确定生物体的分解代谢或受感染状态以及从健康向患病的转变以允许促进治疗介入。

[0009] 简要概述

[0010] 在一个方面,确定个体是否正从健康状态转变至不健康状态的方法包括:

[0011] 在总时间段($t_{\text{总}}$)内对所述个体的呼吸进行监测并且对其中第一同位素与第二同位素的相对量进行测量,其中所述个体在时间段 $t_{0-\text{健康}}$ 期间是健康的,其中 t_0 是时间段 $t_{\text{总}}$ 开始的时间点,并且 $t_{\text{健康}}$ 是 $t_{\text{总}}$ 期间所述个体健康的时间点,

[0012] 在时间段 $t_{0-\text{健康}}$ 期间对所述第一同位素与所述第二同位素的相对量的健康功能振荡模式(functional oscillation pattern)进行鉴定,

[0013] 在 $t_{\text{总}}$ 内的测试时间段 $t_{\text{测试}}$ 对所述第一同位素与所述第二同位素的相对量的测试功能振荡模式进行鉴定,其中 $t_{\text{测试}}$ 与 $t_{0-\text{健康}}$ 不重叠,以及

[0014] 当所述健康功能振荡模式与所述测试功能振荡模式在振荡周期、振荡/单位时间、和/或振荡周期中的变异度(variability)不同时,确定所述个体正从健康状态转变至不健康状态,

[0015] 其中所述第一同位素与所述第二同位素选自 ^{13}C 和 ^{12}C 对、 ^{15}N 和 ^{14}N 对、 ^{17}O 和 ^{16}O 对、以及硫同位素对。

[0016] 在另一个方面,确定个体是否处于不健康状态的方法包括:

[0017] 在总时间段($t_{\text{总}}$)内对所述个体的呼吸进行监测并且对其中第一同位素与第二同位素的相对量进行测量,其中所述个体在时间段 $t_{0-\text{不健康}}$ 中是不健康的,其中 t_0 是时间段 $t_{\text{总}}$ 开始的时间点,并且 $t_{\text{不健康}}$ 是 $t_{\text{总}}$ 期间所述个体不健康的时间点,

[0018] 在时间段 $t_{0-\text{不健康}}$ 期间对所述第一同位素与所述第二同位素的相对量的不健康功能振荡模式进行鉴定,

[0019] 在 $t_{\text{总}}$ 内的测试时间段 $t_{\text{测试}}$ 对所述第一同位素与所述第二同位素的相对量的测试功能振荡模式进行鉴定,其中 $t_{\text{测试}}$ 与 $t_{0-\text{不健康}}$ 不重叠,以及

[0020] 当所述不健康功能振荡模式与所述测试功能振荡模式在振荡周期、振荡/单位时间、和/或振荡周期中的变异度不同时,确定所述个体正从不健康状态转变至健康状态,

[0021] 其中所述第一同位素与所述第二同位素选自 ^{13}C 和 ^{12}C 对、 ^{15}N 和 ^{14}N 对、 ^{17}O 和 ^{16}O 对、以及硫同位素对。

[0022] 在又一个方面,确定个体感染之严重程度的方法包括:

[0023] 在时间周期(t)内对所述个体的呼吸进行监测并且对其中第一同位素与第二同位素的相对量进行测量,其中所述第一同位素与所述第二同位素选自 ^{13}C 和 ^{12}C 对、 ^{15}N 和 ^{14}N 对、 ^{17}O 和 ^{16}O 对、以及硫同位素对;

[0024] 对所述个体在时间周期(t)内对所述第一同位素与所述第二同位素的相对量的功能振荡模式进行鉴定,以及

[0025] 测定所述个体的所述功能振荡模式与健康的和/或受感染的参考群体的平均功能振荡模式之间相比的任何差别,

[0026] 其中所述个体的所述功能振荡模式与所述参考群体的所述平均功能振荡模式之间的差别程度确定了感染的严重程度。

[0027] 在再一个方面,确定个体是否处于不健康状态的方法包括:

[0028] 在时间周期($t_{\text{总}}$)内对所述个体的呼吸进行监测并且对其中第一同位素与第二同位素的相对量进行测量,其中所述第一同位素与所述第二同位素选自 ^{13}C 和 ^{12}C 对、 ^{15}N 和 ^{14}N 对、 ^{17}O 和 ^{16}O 对、以及硫同位素对;

[0029] 在时间周期 ($t_{\text{总}}$) 内对所述第一同位素与所述第二同位素的相对量的功能振荡模式进行鉴定,并且将所述个体的所述功能振荡模式与已知健康/或不健康的参考群体的平均功能振荡模式进行比较,以及

[0030] 当所述个体的所述功能振荡模式与所述健康和/或受感染的参考群体的所述平均功能振荡模式在频率和/或振幅上不同时,确定所述个体处于不健康状态。

附图说明

[0031] 图1示出在收集自人对象的数据中呼吸 Δ 值 (delta value) 的振荡证据。使用同位素分析仪从健康人对象每秒收集原始呼吸 Δ 值,持续30分钟。使用标准Savitzky-Golay滤波器 (阶数=2) 来平滑原始数据。示出了通过经平滑振荡数据的Hilbert-Huang变换产生的模态3和4的和。X轴代表30分钟的采样 (0.5小时)。Y轴是实际呼吸碳 Δ 值。在三个固定时间段 (以粗体水平条示出) 内,观察到了具有可变频率的重复的振荡。段3示出“缺失的”振荡峰。垂直线说明振荡模式的重复性和复杂性两者,其可使简单定量分析有挑战性,但是在数学上可行。

[0032] 图2示出呼吸 CO_2 (Y轴) 的改变与呼吸碳 Δ 值 (X轴) 的变化之间的相关性。低 R^2 示出呼吸碳 Δ 值的变化独立于呼吸 CO_2 浓度的变化。

[0033] 图3示出使用同位素分析仪每秒测量的室内空气中的碳 Δ 值。X轴的总时间是60分钟,通过条长度示出2分钟的段。室内空气中的碳 Δ 值大约为-13并且随着时间测量的室内空气中的碳 Δ 值不存在振荡模式。

[0034] 图4示出使用同位素分析仪每秒测量的个体小鼠 ($n=3$ /处理) 的原始碳 Δ 值。从每个处理组选择一只小鼠用于显示以降低数据密度。X轴是注射后的小时数,而Y轴是呼吸碳 Δ 值。以“细虚”线表示用无菌盐水腹腔注射的小鼠的值,“淡实线”表示以1mg脂多糖 (LPS) /Kg体重注射的,并且“深实线”表示以5mg脂多糖/Kg体重注射的。始于图例框的箭头指明相应的迹线。对于注射了5mg/kg LPS的动物,呼吸碳 Δ 值的下降趋势线 (大箭头) 清楚地存在于振荡模式之中。

[0035] 图5说明了数据平滑对图4示出的原始数据的影响。使用标准Savitzky-Golay滤波器 (阶数=2) 来归一化和平滑数据以进一步揭示呼吸碳 Δ 值振荡的复杂模式的存在。

[0036] 图6示出Hilbert-Huang变换的呼吸碳同位素 Δ 值的两个模态。使用标准Savitzky-Golay滤波器 (阶数=2) 将经4500秒收集时段来自6只健康动物的原始呼吸碳 Δ 值 (例如在图4中所示) 平滑 (以创建例如图5所示的数据),然后使用Hilbert-Huang变换分解来清楚地揭示振荡模式。将每一区组 (block) 内示出 (区组=小鼠) 的数据Hilbert-Huang (HH) 变换为7个模态,其中在每次相继的模态变换时,提取最低振荡频率。选择具有较高频率和每小时有4至15次振荡的Hilbert-Huang变换的模态进一步用于傅立叶 (Fourier) 分析。每只小鼠示出两个Hilbert-Huang变换 (通常是HH模态3和4)。X轴为秒,Y轴是根据HH分解的振荡标度 (无标度量度)。

[0037] 图7是对于健康的和注射了脂多糖 (LPS) 的小鼠,通过Hilbert-Huang (HH) 变换 (归一化振荡数据) 产生的选定频率模态 (在图6中示出并描述于图6的图例中) 之“30分钟”时间段的傅立叶分析。在HH变换数据的傅立叶分析中,健康动物示出了具有许多辅频 (less dominate frequency) 的主频。在注射了LPS的动物的情况下,失去健康功能振荡模式之特

性并且一个或更多个改变的功能振荡模式变得明显。Y轴和X轴为任意单位。

[0038] 图8示出用来建立比较数据库的随机选择的数据区域(框)的三个实施例,所述比较数据库用于测试具有未知健康状况的动物的呼吸碳 Δ 值振荡模式。框以半比例绘制以减少混乱并且说明概念-其并非按比例绘制。在数据分析期间选择的框记录30分钟时间段的呼吸碳 Δ 值。使用来自已知健康的和脂多糖刺激的动物的呼吸碳 Δ 振荡数据来创建代表健康和疾病状态两者的振荡模式数据库。还从饲喂不同饮食的动物收集数据,因为已知饮食可影响 Δ 值(原始数据未示出,但是类似于图8)。将健康状态和/或饮食数据组合以用于与来自未知状况的数据组进行比较。(参见描述数据管理的实施例)。

[0039] 图8示出用来建立比较数据库的随机选择的30分钟数据区域(框)的三个实施例,所述比较数据库用于测试具有未知健康状况的动物的呼吸碳 Δ 值振荡模式。使用来自已知健康的和脂多糖刺激的动物的呼吸碳 Δ 振荡数据来创建代表健康和疾病状态两者的振荡模式数据库。还从饲喂不同饮食的动物收集数据,因为已知饮食可影响 Δ 值(原始数据未示出,但是类似于图8)。将健康状态和/或饮食数据组合以用于与来自未知状况的数据组进行比较。(参见描述数据管理的实施例)。

[0040] 图9示出自图8示出的每一参考数据框收集的时间序列的较低维投影。估计量 f (参见用于计算的实施例)计算时间序列数据至第70维。在该图中,以2D平面上的单个点示出每一时间序列的 f 。健康的和注射了脂多糖(LPS)的动物点分别任意沿着X轴和Y轴聚类。动物的健康群体内的饮食变化也聚类。“阴影”条证明了对于每一时间序列, f 值的聚类提供健康动物与“不健康的”(注射了LPS)的动物的完全区分。饮食也影响 f 值,然而饮食不干扰基于如由 f 定义的呼吸碳 Δ 值振荡模式来区分健康动物与不健康动物的能力。

[0041] 图10示出所述算法的2D图像(参见用于解释的实施例),其用于检测已知健康状态的35分钟时间序列呼吸碳 Δ 值是否可充分地测量健康状态,但是其通过来自两种饮食的动物的混合数据来创建。在99%置信度下,可从不健康的动物的呼吸样品数据库中区分出健康的呼吸样品。该实验还证明了当基于碳 Δ 值的呼吸振荡时,饮食并不是区别健康状态与不健康状态的混淆因素。所示实验还证明了将未知的与建立的数据库进行比较的所述方法在建立健康状态中有效。

[0042] 从以下详细说明、附图、以及所附权利要求书,本领域技术人员将了解和理解上述及其他特征。

[0043] 详细描述

[0044] 本公开内容涉及使用新发现的呼出气体同位素比数据的振荡来鉴定生物体(例如,人)的“不健康”状态。已经在人呼吸数据中以及健康的和不健康的状态的小鼠内毒素血症模型中鉴定了振荡模式。可以使用标准分析方法区分健康对象和不健康对象中的振荡。此外,可将本领域已知的机器学习工具应用于振荡数据并且用来将健康对象和不健康对象之间的振荡差异分类而不考虑对象的饮食。本文所用术语不健康的、患病的、以及受感染的都是指不存在“健康”的状态,其反映在呼出气体中同位素比的振荡模式的变化中。可将本文公开的方法用于临床中作为及时护理(point of care, POC)测试以确定患者的状态及他们的感染类型。此外,本方法可在兽医临床中用于对动物进行类似的测试。虽然所述方法可用于富含稳定同位素的生物体,但有利地,该方法还可对同位素非富集的个体进行。

[0045] 本文所用术语个体是指人和动物,其包括所有脊椎动物、尤其是哺乳动物,例如

狗、猫和马、以及鸟类例如鸡和火鸡。

[0046] 在一个实施方案中,本文公开的方法用于检测不健康的状态,例如个体的疾病状态或受感染的状态。对抗感染(例如起源于细菌的那些)需要迅速的蛋白质分解以供给高能量和原料需求(例如,氨基酸)用于抗体产生及其他抗感染应答。在身体组织中存储的蛋白质、脂肪以及碳水化合物的特定同位素比不同于经新陈代谢食物的同位素比,并且当通过感染诱导分解代谢状态时,身体开始消耗存储的组织,这(由于在存储的组织中的不同比值)导致呼吸(例如,呼出的 $^{13}\text{CO}_2$ 含量)中的比值变化。类似地,不同疾病状态引起蛋白质底物和新陈代谢的变化。此外,“动力学同位素效应”也受疾病或感染影响,其中分子基于其同位素重量参与不同的化学反应。如本文所示,除了同位素比的斜率的变化,还有同位素比的固有振荡模式的变化,与斜率相比其可在更短时间标度上检测。有利地,不同疾病和感染例如将以不同的方式改变同位素振荡模式,因此允许基于同位素振荡模式变化的一般诊断机制。

[0047] 在感染或对疾病状态之急性期响应的存在下,在呼吸中测量的重同位素与轻同位素之比变得更负。这意味着呼吸中轻同位素的相对量升高而重同位素的量降低。重同位素相对多度的该变化的原因是因为动力学同位素效应。分子(例如氨基酸)可用于燃料或蛋白质合成。在感染或急性疾病状态期间,最可能用于燃料从而被转化为 CO_2 的分子是不含 ^{13}C 的分子,因此在感染期间或急性疾病状态期间呼吸变得富含 ^{12}C 。含 ^{13}C 的分子与身体在一起并且用于新蛋白质的合成,例如在急性疾病状态期间所需的抗体和其他蛋白质。认为该变化是身体组织用于“燃料”(^{12}C 分子) 相比于蛋白质合成(^{13}C 分子) 增加的直接反映。在不存在感染或急性疾病状态响应的诱导的条件下,呼吸 CO_2 类似于身体中所见的同位素比。

[0048] 例如,在细菌感染期间,在感染第一小时内,通过突然释放分解代谢的细胞因子来标记对于入侵的免疫应答(急性并且涉及先天免疫系统)。这些细胞因子由肿瘤坏死因子(TNF),以及白细胞介素(IL) 1和6组成。这三种细胞因子导致身体营养物(例如氨基酸)的迅速重新分布。例如,TNF和IL-1将诱导骨骼肌的降解,导致氨基酸的释放可用于制造免疫和炎性急性期蛋白质或用作能量来源。随着氨基酸流向蛋白质合成或是作为燃料燃烧,碳同位素发生分离。

[0049] 虽然病毒感染也可诱导碳分离和更多负的呼吸碳 Δ 值,但与细菌感染起始相比时,与病毒感染早期相关的细胞因子引起不同细胞因子(即干扰素)的释放。与病毒感染相关的碳分离可产生不同模式,例如与病毒繁殖期相关的模式。

[0050] 此前已示出在细菌攻击开始之后约两小时内,同位素比量有明显变化,随后比长期相对稳定,尽管相对于未被攻击的个体发生了变化。相反地,病毒攻击的宿主表现出一系列周期性改变,开始得显著更晚(例如2至3天)。同样,在细菌感染的情况下,与病毒感染期间相比呼吸以更高速率变得“更轻”。因此,在指示病毒生命周期的比值模式下,改变的速度以及存在或不存在重复的尖峰是感染原类型的指示。

[0051] 类似于在感染中所观察到的,创伤、烧伤和外科手术也可影响对象的疾病/健康状态(特别是疾病的急性期),并且可以导致同位素比量的明显变化。同位素比量的变化及振荡应当在急性疾病期内更加突出,因为在急性疾病期期间蛋白质新陈代谢的变化更大。

[0052] 因此,可以使用呼吸中同位素比随时间的变化来确定个体的健康的/不健康的状态。然而,对人而言,可能在年度体检或于另外的患者如若去医疗机构且未抱怨疾病症状的

机会下获得对于患者基线读数。或者,第一读数可以是当患者第一次抱怨感染或疾病类型症状(例如,特别是体温升高)时。在另一个方面,可将个体的数据与相同物种的个体之群体的平均数据进行比较。

[0053] 本发明人已经出乎意料地发现,呼吸同位素比在健康的和不健康的个体中具有振荡模态,并且所述振荡模态在健康个体和患病个体中不同。这些振荡叠加在同位素比随时间的向下的斜率上。因此,通过测量呼吸中同位素比的振荡(独立于比值变化的斜率),可获得个体分解代谢状态/健康的指示。同位素比之振荡频率的测量不同于呼吸同位素比的绝对监测。测量同位素比之振荡频率的变化可有利地用来确定个体是否正从健康状态转变到不健康状态,来确定个体是否处于不健康的状态,以及来确定个体是否正从不健康状态转变到健康状态。有利地,可以在不知道处于健康状态个体的同位素比频率模式的情况下确定所述个体的不健康状态。使用振荡模态的一个优点是相比于测定斜率所需的时间周期,可以在更短时间周期内确定生物体的状态,例如35分钟相比于2小时。使用振荡模态的另一个优点是由生物体消耗的饮食不干扰检测健康状态的能力并且如果固定了健康状态,则可以对关于饮食状态的线索进行辨别。

[0054] 在本文公开的方法中,使用个体随时间的呼吸来测量其中随时间第一同位素与第二同位素的相对量,其中所述第一同位素和所述第二同位素是例如 ^{13}C 和 ^{12}C 对,但是还可替代地是 ^{15}N 和 ^{14}N 对、或 ^{17}O 和 ^{16}O 对、或硫同位素对(例如, ^{32}S 和 ^{34}S ; ^{33}S 和 ^{36}S)。

[0055] 在一个实施方案中,利用光腔衰荡光谱(cavity ringdown spectroscopy)进行相对同位素测量。在一个特定实施方案中,使用具有频繁采样(例如,每秒)的分光计进行测量,使得可以测定振荡模态。一种示例性仪器是Picarro G2101-i同位素 CO_2 分析仪。在一个实施方案中,在总时间段($t_{\text{总}}$)内测量第一同位素与第二同位素的相对量包括在时间周期($t_{\text{总}}$)内连续测量或在离散时间点(t_p)和离散时间段(t_i)内测量。离散时间段可以在健康状态($t_{\text{健康}}$)期间、不健康状态($t_{\text{不健康}}$)期间、或未知或可测试状态($t_{\text{测试}}$)期间。在一个实施方案中,测量之间的时间点(t_p)为一秒并且离散时间段(t_i)为一分钟至一小时。

[0056] 在一个实施方案中,确定个体是否正从健康状态转变至不健康状态的方法包括:

[0057] 在总时间段 $t_{\text{总}}$ 内对所述个体的呼吸进行监测并对其中第一同位素与第二同位素的相对量进行测量,其中所述个体在时间段 $t_{0-\text{健康}}$ 中是健康的,其中 t_0 是时间段 $t_{\text{总}}$ 开始的时间点,而 $t_{\text{健康}}$ 是在 $t_{\text{总}}$ 期间所述个体健康的时间点,

[0058] 在时间段 $t_{0-\text{健康}}$ 期间对所述第一同位素与所述第二同位素的相对量的健康功能振荡模式进行鉴定,

[0059] 在 $t_{\text{总}}$ 内的测试时间段 $t_{\text{测试}}$,对所述第一同位素与所述第二同位素的相对量的测试功能振荡模式进行鉴定,其中 $t_{\text{测试}}$ 与 $t_{0-\text{健康}}$ 不重叠,以及

[0060] 当所述健康功能振荡模式与所述测试功能振荡模式在振荡周期、振荡/单位时间、和/或振荡周期中的变异度不同时,确定所述个体正从健康状态转变至不健康状态,

[0061] 其中所述第一同位素和所述第二同位素选自 ^{13}C 和 ^{12}C 对、 ^{15}N 和 ^{14}N 对、 ^{17}O 和 ^{16}O 对、以及硫同位素对,并且其中测量是在时间周期 $t_{\text{总}}$ 内的连续测量或在离散时间点的测量。

[0062] 在另一个实施方案中,确定个体是否正从不健康状态转变至健康状态的方法包括:

[0063] 在总时间段 $t_{\text{总}}$ 内对所述个体的呼吸进行监测并且对其中第一同位素与第二同位

素的相对量进行测量,其中所述个体在时间段 $t_{0-\text{不健康}}$ 中是不健康的,其中 t_0 是时间段 $t_{\text{总}}$ 开始的时间点,并且 $t_{\text{不健康}}$ 是 $t_{\text{总}}$ 期间所述个体不健康的时间点,

[0064] 在时间段 $t_{0-\text{不健康}}$ 期间对所述第一同位素与所述第二同位素的相对量的不健康功能振荡模式进行鉴定,

[0065] 在 $t_{\text{总}}$ 内的测试时间段 $t_{\text{测试}}$ 对所述第一同位素与所述第二同位素的相对量的测试功能振荡模式进行鉴定,其中 $t_{\text{测试}}$ 与 $t_{0-\text{不健康}}$ 不重叠,以及

[0066] 当所述不健康振荡模式与所述测试振荡模式在振荡周期、振荡/单位时间、和/或振荡周期中的变异度不同时,确定所述个体正从不健康状态转变至健康状态,

[0067] 其中所述第一同位素和所述第二同位素选自 ^{13}C 和 ^{12}C 对、 ^{15}N 和 ^{14}N 对、 ^{17}O 和 ^{16}O 对、以及硫同位素对,并且

[0068] 其中测量是在时间周期 $t_{\text{总}}$ 内的连续测量或在离散时间点的测量。

[0069] 在一个实施方案中,确定个体是否正由不健康状态向健康状态、或健康状态向不健康状态转变的方法还包括通过测定第一同位素与第二同位素相对量的变化来确定时间周期 $t_{\text{总}}$ 内由时间 t_x 至时间 t_y 斜率的变化。

[0070] 虽然通过目测检查很容易观察到呼吸中第一同位素与第二同位素之相对量的振荡,然而振荡模式是复杂的。例如,特定模态可通过其频率容易地鉴定为“仪器噪音”-这是快速的连续测量中不确定性的结果。可将用于平滑(Savitzky-Golay滤波器,阶数=2)和分析数据的标准数学工具(例如Hilbert-Huang变换和傅立叶分析)用于去耦不同功能振荡模式并且定义振荡频率的性质。

[0071] 无论用于分解/变换数据的方法为何,用于定义健康动物的功能振荡模式将不同于不健康的动物。用于分离同位素比之振荡模式的可靠数据(使用用二阶Savitzky-Golay平滑、用Hilbert-Huang分析方法变换并且用傅立叶分析进行分析的原始数据)示出健康的患者具有功能振荡模式(例如,主导振荡)-一种所观察到的在整个测量时间并且在不同健康的动物之测量间持续的振荡模式。健康功能振荡模式的出现是定义个体健康状态的标准。使用该类型分析的呼吸中同位素比的健康功能振荡模式的迹象定义了健康的个体,以及健康功能振荡模式的变化(例如,主频的丧失)导致所述个体的不健康功能振荡模式是从健康向不健康转变的指示。而且,当所述个体从患病转变回健康时,该健康功能振荡模式恢复。定性地,在健康的个体中,由通过Hilbert-Huang变换并且通过傅立叶分析的平滑原始数据产生的功能振荡模式导致特定频率范围内之振荡的单一主频,而在不健康的个体中频率优势(frequency domination)消失,多频变得明显并且观察到振荡频率的转变。

[0072] 如本文所用,“功能振荡模式”是来源于时间周期内第一同位素与第二同位素的相对量之经平滑原始数据的分解的/变换的振荡,使得该分析产生包含至少三个振荡循环/测量周期的功能振荡模式,但是优选4个或更多个振荡循环/测量周期。在一个实施方案中,在该分析内,健康的个体具有6至7分钟的典型平均振荡周期或8.5至10个循环/小时的振荡频率。在不健康的个体中典型平均振荡周期增加至8至9分钟或6.5至7.5个循环/小时的振荡频率;这反映出在振荡的典型周期中至少10%的变化。此外,在不健康个体的通常情况下,发现相对于健康的个体存在以具有不同于健康状态(例如,10%变化)的频率的另外振荡模态之形式的振荡周期不稳定性。增加的平均振荡周期和振荡周期中增大的变异度的原因是由于不健康个体之振荡模式的破坏。根据分析方法,可基于振荡模式(经由模式识别)、平均

振荡周期、振荡循环/小时、或振荡周期中变异度的程度将健康个体与不健康个体相区分。本文所用振荡周期是定义功能模态的重复模式的一个循环的时间,或功能模态中的峰峰时间。振荡频率是每单位时间(例如,一个小时)的振荡次数。应当注意,在一个时间周期内第一同位素与第二同位素的相对量的原始数据可能具有振荡周期和振荡频率两方面都不同的多重功能振荡模式,并且第一、第二、第三等功能振荡模式可根据个体的分解代谢状态/健康上的变化而改变。除了一个或更多个主导振荡频率,该数据还可具有一个或更多个可能在区分个体健康上有用的次振荡频率。

[0073] 总而言之,功能振荡模式是定义健康个体或从其进行测量的时间 $t_{i\text{健康}}$ 值的模式。时间 $t_{\text{不健康}}$ 表示在其中个体不同于 $t_{\text{健康}}$ 的时间,即在其中个体的分解代谢状态/健康有变化的时间。而且,当个体从受感染的或分解代谢的状态变化为健康状态时,预期改变的功能振荡模式将基本回复至第一功能振荡模式。

[0074] 在一个实施方案中,第一同位素与第二同位素的相对量的第一功能振荡模式是具有6至12分钟振荡周期的低频振荡。

[0075] 在确定个体是否正从健康状态转变至不健康状态的方法中,可测量第一同位素与第二同位素的相对量的两个变化。首先,在时间 t_i 与时间 t_x 之间,第一同位素与第二同位素的相对量的功能振荡模式在频率和/或振幅发生变化。此外,第一同位素与第二同位素的相对量从时间周期(t)内 t_0 的相对量变化为时间 t_x 的相对量。这是在转变至前面已经鉴定的不健康状态后斜率的降低。因此,斜率的变化和/或功能振荡模式的变化决定了从健康向不健康的变化。本文所用在时间 t_i 和时间 t_{ix} 之间的振荡频率和/或振荡周期的变化意味着功能振荡模式的振荡周期变化和/或分裂以产生在时间 t_i 时不存在的更多频率。在一个实施方案中,处于不健康状态的个体中功能振荡模式中频率和/或频率的优势(dominance)的变化导致包含多重主频的不规则振荡模式。这样的变化可以通过使数据经过本领域已知的数学工具来检测。

[0076] 本文所公开方法的一个优点是仅测量斜率变化的现有方法相比,可在较短时间周期获取呼吸同位素数据。在一个实施方案中,时间周期 t 小于2小时、小于90分钟、小于1小时、小于45分钟、小于35分钟、小于20分钟、小于10分钟、短至5分钟。仅需要在足以建立振荡模式的时间周期内完成数据收集。在正常状况下的人和小鼠中,虽然通常30分钟是用于数据收集的适当时间周期,但是根据感染阶段、仪器的灵敏度和精确度、待用作比较模板的建立的现有数据的水平、以及其他因素(例如,早期感染可能需要更长的采样周期)可以缩短所述时间周期。

[0077] 在一个实施方案中,该方法还包括鉴定在时间周期($t_{\text{总}}$)内第一同位素与第二同位素的相对量的第二功能振荡模式,其中在时间周期(t)内的时间 t_i 和 t_{ix} 之间,所述第一同位素与所述第二同位素的相对量的所述第二功能振荡模式的频率和/或优势发生变化。

[0078] 在一个特定实施方案中,对时间周期(t)内第一同位素与第二同位素的相对量的功能振荡模式进行鉴定,其包括在时间周期(t)内对所述第一同位素与第二同位素的相对量进行分解以产生有限数目的嵌入式振荡模式(embedded oscillatory pattern),其中可以进行所述嵌入式振荡模式的分析。该过程可以通过连续地提取振荡频率来进行,其开始于来自原始数据的最低频率直至嵌入式频率具有4至15个振荡周期(循环)/小时。当使用Hilbert-Huang方法变换数据时,将所述嵌入式频率定义为固有模态(intrinsic mode)。

可使用傅立叶分析由固有模态计算功能振荡模式。所述方法还任选地包括使用模态分解来鉴定高频振荡模态(例如,大于15个循环/小时),并且在时间周期(t)对所述第一同位素与所述第二同位素的相对量的高频振荡模态进行滤波(Golay滤波器)。

[0079] 本文所用改变的功能振荡模式被定义为一个时间段内由健康的或不健康的功能振荡模式改变的或变化的振荡模式并且表明个体健康状态的变化。改变(modify)意指健康功能振荡模式在其频率和/或振荡周期方面发生变化,即健康功能振荡模式转变至更低频率或单一主频变化为具有当个体健康时振荡模式中不存在的两个或更多个振荡周期的多重频率的迹象。在一个实施方案中,改变的功能振荡模式是包含多重振荡频率的不规则的振荡模式。

[0080] 在一个实施方案中,健康的/不健康的功能振荡模式和改变的功能振荡模式独立于个体的饮食。虽然个体的饮食可影响同位素与基线测量值的相对比,但是功能振荡模式独立于饮食。这相对于饮食可潜在地影响数据解释的现有方法来说是一个明显的优点。

[0081] 在一个实施方案中,当个体从健康状态向不健康状态转变时,健康功能振荡模式的振荡周期变化大于10%。在一个特定实施方案中,当个体从健康状态向不健康状态转变时,健康功能振荡模式的振荡周期变化10%至30%。类似地,当个体从不健康状态向健康状态转变时,不健康功能振荡模式的振荡周期变化大于10%。在一个特定实施方案中,当个体从不健康状态向健康状态转变时,不健康功能振荡模式的振荡周期变化10%至30%。

[0082] 本文公开方法的一个明显优点是其可针对住院患者(例如经插管患者)以连续方式进行。这在早期脓毒症的检测中特别有利。

[0083] 为了限定非人生物体、或该生物体群体,可以以连续基础进行定期监测。或者,在总体基础上可将类似的原理应用于对公寓大楼中的人的健康进行监测。

[0084] 在另一个实施方案中,确定个体是否处于不健康状态的方法,所述方法包括:

[0085] 在时间周期($t_{\text{总}}$)内对所述个体的呼吸进行监测并且对其中第一同位素与第二同位素的相对量进行测量,其中所述第一同位素和所述第二同位素选自 ^{13}C 和 ^{12}C 对、 ^{15}N 和 ^{14}N 对、 ^{17}O 和 ^{16}O 对、以及硫同位素对,

[0086] 在时间周期($t_{\text{总}}$)内对所述第一同位素与所述第二同位素的相对量的功能振荡模式进行鉴定,并且将所述个体的所述功能振荡模式与已知健康/或不健康的参考群体内的平均功能振荡模式进行比较,以及

[0087] 当个体的功能振荡模式变化与健康/或受感染的参考群体的平均功能振荡模式在频率和/或振幅方面不同时,确定所述个体处于不健康状态。

[0088] 理想地,参考群体应由每一群体内(健康的 $n > 5$ 位个体,以及不健康的 $n > 5$ 位个体)的至少6位个体构成。用于将受试个体与参考群体进行比较的数据可包括原始数据和/或经平滑和分解的数据。可使用许多工具来比较测试数据与参考群体,其包括分析方法或模式识别算法。

[0089] 在又一个实施方案中,确定个体感染之严重程度的方法包括:

[0090] 在时间周期(t)内对所述个体的呼吸进行监测并对其中第一同位素与第二同位素的相对量进行测量,其中所述第一同位素和所述第二同位素选自 ^{13}C 和 ^{12}C 对、 ^{15}N 和 ^{14}N 对、 ^{17}O 和 ^{16}O 对、以及硫同位素对;

[0091] 在时间周期(t)内对所述第一同位素与所述第二同位素的相对量的功能振荡模式

进行鉴定,以及

[0092] 测定健康的和/或受感染的参考群体的平均功能振荡模式与所述个体的所述功能振荡模式之间相比的任何差别,

[0093] 其中所述个体的所述功能振荡模式与所述参考群体的所述平均功能振荡模式之间的差别程度确定了感染的严重程度。

[0094] “差别的程度”依赖于模式比较的方法。如果计算分析允许定量评估,则基于p值(概率)统计上定义差别的程度,其中相同的概率越低,感染的严重程度越大。如果“差别的程度”不能以定量方式计算,那么严重程度是用来定义平均群体的响应范围的函数。个体越吻合同样严重程度的已知受感染群体之振荡模式的范围,个体越与严重性程度相匹配。

[0095] 本文示例了两种用于区分健康的和不健康的非限制性方法。利用本文所述的一般框架使用本领域已知的算法可以沿着类似的方向构造其他方法。根据该应用,可本质上连续地在感染前和感染后(例如,在医院/手术环境中)进行监测,可仅在事件后进行监测(例如,在更广的临床环境中),其中与参考群体的比较是可能的,并且除了事件后数据,以前(例如,一个月以前)为患者(例如,减重患者)收集的事件前数据也可用。这些应用主要通过其产生的输出而非通过对输入进行处理的方法来区别。在可进行连续的监测(前/后方法)的情况下,可产生连续的迹线并且将其与“阈值”相比较,其中交叉表明“状态变化”-例如,从健康到患病。也就是说,当可得到连续的数据流时(例如,超过约35分钟),可产生连续的输出或数值指标(例如,概率)流。在临床环境中,与此相反,输出可以是具有相关置信值的二进制值(例如,患病对健康)。也就是说,输出可以是单一指标而非多个值。群体值以及患者自身的变化范围定义健康对非健康状态的“带(band)”。在任意时间点上,振荡的当前模态位于“值的带”的一些地方。这些值接近该带之“健康边缘”或该带之“不健康边缘”的程度定义了转变至健康或患病的概率。

[0096] 以下实验数据用作该申请的基础。第一,来自健康人个体的数据示出当对数据进行分解或分析时,碳同位素比存在振荡模式(图1)。该振荡模式独立于CO₂浓度(图2)和机器噪声(图3)。第二,使用小鼠内毒素血症模型来研究由于感染的碳同位素比振荡的变化(图4)。当使用标准Savitzky-Golay滤波器(阶数=2)对来自小鼠模型的原始数据进行归一化并平滑时,振荡模式明显是非线性的,但是健康个体与患病个体之间在视觉上可区分(图5)。第三,使用另一种分析方法(Hilbert-Huang变换)示出可将经归一化和平滑的数据分解以可视地提供用于解析分析的嵌入式振荡模式(图6)。第四,经分解之振荡数据的傅立叶分析示出区分未经感染动物与经感染动物的能力(图7)。第五,使用不同的分析程序,其中将个体的振荡数据与已知健康的参考群体和经感染群体进行比较,不仅可以确定所述个体的健康状态,而且可测定环境因素,例如已知来改变呼吸同位素比的饮食并不干扰区分健康小鼠与经感染小鼠的能力(图8、图9和图10)。

[0097] 通过以下非限制性实施例对本发明进一步说明。

实施例

[0098] 实验方案

[0099] 小鼠研究:用细菌内毒素(LPS)感染小鼠,并且经由光腔衰荡光谱对其呼吸中稳定的同位素比的变化进行监测,使用Picarro G2101-i同位素CO₂分析仪并且每秒采样。所述

内毒素是来自革兰氏阴性细菌之细胞壁的糖脂成分,其诱导称为急性期响应的强炎症反应,其是感染的标志。通常于呼吸中在范围为0.1%至4%的CO₂浓度下测量同位素比。

[0100] 将八周龄的雄性BALB/c鼠保持12小时的昼/夜循环,并且允许随意获得食物和水。将小鼠随机分配至低(1mg/kg)脂多糖(LPS)或高(5mg/kg)脂多糖(LPS)或假(盐水)注射的三组之一。将小鼠在上午9:45逐次放置于新陈代谢室(一只/天)。将通过该室的气流保持在一定速率使得CO₂浓度不超过0.5%。使用Picarro G2101-i同位素CO₂分析仪经由侧流对碳 Δ 值(即¹³CO₂/¹²CO₂比)连续地(即约每秒一个数据点)进行测量。在上午11:45小鼠接受盐水中1或5mg/kg体重的脂多糖(LPS)或者仅盐水的腹膜内注射。在每一天下午3:45结束时将小鼠从所述室中取出。

[0101] 实施例1:健康的人的呼吸示出 Δ 振荡

[0102] 指示健康的禁食的人在佩戴密封面具的同时在桌旁静坐。所述面具由具有去除所有过滤器的工业挥发性有机化合物面具以及将所述面具连接至iCO₂分析仪的1/4英寸聚乙烯管组成。将从所述面具呼出的气体与无CO₂空气(零级空气)混合使得最终CO₂浓度为大约1000ppm。每天至少一个小时对测量值进行收集。从Picarro G2101-i同位素CO₂分析仪获得连续的数据(样品/秒)。使用标准Savitzky-Golay滤波器(阶数=2)对该数据进行平滑。

[0103] 为了验证振荡的目视观测,进行Hilbert Huang变换并且通过提取其他嵌入式振荡模式来辨别嵌入的振荡模式(模态)。第一模态和第二模态代表具有长振荡周期(30至60分钟)的振荡的第一提取和第二提取并且此处并不使用。这些更长循环模态基于来自当前仪器的数据未示出健康与患病之间的可辨别差别。此外,因为使用长振荡周期收集重复的振荡循环延长了评价振荡模式所必需的时间(换言之,相对于现有斜率技术,长振荡模式的使用不缩短用来检测感染状态的窗口)。将提取的第三和第四模态叠加并且在可视地检查振荡的存在。该结果示于图1中。示出了通过来自30分钟(0.5小时)采集的健康的人呼吸样品的经平滑振荡数据之Hilbert-Huang变换产生的模态3和模态4的和。选择模态3和模态4用于另外的分析,因为它们具有容许4至15次振荡/小时的振荡周期,也就是说,模态3和模态4是功能振荡模式。该分析示出人表现出 Δ 值中的振荡模式。每一实心水平条始于“第一关键”峰并且连续至随后的“第一关键”峰。在每一对关键峰之间有两个“标记”峰。三重峰形成重复特征(或模式)。该峰峰时间是一个振荡周期。物理的Y轴大概遵照 Δ 同位素的大约标度。该图是无标度的,因为其使用Hilbert-Huang变换的两种模态的叠加产生。

[0104] 存在这样的可能性,观察到的振荡是仪器、背景、实验设置、或表现出振荡行为的人(和小鼠)的CO₂产物的人为产物。我们测试了CO₂水平与 Δ 值之间的相关性(图2)。如所示,该相关性实际是零,意味着CO₂振荡与 Δ 值振荡之间实际没有关系。

[0105] 数据从背景(无生物体的室)和房间数据收集。所述数据示出较小的变化(小于0.5ppm)。所述变化与振荡模式不一致并且振幅显著地更小(图3)。

[0106] 一起考虑,该数据证明:1)人中存在 Δ 值的振荡,以及2)它们不是装置使用或CO₂的人为产物。

[0107] 实施例2:小鼠呼吸示出LPS处理后的 Δ 振荡变化

[0108] 首先将连续获得的数据与前面收集的数据进行比较以确保已经保留了LPS处理后建立的降低的(更加正的)碳同位素 Δ 值。该步骤作为用于更快采样和数据处理的方法的对照。特别地,通过使用前述仪器已经建立了LPS后同位素比的下降趋势。本仪器允许对经注

射LPS的小鼠的相同下降趋势进行检测(图4)。与其中每15分钟测量 Δ 值的前述测量相比,图4示出的数据使用其中每秒测量 Δ 值的新一代同位素监测得到。该图证明当使用新仪器时可观察到前面所观察的下降趋势。更重要地,该新数据表明在呼吸中存在可能在区分对照与LPS注射中有用的振荡模式。数据是具有第一时间点的在注射=0小时的大约一小时的周期。

[0109] 接着检查来自图4的数据以检查如图5所示的振荡模式的存在。根据在以下数据归一化部分中定义的步骤来进行数据归一化。数据归一化的一个特别的方面(平滑步骤)降低了数据背景中的噪声。针对所有小鼠可视地检查数据以检查振荡模式的存在。如上述实验1所描述,所有小鼠在LPS注射前和后都存在振荡模式。

[0110] 在归一化和平滑后仔细(close up)的可视检查示出复杂振荡的存在。在图中对所有小鼠LPS注射前15分钟周期内的数据示出关于水平轴:“标度的时间”以及垂直轴:“同位素 Δ 比”。

[0111] 因为该数据包含似乎结合多重模态的复杂振荡模式,将Hilbert-Huang变换应用于对这些模态进行去耦。该经去耦的模态进一步说明了振荡的存在。特别地,将总计七个模态去耦并且基于4至15次振荡/小时的存在通过傅立叶方法来选择2个模态作为功能振荡模式用于进一步分析。图6示出对6只小鼠所选择的模态。这两个模态展现了在LPS前和后显著经改变的行为。用于分类的标准计算算法将能够根据生物体的状态(健康的、LPS等)分离这些振荡模式。

[0112] 图7是对健康的和注射了LPS的小鼠通过(经归一化振荡数据的)Hilbert-Huang变换产生4至15循环/小时的频率模态的“30分钟”时间段的傅立叶分析。X轴是归一化的且任意的,其中振荡/单位时间的频率随着标度增大而增大。Y轴是无标度Hilbert-Huang y轴的变换。健康的小鼠的近似频率是7分钟。注射了LPS的小鼠具有于10分钟时出现的分裂频率外加更低频率。

[0113] 该分析示出处于健康状态的生物体具有至少一个具有许多辅频的功能振荡频率。在上述小鼠的情况下,当小鼠健康时出现接近7分钟功能振荡频率。当用LPS干扰时,七分钟的功能振荡频率分裂、以及出现更低频率、改变的振荡频率(例如,十分钟)。这是LPS注射后非常快出现的体内稳态破坏的强指示。使用本分析,每一生物体(表型)呈现其自身模型,在所观察的数据中具有其自身的“噪声”。非线性的Hilbert-Huang不为频率选择性-其是模态选择性的并且当与傅立叶分析结合时在动物健康变化的检测中是有用的。

[0114] 实施例3:用时间序列分类的替代分析(alternative analysis)

[0115] 接着,使用不同的方法对患病的和健康的生物体(包括饮食变化)进行分析和分类。该替代方法的使用表明a) 尽管观测的数据具有天然变异度,该振荡数据清楚地将健康与患病相区分,以及b) 该分析方法不是很重要,并且可以使用在本领域中已知的其他方法。存在振荡的基本观察并且其以可检测的方式变化是更重要的方面。

[0116] 本文建立的方案基于通常为时间序列分类所设计的算法的集合。时间序列分类是旨在暂时地对可能变化长度的结构化数据进行标识的监督的学习方法。已经将许多应用自然地形成时间序列分类的形式。例如,医疗诊断中的ECG图表的指数是类似应用的一个实例。该方案的部分使用概念上类似的算法。然而,总体方案在数个应用特定方式上不同,其适合于我们诊断方法的性质。

[0117] 在建立用于数据分析的方案中,应当考虑以下诊断情景。患病的患者或患病的生物体的监测可在任意时间开始。在监测开始时,目标动物或患者可以是健康的或患病的。如果所述目标是患病的,从目标已经患病的时间长度一般是未知的。目的在于从目标短周期内收集数据并且判定所述目标是患病的还是健康的。该情景不排除数据的更长周期的收集或延长的连续监测。对诊断而言短时间窗口建立了阈值时间(最少时间)。更长时间可改进诊断测试的灵敏度。

[0118] 已经建立了同位素比的振荡趋势的存在,定义用于对具有不同振荡模式的比值进行确定和分类的分析过程。

[0119] 为了保持表述清楚,数据的讨论将在使用原始形式的来自仪器的数据的隐含假定下进行。在算法描述中进行关于该数据变换的细节的必要叙述。这些变换将不影响前述步骤中描述的方法学或过程。可将来自小鼠的现有数据表示为一组用标记注解的时间序列: $D_1 = \{(x_k, i_k) \in X \times I\}$ 。在该组中, X 是时间序列(矢量),并且 i 是指示生物体状态(例如,患病的或健康的)的标记。所述组的标记 I 用来指示可用于区分生物体多种状态之替换组的下标。时间序列矢量由在比规定周期更长的时间跨度内收集的并且以充分速率采样的同位素比组成。时间周期的一个实例是35分钟,且采样速率的一个实例是每30秒一次。初始组用于构造估计量 f 的目的。通过表明它们如何不同于基线组,函数 f 评估新时间序列矢量(未来)的值。特别地,作为一个实例,给定的规定长度的未来数据组 y 、估计量 $f(y)$ 将提供患病的(或健康的)的值连同给定的概率 p (对健康而言为 $1-p$)。图8与图4是相同的。对于每一模拟运行30分钟窗口的组是随意选择的(使用伪随机数生成器)。图8中黑框的组示出该随机选择的一个实现(未清晰示出所有窗口-否则黑窗口将覆盖该图)。

[0120] 一旦构造了 f ,基于新时间序列矢量 y 的生物体的状态的评估是简单的- $f(y)$ 提高具有概率 p 的状态。当 $f(y)$ 改变(例如,概率 p 在阈值之下减小)时,则生物体发生了状态变化。虽然概念上简单,但是算法在实践中利用了一系列预处理步骤。在下文中对这些步骤进行讨论。

算法:预处理数据(用于学习 f 以及计算 $f(y)$)

[0121]	输入: x ; 输出 x	% 和 x 一样大小的新矢量
	平滑 x	% 应用于原始数据的平滑核 (kernel)
	变换 x	% x 的频谱变换—例如傅立叶
	相位 x	% 信号的相位被调节至参考相位

[0122] 经预处理的数据是构造计算函数 f 的基础。虽然我们通常将此称为 f -但是通过构造,该结果是在多重阈值下于给定的矢量 y 评估 f 从而获得概率之函数的分层总体(stratified ensemble)。

算法：学习 f

输入：信号和类的组 $\{x, i\}$ ；输出： f

预处理所有数据 $\{x\}$

[0123]

集合 $D = \{(x_k, i_k) \in X \times B\}$

解决以下最优化问题 (参见下面的算法)。

最小化 $D[f] = \sum_{Card(\{x\})} |i_k - f(x_k)| p_k - \lambda \|f\|_{ps}$

将结果保存为 f 的定义

[0124] 图9示出作为2D平面上的点之时间序列的更低维度投影。估计量 f 作用于70维的时间序列数据。通过利用使用数据的可替代的随意窗口采样的许多估计量来产生概率。保持采样运行以用于随后的交叉验证。

[0125] 决策函数 (decision function) 使用构造 f 来评估任意的新时间序列 y 。输出分配权重 (概率) 至每一 (二进制) 状态。我们注意到在连续的测量中, 可使用运行的概率值来确定逐渐的状态改变。

算法：决策 y

[0126]

输入： y, f ；输出： p, i ；

应用 $p, I = f(y)$ ；

[0127] 在图10中, 进行了一个实验, 其中对小鼠饲喂两种具有不同同位素比的饮食。对呼吸同位素振荡模式进行测量。示出了使用来解决问题的算法, 将来自饲喂每一种饮食之小鼠的数据进行混合并测试以辨别这些健康小鼠是否可以与注射有内毒素 (患病的) 的小鼠区分开。如将预测的, 对来自饲喂不同饮食的小鼠的经混合数据做无饮食的同位素水平的标度 (饲喂其各自饮食的小鼠的健康的呼吸之间的中间), 但是明显不同于患病小鼠。这些数据证实, 饮食在基于呼吸同位素的振荡模式区分个体的健康中不是困扰因素。

[0128] 除非本文另有指明或与上下文明显矛盾, 否则没有数词限定的表述以及类似的指代词 (尤其在下面权利要求书的上下文中) 意指涵盖单数和复数两者。本文中使用的术语“第一”、“第二”等不意味着任何特定顺序, 而仅便于表示例如多个层。术语“包括”、“具有”、“包含”和“含有”意指开放式术语 (即意味着“包括但不限于”), 除非另有说明。数值范围的叙述仅意在作为单独地指落入该范围内的各独立值的速记方法, 除非本文另有指明, 且将各独立值并入说明书中, 如同其在本文中单独叙述一样。所有范围的端点包含在该范围内, 而且可以独立组合。文中描述的所有方法均按合适的顺序进行, 除非本文另外指明或与上下文明显矛盾。任何和全部实例或示例性用语 (如“例如”) 的使用仅意在更好的说明本发明, 而非对本发明范围予以限制, 除非另有要求。说明书中任何语言均不应解释为表示对于本文所用本发明的实践而言必要的任何未要求的要素。

[0129] 虽然已经参照一个示例性的实施方案对本发明进行了描述, 但是本领域技术人员应该理解的是, 可在不偏离本发明范围的情况下做出多种变化并可用等同方案来替代其要素。此外, 可以在不脱离其基本范围的情况下进行许多改变以使特殊情况或材料适应本发

明的教导。因此,本发明的目的不限于作为实施本发明所期望的最佳模式而公开的特定实施方案,而是本发明将包括所有落入所附权利要求书范围内的所述实施方案。本发明涵盖上述要素以其所有可能变化的任何组合,除非本文另有说明或者与清楚地与上下文明显矛盾。

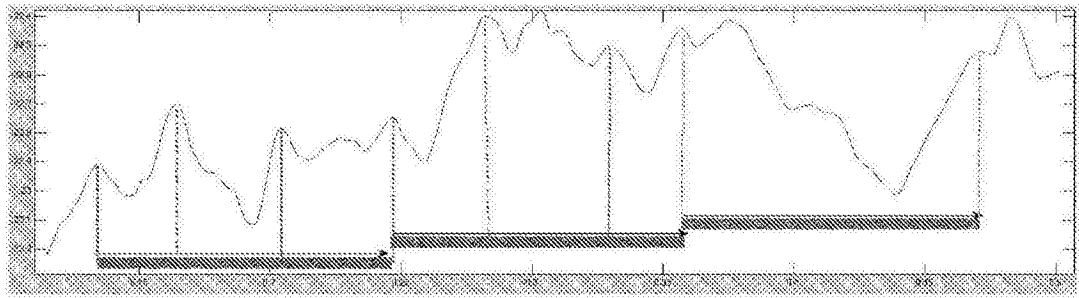


图1

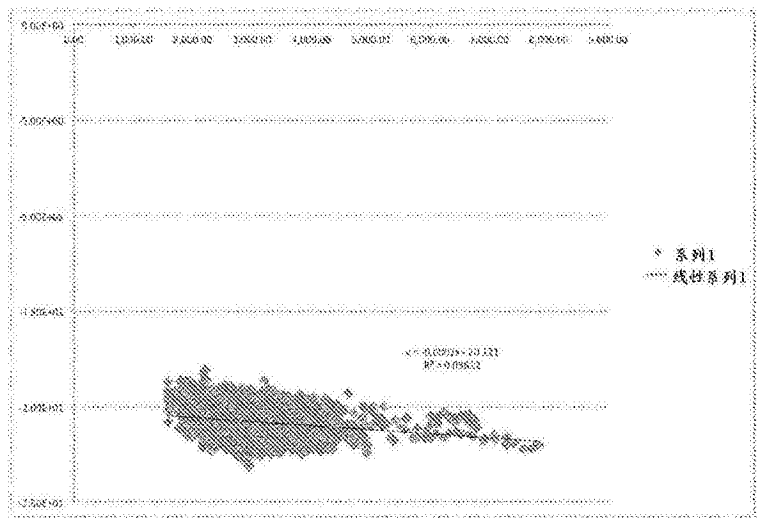


图2

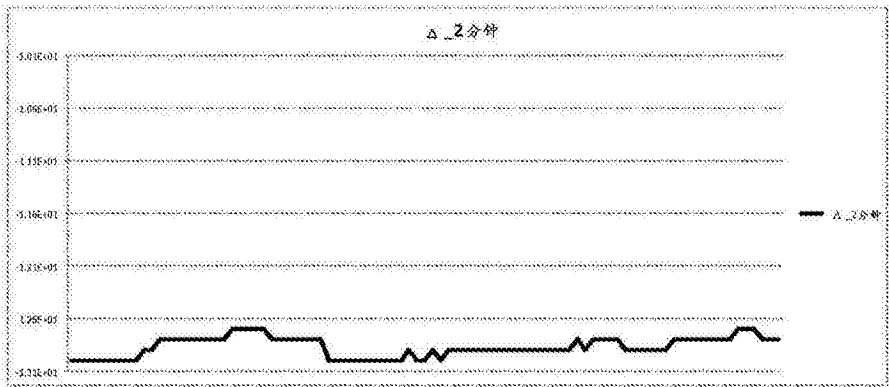


图3

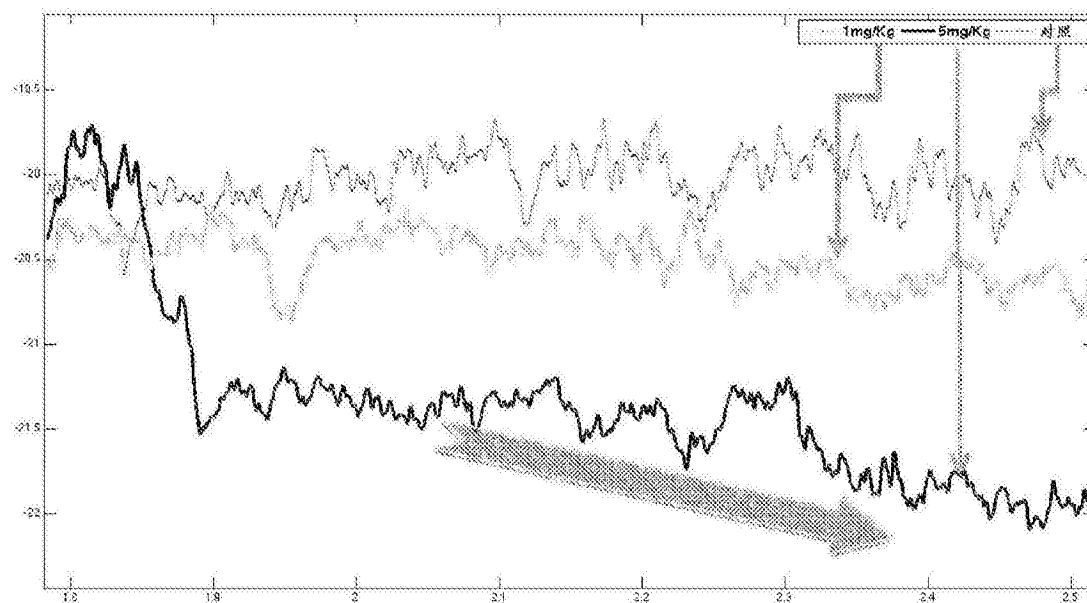


图4

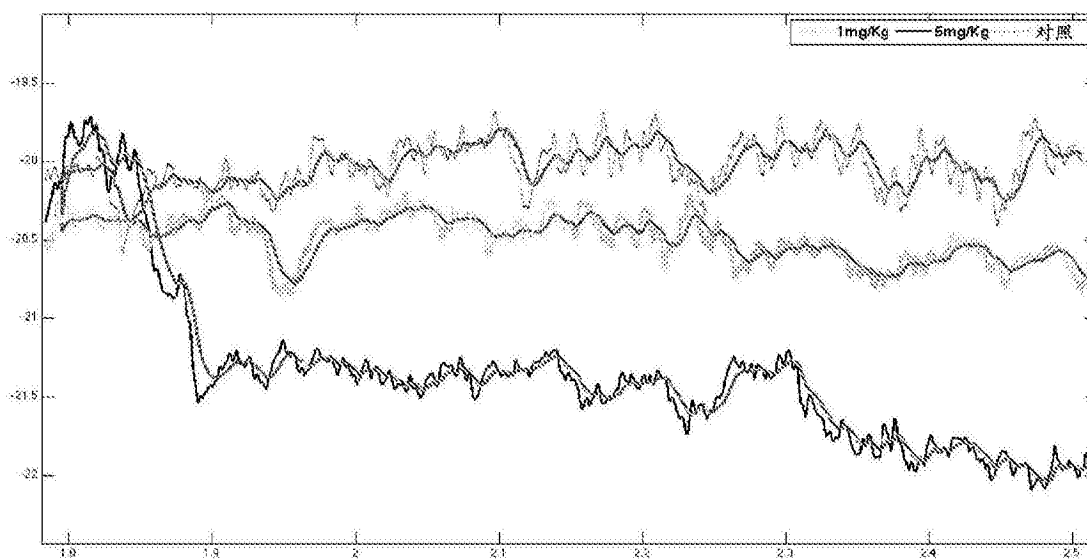


图5

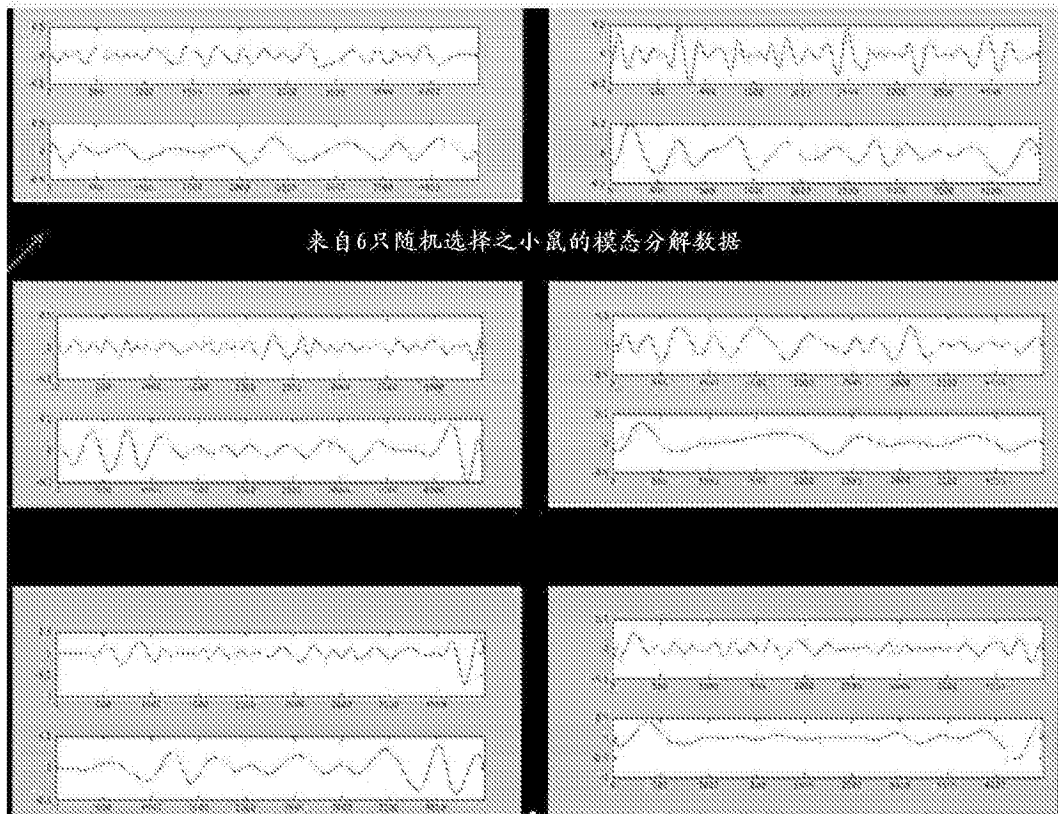


图6

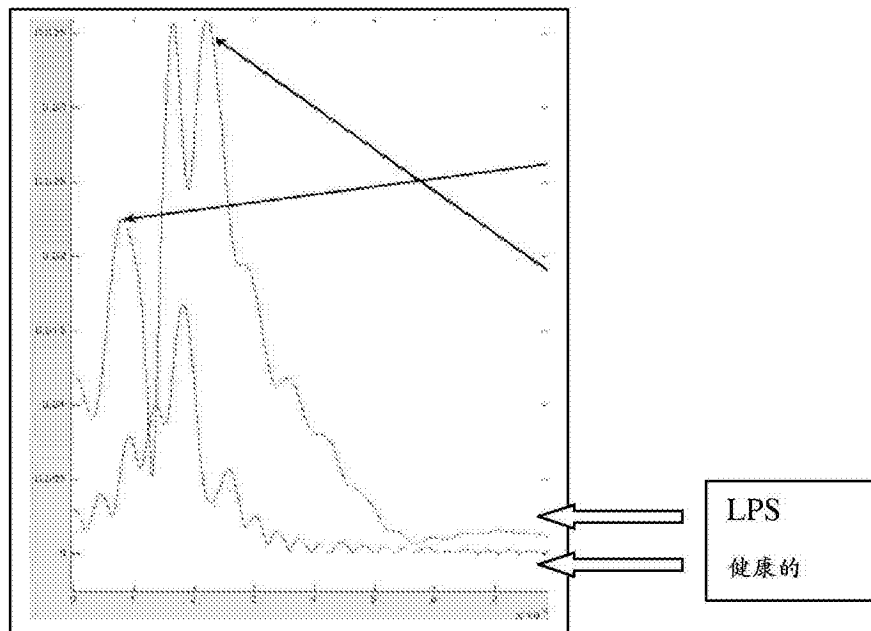


图7

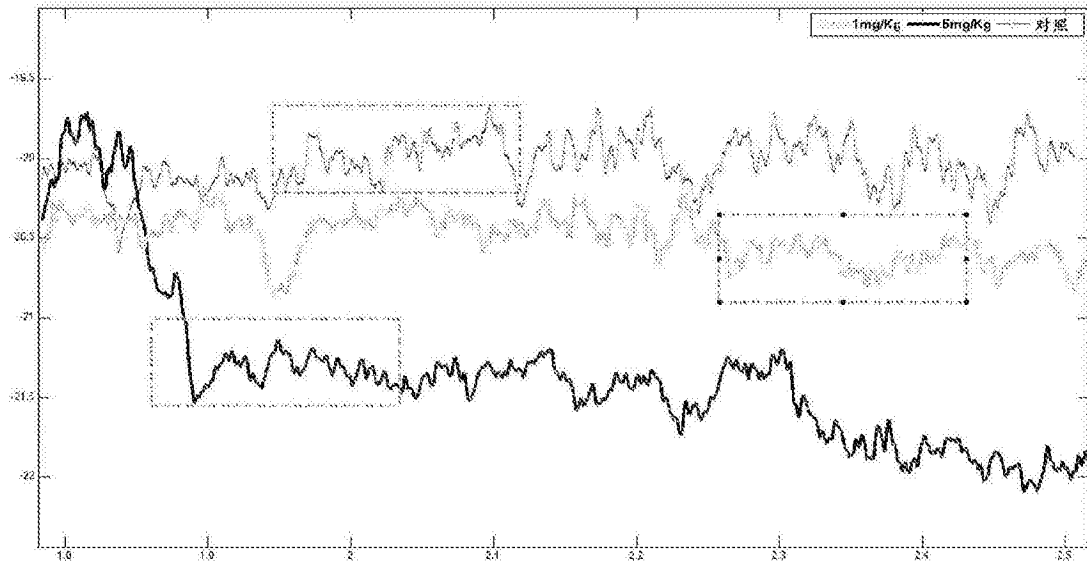


图8

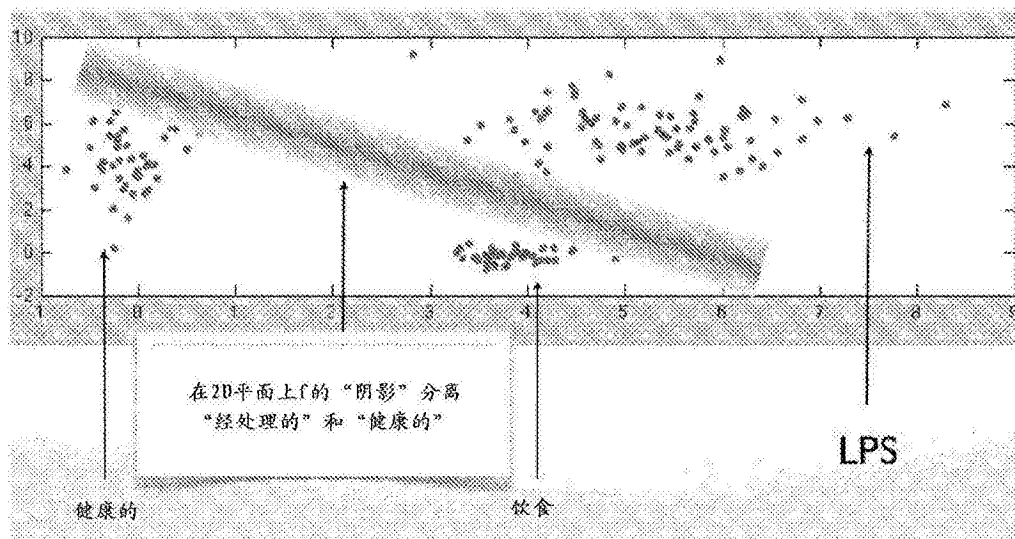


图9

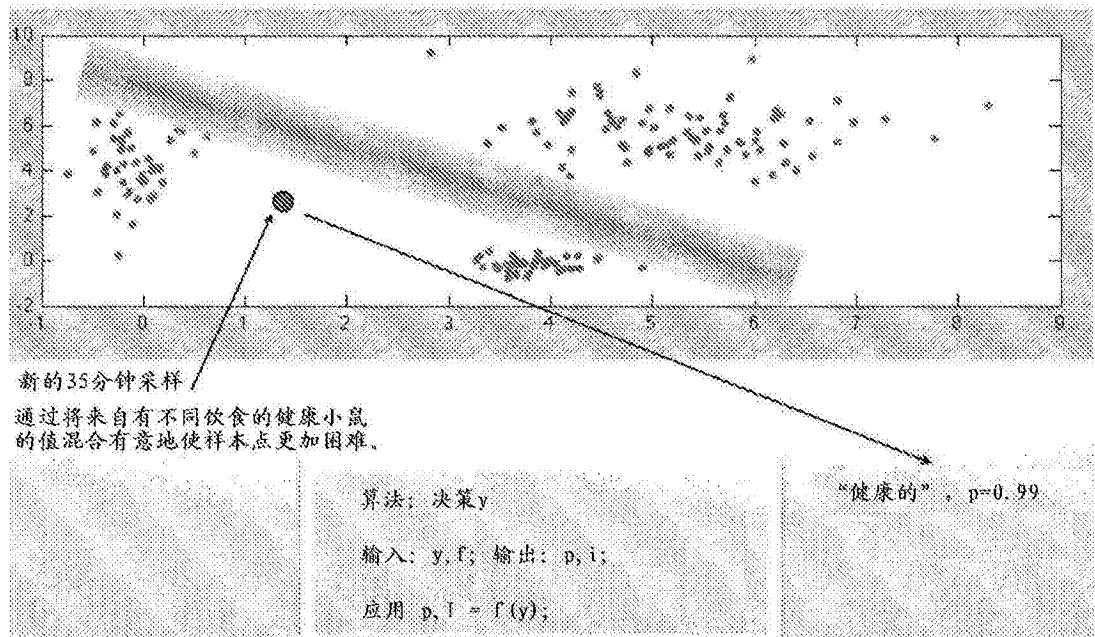


图10