

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



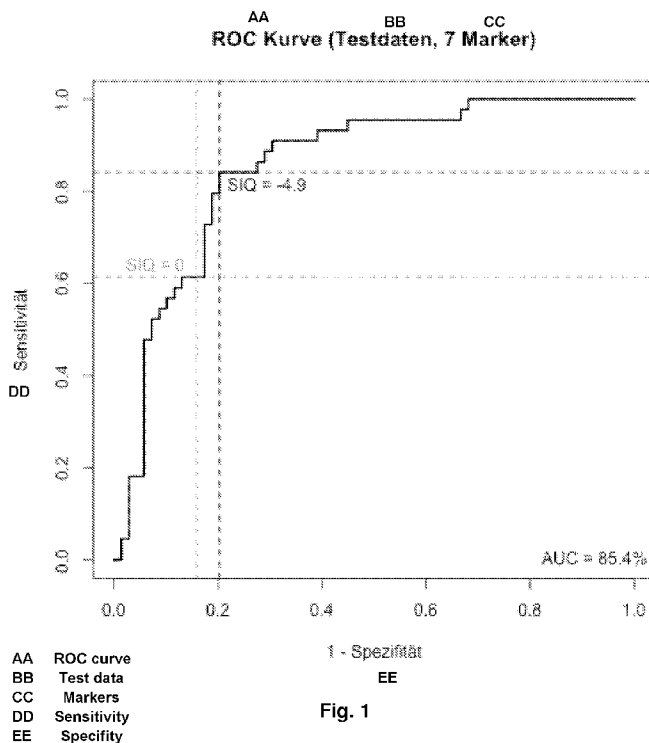
(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
31. März 2011 (31.03.2011)

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2011/036091 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation:
C12Q 1/68 (2006.01)
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2010/063659
- (22) Internationales Anmeldedatum:
17. September 2010 (17.09.2010)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
10 2009 044 085.2
23. September 2009 (23.09.2009) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): SIRS-LAB GMBH [DE/DE]; Winzerlaer Straße 2, 07745 Jena (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MÖLLER, Eva [SK/DE]; Am Wiesenbach 11A, 07751 Jena (DE). WLOTZKA, Britta [DE/DE]; Holzheienstr. 9d, 99084 Erfurt (DE). RURYK, Andriy [UA/DE]; Am Herrenberge 7 / 502, 07745 Jena (DE).
- (74) Anwalt: WINTER BRANDL FÜRNISS HÜBNER RÖSS KAISER POLTE; Alois-Steinecker-Str. 22, 85354 Freising (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

- (54) Title: METHOD FOR THE IN VITRO DETECTION AND DIFFERENTIATION OF PATHOPHYSIOLOGICAL STATES
- (54) Bezeichnung : VERFAHREN ZUR IN VITRO ERFASSUNG UND UNTERSCHIEDUNG VON PATHOPHYSIOLOGISCHEN ZUSTÄNDEN



(57) Abstract: The present invention relates to the use of defined polynucleotides for forming at least one multigene biomarker for producing a multiplex assay as an aid for the in vitro detection and/or early detection and/or differentiation and/or sequence observation and/or evaluation of pathophysiological states of a patient, wherein the pathophysiological state is selected from the group comprising: SIRS, sepsis, and the severities thereof; sepsis-like states; septic shock; bacteremia, infectious/non-infectious multiple organ failure; early detecting of said states; focus control; control of surgical removal measures of the infection focus; responder/non-responder for a particular therapy; therapy monitoring; differentiating between infectious and non-infectious genesis for systemic reactions of the organism, such as SIRS, sepsis, post-operative complications, chronic and/or acute organ dysfunction, shock reactions, inflammation reactions, and/or trauma.

(57) Zusammenfassung:

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2011/036091 A1



SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eingehen (Regel 48 Absatz 2 Buchstabe h)

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)

— mit dem Sequenzprotokollteil der Beschreibung (Regel 5 Absatz 2 Buchstabe a)

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von definierten Polynukleotiden zur Bildung wenigstens eines Multigenbio-markers zur Herstellung eines Multiplex-Assays als Hilfsmittel zur in vitro Erfassung und/oder Früherkennung und/oder Unterscheidung und/oder Verlaufsbeobachtung und/oder Beurteilung von pathophysiologischen Zuständen eines Patienten, wobei der pathophysiologische Zustand ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: SIRS, Sepsis und deren Schweregraden; sepsisähnlichen Zuständen; septischem Schock; Bakteriämie, infektiösem/nicht-infektiösem Multiorganversagen; Früherkennung dieser Zustände; Fokuskontrolle; Kontrolle von chirurgischen Sanierungsmaßnahmen des Infektionsfokus; Responder/non-Responder für eine bestimmte Therapie; Therapiekontrolle; Unterscheidung zwischen infektiöser und nicht-infektiöser Genese bei systemischen Reaktionen des Organismus, wie z.B. SIRS, Sepsis, postoperative Komplikationen, chronischem und/oder akuter Organdysfunktion, Schock-Reaktion, Entzündungsreaktion und/oder Trauma.

Beschreibung

Verfahren zur in vitro Erfassung und Unterscheidung von pathophysiologischen Zuständen

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur in vitro Erfassung und/oder Früherkennung und/oder Unterscheidung und/oder Verlaufsbeobachtung von pathophysiologischen Zuständen gemäß Anspruch 1, die Verwendung von wenigstens drei Polynukleotiden zur Bildung wenigstens eines Multigenbiomarkers zur Herstellung eines Multiplex-Assays als Hilfsmittel zur Beurteilung, ob bei einem Patienten ein pathophysiologischer Zustand vorliegt, und/oder zur Feststellung des Schweregrades und/oder zur Früherkennung und/oder zur Unterscheidung und/oder Verlaufsbeobachtung von pathophysiologischen Zuständen gemäß Anspruch 5, eine Verwendung gemäß Anspruch 12; Primer zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens gemäß Anspruch 16, sowie einen Kit zur Durchführung des Verfahrens gemäß Anspruch 17.

Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung von Polynukleotiden zur Erfassung von Genaktivitäten von mindestens einem Multigenbiomarker, zur Herstellung eines Hilfsmittels zur Diagnose bei Patienten mit bestimmten pathophysiologischen Zuständen, wie beispielsweise Sepsis und Sepsis-ähnliche Zuständen, mit ähnlichen Merkmalen wie ein „In Vitro Diagnostic Multivariate Index Assay“ (IVDMIA).

Sepsis („Blutvergiftung“) ist eine lebensbedrohliche Infektion, die den gesamten Organismus erfasst. Sie ist mit hoher Sterblichkeit verbunden, kommt immer häufiger vor und erfasst Menschen in jedem Lebensalter. Sepsis gefährdet den medizinischen Fortschritt in vielen Bereichen der Hochleistungsmedizin und verbraucht einen Großteil der Ressourcen im Gesundheitswesen. Die Sterblichkeit der schweren Sepsis hat sich in den letzten Jahrzehnten nicht entscheidend verbessert. Die letzten beiden Innovationssprünge nach Einführung der Blutkultur (ca. 1880) waren die Einführung der Antibiotika vor über 60 und der Beginn der Intensivmedizin vor etwa 50 Jahren. Um heute ähnlich entscheidende Behandlungsfortschritte zu erzielen, müssen neuartige Diagnostika zur Verfügung gestellt werden.

Sepsis wird durch Infektionserreger verursacht. Da es bislang keine spezielle Therapie gegen die Sepsis gibt, hängt der Erfolg der Behandlung weitgehend von der erfolgreichen Bekämpfung der zugrunde liegenden Infektion und der Qualität der intensivmedizinischen Behandlung ab. Entscheidend für das Überleben ist die frühzeitige Gabe eines Antibiotikums, das außerdem den verursachenden Erreger erfolgreich bekämpft [Kumar et. al., 2006]. Defizite der Sepsis-Diagnostik verzögern jedoch den Therapiebeginn und die Wahl eines geeigneten Antibiotikums. Da die Identifizierung des Sepsiserregers mit den derzeitigen Methoden der Blutkultur nur in weniger als 25 % der Sepsisfälle gelingt und die Befunde im Fall des Erregernachweises erst nach 2-3 Tagen vorliegen, muss die initiale Wahl des Antibiotikums oder Antimykotikums (gegen Pilze gerichtete Substanzen) „kalkuliert“, d.h. auf Verdacht gewählt werden. In 20 - 30 % der Fälle ist diese Wahl nicht richtig.

Weitere Ursachen für die Verzögerung der Therapie liegen in der Fehlinterpretation der Krankheitssymptome und Laborwerte. Verbesserte Diagnostika, die die Sepsisdiagnose vereinfachen und beschleunigen, können zu einer erheblichen Reduktion der Sepsissterblichkeit und Verkürzung ihrer Behandlungsdauer beitragen. Medizinische Fachgesellschaften bestätigen die Defizite der bisherigen Sepsis-Diagnostik in Umfragen unter nordamerikanischen und europäischen Intensivmedizinern [Marshall et. al., 2003]. Auch die Betroffeneninitiative „Deutsche Sepsis Hilfe e.V.“ und der Deutschen Sepsis-Gesellschaft beklagen die Defizite.

Im Zuge der Entwicklung marktreifer in-vitro-Diagnostika aus dem Bereich molekularer Diagnostik wurde am 26.7.2007 ein Richtlinienentwurf der Food and Drug Administration (FDA) der Vereinigten Staaten von Amerika veröffentlicht. Diese Richtlinie liefert Empfehlungen, Definitionen und Anhaltspunkte für den Entwicklungs- und Zulassungsprozess. Weiterhin werden Spezifikationen für die neue Klasse der „in vitro-diagnostischen multivariaten Index-Assays (IVDMIA)“ vorgeschlagen. Kennzeichen dieser Assays sind:

- 1) Die Kombination von mehreren Einzelwerten mittels eines Interpretationsschrittes, um einen einzelnen patientenspezifischen Ausgabewert in Form eines Index, Score oder einer Klassifikation zu erhalten. Dieser Wert ist für

diagnostische Aussagen, zur Schadensbegrenzung, Behandlung oder Vorbeugung einer Krankheit einsetzbar.

2) Das erreichte Ergebnis ist von den Messwerten in einer Weise abgeleitet, die keine Rückschlüsse auf die eigentlichen Messdaten erlaubt. Daher kann das Ergebnis vom End-Anwender nicht bestätigt bzw. nachvollzogen werden.

3) Dadurch ist es notwendig, dem Anwender alle Informationen zur Interpretation des Testergebnisses zur Verfügung zu stellen.

Eine Infektion ist mit den Merkmalen Aufnahme von Pathogenen, deren Vermehrung im Organismus und der damit verbundenen Auslösung von pathophysiologischen und symptomatischen Reaktionen verbunden. Im Unterschied dazu liegen bei einer Kolonisierung keinerlei Krankheitssymptome des Wirts-Organismus vor.

Infolge einer Infektion kommt es innerhalb des Körpers zu einer Konfrontation zwischen den Pathogenen und der körpereigenen Abwehr. Bei der unspezifischen Abwehr handelt es sich um körpereigene, keimschädigende Substanzen, die im Blut gelöst sind (humoral) sowie um Granulozyten und Makrophagen, die begrenzt in der Lage sind, Eindringlinge, Fremdkörper und Zelltrümmer zu beseitigen. Das Wirkprinzip der spezifischen Abwehr besteht darin, Fremdkörper und Pathogene mit im Blut zirkulierenden Antikörpern zu markieren, um sie anschließend durch T-Lymphozyten vernichten zu lassen.

Bei der Ausbreitung eines Pathogens können mehrere krankheitserzeugende Prozesse initiiert werden. Zum einen werden Abwehrreaktionen wie z. B. Fieber, Gefäßerweiterungen und/oder Einkapselungen ausgelöst. Es kann zu einer Schädigung oder Zerstörung von Geweben, Organen oder Organsystemen z. B. Multiorganversagen (MOV) kommen. In Abhängigkeit vom Pathogen kann der Erreger Gifte, Exotoxine, absondern, die zu teilweise heftigen Reaktionen der Wirtsantwort führen. Eine andere Möglichkeit besteht darin, dass sich Erregerbestandteile, sogenannte Endotoxine, im Falle einer Keimabtötung wie ein Gift auswirken können.

Bei einer Beschränkung des Infektionsgeschehens auf einen Bereich des Organismus spricht man von einer lokalen Infektion, wie z. B. im Falle von Abszessen oder Wundinfektionen. Die Symptome einer lokalen Infektion sind Rötung, Schwellung, Schmerz und eingeschränkte Funktion. Wenn sich die Pathogene dagegen im ganzen Körper z. B. über die Blutbahnen oder die Lymphbahnen

ausbreiten handelt es sich um eine allgemeine oder generalisierte oder systemische Infektion. Vom Beginn einer Infektion bis zur Auslösung von Reaktionen (Symptomen) ist abhängig vom Individuum eine unterschiedlich lange Zeitspanne zu beobachten, die als Inkubationszeit bezeichnet wird.

Die vielgestaltige Art, Symptomatik, Schweregrad und Verläufe von Infektionen machen einen spezifischen Nachweis oder eine Differentialdiagnose bezüglich steriler Entzündungs-erkrankungen in der klinischen Routine sehr schwierig und häufig unpräzise. Hierin ist ein Hauptgrund für häufige schwere infektiöse Komplikationen in vielen unterschiedlichen Indikationen und medizinischen Disziplinen zu sehen. Es besteht ein großer medizinischer Bedarf in einer Vielzahl medizinischer Disziplinen mit ausreichender Sensitivität und Spezifität solche infektiösen Komplikationen zu erkennen, durch adäquate klinische Interventionen zu behandeln und eine Verlaufskontrolle der individuellen klinischen Maßnahmen zur Behandlung der infektiösen Komplikationen verfügbar zu machen. Dies gilt insbesondere für den Übergang von lokalen zu generalisierten Infektionen, die in kurzer Zeit zu lebensbedrohlichen Zuständen führen.

Die Unterscheidung von systemisch-inflammatorisch und infektiös bedingten Krankheitszuständen spielt für die klinischen Entscheidungen zur Behandlung von Patienten und anschließender Verlaufsbeobachtung neben der Sepsis auch in einer Reihe von weiteren Indikationen eine wichtige Rolle. In diesem Zusammenhang kann der Behandlung von akut und chronisch kranken Patienten sowie der peri-operative Kontrolle gesehen werden. Es ist bekannt, dass im Fall einer akuten Pankreatitis die Prognose eines letalen Ausgangs durch eine Infektion von 16% auf 40% signifikant verschlechtert. Bei der Ausbildung einer komplexen Superinfektion besteht ein hohes Risiko einer Sepsis mit einer Mortalität von bis zu 90%. Des Weiteren ist die Verlaufsbeobachtung einer intra-abdominalen Inflammation und/oder Infektion bei chronisch kranken, postoperativen und Trauma-Patienten von Bedeutung. Es bestehen auch heute Schwierigkeiten einer eindeutigen klinischen Diagnose von intra-abdominalen Infektionen. Die Verlaufsbeobachtung chronisch Kranker, wie zum Beispiel Patienten mit Leberzirrhose oder Niereninsuffizienz ist von klinischer Relevanz, da diese Patientengruppe in Abhängigkeit der Organdekompensation prädestiniert sein kann inflammatorische und oder infektiöse Krankenverläufe zu nehmen. Insbesondere niereninsuffiziente Patienten mit Peritonealdialyse neigen zu chronischen Inflammationen und Infektionen [Blake 2008]. Von besonderem

Interesse ist die Beobachtung von Patienten mit Leberzirrhose, da diese spontane bakterielle Peritonitiden entwickeln können, die eine hohe Mortalität aufweisen. [Koulaouzidis et al. 2009]. Die Diagnose von sekundären Peritonitiden im Rahmen einer postoperativen Nachbehandlung ist von großem klinischem Wert und kann den Operationserfolg stark beeinflussen. Postoperative Infektionen sind auch heute noch ein großes Problem in der chirurgischen Behandlung. Ein Prozent der durchgeführten Laparotomien führen zu Komplikationen nach der Operation. Dabei kann die Komplikationsrate zwischen den chirurgischen Prozeduren stark schwanken. Insbesondere Eingriffe am Magen-Darm-Trakt können durch Nahtinsuffizienzen zu einer fulminanten Ausbreitung von Bakterien in den sterilen Bauchraum führen. Infektiöse Verläufe spielen unter anderem auch in der Operationsfolgebehandlung nach Transplantationen, Thorakotomien, Extremitäten- und Gelenkkorrekturen und neurochirurgischen Eingriffen eine Rolle.

Dem Fachmann ist bekannt, dass es sich bei diesen Ausführungen um lediglich um eine beispielhafte Auswahl handelt und es zahlreiche weitere Anwendungsfelder gibt, für die die Identifizierung einer infektiösen Komplikation von großer Wichtigkeit ist. Mit der vorliegenden Erfindung wird eine Lösung für dieses diagnostische Problem bereitgestellt.

Die vorliegende Erfindung betrifft insbesondere Gene und/oder deren Fragmente und ihre Verwendung zur Erstellung von Multigenbiomarkern, welche spezifisch für einen Zustand und/oder Untersuchungsfrage sind.

Die Erfindung betrifft ferner von den Markergenen abgeleitete PCR-Primer und Sonden für Hybridisierungs- bzw. Vervielfertigungsverfahren.

Nach wie vor ist die Sepsis eines der schwierigsten Krankheitsbilder in der modernen Intensivmedizin, wobei für den klinisch tätigen Arzt nicht nur die Therapie, sondern auch die Diagnose eine Herausforderung darstellt. Trotz Fortschritten im pathophysiologischen Verständnis und der supportiven Behandlung von Intensivpatienten sind generalisierte inflammatorische Zustände wie SIRS und Sepsis bei Patienten auf Intensivstationen sehr häufig auftretende und erheblich zur Sterblichkeit beitragende Erkrankungen [Marshall et al., 2003; Alberti et al., 2003]. Die Sterblichkeit beträgt ca. 20 % bei SIRS, ca. 40 % bei Sepsis und steigt bei

Entwicklung von multiplen Organdysfunktionen bis auf 70-80 % an [Brun-Buisson et al., 1995; Le-Gall et al., 1995; Brun-Buisson et al., 2003]. Der Morbiditäts- und Letalitätsbeitrag von SIRS und Sepsis ist von fachübergreifender klinisch-medizinischer Bedeutung, denn dadurch werden in zunehmendem Maße die Behandlungserfolge der fortgeschrittensten Therapieverfahren zahlreicher medizinischer Fachgebiete (z.B. Traumatologie, Neurochirurgie, Herz-/Lungenchirurgie, Viszeralchirurgie, Transplantationsmedizin, Hämatologie/Onkologie, etc.) gefährdet, denen ohne Ausnahme eine Erhöhung des Krankheitsrisikos für SIRS und Sepsis immanent ist. Dies drückt sich auch im kontinuierlichen Anstieg der Häufigkeit der Sepsis aus: zwischen 1979 und 1987 wurde ein Anstieg um 139%, nämlich von 73,6 auf 176 Krankheitsfälle je 100.000 Krankenhauspatienten verzeichnet [MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1990]. Die Senkung der Morbidität und Letalität einer Vielzahl von schwer erkrankten Patienten ist daher an einen gleichzeitigen Fortschritt in der Vorbeugung, Behandlung und insbesondere der Erkennung und Verlaufsbeobachtung der Sepsis und schweren Sepsis gebunden.

Im Laufe der Zeit hat der Sepsisbegriff einen erheblichen Bedeutungswandel erfahren. Eine Infektion bzw. der dringliche Verdacht auf eine Infektion sind auch heute noch wesentlicher Bestandteil aktueller Sepsisdefinitionen. Besondere Berücksichtigung findet jedoch dabei die Beschreibung Infektionsort-ferner Organfehlfunktionen im Rahmen der inflammatorischen Wirtsreaktion. Im internationalen Schrifttum haben sich zwischenzeitlich die Kriterien der Konsensuskonferenz des „American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference (ACCP/SCCM)“ aus dem Jahr 1992 am breitesten zur Definition des Sepsis-Begriffs durchgesetzt [Bone et al., 1992]. Entsprechend dieser Kriterien werden die klinisch definierten Schweregrade „systemic inflammatory response syndrom“ (SIRS), „Sepsis“, „severe Sepsis“ und „septic shock“ unterschieden. Als SIRS wird dabei die systemische Antwort des inflammatorischen Systems auf einen nichtinfektiösen Reiz definiert. Dazu müssen mindestens zwei der folgenden klinischen Kriterien erfüllt sein: Fieber $>38^{\circ}\text{C}$ oder Hypothermie $<36^{\circ}\text{C}$, eine Leukozytose $>12\text{g/l}$ oder eine Leukopenie $<4\text{g/l}$ bzw. eine Linksverschiebung im Differentialblutbild, eine Herzfrequenz von über 90/min, eine Tachypnoe >20 Atemzüge/min oder ein PaCO_2 (Partialdruck des Kohlendioxid im

arteriellen Blut) $<4,3$ kPa. Diese Definition hat eine hohe Sensitivität, aber eine niedrige Spezifität. Für intensivmedizinische Belange ist sie wenig hilfreich, da in der Regel jeder Intensivpatient, zumindest für kurze Zeit, die SIRS-Kriterien erfüllt.

Als Sepsis werden solche klinischen Zustände definiert, bei denen die SIRS-Kriterien erfüllt sind und ursächlich eine Infektion nachgewiesen wird oder zumindest sehr wahrscheinlich ist. Eine Infektion wird definiert als ein pathologischer Prozess, welcher durch eine Invasion von Pathogenen beziehungsweise potentiell pathogenen Organismen in ein normalerweise steriles Gewebe hervorgerufen wird. Wenn es dem Körper nicht gelingt, diese Infektion auf den Ursprungsort zu begrenzen, induzieren die Krankheitserreger oder deren Toxine in den vom Infektionsort entfernten Organen bzw. Geweben des Körpers eine Entzündung. Eine sofortige intensivmedizinische Behandlung, die zielgerichtete Gabe von Antibiotika und die operative Sanierung des infektiösen Herdes sind nötig, um eine Genesung zu erreichen. Eine schwere Sepsis ist vom zusätzlichen Auftreten von Organfunktionsstörungen gekennzeichnet. Häufige Organfunktionsstörungen sind Änderungen der Bewusstseinslage, eine Oligurie, eine Laktazidose oder eine Sepsis-induzierte Hypotension mit einem systolischen Blutdruck von weniger als 90 mmHg bzw. ein Druckabfall um mehr als 40 mmHg vom Ausgangswert. Wenn eine solche Hypotension nicht durch die Verabreichung von Kristalloiden und/oder Kolloiden zu beheben ist und es zusätzlich zu einer Katecholaminpflichtigkeit des Patienten kommt, so spricht man von einem septischen Schock. Dieser wird bei etwa 20 % aller Sepsispatienten nachgewiesen.

Es besteht unter vielen Medizinern Einigkeit darüber, dass die Konsensuskriterien nach [Bone et al., 1992] keiner spezifischen Definition von Sepsis entsprechen. So zeigte eine von der European Society of Intensive Care Medicine (ESICM) durchgeführte Umfrage, dass 71 % der befragten Ärzte trotz langjähriger klinischer Erfahrungen Unsicherheit bei der Diagnosestellung einer Sepsis hatten [Poeze et al., 2003]. Der Versuch, eine einheitliche Terminologie durchzusetzen, fand in der klinischen Umsetzung variable Akzeptanz. Insbesondere die Fortschritte im Verständnis der Pathophysiologie der Sepsis veranlasste verschiedene Experten, nach einer entsprechenden Modifikation der bisherigen Definitionen zu suchen. Die Definitionen von Sepsis, schwerer Sepsis und septischem Schock wurden bestätigt und als nützlich für Kliniker und Forscher beurteilt. Allerdings wurden die

diagnostischen Kriterien der Sepsis erheblich erweitert, um dem klinischen Aspekt der Infektabwehr gerecht zu werden. Die internationale Sepsis-Konferenz 2001 schlug außerdem ein neues Konzept (PIRO genannt) zur Beschreibung der Sepsis vor, welches sich aus den Kriterien Prädisposition, Infektion, Immunantwort (Response) und Organdysfunktion zusammensetzt [Levy et al., 2003]. Trotz einer neuen Definition der SIRS/Sepsis mit dem Akronym PIRO [Opal et al., 2005] wird in den meisten Studien immer noch die ACCP/SCCM Konsensuskonferenz aus dem Jahre 1992 benutzt [Bone et al., 1992], um ihre Patienten zu klassifizieren.

Mehrere Ansätze zur Diagnosestellung von SIRS und Sepsis wurden entwickelt. Diese Ansätze können in 3 Gruppen geteilt werden.

Der erste Gruppe enthält Score-Systeme wie beispielsweise APACHE, SAPS und SIRS welche die Patienten auf der Basis einer Vielzahl physiologischer Indices stratifizieren können. Während in einigen Studien für den APACHE II Score ein diagnostisches Potential nachgewiesen werden konnte, haben andere Studien gezeigt, dass APACHE II und SAPS II nicht zwischen Sepsis und SIRS differenzieren können [Carrigan et al., 2004].

Die zweite Gruppe enthält Proteinmarker, die aus Plasma und Serum nachgewiesen werden. Solche sind zum Beispiel CA125, S100B, Copeptin, Glycin N-acyltransferase (GNAT), Protachykinin und/oder seine Fragmente, Aldose 1-Epimerase (Mutarotase), Chp, Carbamoylphosphat Synthetase 1, LASP-1 (Brahms Diagnostika GmbH Deutschland), IL-1 Ra, MCP-1, MPlF-1, TNF-alpha, TNF-R1, MIG, BLC, HVEM, IL-10, IL-15, MCP-2, M-CSF, MIP-3b, MMP-9, PARC, ST-2; IL-6, sIL-2R, CD141, MMP-9, EGF, ENA-78, EOT, Gro-beta, IL-1b, Leptin, MIF, MIP-1a, OSM, Protein C, P-Selectin, und HCC4 (Molecular Staging, Inc., USA) oder CD 14 Antigen, Lipopolysaccharid-Bindungsstellen auf den Proteinen Alkalische Phosphatase und Inter-Alpha-Trypsin Inhibitor (Mochida Pharm Co, Ltd. Japan). Trotz der großen Menge von patentierten Biomarkern konnten sich nur wenige im klinischen Alltag durchsetzen. Von diesen scheinen Procalcitonin (PCT, BRAHMS) und das C-reaktive Protein (CRP, Eli Lilly) die Marker zu sein, die am besten zwischen infektiösen und nicht infektiösen Ursachen der SIRS unterscheiden können.

Procalcitonin ist ein 116 Aminosäuren langes Peptid das eine Rolle bei Entzündungsreaktionen spielt. Dieser Marker ist im Laufe der Zeit zunehmend als neuer Infektionsmarker auf Intensivstationen eingesetzt worden [Sponholz et al., 2006]. Dieser Marker gilt als Infektionsmarker und dient dazu, den Schweregrad der Sepsis festzulegen, wobei die Dynamik der Werte wichtiger ist als die Absolutwerte selbst, um z. B. bei Herzchirurgie-Patienten zwischen infektiöser und nicht-infektiöser Komplikation zu unterscheiden [Sponholz et al., 2006]. Trotz der weitgehenden Akzeptanz des Biomarkers PCT konnte in internationalen Studien gezeigt werden, dass die erreichten Sensitivitäten und Spezifitäten des Sepsismarkers PCT vor allem bei der Abgrenzung einer systemischen bakteriellen SIRS, also Sepsis, von einer nicht -bakteriellen SIRS noch immer unzureichend sind [Ruokonen et al., 1999; Suprin et al. 2000; Ruokonen et al.,2002; Tang et al., 2007a]. Die Meta-Analyse von Tang und Kollegen [Tang et al., 2007a], in der 18 Studien berücksichtigt wurden, zeigt, dass PCT nur schlecht geeignet ist, um SIRS von Sepsis zu diskriminieren. Darüberhinaus betonen die Autoren, dass PCT eine sehr schwache diagnostische Genauigkeit mit einem Odd Ratio (OR) von 7.79 hat. Als Regel benennen die Autoren, dass ein OR <25 nicht aussagekräftig, zwischen 25 und 100 hilfreich und im Falle von mehr als 100 hoch genau ist [Tang et al., 2007a].

C-reaktives Protein (CRP) ist ein 224 Aminosäuren langes Protein, das eine Rolle bei Entzündungsreaktionen spielt. Die Messung von CRP soll dazu dienen, um den Krankheitsverlauf sowie die Wirksamkeit der gewählten Therapie zu verfolgen.

In mehreren Berichten wurde beschrieben, dass im intensivmedizinischen Bereich PCT ein besser geeigneter diagnostischer Marker als CRP ist [Sponholz et al., 2006; Kofoed et al., 2007]. Darüber hinaus wird PCT als besser geeignet als CRP angesehen, um eine nicht infektiöse versus infektiöse SIRS sowie bakterielle versus virale Infektion zu unterscheiden [Simon et al., 2004].

Es ist für den Fachmann naheliegend das die, mit dieser Erfindung bereitgestellten, Lösung mit den vorgenannten Biomarkern wie z. B. aber nicht ausschließlich PCT oder CRP kombiniert werden kann um die diagnostische Aussage zu erweitern.

Die dritte Gruppe enthält Biomarker oder Profile, die auf Transkriptom - Ebene identifiziert wurden. Diese molekularen Parameter sollten eine bessere Korrelation der molekularen inflammatorischen/immunologischen Wirtsantwort mit dem Schweregrad der Sepsis ermöglichen, aber auch Aussagen zur individuellen Prognose liefern. Nach derartigen Biomarkern wird derzeit von verschiedenen wissenschaftlichen Gruppen und kommerziellen Organisationen intensiv gesucht, wie zum Beispiel Veränderungen der Cytokinkonzentrationen im Blut verursacht durch Bakterienzellwandbestandteile wie Lipopolysaccharide [Mathiak et al., 2003], oder Verwendung von Genexpressionsprofilen in einer Blutprobe zur Bestimmung von Unterschieden bei überlebenden und nicht-überlebenden Sepsispatienten [Pachot et al., 2006]. Genexpressionsprofile oder Klassifikatoren sind für die Bestimmung des Schweregrads von Sepsis [WO 2004/087949], die Unterscheidung zwischen einer lokalen oder systemischen Infektion [nicht veröffentlichte DE 10 2007 036 678.9], die Identifizierung der Infektionsquelle [WO 2007/124820] oder von Genexpressionssignaturen für die Unterscheidung zwischen mehreren Ätiologien und Pathogen-assoziierten Signaturen [Ramilo et al., 2007] geeignet. Allerdings besteht aufgrund der unzureichenden Spezifität und Sensitivität der Konsensuskriterien nach [Bone et al., 1992], der aktuell verfügbaren Proteinmarker sowie aufgrund des Zeitbedarfs des Nachweises der Infektionsursache durch Blutkultur ein dringender Bedarf für neue Verfahren, die die Komplexität der Erkrankung berücksichtigen. Viele Geneexpressionsstudien, die entweder einzelne Gene und/oder Kombinationen von Genen, die als Klassifikatoren benannt sind, verwenden sowie zahlreiche Beschreibungen von statistischen Verfahren zur Ableitung eines Score und/oder Index [WO03084388; US6960439] gehören zum Stand der Technik.

Es besteht heute ein Konsens dahingehend, dass komplexe Erkrankungen sinnvoll nur über mehrere Parameter beschrieben werden können.

In zunehmendem Maße finden molekulare Signaturen Eingang in die klinische Diagnostik, insbesondere bei komplexen Erkrankungen, die mit herkömmlichen Biomarkern nicht erfasst werden können, aber auch zur Beurteilung von Risiken für die Patienten und zur Identifizierung von Respondern beim Einsatz von Medikamenten und Therapien. Nachfolgende Aufzählung soll den aktuellen Stand und die Einsatzgebiete der Genexpressionsdiagnostik verdeutlichen.

- 1) Die Microarray-basierte, 70 Gene umfassende Signatur namens MammaPrint (Agendia, NL) erlaubt es, eine Prognose über das Rezidiv- und Metastasierungsrisiko von Frauen mit Brustkrebs zu treffen. Dabei wird untersucht, ob das Risiko, in den nächsten Jahren entfernte Metastasen zu entwickeln, als hoch oder niedrig eingestuft werden kann und sie von einer Chemotherapie profitieren würden. Die Zulassung dieses Tests durch die FDA brachte die Entwicklung von Richtlinien für eine neue Klasse von diagnostischen Tests, sog. IVDMA (in vitro diagnostic multivariate index assay) mit sich. Die MammaPrint-Signatur wird auf einem Mikroarray in den Laboren des Herstellers gemessen und berechnet.

- 2) An Formalin-fixierten Gewebeproben wird mittels des Oncotype DX –Multigen-Assays (Genomic Health, USA) die Wahrscheinlichkeit des Wiederauftretens von Brustkrebs in Patientinnen beurteilt, sowie das Ansprechen der Patientinnen auf Chemotherapie geprüft. 21 Gene werden als „Recurrence-Score“ zusammengefasst. Die Messung findet in den Räumen der Firma statt, es kommt ebenfalls die TaqMan-PCR Technologie zum Einsatz.

- 3) Der AlloMap Genexpressionstest der Firma XDX (USA) wird zur Überwachung eventueller Abstoßungsreaktionen bei Patienten mit Herztransplantation eingesetzt, die ca. 30 % der Patienten innerhalb eines Jahres zeigen. Bislang waren zur Diagnose mehrere Biopsien notwendig. Der Test basiert auf 11 quantitativen PCR-Assays (zusätzlich 9 Kontrollen und Referenzen) unter Nutzung der TaqMan Technologie (Hoffman-La Roche) in den Räumen des Herstellers. Das Probenmaterial ist Blut. Bereits zwei Monate nach der Transplantation sind die Messergebnisse zuverlässig und sagen das Ausbleiben von Abstoßungsreaktionen für die nächsten 80 Tage voraus.

Eine Gemeinsamkeit dieser Tests ist, dass die adressierte diagnostische Fragestellung Untersuchungszeiten bis zum Vorliegen des Ergebnisses von mehreren Tagen erlaubt. Für diagnostische Tests in der Indikation Sepsis dagegen, muß die Information innerhalb eines einzigen Arbeitstages vorliegen.

Bei der Verwendung von Genexpressionsmarkern für die Bestimmung eines pathophysiologischen Zustandes werden stets die in einer Probe vorhandenen Mengen der entsprechenden mRNA, die Genexpressions-Level, quantitativ bestimmt. Die durch diese Genexpressionslevel ermittelte Information ist die jeweilige Über- oder Unterexpression dieser mRNAs die bezogen auf einen Kontroll-Zustand oder bezogen auf Kontroll-Gene experimentell ermittelt wird. Die Feststellung von Über- oder Unterexpression kann analog zur Bestimmung der Konzentration einer Protein-Biomarkers gesehen werden.

Mehrere Anwendungen von Genexpressionsprofilen sind in dem Stand der Technik bekannt.

Pachot und Kollegen demonstrieren den Nutzen von Expressionssignaturen für die Verlaufsbeurteilung von Patienten mit septischem Schock. Hier finden sich molekulare Unterschiede, die die Wiederherstellung eines funktionierenden Immunsystems in den Überlebenden widerspiegeln. 28 Markergene mit Funktionen im innaten Immunsystem zeigen innerhalb des ersten Tages nach Diagnose des septischen Schocks mit hoher Sensitivität (100%) und Spezifität (88%) an, ob die Immunparalyse reversibel ist und damit das Überleben des Patienten ermöglicht. Allerdings war in der Untersuchung das Patientenkollektiv zu klein (38) um ein robustes Profil zu erstellen und eine Validierung dieses Datensatzes durch einen unabhängigen Datenatz ist bislang nicht erfolgt. Der Stand der Technik enthält zahlreiche Studien zur Identifikation von Genexpressionsmarkern [Tang et al., 2007b] oder Genexpressionsprofilen für die Feststellung einer systemischen Infektion [Johnson et al., 2007].

Tang und Kollegen [Tang et al., 2007b] suchten in einer bestimmten Blutzellpopulation, den Neutrophilen, nach einer Signatur, welche eine Unterscheidung von Patienten mit SIRS und Sepsis ermöglicht. 50 Marker aus dieser Zellpopulation genügen um die Immunantwort auf eine systemische Infektion wiederzugeben und neue Erkenntnisse zur Pathophysiologie und den beteiligten Signalwegen zu ermöglichen.

Die Klassifikation von Patienten mit und ohne Sepsis gelingt mit hoher Sicherheit (PPV 88% bzw. 91% in Trainings- und Testdatensatz). Die Anwendbarkeit für die klinische Diagnose ist allerdings dadurch begrenzt, dass im Blut diese Signatur von Signalen aus anderen Blutzelltypen überlagert werden kann. Bezüglich der Anwendbarkeit ist die Präparation dieser Blutzellpopulation mit erheblich erhöhtem Aufwand verbunden. Die Aussagekraft der in dieser Studie publizierten Ergebnisse ist für praktische Anwendungen jedoch limitiert, weil die Patientenauswahl sehr stark heterogen war. Es wurden Patienten in die Studie eingeschlossen, die stark unterschiedliche Begleiterkrankungen wie z. B. zu 11% bis 16% Tumorerkrankungen aufwiesen oder sehr stark unterschiedlichen therapeutischen Maßnahmen unterlagen (z.B. 27% bis 64% Vasopressor-Therapie), wodurch die Genexpressionsprofile stark beeinflusst wurden.

Johnson und Kollegen [Johnson et al., 2007] beschreiben an einem Kollektiv von Traumapatienten, dass sich die Ausprägung einer Sepsis bereits bis zu 48 Stunden vor der klinischen Diagnose anhand molekularer Veränderungen messen lässt. Die Traumapatienten wurden über mehrere Tage untersucht. Ein Teil der Patienten entwickelte eine Sepsis. Nichtinfektiöse SIRS-Patienten wurden mit prä-septischen Patienten verglichen. Die identifizierte Signatur aus 459 Transkripten setzt sich aus Markern der Immunantwort und Entzündungsmarkern zusammen. Probenmaterial war Vollblut, die Analysen wurden auf einem Mikroarray durchgeführt. Unklar ist, ob sich diese Signatur auch auf andere Kollektive septischer bzw. prä-septischer Patienten ausdehnen lässt. Eine Klassifikation und der diagnostische Nutzen dieser Signatur wurde nicht gezeigt.

Weiterhin werden im Stand der Technik andere Signaturen beschrieben, beispielsweise die Antwort des Wirtes auf eine Infektion.

Die Spezifität der Wirtsantwort auf unterschiedliche Erreger ist bisher in mehreren experimentellen Systemen untersucht worden. In keiner Studie jedoch wurden Genexpressionsprofile und/oder Signaturen durch Test aus Vollblut von Sepsis-Patienten beschrieben.

Das Ziel von Feezor und Kollegen [Feezor et al., 2003] war es, Unterschiede zwischen Infektionen mit gram-negativen und gram-positiven Erregern zu identifizieren. Blutproben von drei verschiedenen Spendern wurden *ex vivo* mit *E.coli*-LPS und Hitze-inaktiviertem *S.aureus* stimuliert. Mittels Microarraytechnologie wurden Genexpressionsuntersuchungen durchgeführt. Die Arbeitsgruppe fand sowohl Gene, die nach *S.aureus*-Stimulation hochreguliert und nach LPS-Stimulation herunterreguliert waren, als auch Gene die nach LPS-Behandlung stärker exprimiert wurden als nach der Zugabe von Hitze-inaktivierten *S.aureus*-Keimen. Gleichzeitig wurden viele Gene durch gram-positive und gram-negative Stimulation in gleichem Maße hochreguliert. Dies betrifft zum Beispiel die Zytokine TNF- α , IL-1 β und IL-6. Die differentiell exprimierten Gene wurden leider nicht namentlich veröffentlicht, so dass lediglich ein indirekter Vergleich anderen Ergebnissen möglich ist. Neben der Genexpression wurden von Feezor et al. auch die Plasmakonzentrationen einiger Zytokine untersucht. Dabei korrelierten die Genexpressionsdaten nicht zwangsweise mit den Plasmakonzentrationen. Bei der Genexpression wird die Menge an mRNA vermessen. Diese ist jedoch vor der Proteinsynthese posttranskriptionaler Regulation unterworfen, woraus die beobachteten Unterschiede resultieren können.

Die interessanteste Publikation zu diesem Thema wurde von einer texanischen Forschungsgruppe um Ramilo [Ramilo et al., 2007], veröffentlicht. Hier wurden ebenfalls Genexpressionsuntersuchungen an humanen Blutzellen durchgeführt, die Unterschiede in der molekularen Wirtsreaktion auf verschiedene Pathogene aufdeckten. Dazu wurden pediatriische Patienten mit akuten Infektionen, wie z.B. akuten Atemwegserkrankungen, Harnwegsinfektionen, Bakteriämien, lokalen Abszessen, Knochen- und Gelenkinfektionen sowie Meningitis untersucht. Microarrayexperimente wurden mit RNA-Proben durchgeführt, die aus peripheren mononuklearen Blutzellen von jeweils zehn Patienten mit *E.coli*- bzw. *S.aureus*-Infektion isoliert wurden. Die Identifizierung der Erreger erfolgte mittels Blutkultur. Anhand des Trainingsdatensatzes wurden 30 Gene identifiziert, durch deren Verwendung die verursachenden pathogenen Keime mit hoher Genauigkeit diagnostiziert werden konnten.

Trotz der zahlreichen publizierten Studien und der darin beschriebenen individuellen Signaturen, die den Stand der Technik begründen, erlaubt keine davon eine diagnostische Aussage über Sepsis und/oder Sepsis-ähnliche Zustände. Keine dieser Publikationen bietet die Zuverlässigkeit, Genauigkeit und Robustheit der hier offenbarten Erfindung. Diese Studien sind darauf konzentriert, den aus wissenschaftlicher Sicht "besten" Multigenbiomarker (Klassifikator) zu identifizieren, jedoch nicht, wie in der vorliegenden Erfindung, den für eine spezifische klinische Fragestellung optimalen Multigenbiomarker [Simon et al., 2005].

Somit ist es Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Testsystem zur Verfügung zu stellen, mit dem eine schnelle und zuverlässige Aussage über einen pathophysiologischen Zustand, beispielsweise Sepsis und generalisierte Infektion, möglich ist.

Die Lösung dieser Aufgabe erfolgt verfahrenstechnisch durch die Merkmale des Anspruchs 1.

Bezüglich einer Verwendung wird die Aufgabe durch die Merkmale der Ansprüche 5 und 12 gelöst.

Die Lösung der genannten Aufgabe erfolgt auch durch einen Primer gemäß Anspruch 16.

Ein Kit gemäß Anspruch 17 löst die Aufgabe ebenfalls.

In allgemeiner Form betrifft die vorliegende Erfindung ein System, das folgende Elemente umfaßt:

- Set von Genaktivitätsmarkern
- Referenzgene als interne Kontrolle der Genaktivitätsmarkersignale in Vollblut
- Detektion hauptsächlich über Real-Time-PCR oder andere Amplifikationsverfahren oder Hybridisierungsverfahren

- Verwendung eines Algorithmus, um die Einzelergebnisse der Genaktivitätsmarker zu einem gemeinsamen numerischen Wert, Index oder auch Score, umzuwandeln
- Darstellung dieses numerischen Wertes auf einer entsprechend eingeteilten Skala
- Kalibrierung, d.h. Einteilung der Skala entsprechend der intendierten Anwendung durch vorherige Validierungsexperimente.

Das System liefert eine Lösung für das Problem der Feststellung von Krankheitszuständen wie z. B. die Unterscheidung von infektiösem und nicht-infektiösem Multiorganversagen aber auch für andere in diesem Kontext relevante Anwendungen und Fragestellungen.

Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur in vitro Erfassung und/oder Früherkennung und/oder Unterscheidung und/oder Verlaufsbeobachtung und/oder Beurteilung von pathophysiologischen Zuständen, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus: SIRS, Sepsis und deren Schweregraden; sepsisähnlichen Zuständen; septischem Schock; Bakteriämie, infektiösem/nicht-infektiösem Multiorganversagen; Früherkennung dieser Zustände; Fokuskontrolle; Kontrolle von chirurgischen Sanierungsmaßnahmen des Infektionsfokus; Responder/non-Responder für eine bestimmte Therapie; Therapiekontrolle; Unterscheidung zwischen infektiöser und nicht- infektiöser Genese bei systemischen Reaktionen des Organismus, wie z.B. SIRS, Sepsis, postoperative Komplikationen, chronischem und/oder akuter Organdysfunktion, Schock-Reaktion, Entzündungsreaktion und/oder Trauma; wobei das Verfahren folgende Schritte umfasst:

- a) Isolierung von Probennukleinsäuren aus einer von einem Patienten stammenden Probe;
- b) Bestimmung von Genaktivitäten mittels einer Mehrzahl von wenigstens drei Polynukleotiden, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus M2, M3, M4, M6, M7, M8, M9, M10, M12, M13, M15, M16 und M17; und/oder deren

Isoformen und/oder deren Genloci und/oder deren Transkripten und/oder Fragmenten mit einer Länge von mindestens 5 Nucleotiden davon, zur Bildung wenigstens eines für die Erfassung und/oder Unterscheidung und/oder den Verlauf von pathophysiologischen Zuständen eines Patienten charakteristischen Multigenbiomarkers; wobei die Polynucleotide gemäß folgender Tabelle definiert sind:

Polynucleotid	Transkriptvariante/ <i>cis</i> -regulatorische Sequenzen	Accession Number	SEQ ID
M2	M2_1	NM_001031700	1
	M2_2	NM_016613	2
	M2_3	NM_001128424	3
M4	M4_1	NM_203330	4
	M4_2	NM_000611	5
	M4_3	NM_203329	6
	M4_4	NM_203331	7
	M4_5	NM_001127223	8
	M4_6	NM_001127225	9
	M4_7	NM_001127226	10
	M4_8	NM_001127227	11
M6	M6_1	NM_001831	12
	M6_2	NM_203339	13
M7	M7_1	NM_031311	14
	M7_2	NM_019029	15
M9	M9	NM_006682	16
M10	M10	NM_033554	17
M15	M15_1	NM_003580	18
	M15_2	NM_001144772	19
M3	M3_A	NM_001123041	20
	M3_B	NM_001123396	21
M8	M8	NM_025209	22
	M8_ <i>cis</i>	AI807985	23
M12	M12	NM_002185	24
	M12_ <i>cis</i>	DB155561	25
M13	M13	NM_001080394	26
M16	M16	NM_003268	27
M17	M17	NM_182491	28

- c) Bestimmung von Genaktivitäten wenigstens eines internen Referenzgens, auf die die unter b) bestimmten Genaktivitäten bezogen, insbesondere normalisiert, werden;

- d) Bilden eines Wertes aus den einzelnen bestimmten Genaktivitäten des Multigenbiomarkers, der den pathophysiologischen Zustand anzeigt.

Ein bevorzugtes Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, dass das Referenzgen ausgewählt wird aus Polynukleotiden der Gruppe bestehend aus R1, R2 und R3 und/oder deren Isoformen und/oder deren Genloci und/oder deren Transkripten und/oder Fragmenten mit einer Länge von mindestens 5 Nucleotiden davon, wobei die Referenzgene gemäß folgender Tabelle definiert sind:

Referenzgene	Transkriptvariante/cis-regulatorische Sequenzen	Accession Number	SEQ ID
R1	R1_A	NM_001228	29
	R1_B	NM_033355	30
	R1_C	NM_033356	31
	R1_E	NM_033358	32
	R1_F	NM_001080124	33
	R1_G	NM_001080125	34
R2	R2_1	NM_002209	35
	R2_2	NM_001114380	36
R3	R3	NM_003082	37

Ein weiter bevorzugtes Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, dass als Polynukleotidsequenzen Genloci, sense und/oder antisense Stränge von prä-mRNA und/oder mRNA, small RNA, insbesondere scRNA, snoRNA, micro RNA, siRNA, dsRNA, ncRNA oder transposable Elemente zur Erfassung der Genexpressionsprofile verwendet werden.

Eine weitere bevorzugte Ausführungsform liegt in einem Verfahren, das dadurch gekennzeichnet ist, dass in Schritt b) die Genaktivität von 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, oder 12 Polynucleotiden, oder von sämtlichen 13 Polynucleotiden bestimmt wird, wobei die Polynucleotide ausgewählt werden aus der Gruppe, bestehend aus: M2, M3, M4, M6, M7, M8, M9, M10, M12, M13, M15, M16 und M17 und/oder deren Isoformen und/oder deren Genloci und/oder deren Transkripten und/oder Fragmenten mit einer Länge von mindestens 5 Nucleotiden davon, wobei die Polynucleotide gemäß folgender Tabelle definiert sind:

Polynucleotid	Transkriptvariante/ <i>cis</i> -regulatorische Sequenzen	Accession Number	SEQ ID
M2	M2_1	NM_001031700	1
	M2_2	NM_016613	2
	M2_3	NM_001128424	3
M4	M4_1	NM_203330	4
	M4_2	NM_000611	5
	M4_3	NM_203329	6
	M4_4	NM_203331	7
	M4_5	NM_001127223	8
	M4_6	NM_001127225	9
	M4_7	NM_001127226	10
	M4_8	NM_001127227	11
M6	M6_1	NM_001831	12
	M6_2	NM_203339	13
M7	M7_1	NM_031311	14
	M7_2	NM_019029	15
M9	M9	NM_006682	16
M10	M10	NM_033554	17
M15	M15_1	NM_003580	18
	M15_2	NM_001144772	19
M3	M3_A	NM_001123041	20
	M3_B	NM_001123396	21
M8	M8	NM_025209	22
	M8_ <i>cis</i>	AI807985	23
M12	M12	NM_002185	24
	M12_ <i>cis</i>	DB155561	25
M13	M13	NM_001080394	26
M16	M16	NM_003268	27
M17	M17	NM_182491	28

Hierbei hat sich herausgestellt, dass die Verwendung von 7 Polynucleotiden häufig optimal ist.

Die Erfindung betrifft in einer weiteren Ausführungsform die Verwendung von wenigstens drei Polynucleotiden, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus: M2, M3, M4, M6, M7, M8, M9, M10, M12, M13, M15, M16 und M17 und/oder deren Isoformen und/oder deren Genloci und/oder deren Transkripten und/oder Fragmenten mit einer Länge von mindestens 5 Nucleotiden davon, zur Bildung wenigstens eines Multigenbiomarkers zur Herstellung eines Multiplex-Assays als Hilfsmittel zur *in vitro* Erfassung und/oder Früherkennung und/oder Unterscheidung und/oder Verlaufsbeobachtung und/oder Beurteilung von pathophysiologischen Zuständen eines Patienten, wobei der pathophysiologische Zustand ausgewählt wird

aus der Gruppe bestehend aus: SIRS, Sepsis und deren Schweregraden; sepsisähnlichen Zuständen; septischem Schock; Bakteriämie, infektiösem/nicht-infektiösem Multiorganversagen; Früherkennung dieser Zustände; Fokuskontrolle; Kontrolle von chirurgischen Sanierungsmaßnahmen des Infektionsfokus; Responder/non-Responder für eine bestimmte Therapie; Therapiekontrolle; Unterscheidung zwischen infektiöser und nicht- infektiöser Genese bei systemischen Reaktionen des Organismus, wie z.B. SIRS, Sepsis, postoperative Komplikationen, chronischem und/oder akuter Organdysfunktion, Schock-Reaktion, Entzündungsreaktion und/oder Trauma; wobei die Polynucleotide gemäß folgender Tabelle definiert sind:

Polynucleotid	Transkriptvariante/ <i>cis</i> -regulatorische Sequenzen	Accession Number	SEQ ID
M2	M2_1	NM_001031700	1
	M2_2	NM_016613	2
	M2_3	NM_001128424	3
M4	M4_1	NM_203330	4
	M4_2	NM_000611	5
	M4_3	NM_203329	6
	M4_4	NM_203331	7
	M4_5	NM_001127223	8
	M4_6	NM_001127225	9
	M4_7	NM_001127226	10
	M4_8	NM_001127227	11
M6	M6_1	NM_001831	12
	M6_2	NM_203339	13
M7	M7_1	NM_031311	14
	M7_2	NM_019029	15
M9	M9	NM_006682	16
M10	M10	NM_033554	17
M15	M15_1	NM_003580	18
	M15_2	NM_001144772	19
M3	M3_A	NM_001123041	20
	M3_B	NM_001123396	21
M8	M8	NM_025209	22
	M8_ <i>cis</i>	AI807985	23
M12	M12	NM_002185	24
	M12_ <i>cis</i>	DB155561	25
M13	M13	NM_001080394	26
M16	M16	NM_003268	27
M17	M17	NM_182491	28

Eine bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist eine Verwendung, bei der der Multigenbiomarker eine Kombination von mehreren Polynukleotid-, insbesondere Gensequenzen ist, anhand deren Genaktivitäten mittels einer Interpretationsfunktion eine Klassifikation durchgeführt und/oder ein Index gebildet wird.

In der Praxis der Anmelderin hat sich herausgestellt, dass eine solche Verwendung besonders geeignet ist, welche dadurch gekennzeichnet, dass die Genaktivitäten mittels enzymatischer Verfahren, insbesondere Amplifikationsverfahren, bevorzugt Polymereasekettenreaktion (PCR), vorzugsweise Real-Time-PCR, insbesondere sondenbasierte Verfahren wie Taq-Man, Scorpions, Molecular Beacons; und/oder mittels Hybridisierungsverfahren, insbesondere solchen auf Microarrays; und/oder direkter mRNA-Nachweis, insbesondere Sequenzierung oder Massenspektrometrie; und/oder isothermale Amplifikation, erfasst werden.

Eine weitere bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung liegt in einer Verwendung, die dadurch gekennzeichnet, dass aus den einzelnen bestimmten Genaktivitäten ein Index gebildet wird, der nach entsprechender Kalibrierung ein Maß für den Schweregrad und/oder den Verlauf des pathophysiologischen Zustands ist, wobei vorzugsweise der Index auf einer leicht interpretierbaren Skala angezeigt wird.

Es ist ferner bevorzugt, dass man die erhaltenen Genaktivitätsdaten zur Herstellung von Software für die Beschreibung mindestens eines pathophysiologischen Zustands und/oder einer Untersuchungsfrage und/oder als Hilfsmittel für Diagnosezwecke und/oder für Patientendatenmanagement-Systeme, insbesondere für die Verwendung zur Patientenstratifikation und als Einschlusskriterium für klinische Studien, einsetzt.

Darüber hinaus ist eine Verwendung bevorzugt, bei welcher zur Erstellung der Genaktivitätsdaten solche spezifischen Genloci, sense und/oder antisense Stränge von prä-mRNA und/oder mRNA, small RNA, insbesondere scRNA, snoRNA, micro RNA, siRNA, dsRNA, ncRNA oder transposable Elemente, Gene und/oder Genfragmente mit einer Länge von mindestens 5 Nucleotiden verwendet werden, welche eine Sequenzhomologie von mindestens ca. 10%, insbesondere ca. 20%, vorzugsweise ca. 50%, besonders bevorzugt ca. 80% zu den Polynukleotidsequenzen M2, M3, M4, M6, M7, M8, M9, M10, M12, M13, M15, M16 und M17 aufweisen.

Eine weitere bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung liegt in einer Verwendung die dadurch gekennzeichnet, dass 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 oder 12 Polynucleotide, oder sämtliche 13 Polynucleotide verwendet werden, wobei die Polynucleotide ausgewählt werden aus der Gruppe, bestehend aus: M2, M3, M4, M6, M7, M8, M9, M10, M12, M13, M15, M16 und M17 und/oder deren Isoformen und/oder deren Genloci und/oder deren Transkripten und/oder Fragmenten mit einer Länge von mindestens 5 Nucleotiden davon, wobei die Polynucleotide gemäß folgender Tabelle definiert sind:

Polynucleotid	Transkriptvariante/ <i>cis</i> -regulatorische Sequenzen	Accession Number	SEQ ID
M2	M2_1	NM_001031700	1
	M2_2	NM_016613	2
	M2_3	NM_001128424	3
M4	M4_1	NM_203330	4
	M4_2	NM_000611	5
	M4_3	NM_203329	6
	M4_4	NM_203331	7
	M4_5	NM_001127223	8
	M4_6	NM_001127225	9
	M4_7	NM_001127226	10
	M4_8	NM_001127227	11
M6	M6_1	NM_001831	12
	M6_2	NM_203339	13
M7	M7_1	NM_031311	14
	M7_2	NM_019029	15
M9	M9	NM_006682	16
M10	M10	NM_033554	17
M15	M15_1	NM_003580	18
	M15_2	NM_001144772	19
M3	M3_A	NM_001123041	20
	M3_B	NM_001123396	21
M8	M8	NM_025209	22
	M8_ <i>cis</i>	AI807985	23
M12	M12	NM_002185	24
	M12_ <i>cis</i>	DB155561	25
M13	M13	NM_001080394	26
M16	M16	NM_003268	27
M17	M17	NM_182491	28

und/oder wobei eine Anzahl von 7 Polynucleotiden bevorzugt ist.

Grundsätzlich kann die Erfindung gemäß einer alternativen Ausführungsform auch ausgeführt werden unter Verwendung mindestens eines Polynukleotids, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus: M2, M3, M4, M6, M7, M8, M9, M10, M12, M13, M15, M16 und M17 und/oder deren Isoformen und/oder deren Genloci und/oder deren Transkripten und/oder Fragmenten mit einer Länge von mindestens 5 Nucleotiden davon, wobei die Polynucleotide gemäß folgender Tabelle definiert sind:

Polynucleotid	Transkriptvariante/ <i>cis</i> -regulatorische Sequenzen	Accession Number	SEQ ID
M2	M2_1	NM_001031700	1
	M2_2	NM_016613	2
	M2_3	NM_001128424	3
M4	M4_1	NM_203330	4
	M4_2	NM_000611	5
	M4_3	NM_203329	6
	M4_4	NM_203331	7
	M4_5	NM_001127223	8
	M4_6	NM_001127225	9
	M4_7	NM_001127226	10
	M4_8	NM_001127227	11
M6	M6_1	NM_001831	12
	M6_2	NM_203339	13
M7	M7_1	NM_031311	14
	M7_2	NM_019029	15
M9	M9	NM_006682	16
M10	M10	NM_033554	17
M15	M15_1	NM_003580	18
	M15_2	NM_001144772	19
M3	M3_A	NM_001123041	20
	M3_B	NM_001123396	21
M8	M8	NM_025209	22
	M8_ <i>cis</i>	AI807985	23
M12	M12	NM_002185	24
	M12_ <i>cis</i>	DB155561	25
M13	M13	NM_001080394	26
M16	M16	NM_003268	27
M17	M17	NM_182491	28

zur Herstellung eines Assays zur Beurteilung, ob bei einem Patienten ein pathophysiologischer Zustand vorliegt, und/oder zur Feststellung des Schweregrades und/oder des Verlaufs eines pathophysiologischen Zustands.

Hier bei wird der pathophysiologische Zustand ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus: SIRS, Sepsis und deren Schweregraden; sepsisähnlichen Zuständen; septischem Schock; Bakteriämie, infektiösem/nicht-infektiösem Multiorganversagen; Früherkennung dieser Zustände; Fokuskontrolle; Kontrolle von chirurgischen Sanierungsmaßnahmen des Infektionsfokus; Responder/non-Responder für eine bestimmte Therapie; Therapiekontrolle; Unterscheidung zwischen infektiöser und nicht- infektiöser Genese bei systemischen Reaktionen des Organismus, wie z.B. SIRS, Sepsis, postoperative Komplikationen, chronischem und/oder akuter Organdysfunktion, Schock-Reaktion, Entzündungsreaktion und/oder Trauma.

Vorzugsweise ist die Probennukleinsäure RNA, insbesondere Gesamt-RNA oder mRNA, oder DNA, insbesondere cDNA.

Für eine weiter verfeinerte diagnostische Aussage kann es zur Beurteilung des pathophysiologischen Zustands von Vorteil sein, neben wenigstens einem der Polynucleotide, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus: M2, M3, M4, M6, M7, M8, M9, M10, M12, M13, M15, M16 und M17 und/oder deren Isoformen und/oder deren Genloci und/oder deren Transkripten und/oder Fragmenten mit einer Länge von mindestens 5 Nucleotiden davon, wobei die Polynucleotide gemäß folgender Tabelle definiert sind:

Polynucleotid	Transkriptvariante/ <i>cis</i> -regulatorische Sequenzen	Accession Number	SEQ ID
M2	M2_1	NM_001031700	1
	M2_2	NM_016613	2
	M2_3	NM_001128424	3
M4	M4_1	NM_203330	4
	M4_2	NM_000611	5
	M4_3	NM_203329	6
	M4_4	NM_203331	7
	M4_5	NM_001127223	8
	M4_6	NM_001127225	9
	M4_7	NM_001127226	10
	M4_8	NM_001127227	11
M6	M6_1	NM_001831	12
	M6_2	NM_203339	13
M7	M7_1	NM_031311	14
	M7_2	NM_019029	15
M9	M9	NM_006682	16
M10	M10	NM_033554	17
M15	M15_1	NM_003580	18

	M15_2	NM_001144772	19
M3	M3_A	NM_001123041	20
	M3_B	NM_001123396	21
M8	M8	NM_025209	22
	M8_cis	AI807985	23
M12	M12	NM_002185	24
	M12_cis	DB155561	25
M13	M13	NM_001080394	26
M16	M16	NM_003268	27
M17	M17	NM_182491	28

noch wenigstens einen weiteren Marker zu verwenden, welcher ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: Procalcitonin (PCT), C-reaktives Protein (CRP); Leukocytenzahl; Cytokinen; Interleukinen sowie weiteren bislang im Stand der Technik bekannten, dem Fachmann wohlbekannten klinischen Laborparametern und genetischen, transkriptomischen und proteomischen Markern .

Um die vorliegende Erfindung auszuführen, ist es erforderlich, geeignete Primer-Paare (forward und reverse) einzusetzen. Derartige besonders geeignete Primer sind solche, die in folgender Tabelle aufgezählt sind:

Marker und Referenzgene	Primer für quantitative PCR/resultierende Amplikon	SEQ ID
M2	M2-fw	38
	M2-rev	39
	M2-Amplikon	40
M4	M4-fw	41
	M4-rev	42
	M4-Amplikon	43
M6	M6-fw	44
	M6-rev	45
	M6-Amplikon	46
M7	M7-fw	47
	M7-rev	48
	M7-Amplikon	49
M9	M9-fw	50
	M9-rev	51
	M9-Amplikon	52
M10	M10-fw	53
	M10-rev	54
	M10-Amplikon	55
M15	M15-fw	56
	M15-rev	57
	M15-Amplikon	58
M3	M3-fw	59
	M3-rev	60
	M3-Amplikon	61
M8	M8-fw	62
	M8-rev	63
	M8-Amplikon	64
M12	M12-fw	65
	M12-rev	66
	M12-Amplikon	67
M13	M13-fw	68
	M13-rev	69
	M13-Amplikon	70
M16	M16-fw	71
	M16-rev	72
	M16-Amplikon	73
M17	M17-fw	74
	M17-rev	75
	M17-Amplikon	76

R1	R1-fw	77
	R1-rev	78
	R1-Amplikon	79
R2	R2-fw	80
	R2-rev	81
	R2-Amplikon	82
R3	R3-fw	83
	R3-rev	84
	R3-Amplikon	85

Es muß jedoch betont werden, dass die genannten Primer lediglich beispielhaft sind.

Die genannten Amplikons können beispielsweise als Sonden für Hybridisierungsverfahren verwendet werden.

Die Erfindung betrifft ferner einen Kit zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens, enthaltend mindestens einen Multigenbiomarker, welcher eine Mehrzahl von Polynukleotidsequenzen umfasst, die ausgewählt werden aus der Gruppe, bestehend aus: M2, M3, M4, M6, M7, M8, M9, M10, M12, M13, M15, M16 und M17 und/oder deren Isoformen und/oder deren Genloci und/oder deren Transkripten und/oder Fragmenten mit einer Länge von mindestens 5 Nucleotiden davon, wobei die Polynucleotide gemäß folgender Tabelle definiert sind:

Marker und Referenzgene	Transkriptvariante/ <i>cis</i> -regulatorische Sequenzen	Accession Number	SEQ ID
M2	M2_1	NM_001031700	1
	M2_2	NM_016613	2
	M2_3	NM_001128424	3
M4	M4_1	NM_203330	4
	M4_2	NM_000611	5
	M4_3	NM_203329	6
	M4_4	NM_203331	7
	M4_5	NM_001127223	8
	M4_6	NM_001127225	9
	M4_7	NM_001127226	10
	M4_8	NM_001127227	11
M6	M6_1	NM_001831	12
	M6_2	NM_203339	13
M7	M7_1	NM_031311	14
	M7_2	NM_019029	15
M9	M9	NM_006682	16
M10	M10	NM_033554	17

M15	M15_1	NM_003580	18
	M15_2	NM_001144772	19
M3	M3_A	NM_001123041	20
	M3_B	NM_001123396	21
M8	M8	NM_025209	22
	M8_cis	AI807985	23
M12	M12	NM_002185	24
	M12_cis	DB155561	25
M13	M13	NM_001080394	26
M16	M16	NM_003268	27
M17	M17	NM_182491	28

wobei der Multigenbiomarker spezifisch für einen pathophysiologischen Zustand eines Patienten ist und solche Zustände einschließt, die ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus: SIRS, Sepsis und deren Schweregraden; sepsisähnlichen Zuständen; septischem Schock; Bakteriämie, infektiösem/nicht-infektiösem Multiorganversagen; Früherkennung dieser Zustände; Fokuskontrolle; Kontrolle von chirurgischen Sanierungsmaßnahmen des Infektionsfokus; Responder/non-Responder für eine bestimmte Therapie; Therapiekontrolle; Unterscheidung zwischen infektiöser und nicht- infektiöser Genese bei systemischen Reaktionen des Organismus, wie z.B. SIRS, Sepsis, postoperative Komplikationen, chronischem und/oder akuter Organdysfunktion, Schock-Reaktion, Entzündungsreaktion und/oder Trauma.

Ein bevorzugter Kit ist dadurch gekennzeichnet, dass die Polynukleotidsequenzen auch Genloci, sense und/oder antisense Stränge von prä-mRNA und/oder mRNA, small RNA, insbesondere scRNA, snoRNA, micro RNA, siRNA, dsRNA , ncRNA oder transposable Elemente umfassen.

Ein weiter bevorzugter Kit ist dadurch gekennzeichnet, dass der er wenigstens ein Referenzgen enthält, welches ausgewählt ist, aus der Gruppe bestehend aus: R1, R2 und R3 und/oder deren Isoformen und/oder deren Genloci und/oder deren Transkripten und/oder Fragmenten mit einer Länge von mindestens 5 Nucleotiden davon, wobei die Referenzgene gemäß folgender Tabelle definiert sind:

Referenzgene	Transkriptvariante/cis-regulatorische Sequenzen	Accession Number	SEQ ID
R1	R1_A	NM_001228	29
	R1_B	NM_033355	30

	R1_C	NM_033356	31
	R1_E	NM_033358	32
	R1_F	NM_001080124	33
	R1_G	NM_001080125	34
R2	R2_1	NM_002209	35
	R2_2	NM_001114380	36
R3	R3	NM_003082	37

Eine ebenfalls bevorzugte Verwendung ist dadurch gekennzeichnet, dass aus den einzelnen bestimmten Genaktivitäten ein Index (Score) gebildet wird, der nach entsprechender Kalibrierung ein Maß für den Schweregrad und/oder den Verlauf des pathophysiologischen Zustands, insbesondere der Sepsis oder des sepsisähnlichen Zustandes, ist.

Es ist ferner bevorzugt, den Index (Score) auf einer leicht interpretierbaren Skala anzuzeigen.

In der Praxis der Anmelderin hat sich herausgestellt, daß hier eine dimensionslose Skala von -5 bis +5 oder zur Verstärkung der Unterschiede ein entsprechendes Vielfaches, z.B. von -50 bis +50 besonders geeignet ist, um pathophysiologische Zustände zu klassifizieren. Dieser Score wird „SIQ-Score“ genannt.

Im Rahmen eines optimierten EDV-gestützten Krankenhausmanagements wie auch zur weiteren Forschung auf dem Gebiet der Sepsis hat es sich als vorteilhaft herausgestellt, dass man die erhaltenen Genaktivitätsdaten zur Herstellung von Software für die Beschreibung mindestens eines pathophysiologischen Zustands und/oder einer Untersuchungsfrage und/oder als Hilfsmittel für Diagnosezwecke und/oder für Patientendatenmanagement-Systeme einsetzt.

Der Index wird vorzugsweise mittels statistischer Verfahren wie überwachte Klassifikationsverfahren aus dem Bereich des maschinellen und statischen Lernens wie z.B. (diagonale, lineare, quadratische) Diskriminanzanalyse, Super vector machines, verallgemeinerte partielle kleinste Quadrate, k-nächste Nachbarn, random forests, k-nächste Nachbar ermittelt. Für eine lineare Diskriminanzanalyse kann beispielsweise folgende Formel verwendet werden:

$$f_{LD}(x_1, \dots, x_p) = \sum_{i=1}^p w_i x_i - w_0$$

Bevorzugt ist der Multigenbiomarker eine Kombination von mehreren Polynukleotid-, insbesondere Gensequenzen, anhand deren Genaktivitäten mittels einer Interpretationsfunktion eine Klassifikation durchgeführt und/oder ein Index oder Score gebildet wird.

Für die Zwecke der vorliegenden Erfindung hat es sich ferner als vorteilhaft herausgestellt, dass die Genaktivitäten mittels enzymatischer Verfahren, insbesondere Amplifikationsverfahren, bevorzugt Polymereasekettenreaktion (PCR), vorzugsweise Real-Time-PCR; und/oder mittels Hybridisierungsverfahren, insbesondere solchen auf Microarrays, erfasst werden.

Bei der Erfassung der Genaktivitäten auftretende differentielle Expressionssignale der in dem Multigenbiomarker enthaltenen Polynukleotidsequenzen können vorteilhaft und eindeutig einem pathophysiologischen Zustand, einem Verlauf und/oder Therapiemonitoring zugeordnet werden.

Typischerweise wird aus den einzelnen bestimmten Genaktivitäten ein Index (Score, SIQ-Score) gebildet wird, der nach entsprechender Kalibrierung ein Maß für den Schweregrad und/oder den Verlauf des pathophysiologischen Zustands, insbesondere der Sepsis oder des sepsisähnlichen Zustandes, ist.

Dieser Score kann dem behandelnden Arzt ein schnelles diagnostisches Hilfsmittel in die Hand geben.

Die vorliegende Erfindung ermöglicht es, als Teil eines integrierten Systems (In Vitro Diagnostic Multivariate Index Assay, IVDMA) eine potenzielle infektiöse Komplikation in Patienten mit SIRS oder möglichen Sepsis einzuschätzen. Dieses System umfasst die Wahl der Patienten und die Bestimmung von deren Genexpressionssignalen in einem interpretierbaren Index, welchen der Arzt als Hilfsmittel zur Diagnose verwenden kann.

Die Anmelderin hat mehrere Verfahren entwickelt, die unterschiedliche Sequenzpools benutzt, um Zustände festzustellen und/oder zu unterscheiden oder definierte Untersuchungsfragen zu beantworten. Beispiele sind in folgenden Patentschriften zu finden: Unterscheidung zwischen SIRS, Sepsis und sepsisähnlichen Zuständen [WO 2004/087949; WO 2005/083115], Erstellung von Kriterien zur Vorhersage des Krankheitsverlaufs bei Sepsis [WO 05/106020], Unterscheidung zwischen nichtinfektiösen und infektiösen Ursachen eines Multiorganversagens [WO 2006/042581], *in vitro* Klassifizierung von Genexpressionsprofilen von Patienten mit infektiösem/nichtinfektiösem Multiorganversagen [WO 2006/100203], Feststellung der lokalen Ursachen eines Fiebers unklarer Genese [WO 2007/144105], Polynukleotide zur Erfassung von Genaktivitäten für die Unterscheidung zwischen lokaler und systemischer Infektion [DE 10 2007 036 678.9].

Die Erfindung betrifft Polynukleotidsequenzen, ein Verfahren und ferner Kits zur Erstellung von Multigenbiomarkern, die in einem und/oder mehreren Modulen Merkmale eines „*In Vitro* Diagnostic Multivariate Index Assay“ (IVDMIA) aufweisen.

Bezüglich der in der vorliegenden Anmeldung verwendeten Nucleotidsequenzen ist Folgendes zu bemerken:

RefSeq ist eine öffentliche Datenbank, die von Nukleotid- und Proteinsequenzen mit ihren Eigenschaften sowie bibliographische Informationen beinhaltet.

Die RefSeq Datenbank wurde durch das National Center for Biotechnology Information (NCBI), eine Abteilung von National Library of Medicine, die zum US National Institute of Health gehört erstellt und wird fortlaufend gepflegt und aktualisiert (1).

NCBI erstellt RefSeq aus den Sequenzdaten der Archiv-Datenbank „GenBank“ (2), einer umfangreichen öffentlichen Datenbank von Sequenzen, die bei GenBank in den USA, der EMBL Datenbibliothek in Großbritannien und der DDBJ Datenbank von Japan eingestellt und auch zwischen diesen Datenbanken ausgetauscht werden.

Die RefSeq Sammlung ist einzigartig, wenn es um die Bereitstellung von fehlerkorrigierten, nichtredundanten, explizitverlinkten Nukleotid- und Proteindatenbanken geht. Die Einträge sind nichtredundant mit dem Ziel, die

verschiedenen biologischen Moleküle zu repräsentieren, die für Organismus, Stamm oder Haplotyp charakteristisch sind.

Wenn bestimmte Einträge mehrfach in der Sammlung auftreten, kann es mehrere Gründe dafür geben:

- es kodieren alternative gespleißte Transkripte für das gleiche Proteinprodukt (sog. Transkriptvarianten),
- es existieren mehrere genomische Bereiche innerhalb einer Spezies oder zwischen Spezies, welche für das gleiche Proteinprodukt kodieren,
- wenn RefSeqs erstellt werden, die alternative Haplotypen darstellen und manche mRNA- und Proteinsequenzen sind dabei identisch in allen Haplotypen.

RefSeq Datenbank liefert das kritische Fundament für Sequenzintegration, genetische und funktionelle Information und gilt international als der Standard für Genomannotation. Bei der Sequenzsuche durch BLAST sind RefSeq Angaben in mehreren NCBI-Ressourcen erhältlich einschließlich Entrez Nucleotide, Entrez Protein, Entrez Gene, Map Viewer, beim FTP-Download; oder durch die Vernetzung mit PubMed (Pruitt et al. 2007; The NCBI handbook 2002). RefSeq Angaben können durch das eindeutige Accession-Format, welches den Unterstrich beinhaltet () identifiziert werden.

Arbeitsgruppen nutzen verschiedene Methoden und Protokolle und kompilieren die RefSeq Kollektion für verschiedene Organismen. RefSeq Unterlagen werden durch mehrere unterschiedliche Verfahren erstellt (The NCBI handbook 2002):

1. wissenschaftliche Kooperation
2. Computer-unterstützte Genomnotationsverfahren
3. Fehlerkorrektur durch die NCBI-Mitarbeiter
4. Auszüge aus GenBank

Jede Angabe hat einen Kommentar, der den Stand der jeweiligen Fehlerkorrektur aufweist sowie die Zuordnung der kooperierenden Arbeitsgruppe. Dadurch beinhaltet die RefSeq Angabe entweder die essentiell unveränderte, initial valide Kopie der originellen GenBank Einträge oder korrigierte sowie zusätzliche Informationen, die durch Kooperationspartner oder Experten hinzu gefügt wurden (The NCBI handbook 2002).

Falls ein Molekül in GenBank durch mehrere Sequenzen repräsentiert wird, wird durch die NCBI Mitarbeiter eine Entscheidung für die „beste“ Sequenz getroffen, die dann als RefSeq präsentiert wird.

Hauptziel ist es, bekannte Mutationen, Sequenzierungsfehler, Klonierungsartefakte und fehlerhafte Annotationen zu vermeiden. RefSeq Sequenzen, die von solchen Fehlertypen behaftet sind, werden korrigiert. Sequenzen werden validiert, indem geprüft wird, ob die genomische Sequenz, die zur annotierte mRNA korrespondiert, tatsächlich zur mRNA-Sequenzangabe passt, und ob kodierende Regionen tatsächlich in die korrespondierende Proteinsequenz translatiert werden. Eine weitere wichtige Aufgabe ist es, die Kollektion durch das Hinzufügen vorher nicht bekannter unterrepräsentierter Gene und/oder alternative Spliceprodukte zu erweitern sowie zusätzliche Annotation von Sequenzeigenschaften bereit zustellen, welche reife Peptidprodukte und ihre funktionellen Domänen repräsentieren und/oder seltene biologische Phänomene, wie z.B. nicht-AUG-Initiationsorte der Transkription oder Selenoproteine, hervorheben (The NCBI handbook 2002).

Die Überprüfung der Qualität erfolgt auf regelmäßiger Basis, um fragwürdige Sequenzen aufzufinden und zu überprüfen. Diese Qualitätstests kontrollieren die Fehler und Konflikte in Nomenklatur, Sequenzähnlichkeiten und genomische Lokalisierung, potenzielle Klonierungsfehler (wie z.B. Chimären) und gleichen die Daten mit anderen NCBI Ressourcen, inklusive HomoloGene-, Map Viewer- und GenBank verwandten Sequenzen, ab (The NCBI handbook 2002).

Bei den vorliegenden hoch-qualitativen genomischen Sequenzen von Human und Maus stand die Prüfung von cDNA-basierten RefSeqs in Bezug zum Genom im Hauptfokus. Die CCDS-Kooperation (The NCBI handbook 2002) hat auch geholfen, die Aufmerksamkeit auf die Bereiche zu fokussieren, wo es Diskrepanzen zwischen mRNA und Protein-Menge gibt.

Die Qualitätssicherungsprozesse umfassen die Registrierung der Datenbankattribute, um zu dokumentieren, dass

- die Kategorie des Qualitätstests aktualisiert wurde,
- keine Probleme mit RefSeq-Transkript und –Protein gefunden wurden und deshalb der gemeldete Fehler ignoriert werden soll,
- bedingt durch Genom-Assemblierung ein Problem an dieser Position entstanden ist

- Probleme der Genom-Assemblierung können sein:
- Es entstehen Lücken bei der Zusammensetzung der Einzelsequenzen
- in manchen Fällen beinhaltet die aufgestellte Sequenz eine bekannte Mutation oder seltenen Polymorphismus und ist somit keine ideale repräsentative Sequenz (Pruitt et al. 2007).

Die Entscheidung, die in der vorliegenden Anmeldung benannte Markerpopulation auf der Basis ihrer RefSeq- Identität für die Zwecke der vorliegenden Erfindung zu verwenden, wurde aufgrund der oben beschriebenen Eigenschaften der RefSeq - Datenbank gefällt. Die Eigenschaften dieser Datenbank, die Erstellung, Qualität, Pflege und Aktualisierungen der biologischen Sequenzen betreffend, sowie das Vorliegen funktioneller Informationen auf Nukleinsäureebene, gleichermaßen für alternative Spleißvarianten, gaben dafür den Ausschlag.

Wie bereits erläutert, bietet der biologische Mechanismus des alternativen Spleißing Raum für dem Fachmann wohl bekannte Erstreckungen des Schutzzumfangs. So ist denkbar, dass mit neuen Transkriptvarianten völlig neue Primärstrukturen identifiziert werden, oder dass sich Sequenzänderungen der bekannten Transkriptvarianten ergeben. Andererseits, werden die genomischen Regionen beansprucht, die für alle diese bekannten und unbekanntes Varianten der kodierenden Transkripte, mitsamt ihren cis-regulatorischen Sequenzen als vollkommene genomische funktionelle Einheiten umfasst und somit unter den Schutzzumfang der vorliegenden Erfindung fallen oder zumindest dem Fachmann leicht auffindbare Äquivalente zu den in den Ansprüchen, Beschreibung und im Sequenzprotokoll genannten Sequenzen zur Verfügung stellen.

Definitionen:

Für die Zwecke der vorliegenden Erfindung werden folgende Definitionen verwendet:

Zustand: die klinisch definierten Schweregrade „systemic inflammatory response syndrom“ (SIRS), „sepsis“, „severe sepsis“ und „septic shock“ wie definiert in [Bone et al., 1992] und das PIRO Konzept [Levy et al., 2003].

Multiorganversagen: Als Multiorganversagen bezeichnet man das gleichzeitig oder in rascher zeitlicher Abfolge auftretende Versagen von zwei oder mehr vitalen Organsystemen. Das Multiorgandysfunktionssyndrom (MODS) geht als initiale Organinsuffizienz dem MOV voraus [Zeni et al., 1997]. Man spricht heute vom Multiorganversagen wenn zwei oder mehr Organe gleichzeitig oder nacheinander Funktionstörungen aufweisen, wobei ein chronisch persistierendes Organversagen auszuschließen ist. Die Prognose des MOV hängt eng mit der Anzahl der beteiligten Organsysteme zusammen. Die Mortalität beträgt bei Versagen eines Organs innerhalb der ersten 24 Stunden 22%, nach 7 Tagen 41 %. Beim Versagen von drei Organsystemen steigt die Mortalität am ersten Tag auf 80 % und nach 4 Tagen auf 100 % an [Knaus et al., 1985].

Ein wichtiger Pathomechanismus für die Entstehung von MODS und MOV ist die Entwicklung eines systemischen Inflammationssyndromes (SIRS, [Bone et al., 1992]. MODS und MOV können sowohl infektiologischer als auch nicht-infektiologischer Genese sein.

Fieber unklarer Genese: Fieber unklarer Genese (Fever of unknow origin, FOU) ist klinisch definiert als ein Fieber, bei dem die Temperatur über einen Zeitraum von mehr als 3 Wochen höher als 38,8°C ist, ohne dass nach einer einwöchigen Untersuchungszeit eine eindeutige Diagnose der Ursache vorliegt. In Abhängigkeit des Ursprungs wurden vier Klassen des FOU beschrieben: FOU klassischen, nosokomialen, immunschwachen oder HIV-bezogenen Ursprungs [Roth und Basello, 2003]. FOU wurde auch als "eine eher bekannte Krankheit mit einem ungewöhnlichen Erscheinungsbild als eine seltene Störung" geschildert [Amin und Kauffman, 2003].

Nur in 10% der Patienten mit postoperativem Fieber wird eine Infektion dokumentiert [Pile et al., 2006]. In den meisten Fälle geht die Temperatur des

Patienten innerhalb von vier Tagen nach dem Eingriff zurück auf Normaltemperatur. Trotzdem entwickeln einige Patienten am oder nach dem fünften postoperativem Tag eine Infektion, wobei es sich in 12% der Fälle um eine Lungenentzündung handelt. Ebenso wird von Pile und Kollegen berichtet, dass es sich bei Fieber, welches zwei Tage nach dem Eingriff auftritt, mit hoher Wahrscheinlichkeit um eine Infektion handelt, wie z.B. eine Infektion der Harnwege und/ oder des inneren Unterleibs (Peritonitis), Lungenentzündung oder eine durch einen intravenösen Katheder ausgelöste Infektion.

Untersuchungsfrage: Eine klinische relevante Frage, die für die Behandlung eines Patientens wichtig ist, beispielsweise: Vorhersage des Krankheitsverlaufs, Therapieüberwachung, Fokus der Infektion, Überlebenschancen, Prädisposition, etc.

Eine **systemische Infektion** ist eine Infektion, bei der sich die Erreger über die Blutbahn im gesamten Organismus ausgebreitet haben.

SIRS: Systemic Inflammatory Response Syndrome, nach Bone [Bone et al., 1992] und Levy [Levy et al., 2003] ein generalisierter, inflammatorischer, nichtinfektiöser Zustand eines Patienten.

Sepsis: Nach Bone [Bone et al., 1992] und Levy [Levy et al., 2003] ein generalisierter, inflammatorischer infektiöser Zustand eines Patienten.

Biologische Flüssigkeit: Als biologische Flüssigkeiten im Sinne der Erfindung werden alle Körperflüssigkeiten der Säugetiere, einschließlich des Menschen, verstanden.

Gen: Ein Gen ist ein Abschnitt auf der Desoxyribonukleinsäure (DNA), der die Grundinformationen zur Herstellung einer biologisch aktiven Ribonukleinsäure (RNA) sowie regulatorische Elemente, welche diese Herstellung aktivieren oder inaktivieren, enthält. Als Gene im Sinne der Erfindung werden auch alle abgeleiteten DNA-Sequenzen, Partialesequenzen und synthetische Analoga (beispielsweise Peptid-Nukleinsäuren (PNA)) verstanden. Die auf Bestimmung der Genexpression auf RNA-

Ebene bezogene Beschreibung der Erfindung stellt somit ausdrücklich keine Einschränkung sondern nur eine beispielhafte Anwendung dar.

Genlocus: Genlocus (*Genort*) ist die Position eines Gens im Genom. Besteht das Genom aus mehreren Chromosomen, ist die Position innerhalb des Chromosoms gemeint, auf dem sich das Gen befindet. Verschiedene Ausprägungen oder Varianten dieses Gens werden als Allele bezeichnet, die sich alle an derselben Stelle auf dem Chromosom, nämlich dem Genlocus befinden. Somit beinhaltet der Begriff „Genlocus“ einerseits die reine genetische Information für ein spezifisches Genprodukt und andererseits sämtliche regulatorische DNA-Abschnitte sowie sämtliche zusätzliche DNA-Sequenzen, welche mit dem Gen am Genlocus in irgendeinem funktionellen Zusammenhang stehen. Die letzteren schließen an Sequenzregionen an, die in der unmittelbar Nähe (1Kb) aber außerhalb des 5‘ und/oder 3‘- Endes eines Genlocus liegen. Die Spezifizierung des Genlocus erfolgt durch die Accession-Nummer und/oder RefSeq ID des RNA-Hauptproduktes, welches von diesem Locus abstammt.

Genaktivität: Unter Genaktivität wird das Maß der Fähigkeit eines Gens verstanden, transkribiert zu werden und/oder Translationsprodukte zu bilden.

Genexpression: Der Vorgang, ein Genprodukt zu bilden und/oder Ausprägung eines Genotyps zu einem Phänotyp.

Multigenbiomarker: Kombination von mehreren Gen-Sequenzen deren Genaktivitäten mittels einer Interpretationsfunktion ein kombiniertes Gesamtergebnis (z.B. eine Klassifikation und/oder ein Index) bilden. Dieses Ergebnis ist spezifisch für einen Zustand und/oder eine Untersuchungsfrage.

Hybridisierungsbedingungen: Dem Fachmann wohl bekannte physikalische und chemische Parameter, welche die Etablierung eines thermodynamischen Gleichgewichtes aus freien und gebundenen Molekülen beeinflussen können. Im Interesse optimaler Hybridisierungsbedingungen müssen Zeitdauer des Kontaktes der Sonden- und Probenmoleküle, Kationenkonzentration im Hybridisierungspuffer,

Temperatur, Volumen sowie Konzentrationen und -verhältnisse der hybridisierenden Moleküle aufeinander abgestimmt werden.

Amplifikationsbedingungen: Konstante oder sich zyklisch verändernde Reaktionsbedingungen, welche die Vervielfältigung des Ausgangsmateriales in Form von Nukleinsäuren ermöglichen. Im Reaktionsgemisch liegen die Einzelbausteine (Desoxyribonukleotide) für die entstehenden Nukleinsäuren vor, ebenso wie kurze Oligonukleotide, welche sich an komplementäre Bereiche im Ausgangsmaterial anlagern können, sowie ein Nukleinsäure-Synthese-Enzym, Polymerase genannt. Dem Fachmann wohl bekannte Kationenkonzentrationen, pH-Wert, Volumen und die Dauer und Temperatur der einzelnen Reaktionsschritte sind von Bedeutung für den Ablauf der Amplifikation.

Primer: Als Primer wird in der vorliegenden Erfindung ein Oligonukleotid bezeichnet, das als Startpunkt für Nukleinsäure-replizierende Enzyme wie z. B. die DNA-Polymerase dient. Primer können sowohl aus DNA als auch aus RNA bestehen (Primer3, siehe z.B. http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi des MIT)

Sonde: In der vorliegenden Anmeldung ist eine Sonde ein Nukleinsäurefragment (DNA oder RNA), das mit einer molekularen Markierung (z.B. Fluoreszenzlabel, insbesondere Scorpion[®], molecular beacons, Minor Groove Binding- Sonden, TaqMan[®]-Sonden, Isotopenmarkierung, usw.) versehen werden kann und zur sequenzspezifischen Detektion von Ziel-DNA- und/oder Ziel-RNA-Molekülen eingesetzt wird.

PCR: ist die Abkürzung für die englische Bezeichnung „Polymerase Chain Reaction“ (Polymerase-Kettenreaktion). Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine Methode, um DNA *in vitro* außerhalb eines lebenden Organismus mit Hilfe einer DNA-abhängigen DNA Polymerase zu vervielfältigen. PCR wird insbesondere gemäß der vorliegenden Erfindung eingesetzt, um kurze Teile - bis zu etwa 3.000 Basenpaare – eines interessierenden DNA-Strangs zu vervielfältigen. Dabei kann es sich um ein Gen oder auch nur um einen Teil eines Gens oder auch um nicht kodierende DNA-Sequenzen handeln. Es ist dem Fachmann wohl bekannt, dass eine

Reihe von PCR-Verfahren im Stand der Technik bekannt sind, welche alle durch den Begriff „PCR“ mit umfasst sind. Dies gilt insbesondere für die „Real-Time-PCR“ (vgl. auch die Erläuterungen weiter unten).

PCR-Primer: Typischerweise benötigt eine PCR zwei Primer, um auf den beiden Einzelsträngen der DNA jeweils den Startpunkt der DNA-Synthese festzulegen, wodurch der zu vervielfältigende Bereich von beiden Seiten begrenzt wird. Derartige Primer sind dem Fachmann wohlbekannt, beispielsweise aus der Website „Primer3“, siehe z.B. http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi des MIT.

Transkript: Für die Zwecke der vorliegenden Anmeldung wird unter einem Transkript jegliches RNA-Produkt verstanden, welches anhand einer DNA-Vorlage hergestellt wird.

Small RNA: Kleine RNAs im Allgemeinen. Vertreter dieser Gruppe sind insbesondere, jedoch nicht ausschließlich:

a) scRNA (small cytoplasmatic RNA), welche eines von mehreren kleinen RNA-Molekülen im Cytoplasma eines Eukaryonten ist.

b) snRNA (small nuclear RNA), eine der vielen kleinen RNA-Formen, die nur im Zellkern vorkommen. Einige der snRNAs spielen beim Spleißen oder bei anderen RNA-verarbeitenden Reaktionen eine Rolle.

c) small non-protein-coding RNAs, welche die sogenannten small nucleolar RNAs (snoRNAs), microRNAs (miRNAs), short interfering RNAs (siRNAs) und small double-stranded RNAs (dsRNAs) einschließen, welche die Genexpression auf vielen Ebenen, einschließlich der Chromatin-Architektur, RNA-Editierung, RNA- Stabilität, Translation und möglicherweise auch Transkription und Spleißen. Im Allgemeinen werden diese RNAs auf mehrfachem Wege prozessiert aus den Introns und Exons längerer Primärtranskripte, einschließlich proteincodierender Transkripte. Obwohl etwa nur 1,2% des Humangenoms Proteine codiert, wird ein großer Teil dennoch transkribiert. Tatsächlich bestehen ca. 98% der in Säugern und Menschen gefundenen Transkripte aus non-protein-coding RNAs (ncRNA) aus Introns von proteincodierenden Genen und den Exons und Introns von nicht proteincodierenden

Genen, einschließlich vieler, welche anti-sense zu proteincodierenden Genen sind oder mit diesen überlappen. Small nucleolar RNAs (snoRNAs) regulieren die sequenzspezifische Modifikation von Nukleotiden in Target-RNAs. Hierbei treten zwei Typen von Modifikationen auf, nämlich 2'-O-Ribosemethylierung und Pseudouridylierung, welche durch zwei große snoRNA-Familien reguliert werden, die einerseits box C/D-snoRNAs und andererseits box H/ACA snoRNAs genannt werden. Derartige snoRNAs weisen eine Länge von etwa 60 bis 300 Nukleotiden auf. miRNAs (microRNAs) und siRNAs (short interfering RNAs) sind noch kleinere RNAs mit im Allgemeinen 21 bis 25 Nukleotiden. miRNAs stammen aus endogenen kurzen Hairpin-Vorläuferstrukturen und benutzen gewöhnlich andere Loci mit ähnlichen – jedoch nicht identischen Sequenzen als Ziel translationaler Repression. siRNAs entstehen aus längeren doppelsträngigen RNAs oder langen Hairpins, oftmals exogenen Ursprungs. Sie haben gewöhnlich homologe Sequenzen an demselben Locus oder woanders im Genom zum Ziel, wo sie am sogenannten gene silencing, ein Phänomen, welches auch RNAi genannt wird, beteiligt sind. Die Grenzen zwischen miRNAs und siRNAs sind jedoch fließend.

d) Zusätzlich kann der Begriff "small RNA" auch sogenannte transposable Elemente (TEs) und insbesondere Retroelemente umfassen, welche ebenfalls für die Zwecke der vorliegenden Erfindung unter dem Begriff „small RNA“ verstanden werden.

RefSeq ID: Diese Bezeichnung bezieht sich auf Einträge in der NCBI Datenbank (www.ncbi.nlm.nih.gov). Diese Datenbank liefert nicht-redundante Referenz-Standards zu genomischer Information. Diese genomischen Informationen schließen unter anderem Chromosomen, mRNAs, RNAs und Proteine ein. Jede RefSeq ID stellt ein einzelnes, natürlich vorkommendes Molekül eines Organismus dar. Die biologischen Sequenzen, die eine RefSeq repräsentieren, sind von GenBank Einträgen (ebenfalls NCBI) abgeleitet, sind aber eine Zusammenstellung von Informationselementen. Diese Informationselemente stammen aus Primär-Forschung auf DNA-, RNA- und Proteinebene.

Accession-Nummer: Eine Accession-Nummer stellt die Eintragsnummer eines Polynukleotides in der dem Fachmann bekannten NCBI-GenBank dar. In dieser

Datenbank werden sowohl RefSeq ID's als auch weniger gut charakterisierte und redundante Sequenzen als Einträge verwaltet und der Öffentlichkeit zugänglich gemacht (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/index.html).

Lokale Infektion: Die Infektion beschränkt sich auf die Eintrittspforte des Erregers (z.B. Wundinfektion)

Generalisierte Infektion: Pathogene dringen ins Gefäßsystem vor und ziehen den gesamten Organismus in Mitleidenschaft. Generalisierte Infektionen können zu einer Sepsis führen.

Kolonisierung: Die Gegenwart von Mikroorganismen löst im Organismus keinerlei Krankheitssymptome aus.

Schwere Infektion: Infektiöser Herd mit der Gefahr der zunehmenden Ausbreitung mit den Symptomen Fieber ab 39°C und/oder Bakteriämie.

Bakteriämie: Ein Zustand, in dem vorübergehend und kurzfristig Bakterien im Blut anwesend sind, ohne dass dies mit dem Auftreten von bakteriell bedingten klinischen Symptomen verbunden sein muss.

Alternatives Splicing: ein Prozess, bei dem die Exons des primären Gentranskripts (pre-mRNA) nach Ausschneiden der Introns in unterschiedlichen Kombinationen wiederverbunden werden.

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool (nach Altschul et al., J Mol Biol 215:403-410; 1990). Sequenzvergleichsalgorithmus, geschwindigkeitsoptimiert, wird für die Suche in Sequenzdatenbanken für eine optimale lokale Anpassung an die Abfragesequenz genutzt.

cDNA: Komplementäre DNA. DNA-Sequenz, Produkt der Reversen Transkription von mRNA.

Codierende Sequenz: Protein-kodierender Abschnitt eines Gens bzw. einer mRNA in Abgrenzung zu Introns (nicht kodierende Sequenzen) und 5-' oder 3'-nichttranslatierten Abschnitten. Kodierende Sequenzen der cDNA oder reifen mRNA umfassen den Bereich zwischen Start- (AUG oder ATG) und Stopcodon.

EST: Expressed Sequence Tag. Kurze ssDNA-Abschnitte der cDNA (normalerweise ~300-500 bp), üblicherweise in großen Mengen produziert. Repräsentieren die Gene, die in bestimmten Geweben und/oder während bestimmter Entwicklungsphasen exprimiert werden. Teilweise codierend bzw. nicht codierende Kennzeichnungen der Expression für cDNA-Bibliotheken. Wertvoll für die Größenbestimmung vollständiger Gene und im Rahmen von Kartierungen (Mapping).

Exon: Kodierender, der mRNA entsprechender Sequenzbereich typischer eukaryotischer Gene. Exons können die kodierenden Sequenzen, den 5'-nichttranslatierten Bereich oder den 3'-nichttranslatierten Bereich umfassen. Exons kodieren spezifische Abschnitte des vollständigen Proteins und sind normalerweise durch lange Abschnitte (Introns) getrennt, die bisweilen als "junk DNA" bezeichnet werden und deren Funktion nicht genau bekannt ist aber wohl kurze, nicht-translatierte RNAs (snRNA) oder regulatorische Informationen kodieren.

GenBank Nukleotidsequenz-Datenbank mit Sequenzen aus mehr als 100.000 Organismen. Einträge, die mit Eigenschaften der kodierende Bereiche annotiert sind, umfassen auch die Translationsprodukte. GenBank ist Teil der internationalen Kooperation der Sequenzdatenbanken, die auch EMBL und DDBJ umfasst.

Intron: Nicht-codierender Sequenzbereich eines typischen eukaryotischen Gens, wird während des RNA-Splicings aus dem primären Transkript herausgeschnitten und befindet sich somit nicht mehr in der reifen, funktionellen mRNA, rRNA oder tRNA.

mRNA: Messenger RNA oder manchmal nur "message". RNA, die die für Proteinkodierung notwendigen Sequenzen enthält. Der Begriff mRNA wird in Abgrenzung zum (ungesplitten) Primärtranskript nur für das reife Transkript mit PolyA-Schwanz (exklusive der über das Splicing entfernten Introns) benutzt. Weist 5'-nichttranslatierte, Aminosäuren-kodierende, 3'- nichttranslatierte Bereiche und (fast immer) einen Poly(A)-Schwanz auf. Stellt typischerweise ca. 2% der gesamten zellulären RNA.

Poly(A)-Schwanz: ssAdenosin-Verlängerung (~ 50-200 Monomere), die während des Splicings an das 3'-Ende der mRNA gehangen wird. Der PolyA-Tail erhöht vermutlich die Stabilität der mRNA (möglicherweise Protektion gegen Nukleasen). Nicht alle mRNA weisen das Konstrukt auf, so z.B. die Histon-mRNA.

RefSeq NCBI-Datenbank der Referenzsequenzen. Fehler-korrigierte, nicht-redundante Sequenzsammlung genomischer DNA-Contigs, mRNA- und Protein-Sequenzen bzw. von bekannten Genen und vollständiger Chromosomen.

SNPs: Single Nucleotide Polymorphisms. Auf einzelnen Nukleotidabweichungen beruhende genetische Unterschiede zwischen Allelen des gleichen Gens. Entstehen an spezifischen individuellen Positionen innerhalb eines Gens.

Transkriptvarianten: Alternative Splicing-Produkte. Die Exons des primären Gentranskripts (prä-mRNA) wurden auf unterschiedliche Weise wiederverbunden und werden nachfolgend translatiert.

3'-nichttranslatiertes Bereich: Transkribierter 3'-terminaler mRNA-Bereich ohne proteinkodierende Information (Bereich zwischen Stopkodon und PolyA-Schwanz). Kann die Translationseffizienz oder die Stabilität der mRNA beeinflussen.

5'- nichttranslatiertes Bereich: Transkribierter 5'-terminaler mRNA-Bereich ohne proteinkodierende Information (Bereich zwischen initialem 7-Methylguanosin und der Base unmittelbar vor dem ATG-Startcodon). Kann die Translationseffizienz oder die Stabilität der mRNA beeinflussen.

Polynucleotid-Isoformen: Polynucleotide mit gleicher Funktion, jedoch unterschiedlicher Sequenz.

Abkürzungen

AUC (area under curve)	Fläche unter der Kurve
CRP	C-reaktives Protein
CV (cross validation)	Kreuzvalidierung
DLDA (diagonal linear discriminant analysis)	diagonale lineare Diskriminanzanalyse Klassifikationsverfahren
GPLS (generalized partial least squares)	verallgemeinerte partielle kleinste Quadrate (Klassifikationsverfahren)
IQR (inter quartile range)	Abstand zwischen dem 75% und 25% Perzentil
kNN (k nearest neighbours)	k-nächste Nachbarn (Klassifikationsverfahren)
LDA (linear discriminant analysis)	lineare Diskriminanzanalyse

NPV (negative predictive value)	(Klassifikationsverfahren) negativer prädikativer Wert (Anteil der korrekt negativen Tests)
OR	Odd Ratio
PCT	Procalcitonin
PPV (positive predictive value)	positiver prädikativer Wert (Anteil der korrekt positiven Tests)
RF (random forests)	Klassifikationsverfahren
ROC (receiver operator characteristics)	Abbildung zur Darstellung von Klassifikationsergebnissen
Sensitivität	Anteil der korrekten Tests in der Gruppe mit vorgegebener Erkrankung (infektiöse SIRS bzw. Sepsis)
Spezifizität	Anteil der korrekten Tests in der Gruppe ohne vorgegebene Erkrankung (nicht-infektiöse SIRS)
SVM (support vector machines)	Klassifikationsverfahren

Für eine schnelle Diagnostik hat sich in der Praxis herausgestellt, dass Echtzeit- oder Real-Time-Amplifikationsverfahren die bevorzugten Verfahren sind. Daher werden im Folgenden die Grundlagen, welche dem Fachmann wohlbekannt sind, kurz im Hinblick auf ihre Bedeutung für die vorliegende Erfindung zusammengefasst.

Andere, dem Fachmann bekannten Verfahren, wie z.B. Sequenzierung, Mikroarray basierte Methoden, NASBA usw. sind ebenfalls möglich.

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist es möglich, spezifische Sequenzbereiche aus geringsten Ausgangsmengen von Nukleinsäuren in-vitro und zudem schnell zu amplifizieren, um sie so einer Analyse oder Weiterverarbeitung zugänglich zu machen. Ein doppelsträngiges DNA-Molekül wird durch Hitzeeinwirkung aufgeschmolzen (denaturiert). Die Einzelstränge dienen in der Folge als Matrize für die enzymatisch katalysierte Polymerisation von Desoxyribonukleotiden, wodurch wieder doppelsträngige DNA-Moleküle entstehen. Die als Primer bezeichneten Oligodesoxyribonukleotide definieren dabei den zu kopierenden Sequenzabschnitt, indem sie an Orten komplementärer Sequenz mit der Ziel-DNA hybridisieren und als Starter für die Polymerisation dienen. Der Prozess exponentieller Produktbildung wird von verschiedenen Faktoren begrenzt. Im Laufe

der PCR geht die Netto-Produktbildung daher schließlich auf Null zurück und die Gesamtmenge an PCR-Produkt erreicht einen Plateauwert.

Geeignete PCR-Primer sind beispielsweise Primer mit den Sequenzen gemäß Tabelle 3. Es ist dem Fachmann jedoch bekannt, dass eine Vielzahl weiterer Primer zur Ausführung der vorliegenden Erfindung verwendet werden kann.

Seit ihrer Einführung in das molekularbiologische Methodenspektrum wurde eine nahezu unüberschaubare Vielzahl von technischen Varianten entwickelt. Heute ist die PCR eine der wichtigsten Methoden in der molekularen Biologie und der molekularen Medizin. Heute findet sie Verwendung in einem überaus breiten thematischen Spektrum, z. B. beim Nachweis von Viren oder Keimen, bei der Sequenzierung, dem Verwandtschaftsnachweis, der Erstellung von Transkriptionsprofilen und der Quantifizierung von Nukleinsäuren [Valasek und Repa, 2005; Klein, 2002]. Zudem lassen sich mit Hilfe der PCR in einfacher Weise beliebige Sequenzabschnitte des Nukleinsäurebestandes eines Organismus klonieren. Die Vielzahl entwickelter PCR-Varianten ermöglicht u. a. eine zielgerichtete oder zufällige Veränderung der DNA-Sequenz sowie sogar die Synthese größerer, in dieser Form zuvor nicht existenter Sequenzabfolgen.

Mit diesem klassischen Verfahren lassen sich hochsensitiv DNA und über die reverse Transkription (RT) auch RNA qualitativ nachweisen [Wong et al., 2005; Bustin 2002]. Eine Weiterentwicklung dieser Methode ist die Real-Time-PCR, die erstmals 1991 vorgestellt wurde und neben qualitativen Aussagen auch eine Quantifizierung ermöglicht.

Real-Time-PCR, auch quantitative PCR (qPCR) genannt, ist eine Methode zur Detektion und Quantifizierung von Nukleinsäuren in Echtzeit [Nolan et al., 2006]. In der Molekularbiologie gehört sie bereits seit einigen Jahren zu den etablierten Standardtechniken.

Im Gegensatz zur PCR findet hier die Detektion bereits während der Amplifikation statt. Basierend auf Fluoreszenz-markierten Sonden, den Fluorophoren, kann die Amplifikation in Echtzeit verfolgt werden. In jedem Reaktionszyklus nehmen

die fluoreszierenden PCR-Produkte und damit die Intensität der lichtinduzierten Fluoreszenz-Emission zu. Da die Zunahme der Fluoreszenz und die Menge an neusynthetisierten PCR-Produkten über einen weiten Bereich proportional zueinander sind, kann aus den gewonnenen Daten die Ausgangsmenge des Templates bestimmt werden. Eine gelelektrophoretische Auftrennung der Amplifikate ist nicht mehr erforderlich. Die Ergebnisse sind direkt verfügbar, was eine deutliche Zeitersparnis mit sich bringt. Da die Reaktionen in geschlossenen Gefäßen ablaufen, und nach dem Start der PCR keine weiteren Pipettierschritte erforderlich sind, reduziert sich das Kontaminationsrisiko auf ein Minimum. Als Fluorophore werden entweder nukleinsäure-bindende Fluoreszenzfarbstoffe wie SYBRGreen oder sequenzspezifische Fluoreszenzsonden wie Taq-Man-Sonden, LightCycler-Sonden und Molecular Beacons eingesetzt [Kubista et al., 2006]. SYBRGreen ist ein Farbstoff, dessen Fluoreszenz stark zunimmt, sobald das Molekül an doppelsträngige DNA bindet. Diese kostengünstige Lösung ist besonders bei der parallelen Durchführung mehrerer Reaktionen mit unterschiedlichen Primerpaaren geeignet. Nachteile liegen in der geringen Spezifität, da SYBRGreen sequenzunspezifisch an jede doppelsträngige DNA bindet, sowie darin, dass keine Multiplex-Messungen durchgeführt werden können. Mit Hilfe einer Schmelzkurvenanalyse kann nach erfolgter PCR allerdings zwischen dem Zielprodukt und unspezifischer DNA differenziert werden: In Abhängigkeit der Nukleotidlänge und -zusammensetzung zerfällt jeder DNA-Doppelstrang bei einer für ihn charakteristischen Temperatur, der Schmelztemperatur, in seine zwei Einzelstränge. Da die doppelsträngige DNA von spezifischen PCR-Produkten einen höheren Schmelzpunkt hat als unspezifisch entstehende Primerdimere, ist eine Unterscheidung anhand der Fluoreszenzabnahme bei Zunahme der Temperatur möglich.

Im Gegensatz dazu ist der Nachweis mit fluoreszenzbasierten Sonden hochspezifisch, aber auch sehr kostenintensiv. Beim TaqMan-Prinzip enthält der PCR-Ansatz neben den PCR-Primern eine sequenzspezifische TaqMan-Hybridisierungsprobe, die über einen Quencher und einen Reporterfarbstoff verfügt. Die Sonde ist komplementär zu einer Sequenz, die zwischen den Primern liegt. In freier Lösung wird die Fluoreszenz durch die räumliche Nähe des Quenchers unterdrückt. Nach dem FRET-(Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer)-Prinzip schluckt der Quencher die Fluoreszenzemission des angeregten Fluorophors.

Hybridisiert diese Sonde jedoch mit der Zielsequenz, wird sie während der PCR von der Taq-Polymerase hydrolysiert, der Reporterfarbstoff wird räumlich vom Quencher entfernt und emittiert bei Anregung detektierbare Fluoreszenz. Beim LightCycler-Prinzip enthält der PCR-Ansatz neben den PCR-Primern zwei fluoreszenz-markierte Sonden (Donor- und Akzeptor- Fluoreszenzfarbstoff). Ein nach außen hin messbares Fluoreszenzsignal entsteht nur bei unmittelbar benachbarter Hybridisierung der beiden Sonden mit der spezifischen Zielsequenz. Im Rahmen einer anschließenden Schmelzkurvenanalyse können sogar das Vorliegen und die Art einzelner Punktmutationen innerhalb der Hybridisierungsbereiche der Sonden detektiert werden. Ein weiteres Beispiel sind die Molecular Beacons. Diese Oligonukleotide enthalten am 5'- und 3'-Ende zueinander komplementäre Sequenzen, die in ungebundenem Zustand hybridisieren und eine Haarnadelstruktur bilden. Reporterfluorophor und Quencher, lokalisiert an beiden Enden, sind so in direkter Nachbarschaft. Erst wenn die Sonde am Templat bindet, werden die beiden Farbstoffe räumlich getrennt, so dass nach Anregung wieder Fluoreszenz messbar ist. Scorpion- und Sunrise-Primer bilden zwei weitere Modifikationen für sequenzspezifische Sonden [Whitcombe et al., 1999].

Die quantitative Bestimmung eines Templates kann mittels absoluter oder relativer Quantifizierung erfolgen. Bei der absoluten Quantifizierung findet die Messung anhand externer Standards, z.B. Plasmid-DNA in unterschiedlichen Verdünnungen, statt. Die relative Quantifizierung nutzt dagegen so genannte Housekeeping- oder Referenzgene als Referenz [Huggett et al., 2005]. Diese Referenzgene werden konstant exprimiert und bieten damit die Möglichkeit zur Normierung unterschiedlicher Expressionsanalysen. Die Auswahl der Housekeepinggene muss für jedes Experiment individuell erfolgen. Für die vorliegende Erfindung werden bevorzugt Housekeepinggene mit den Sequenzen gemäß Tabelle 2 verwendet.

Die generierten Experiment-Daten werden mit Hilfe der geräteeigenen Software ausgewertet. Für die grafische Darstellung wird die gemessene Fluoreszenzintensität gegen die Anzahl der Zyklen aufgetragen. Die resultierende Kurve unterteilt sich dabei in drei Bereiche. In der ersten Phase, also zu Beginn der Reaktion, überwiegt noch das Grundrauschen, ein Signal des PCR-Produktes ist noch nicht nachweisbar.

Die zweite Phase entspricht der exponentiellen Wachstumsphase. In diesem Segment verdoppelt sich das DNA-Template annähernd in jedem Reaktionsschritt. Entscheidend für die Auswertung ist der Zyklus, bei dem detektierbare Fluoreszenz auftritt und die exponentielle Phase der Amplifikation beginnt. Dieser Threshold-Cycle(CT)-Wert oder auch Crossing Point liefert die Basis für die Berechnung der Ausgangsmenge an vorhandener Ziel-DNA. So ermittelt die Software bei einer absoluten Quantifizierung die Crossing Points der unterschiedlichen Referenz-Verdünnungen und quantifiziert anhand der errechneten Standardkurve die Template-Menge. In der letzten Phase erreicht die Reaktion schließlich ein Plateau.

Die quantitative PCR ist ein wichtiges Werkzeug für Genexpressionsstudien in der klinischen Forschung. Mit der Möglichkeit, mRNA exakt zu quantifizieren, lassen sich bei der Suche nach neuen Wirkstoffen die Auswirkungen bestimmter Faktoren auf Zellen analysieren, die Differenzierung von Vorläuferzellen in verschiedene Zelltypen beobachten oder die Genexpression in Wirtszellen als Antwort auf Infektionen nachverfolgen. Durch den Vergleich von Wildtyp- und Krebszellen auf RNA-Ebene können in der Zellkultur Gene identifiziert werden, die einen entscheidenden Einfluss auf Krebsentstehung haben. In der Routine-Labordiagnostik wird Real-Time-PCR vorrangig zum qualitativen und quantitativen Nachweis von Viren und Bakterien eingesetzt. In der klinischen Routine, insbesondere im Bereich der Intensivmedizin, braucht der Arzt einen schnellen und eindeutigen Befund. Auf Basis der Real-Time-PCR können Tests durchgeführt werden, die noch am gleichen Tag das Ergebnis liefern. Hiermit begründet sich ein enormer Fortschritt für die klinische Diagnostik der Sepsis.

Neben den hier beschriebenen technischen Varianten der PCR-Methode können auch sogenannte isothermale Amplifikationsverfahren wie beispielsweise NASBA oder SDA oder andere technische Varianten für die der Detektion vorausgehenden Vervielfältigung der Zielsequenz verwendet werden.

Ein bevorzugtes Verfahren zur Wahl der Multigenbiomarkersequenzen umfaßt die folgenden Schritte:

- a. Patientenauswahl basiert auf dem extremen Gruppenverfahren;

- b. Generierung von mindestens einem Multigenbiomarker;
- c. Bestimmung finaler Multigenbiomarker.

Ein bevorzugtes Verfahren des dem „*in vitro* Diagnostic multivariate index assay“ ähnlichen Tests umfaßt die folgenden Schritte:

- a. Isolierung von Proben-Nukleinsäuren aus einer von einem Patienten stammenden Probe;
- b. Erfassung von Genaktivitäten mittels Sequenzen von wenigstens einem Zustands- und/oder Untersuchungsfragespezifischen Multigenbiomarkers;
- c. Erfassung von Genaktivitäten für wenigstens ein internes Referenzgen um die in b) erfassten Genaktivitäten zu normalisieren;
- d. Verwendung einer Interpretationsfunktion für die in c) normalisierten Genaktivitäten um einen Zustands- und/oder Untersuchungsfrage-spezifischen Index abzuleiten.

Eine bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung liegt auch in einer Verwendung, bei welcher die Genaktivitäten mittels eines Hybridisierungsverfahrens, insbesondere auf wenigstens einem Mikroarray, bestimmt werden. Der Vorteil eines Mikroarrays liegt in der höheren Informationsdichte des Biochips im Vergleich zu den Amplifikationsverfahren. So ist es z.B. mühelos möglich, auf einem Mikroarray mehrere 100 Sonden bereitzustellen, um in einem einzigen Untersuchungsgang mehrere Fragestellungen gleichzeitig zu untersuchen.

Die mittels der Erfindung erhaltenen Genaktivitätsdaten können auch vorteilhaft für die elektronische Weiterverarbeitung, z. B. zur Aufzeichnung in der elektronischen Krankenakte verwendet werden.

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung besteht in der Verwendung von rekombinant oder synthetisch hergestellten, spezifischen Nukleinsäuresequenzen, Partialsequenzen, einzeln oder in Teilmengen, als Multigenbiomarker in Sepsis-Assays und/oder zur Bewertung der Wirkung und Toxizität beim Wirkstoffscreening und/oder zur Herstellung von Therapeutika und von Stoffen und Stoffgemischen, die als Therapeutikum vorgesehen sind, zur Vorbeugung und Behandlung von SIRS und Sepsis.

Für die erfindungsgemäßen Verfahren (Arraytechnik und/oder Amplifikationsverfahren) wird die Probe ausgewählt aus: Gewebe, Körperflüssigkeiten, insbesondere Blut, Serum, Plasma, Urin, Speichel oder Zellen oder Zellkomponenten; oder eine Mischung davon.

Es ist bevorzugt, dass Proben, insbesondere Zellproben, einer lytischen Behandlung unterzogen werden, um deren Zellinhalte freizusetzen.

Es ist dem Fachmann klar, dass die in den Ansprüchen dargelegten einzelnen Merkmale der Erfindung ohne Einschränkung beliebig miteinander kombinierbar sind.

Klassifikationsmethoden

Die Theorie des Lernens spielt eine Schlüsselrolle auf dem Gebiet der Statistik, Datenanalyse und künstlichen Intelligenz mit zahlreichen Anwendungen in Ingenieurwissenschaften. Klassifikationsverfahren werden hauptsächlich bei 2 unterschiedlichen Aufgaben verwendet, bei der Abgrenzung von vorher unbekanntem Klassen (unüberwachtes Lernen, class discovery) und bei der Zuordnung von bestimmten Daten/Proben/Patienten zu einer bereit definierten Klasse (Klassenvorhersage, class prediction) [Golub et al., 1999].

In der Klassenvorhersage werden Daten/Proben/Patienten benutzt, die bereits existierenden bzw. definierten Klassen/Gruppen zugeordnet wurden (so genannter Trainingsdatensatz), um ein analytisches Verfahren (Klassifikationsalgorithmus) zu entwickeln, das die Unterschiede zwischen den Gruppen widerspiegelt. Unabhängige Proben (sogenannter Testdatensatz) werden verwendet, um die Trennungsgüte der

Klassifikationsregel zu bewerten. Die Vorgehensweise kann in folgende Schritte eingeteilt werden:

1. Definiere einen idealen Daten/Proben/Patientensatz, um charakteristische Profile der zu detektierenden Gruppen zu bekommen.
2. Jede Gruppe wird dann geteilt, so dass 2 gleichwertige Teilmengen, ein Trainingsdatensatz und ein Testdatensatz, entstehen.
3. Profile für den Trainingsdatensatz enthalten idealerweise Daten, die eine maximale Differenz zwischen den Gruppen widerspiegeln.
4. Die Differenz zwischen den Gruppen wird mittels geeigneter Abstandsmaße quantifiziert und anhand eines Algorithmus bewertet. Dieser Algorithmus sollte zu einer Klassifikationsregel führen, die mit der höchsten Spezifität und Sensitivität die Daten in die richtige Klasse einordnet. Typische Vertreter solcher Algorithmen aus dem Bereich des überwachten Lernens sind die Diskriminanzanalyse (DA), Random Forests (RF), Generalized Partial Least Squares (GPLS), Support Vector Machines (SVM) oder k-Nearest Neighbors (kNN).
5. Abschließend wird die Güte der Klassifikationsregel am Testdatensatz geprüft.

Definitionen:

Diskriminanzanalyse (DA): Bei der linearen Diskriminanzanalyse erhalten wir eine lineare, bei der quadratischen Diskriminanzanalyse (QDA) eine quadratische Diskriminanzfunktion. Die Diskriminanzfunktion bestimmt sich aus der Kovarianzmatrix und den Gruppenmittelwerten. Im Fall der quadratischen Diskriminanzanalyse wird zusätzlich angenommen, dass auch die Kovarianzmatrix zwischen den Gruppen variiert [Hastie et al.,2001].

Random Forests (RF): Die Klassifikation mittels Random Forests basiert auf der Kombination von Entscheidungsbäumen, [Breiman, 2001]. Der Ablauf des Algorithmus ist etwa folgendermaßen:

1. Wähle durch Ziehen mit Zurücklegen einen Trainingsdatensatz aus (Out-of-bag data).
2. An jedem Knoten des Entscheidungsbaums wähle zufällig Variablen aus. Berechne mit diesen Variablen die beste Aufteilung des Trainingsdatensatzes auf die Klassen.
3. Nachdem alle Entscheidungsbäume generiert wurden, fass die Klassenzuordnungen der einzelnen Entscheidungsbäume zu einer Klassenzuordnung zusammen.

Generalized Partial Least Squares (GPLS): Bei dem Generalized Partial Least Squares [Ding und Gentleman, 2004] Verfahren handelt es sich um eine sehr flexible Verallgemeinerung des multiplen Regressionsmodells. Aufgrund der großen Flexibilität kann diese Methode auch in vielen Situationen angewendet werden, in denen das klassische Modell versagt.

Support Vector Machine (SVM): Beim Support Vector Machine Klassifikator handelt es sich um einen verallgemeinerten linearen Klassifikator. Die Eingabedaten werden in einem höher dimensional Raum abgebildet und in diesem Raum wird eine optimale trennende (Hyper-)Ebene konstruiert. Diese im höherdimensionalen Raum linearen Schranken transformieren sich zu nichtlinearen Schranken im Raum der Eingabedaten, [Vapnik, 1999].

k-nächsten Nachbarn (k-Nearest Neighbors, kNN): Bei der Methode der k-nächsten Nachbarn, wird die Klassenzugehörigkeit einer Beobachtung (eines Patienten) anhand der sich in seiner Umgebung befindlichen k-nächsten Nachbarn entschieden. Die Nachbarschaft wird dabei in der Regel mit Hilfe des euklidischen Abstands bestimmt und die Klassenzugehörigkeit dann anhand eines Mehrheitsvotums entschieden [Hastie et al., 2001].

Im Folgenden ist ein generelles Konzept beschrieben, wie die erfindungsgemäßen Verfahren durchgeführt werden. Dabei ist dem Fachmann wohlbekannt, dass geringfügige Anpassungen der statistischen Verfahren erforderlich sein können, wenn andere Patientenkollektive und/oder andere Fragestellungen

untersucht werden sollen. Für die Generierung der Klassifikationsregel werden verschiedene statistische Verfahren (Diskriminanzanalyse und/oder Random Forests u.a.) sowie Strategien verwendet (einfache und mehrfache Kreuzvalidierung, zufällige Bootstrapsstichproben u.a.)

Basierend auf Genexpressionsdaten sollte ein Verfahren zur Bestimmung eines Multigenbiomarkers entwickelt werden, der eine infektiöse Komplikation wie beispielsweise Sepsis widerspiegelt. Der Biomarker und der zugehörige Index-Wert, auch „Score“ genannt, bilden die Grundlage eines sogenannten „in vitro Diagnostic multivariate Index Assays“ [IVDMIA, FDA-Guidelines, 2003] zur Verbesserung der Diagnose systemischer Infektionen. Die aus dem Verfahren resultierende Klassifikationsregel sollte insbesondere eine Differenzierung von SIRS- und Sepsis-Patienten mit – im Vergleich zum etablierten Biomarker Procalcitonin – verbesserter Sensitivität und Spezifität ermöglichen, ist jedoch nicht auf diese Fragestellung beschränkt.

Zur Entwicklung eines solchen Multigenbiomarkers sind die folgenden Schritte notwendig: *1. Schritt: Trainingsdatensatz.* Um den Zusammenhang zwischen einer Genexpression bestimmter Gene und der untersuchten Erkrankung aufzudecken, werden Populationen (Kohorten) definiert, die ihr Vorhanden- bzw. Nichtvorhandensein am deutlichsten repräsentieren. Bei der Diagnose einer infektiösen Komplikation werden üblicherweise Sepsis-Patienten (infektiös) und Patienten mit einer sogenannten sterilen SIRS (nichtinfektiös) in die Studie aufgenommen. Entsprechend dieser Festlegung wird ein Plan zur Sammlung bzw. Auswahl der zugehörigen RNA-Proben festgelegt. Von den ausgewählten Proben werden die Genexpressionsprofile auf einer geeigneten Plattform gemessen, vorverarbeitet und einer Qualitätskontrolle unterzogen. Systematische Messfehler werden korrigiert und Ausreißer eliminiert.

2. Schritt: Genvorauswahl. Bei der Generierung eines formalen Klassifikators auf der Basis von Mikroarray-Daten ist die Genvorauswahl ein Schlüsselschritt, da nur ein geringer Anteil der gemessenen Gene einen Beitrag zur Gruppenunterscheidung leistet. Auch die meisten Klassifikationsverfahren setzen eine Genselektion voraus. Durch eine präzise Genauswahl kann das

Klassifikationsverfahren so einfach wie möglich gestaltet und eine Überanpassung an die Trainingsdaten (Overfitting) vermieden werden. Zur Vorauswahl der Klassifikationsgene werden geeignete Filteroptionen wie die Schwelle der statistischen Inferenz, der minimale akzeptierte Abstand zwischen den Gruppen, die minimale Signalintensität u. a. festgelegt. Nur Gene, die solche Bedingungen erfüllen, werden für die Klassifikation betrachtet.

3. Schritt: Klassifikationsverfahren. Verschiedene Klassifikationsverfahren werden bzgl. ihrer Trennfähigkeit hinsichtlich der zu differenzierenden pathophysiologischen Zustände getestet. Dazu werden Methoden der Cross-Validierung verwendet. Ein Klassifikationsverfahren mit dem kleinsten Klassifikationsfehler wird ausgewählt, wobei die kleinste notwendige Anzahl von Genen gleich mitbestimmt wird. Als sinnvolle Regel hat sich herausgestellt, dass die Anzahl der Gene immer kleiner sein soll als die Anzahl der Proben im Trainingsdatensatz, um eine Überanpassung zu vermeiden. Abschließend wird die resultierende Klassifikationsregel definiert.

Patientenauswahl Die Patientenauswahl ist bei der Aufstellung des Trainingsdatensatzes bedeutsam. In einer Vorstudie im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurde vorerst eine Sensitivität von ca. 75 % im Trainings- und ca. 65 % im Testdatensatz erreicht. Diese relativ geringe Klassifikationsgüte ließ sich aber nicht durch die schwache Optimierung des Klassifikators, sondern durch die nicht ausreichend präzise Auswahl von Sepsis-Patienten erklären. Dementsprechend wurden Sepsis-Patienten nach einer Peritonitis viel häufiger richtig klassifiziert als Sepsis-Patienten nach einer „VAP“ (Ventilator-Associated Pneumonia). Tatsächlich liegt die infektiöse Komplikation nach einer Peritonitis an sich vor. Dagegen lässt sich bei VAP eine wirkliche Infektion von einer Kolonisation nur schwer unterscheiden [Mayhall, 2001].

Um die Güte der Patientenauswahl zu bewerten, kann das Prinzip der sogenannten Extremgruppen nützlich sein. Danach werden in einer Studie nur solche Patientengruppen berücksichtigt, die den untersuchten Effekt möglichst deutlich abbilden. Dabei repräsentieren die ausgewählten Stichproben einen idealisierten Fall, in dem viele in der Praxis auftretende Effekte (z.B. die Häufigkeit der Erkrankung)

nicht berücksichtigt werden. Von Liu [Liu et al., 2005] wurde vorgeschlagen, für den Trainingsdatensatz eines auf Mikroarrays basierten Klassifikators Extremgruppen zu bilden. Am Beispiel der Überlebensanalyse von Krebspatienten wurde gezeigt, dass die Anwendung von extremen Gruppen (Patienten, die nach kurzer Zeit gestorben sind vs. Patienten, die lange überlebt haben) zu einer besseren Vorauswahl von Klassifikationsgenen und einer höheren Klassifikationsgüte geführt hat, auch wenn der Trainingsdatensatz aus weniger Profilen (Patienten) bestand, als im üblichen Fall, wenn alle Patienten (auch mit mittleren Überlebenszeiten) berücksichtigt wurden.

Im Folgenden wird ausgeführt, wie weit die Patientenauswahl die Generierung eines Multigenbiomarkers zur Diagnose der infektiösen Komplikation beeinflussen kann. In einer Studie der Anmelderin wurden Patienten, die nach einem schweren operativen Eingriff eine Sepsis entwickelt haben, untersucht. Es wurden Proben vom ersten Tag der Sepsis-Diagnose mit der Probe vom ersten post-operativen Tag verglichen. Die hier signifikant differentiell exprimierten Gene spiegeln aber einen Mischeffekt wider; die infektiöse Komplikation wird verdeckt durch Effekte wie Erholung nach dem operativen Stress oder die post-operative Behandlung. In der bereits erwähnten Pilotstudie wurden die Patienten mit einer klinischen (nicht immer mikrobiologisch gesicherten) Sepsisdiagnose in die Trainingspopulation eingeschlossen, was zu einer Durchmischung der beiden untersuchten Gruppen (Septiker und Kontrollen) führte und die Sensitivität verschlechterte. In dem Ausführungsbeispiel der US-Patentanmeldung Nr. 20060246495 wurde für die Auswahl der Sepsisgruppe ebenfalls die klinische Sepsisdiagnose verwendet. Darüber hinaus wurde die Schwere der Erkrankung zwischen der Gruppe der Sepsispatienten und der Kontrollgruppe der SIRS-Patienten nicht berücksichtigt. Dies kann der Grund der geringen Klassifikationsgüte und ihrer Abhängigkeit vom Klassifikationsalgorithmus sein. In die Studie von Johnson [Johnson et al., 2007] wurden Patienten nach einem Trauma in zwei Gruppen aufgeteilt, mit einer infektiösen Komplikation und ohne eine Infektion. Der Vorteil dieser Studie war, dass Patienten der beiden Gruppen sich in Komorbidität und Vorbehandlung wenig unterschieden. Die Vorauswahl ist aber nicht für alle Sepsispatienten repräsentativ und die Verallgemeinerung des hier aufgedeckten sepsisrelevanten Genexpressionsmusters auf Patienten mit anderem Hintergrund (auf andere Risikogruppen) ist nicht selbstverständlich. Im Allgemeinen muss davon

ausgegangen werden, dass in Studien mit verschiedenen Risikogruppen auch verschiedene Klassifikatoren generiert werden müssen. In der Studie von Tang [Tang et al., 2007a] wurde das Prinzip der Extremgruppen indirekt angewandt, in dem nur Patienten mit einer mikrobiologisch gesicherten Sepsis-Diagnose im Trainingsdatensatz berücksichtigt wurden. Der Proben-Sammelplan führte aber zu einer kleinen Kontrollgruppe (ein Drittel der Proben: 14 aus 44). Dementsprechend wurde im Training eine Spezifität von 77% und in einem unabhängigen Testdatensatz (unter mehr realen Bedingungen) von lediglich 60% erreicht. Die Beschreibung der Patientengruppen in der SIRS-Lab Studie und der Studie von Tang [Tang et al., 2007a] lässt einen weiteren Einflussfaktor erkennen. Sie zeigt, dass die bzgl. des Infektionsfokus heterogenen Sepsisgruppen nicht ausbalanciert sind, sondern dass Gruppen mit verschiedenen Infektionsfoci unterschiedlich vertreten sind. Tatsächlich ist im Großteil der Fälle auf der Intensivstation (ITS) die Lunge (ca. 45-50 %) oder der Abdomen (ca. 25%) der Fokus der Infektion bei einer Sepsisdiagnose. Dementsprechend sind diese Patientengruppen in den Untersuchungen überrepräsentiert, viele andere Foci kommen dann nur vereinzelt vor. Ähnlich sind in den Kontrollgruppen insbesondere postoperative und Traumapatienten vertreten und andere Risikogruppen sind nur durch einzelne Patienten vertreten. Die dargestellte Analyse zeigt, dass in allen Studien die ausgewählten Patientengruppen die infektiöse Komplikation nicht eindeutig abbilden, wodurch die Klassifikationsschwächen erklärt werden können. Andererseits wird aus der Zusammenfassung deutlich, dass es bei der infektiösen Komplikation kaum möglich ist, alle Einflussfaktoren bei der Auswahl der Patientengruppen zu berücksichtigen. Aus diesem Grund wird der folgende Weg zur Patientenauswahl für den Trainingsdatensatz vorgeschlagen.

Allgemeines zu Material und Methoden der vorliegenden Erfindung:

Patientenauswahl

Die Auswahl der repräsentativen Stichproben stand im Mittelpunkt des beschriebenen Verfahrens. Es wurden in den Trainingsdatensatz Patienten mit einer mikrobiologischen gesicherten bzw. ausgeschlossenen Infektionsdiagnose aus jeweils zwei der am besten repräsentierten Sepsis- bzw. Kontrollsubgruppen

eingeschlossen. Damit wird das Prinzip der Extremgruppen nicht nur für den Haupteffekt (infektiös vs. nicht infektiös) sondern auch für die Kontrolle der wichtigsten Einflussgrößen (Schichtung von Populationen) angewandt. Der Vorteil dieser Auswahl ist vorerst, dass man hier einen Klassifikator für die häufigsten Risiko bzw. Erkrankungsgruppen generiert. Darüber hinaus wird erwartet, dass sich ein Klassifikator, der die systemische Infektion für wenige aber sehr unterschiedliche Subgruppen widerspiegelt, sich auf weitere Patientengruppen anwenden lässt. Bei der Auswahl der Trainingsdaten wurde wie folgt vorgegangen. In die Patientendatenbank der Anmelderin wurden im Zeitrahmen von zweieinhalb Jahren 400 ITS-Patienten aufgenommen, bei denen ein Sepsis-Risiko vermutet wurde, und die zugehörigen klinischen Daten über den gesamten Aufenthalt detailliert dokumentiert. Die RNA-Proben wurden über ca. 7-14 Sepsis-relevante Tage gesammelt. In Annäherung an das PIRO-Konzept [Levy et al., 2003] wurden die Patienten retrospektiv nach folgenden Kriterien stratifiziert: (i) welche Indikation führte zur der Übernahme auf die Intensivstation (postoperative Komplikation, Trauma bzw. Polytrauma, akuter Sepsisverdacht), (ii) wurde eine infektiöse Komplikation diagnostiziert, was war der Infektionsfokus, (iii) wie war die Reaktion des Organismus (Anzahl der vorhandenen SIRS-Kriterien, Schock-Behandlung, PCT-, CRP-Werte), (iv) wie schwer war die Erkrankung (SOFA, MODS-Score). Die Datenbankrecherche ergab, dass mit einer infektiösen Komplikation (Sepsis) insbesondere Patienten nach einer Pneumonie (40%) und nach einer Peritonitis (23%) in die Studie aufgenommen wurden. Weitere Fokuse kamen vereinzelt vor. Diese Daten entsprechen den epidemiologischen Studien der Deutschen Sepsisgesellschaft, womit die Sammlung als repräsentativ eingestuft wurde. Die Patientendaten dieser Gruppen wurden unabhängig von 2 Ärzten [nach ACCP/SCCM, 1992; Levy et al., 2003; Calandra und Cohen, 2005] geprüft und die finale Patientenauswahl festgelegt. Es wurden 29 Patienten mit einer mikrobiologisch gesicherten Diagnose ausgewählt und der erste septische Tag bestimmt. Die Zusammenfassung der Schwere-Kriterien ergab, dass bei den Patienten an diesem Tag eine schwere Sepsis bzw. ein septischer Schock diagnostiziert wurde. Sie erreichten einen durchschnittlichen SOFA- Wert von 10, die Summe akuter Organdysfunktionen betrug etwa 3. Als Kontrollgruppe wurden 29 Risiko-Patienten nach einer Bypass-Operation eingeschlossen. Es wurde der erste Tag mit einer ähnlichen Schwere wie bei den Sepsis-Gruppen bestimmt aber ohne Zeichen einer Infektion ausgewählt. Eine Aufstellung zu wichtigen klinischen und

Labor-Parametern für die ausgewählten Patienten findet sich beispielhaft, jedoch ohne Einschränkung hierauf, in Tabelle 1.

Tabelle 1: Zusammenfassung der klinischen Parameter für Patienten des Trainingsdatensatzes. Die Werte entsprechen der Anzahl oder, mit Stern markiert, dem Median (Interquartilabstand) der Werte.

	Sepsis	keine Sepsis
Patientenanzahl	29	29
Mortalität	52%	21%
Geschlecht (m/w)	22/7	20/9
Alter (y)*	66 (13)	68 (8)
SIRS-Kriterien*	3 (0)	3 (2)
SOFA-Score*	10 (4)	7 (4)
Anzahl der Organdysfunktionen*	3 (2)	2 (2)
PCT (ng/ml)*	12 (24,32)	1,82 (10,78)
CRP (mg/l)*	194 (161)	85,45 (88,675)
WBC (no/l)*	12200 (11150)	12800 (8700)
Apache II	19 (6)	13 (5)
Hypotensionsbehandlung	90%	48%
	<i>Sepsis-Fokus:</i>	<i>Indikation für ITS- Aufnahme:</i>
Peritonitis	13	Kardio-pulmonarer Bypass / ITS- Aufenthalt mehr als 3 Tage: 22
Pneumonia	8	
Mediastinitis	4	
Myocarditis	1	Kardio-pulmonarer Bypass / ITS- Aufenthalt max. 3 Tage: 7
Urosepsis	1	
Kneeempyem	1	

Generierung des Klassifikators und Etablierung des SIQ-Scores

Auf dem Weg zur Klassifikatorentwicklung wurden folgende Schritte durchgeführt:

1. Schritt: Qualitätskontrolle: Aus der vom Expertenwissen bestätigten Vorauswahl aus einem Patientenkollektiv wurden die zugehörigen Genexpressionsdaten verschiedenen Ähnlichkeitsanalysen unterworfen, um untypische Hybridisierungsergebnisse auszuschließen [Buneß et al., 2005], wodurch die finale Trainingsdatenmatrix generiert wurde.

2. Schritt: Normalisierung bzw. Vorverarbeitung der Daten: Zum Normalisieren wurde für jede Probe der Mittelwert der 3 ausgewählten Housekeeper-Gene (R1, R2 und R3) berechnet. Von diesem Wert wurde der Ct-Wert jedes einzelnen Markers abgezogen. Jeder so gewonnene Delta Ct Wert spiegelt die relative Abundanz des Targettranskriptes bezogen auf den Kalibrator wider, wobei ein positiver Delta Ct Wert eine Abundanz höher als der Mittelwert der Referenzen und negativer Delta Ct Wert eine Abundanz kleiner als der Mittelwert der Referenzen bedeuten.

3. Schritt: Ranking: Um die Gen-Marker nach ihrer Trennungsgüte anzuordnen, wurde die lineare Diskriminanzanalyse (LDA) [Hastie et al., 2001] zusammen mit der Methode der vorwärts Selektion verwendet, wobei die Trennbarkeit mit dem F-Wert bewertet wurde [Hocking, R. R., 1976]. Dieser Analyseschritt wurde für 1000 Bootstrap-Stichproben wiederholt. Die in jeder Wiederholung ermittelten Marker-Ranks wurden über die 1000 Läufe gemittelt und die Marker-Kandidaten wurden nach dem mittleren Rank aufsteigend angeordnet. Diese Anordnung bedeutet, dass der Marker mit dem kleinsten mittleren Rank der war, der am häufigsten den meisten Beitrag zur Trennungsgüte leistete und der Marker mit dem höchsten mittleren Rank für die Trennung in meisten Wiederholungen wenig beitrug.

4. Schritt: Klassifikation: Für die Marker, die in der Ranking-Analyse die besten Ergebnisse lieferten, wurde basierend auf der LDA eine Diskriminanzfunktion bestimmt. Die zugehörigen Gewichte werden in der Tabelle 9 dargelegt.

5. Schritt: Interne Validierung: Um die Güte der Klassifikation für wachsende Anzahl von Markern zu beurteilen wurde die einfache Kreuzvalidierung verwendet.

6. Schritt: Etablierung des SIQ-Scores: Basierend auf der Diskriminanzfunktion wurde ein auf die Sepsis bezogener diagnostischer Parameter, ein sogenannter SIQ-Score (SIQ) wie folgt eingeführt. Für eine neue unabhängige Probe bekommt man i.a. als Klassifikationsergebnis einen dimensionsfreien Wert der Diskriminanzfunktion. Ein positiver Wert klassifiziert die Probe als infektiös und ein negativer Wert als nicht infektiös. Für typische Vertreter der jeweiligen Gruppe erhält man absolut höhere Werte, schwer klassifizierbare Proben erreichen Werte nahe Null. Der Streubereich

der Diskriminanz-Werte entspricht i.a. der Variabilität der Datenmatrix. So erreichte man in der Klassifikation Diskriminanzwerte von ca. -5 bis 5. Um die Unterschiede deutlicher hervorzuheben, wurde der SIQ-Score (SIQ) als der 10-fache Wert der Diskriminanzfunktion mit den Gewichten aus der Tabelle 9 eingeführt.

Dementsprechend variierten die SIQ-Werte der Testdaten von ca. -50 bis 50.

Die vorliegende Erfindung wird im Folgenden anhand von Beispielen und unter Bezug auf das Sequenzprotokoll, das ebenfalls ein Teil dieser Beschreibung ist, näher erläutert, ohne dass dies eine Einschränkung der Erfindung bedeutet.

Ergebnisse

Im nächsten Schritt wurden die Genexpressionsdaten der Patientendatenbank der Anmelderin, die nicht im Trainingsdatensatz verwendet wurden, einer Klassifikation unterzogen. Dieser unabhängige Testdatensatz bestand aus 113 Proben von 65 Personen (vgl. Tabellen 4 und 5). Dabei wurden Proben von 38 Sepsis-Patienten untersucht, die ein breites Spektrum an klinischen Phänotypen mit dem Risiko eine generalisierte Infektion ausbilden, repräsentieren. Darüber hinaus wurden Proben über den SIRS-Verlauf von 22 postoperativen Patienten sowie 5 gesunden Probanden analysiert.

Für diesen unabhängigen Testdatensatz wurde die beste Klassifikationseffizienz von 81,4% mit 7 folgenden Markern erreicht: M6, M15, M9, M7, M2, M10, M4. Die ROC-Kurve zur Klassifikation von Testdaten wird in Fig. 1 dargestellt. Als Vergleich wird in Fig 4 die ROC-Kurve zur Klassifikation von Testdaten mittels PCT oder CRP dargestellt. Aus der Fig. 4 wird ersichtlich, dass für beide Parameter die Fläche unter der Kurve, die die Güte der Klassifikation widerspiegelt, unter 70% liegt und damit diagnostisch wenig relevant ist.

In der Fig. 2 (Patient 8112) wird der Verlauf des SIQ-Scores für einen Patienten dargestellt, der postoperativ eine Sepsis entwickelt hat. Aus Fig. 2 wird ersichtlich, dass SIQ-Score die diagnostisch-relevante Schwelle bereits 2 Tage vor der klinischen Manifestation der Sepsis übersteigt. Der Verlauf weiterer Sepsis-relevanten klinischen Parametern (PCT, CRP, SOFA, Körpertemperatur, Schockbehandlung) wird als Vergleich mit dargestellt. In diesem Vergleich wird

ersichtlich, dass SIQ-Score der einzige Parameter ist, der vorzeitig die infektiöse Komplikation widerspiegelt. Damit wird demonstriert, dass die beschriebene Erfindung für die frühe Erkennung von infektiösen Komplikationen, wie Sepsis und/oder generalisierter Infektion, angewendet werden kann.

In der Fig. 3 (Patient 7084) wird der Verlauf des SIQ-Scores für einen Patienten dargestellt, der postoperativ eine Sepsis entwickelt hat, in einen septischen Schock fiel, sich aber einer akuten Phase durch eine relevante Behandlung wieder erholt hat. Aus Fig. 3 wird ersichtlich, dass SIQ-Score ein Tag vor der klinischen Manifestation der Sepsis über den diagnostischen Schwellenwert ansteigt und in der akuten Phase über der Schwelle bleibt. Nach der akuten Phase fällt der SIQ-Score unter diese Schwelle. Damit wird demonstriert, dass die beschriebene Erfindung für die Verlaufskontrolle und/oder Therapiekontrolle von z.B. Antibiotika-Therapie und/oder adjunktive klinische Maßnahmen und/oder operative Sanierungsmaßnahmen angewendet werden kann.

Weitere Vorteile und Merkmale der vorliegenden Erfindung ergeben sich aufgrund der Beschreibung von Ausführungsbeispielen sowie anhand der Zeichnung.

Es zeigt:

- Fig. 1 eine ROC-Kurve zur Klassifikation von Testdaten mittels SIQ-Scores;
- Fig. 2 eine Darstellung eines beispielhaften Verlaufs eines erfindungsgemäßen Scores (SIQ-Score) und der sepsisrelevanten klinischen Parameter PCT und CRP (Fig. 2A) sowie SOFA-Score, Körpertemperatur und Katecholamindosierung (Fig. 2B) für einen ersten Patienten;
- Fig. 3 eine Darstellung eines beispielhaften Verlaufs eines erfindungsgemäßen Scores (SIQ-Score) und der sepsisrelevanten klinischen Parameter PCT und CRP (Fig. 3A) sowie SOFA-Score, Körpertemperatur und Katecholamindosierung (Fig. 3B) für einen zweiten Patienten; und
- Fig.4 eine ROC-Kurve zur Klasifikation von Testdaten mittels PCT oder CRP.

Die vorliegende Erfindung wird im Folgenden anhand von Beispielen und unter Bezug auf das Sequenzprotokoll, das ebenfalls ein Teil dieser Beschreibung ist, näher erläutert, ohne dass dies eine Einschränkung der Erfindung bedeutet.

Fig. 1 zeigt eine ROC-Kurve zur Klassifikation der Testdaten mittels des SIQ-Scores. In Fig. 1 wird das Verhältnis zwischen richtig Positiven (Sensitivität) und falsch Positiven (1-Spezifität) markiert, grau gestrichelt für den Schwellenwert von Null und schwarz gestrichelt für die beste erreichte Klassifikation von 81,4%.

Fig. 2 zeigt einen Verlauf des SIQ-Scores eines beispielhaften Patienten und der Sepsis-relevanten klinischen Parameter PCT, CRP, SOFA, Körpertemperatur sowie die Dosierung von Katecholaminen (norepinephrine), die die Schock-Behandlung reflektiert. Im Teil A der Figur wurde die Skala jedes Parameters so angepasst, dass die schwarze horizontale Mittel-Linie den diagnostisch relevanten Schwellenwert markiert. Die Sepsis wurde am 6. Tag diagnostiziert, der SIQ-Score steigt bereits am 4. Tag über die Schwelle von -4.9.

Fig. 3 zeigt einen Verlauf des SIQ-Scores eines weiteren Patienten und der Sepsis-relevanten klinischen Parameter PCT, CRP, SOFA, Körpertemperatur sowie die Dosierung von Katecholaminen (norepinephrine), die die Schock-Behandlung reflektiert. Im Teil A der Figur wurde die Skala jedes Parameters so angepasst, dass die schwarze horizontale Mittel-Linie den diagnostisch relevanten Schwellenwert markiert. Die Sepsis wurde am 4. ITS-Tag diagnostiziert, der SIQ-Score steigt bereits am 3. Tag über die Schwelle von -4.9. Nach der akuten Phase, die mit dem Absetzen der Katecholamine (Schock-Behandlung) am 8 Tag beendet wird, fällt der SIQ-Score unter die Schwelle von -4.9.

Fig. 4 zeigt ROC-Kurven zur Klassifikation der Testdaten mittels der Parameter PCT oder CRP. In der Fig. 4 wird in schwarz die ROC-Kurve zu PCT und in grau die ROC-Kurve zu CRP dargestellt. Die Fläche unter der Kurve, die die Güte der Klassifikation widerspiegelt, beträgt für PCT 56,8% und für CRP 66,9%.

Die nachfolgende Tabelle 2 gibt die eindeutige Zuordnung der erfindungsgemäßen Marker-Polynucleotide zu ihren Transkriptvarianten/cis regulatorischen Sequenzen (Isoformen), der Genbank-Zugriffsnummer und der SEQ ID des Sequenzprotokolls wieder.

Marker und Referenzgene	Transkriptvariante/ <i>cis</i> -regulatorische Sequenzen	Accession Number	SEQ ID
M2	M2_1	NM_001031700	1
	M2_2	NM_016613	2
	M2_3	NM_001128424	3
M4	M4_1	NM_203330	4
	M4_2	NM_000611	5
	M4_3	NM_203329	6
	M4_4	NM_203331	7
	M4_5	NM_001127223	8
	M4_6	NM_001127225	9
	M4_7	NM_001127226	10
	M4_8	NM_001127227	11
M6	M6_1	NM_001831	12
	M6_2	NM_203339	13
M7	M7_1	NM_031311	14
	M7_2	NM_019029	15
M9	M9	NM_006682	16
M10	M10	NM_033554	17
M15	M15_1	NM_003580	18
	M15_2	NM_001144772	19
M3	M3_A	NM_001123041	20
	M3_B	NM_001123396	21
M8	M8	NM_025209	22
	M8_ <i>cis</i>	AI807985	23
M12	M12	NM_002185	24
	M12_ <i>cis</i>	DB155561	25
M13	M13	NM_001080394	26
M16	M16	NM_003268	27
M17	M17	NM_182491	28
R1	R1_A	NM_001228	29
	R1_B	NM_033355	30
	R1_C	NM_033356	31
	R1_E	NM_033358	32
	R1_F	NM_001080124	33
	R1_G	NM_001080125	34
R2	R2_1	NM_002209	35
	R2_2	NM_001114380	36
R3	R3	NM_003082	37

Tabelle 2

Tabelle 3 gibt für jeden der erfindungsgemäßen Marker-Polynucleotide die Primer (forward und reverse) für die quantitative PCR sowie das resultierende

Amplikon und deren eindeutige Zuordnung zu der jeweiligen SEQ ID des Sequenzprotokolls wieder.

Tabelle 3

Marker und Referenzgene	Primer für quantitative PCR/resultierende Amplikon	SEQ ID
M2	M2-fw	38
	M2-rev	39
	M2-Amplikon	40
M4	M4-fw	41
	M4-rev	42
	M4-Amplikon	43
M6	M6-fw	44
	M6-rev	45
	M6-Amplikon	46
M7	M7-fw	47
	M7-rev	48
	M7-Amplikon	49
M9	M9-fw	50
	M9-rev	51
	M9-Amplikon	52
M10	M10-fw	53
	M10-rev	54
	M10-Amplikon	55
M15	M15-fw	56
	M15-rev	57
	M15-Amplikon	58
M3	M3-fw	59
	M3-rev	60
	M3-Amplikon	61
M8	M8-fw	62
	M8-rev	63
	M8-Amplikon	64
M12	M12-fw	65
	M12-rev	66
	M12-Amplikon	67
M13	M13-fw	68
	M13-rev	69
	M13-Amplikon	70
M16	M16-fw	71
	M16-rev	72
	M16-Amplikon	73
M17	M17-fw	74
	M17-rev	75
	M17-Amplikon	76

R1	R1-fw	77
	R1-rev	78
	R1-Amplikon	79
R2	R2-fw	80
	R2-rev	81
	R2-Amplikon	82
R3	R3-fw	83
	R3-rev	84
	R3-Amplikon	85

Biologische Plausibilität der identifizierten Biomarker

Die beschriebenen Biomarker sind in funktioneller Hinsicht mit hoher Signifikanz immunologischen und inflammatorischen Signalwegen zuzuordnen. Eine wissensbasierte Analyse der Biomarkerpopulation wurde mit der Software Ingenuity Pathways Analysis (Ingenuity Systems, USA, www.ingenuity.com) durchgeführt, um den funktionellen Kontext der identifizierten Marker zu verdeutlichen. Basierend auf dem gesamten öffentlich verfügbaren Datenbankwissen werden die Marker in funktionelle Netzwerke und Kategorien eingeordnet. Die Hauptkategorien der vorliegenden Markerpopulation sind das Komplementsystem, Toll-like-Rezeptor-Signaltransduktion, Kommunikation zwischen Zellen der innaten und adaptiven Immunabwehr, TREM-1-Signaltransduktion, Ceramid-Signaltransduktion. Die Marker sind demnach mit hoher Signifikanz an immunologischen und entzündlichen Prozessen beteiligt, was die Relevanz für das Krankheitsbild der Sepsis untermauert. Damit konnte eine wichtige Grundvoraussetzung für Biomarker, das Vorhandensein biologischer Plausibilität, nachgewiesen werden.

Theragnostisches Potenzial der Biomarker am Beispiel der Koagulation:

Die Analyse der biologischen Plausibilität der Biomarker ergab für M6 und M9 eine funktionelle Rolle im Kontext der Koagulation und Fibrinolyse. Beide Prozesse gehören zu den am stärksten deregulierten physiologischen Funktionen in septischen Patienten. Eine Therapieoption von Patienten mit schwerer Sepsis und Organversagen stellt die Behandlung mit aktiviertem Protein C oder Thrombomodulin dar. M6 ist in septischen Patienten überexprimiert und gleichzeitig der negativen

Transkriptionskontrolle durch aktiviertes Protein C unterworfen. M9 ist in septischen Patienten supprimiert und kann die zugeschriebene Aktivität der Prothrombin-Spaltung zur Bereitstellung von Thrombin möglicherweise nicht erfüllen. Thrombin wiederum ist nach Assoziation mit Thrombomodulin ein wichtiger Faktor für die Aktivierung von Protein C. Aufgrund dieser engen funktionellen Zusammenhänge erscheint es möglich, in entsprechenden klinischen Studien nach Mustern zu suchen, welche für den erfolgreichen Einsatz der o.g. therapeutischen Möglichkeiten charakteristisch sind. Dieser theragnostische Ansatz könnte es ermöglichen, die Responder zu identifizieren und Nonrespondern die u.U. gravierenden Nebenwirkungen zu ersparen. Die identifizierten Marker für die für eine solche Anwendung beinhalten somit auch das Potenzial für eine Entscheidungsfindung bezüglich spezieller Therapien des septischen Patienten.

Im Folgenden sind zunächst die klinisch relevanten Daten des untersuchten Patientenkollektives als Tabelle 4 gezeigt:

Tabelle 4

Patient	Alter [Jahre]	Geschlecht	Apache	postoperative Indikationen	nicht operative Indikationen	Aufhmediagnose	Überlebens-status (ITS)	Liege-dauer [Tage]
1013	59	männlich	22	schwere Sepsis		Sepsis, nicht näher bezeichnet	ja	22
1015	71	männlich	29	Eingriff Herzkranzgefäße, Thorax		Instabile Angi pectoris	ja	41
2042	81	männlich	15	Eingriff Herzkranzgefäße		Atherosklerotische Herzkrankheit: Ein-Gefäßerkrankung	ja	7
5008	42	männlich	0		respiratorische Insuffizienz (Infektion), pankreatitis, akutes Organversagen (respiratorisch), akutes Organversagen (metabolisch), akutes Organversagen (rel)	Akute Pankreatitis	nein	13
5009	57	männlich	21		schwere Sepsis, respiratorische Insuffizienz (Atemstillstand), respiratorische Insuffizienz (Infektion), lebersagen, akutes Organversagen (respiratorisch), akutes	Sepsis, nicht näher bezeichnet	nein	42

					Organversagen (metabolisch)			
5010	67	weiblich	0	schwere Sepsis, postoperativ- kardiovaskulaer, postoperativ- gastrointestinal, postoperativ- metabolisch		Akute Peritonitis	nein	31
5018	71	männlich	28	schwere Sepsis, Eingriff Herzkranzgefäße, postoperativ- kardiovaskulaer, postoperativ- respiratorisch, postoperativ-rel		Linksherzinsuffizienz	ja	4
5019		weiblich		neurochirurgisch		Bandscheibenvorfall	ja	
5020		männlich		neurochirurgisch		Bandscheibenvorfall	ja	
5023		weiblich		neurochirurgisch		Bandscheibenvorfall	ja	
6005	48	weiblich	17	schwere Sepsis		Akute Cholezystitis	nein	28
6008	62	weiblich	14	gastrointestinal		Peritonitis, nicht näher bezeichnet	ja	13
6024	64	männlich	12		schwere Sepsis	Sepsis: Escherichia coli [E. coli]	ja	6
6035	63	männlich	29	schwere Sepsis, gastrointestinal		Perforation des Darmes (nichttraumatisch)	nein	20
6036	33	männlich	9	polytrauma		Nicht näher bezeichnete multiple Verletzungen	ja	20
6056	76	weiblich	23	Eingriff Herzkranzgefäße, Eingriff Herzklappen		Aortenklappenstenose	ja	36
6061	68	weiblich	25	Eingriff Herzkranzgefäße, Thorax		Aortenklappenstenose	nein	29
6063	59	männlich	17	Wirbelsäule		Rückenmark- kompression, nicht näher bezeichnet	ja	9
6064	78	männlich	16		DHI-Arrhythmien	Sonstige näher bezeichnete Krankheiten des Pankreas	ja	36
6070	66	männlich	14	schwere Sepsis, Thorax		Chronische Niereninsuffizienz, nicht näher bezeichnet	ja	19
6075	73	weiblich	22	gastrointestinal		Ileus, nicht näher bezeichnet	ja	47
6104	40	weiblich	17		schwere Sepsis, respiratorische Insuffizienz (Asthma), respiratorische Insuffizienz (Aspiration), respiratorische Insuffizienz (Infektion)	Akute respiratorische Insuffizienz, anderorts nicht klassifiziert	ja	28

6120	54	männlich	18		schwere Sepsis	Perforation des Ösophagus	nein	19
6124	69	männlich	15	schwere Sepsis, Thorax		Abnorme Befunde bei der bildgebenden Diagnostik der Lunge	ja	13
6126	39	männlich	23	schwere Sepsis, polytrauma		Atemnotsyndrom des Erwachsenen [ARDS]	ja	126
6141	70	männlich	21	Thorax		Emphysem, nicht näher bezeichnet	nein	38
7023	75	männlich	21	Eingriff Herzkranzgefäße			nein	61
7040	70	männlich	21			Sepsis, nicht näher bezeichnet	ja	27
7052	67	weiblich	22		intrakranielle Blutung	Subarachnoidalblutung, von der A. communicans anterior ausgehend	ja	33
7077	63	männlich	17			Bösartige Neubildung: Mundboden, nicht näher bezeichnet	ja	38
7079	77	männlich	26	Eingriff Herzkranzgefäße			ja	33
7084	69	männlich	17	Eingriff Herzkranzgefäße		Krankheiten der Mitralklappen- und Trikuspidalklappe, kombiniert	ja	24
7096	85	männlich	18			Atherosklerose der Extremitätenarterien: Becken-Bein-Typ, mit Gangrän	ja	8
7105	75	weiblich	20	schwere Sepsis		Sepsis, nicht näher bezeichnet	ja	10
7112	75	weiblich	27	Eingriff Herzkranzgefäße		Atherosklerotische Herzkrankheit: Drei-Gefäßerkrankung	nein	67
7119	64	weiblich	14	Eingriff Herzkranzgefäße		Instabile Angi pectoris	ja	6
7120	84	weiblich	21	schwere Sepsis		Bösartige Neubildung am Rektosigmoid, Übergang	nein	13
714	79	weiblich	26	gastrointestinal		Ulcus duodeni: Chronisch oder nicht näher bezeichnet, mit Perforation	nein	7
749	75	weiblich	16	Eingriff Herzklappen, Thorax		Aortenklappenstenose	ja	27
8009	60	männlich	9	Eingriff Herzkranzgefäße		Atherosklerotische Herzkrankheit: Ohne hämodynamisch wirksame Stenosen	ja	51
8011	64	männlich	4	Eingriff Herzkranzgefäße		Atherosklerotische Herzkrankheit: Ohne hämodynamisch wirksame Stenosen	ja	2
8026	68	weiblich	12	Eingriff Herzkranzgefäße, Eingriff Herzklappen		Atherosklerotische Herzkrankheit: Ein-Gefäßerkrankung	ja	6

8034	77	weiblich	12	Eingriff Herzkranzgefäße		Atherosklerotische Herzkrankheit: Ohne hämodymisch wirksame Stenosen	ja	2
8039	55	weiblich	16	Eingriff Herzklappen		Aortenklappenstenose	ja	7
8044	70	männlich	9	Eingriff Herzkranzgefäße		Atherosklerotische Herzkrankheit: Ohne hämodymisch wirksame Stenosen	ja	2
8052	71	männlich	11	Eingriff Herzkranzgefäße		Atherosklerotische Herzkrankheit: Ohne hämodymisch wirksame Stenosen	ja	2
8056	70	weiblich	13	Eingriff Herzklappen		Mitralklappen- insuffizienz	ja	5
8058	63	weiblich	21	Eingriff Herzklappen		Sonstige Aortenklappen- krankheiten	ja	5
8073	82	männlich	15	Eingriff Herzkranzgefäße		Atherosklerotische Herzkrankheit: Ohne hämodymisch wirksame Stenosen	ja	2
8086	78	männlich	13	Eingriff Herzkranzgefäße		Atherosklerotische Herzkrankheit: Ein- Gefäßerkrankung	ja	6
8096	61	männlich	11	Eingriff Herzkranzgefäße, Eingriff Herzklappen		Mitralklappenstenose	nein	12
8101	63	männlich	12	Eingriff Herzkranzgefäße		Atherosklerotische Herzkrankheit: Ohne hämodymisch wirksame Stenosen	nein	8
8102	70	männlich	17	Eingriff Herzkranzgefäße		Atherosklerotische Herzkrankheit: Ein- Gefäßerkrankung	ja	6
8103	54	männlich	6	Eingriff Herzklappen		Aortenklappenstenose	ja	2
8108	66	männlich	11	Eingriff Herzkranzgefäße		Atherosklerotische Herzkrankheit: Ohne hämodymisch wirksame Stenosen	ja	2
8111	65	männlich	16	Eingriff Herzkranzgefäße		Atherosklerotische Herzkrankheit: Ohne hämodymisch wirksame Stenosen	ja	14
8112	76	männlich	13	Eingriff Herzkranzgefäße		Atherosklerotische Herzkrankheit: Ohne hämodymisch wirksame Stenosen	nein	10
8116	80	weiblich	18	Eingriff Herzkranzgefäße		Atherosklerotische Herzkrankheit: Ein- Gefäßerkrankung	ja	5
8122	67	männlich	17	Eingriff Herzkranzgefäße		Instabile Angi pectoris	ja	5
920	74	männlich	23		schwere Sepsis	Sepsis, nicht näher bezeichnet	ja	4

Tabelle 5: allgemeine Beschreibung der Patienten aus dem Testdatensatz, aufgezeichnet wurden allgemeinen klinischen Parametern, durch die die ITS-Behandlung begründet wird.

Patient	IST-Tag	PCT [ng/ml]	CRP [mg/l]	SOFA-SCORE	Schwere der Erkrankung	Anz. ODF	Leukozyten-zahl	Gruppe	Anz. SIRS-Krit.	Noradrenalin-dosis	CDCS	Wahrscheinlichkeit CDCS	Antibiotika
1013	1	3.9		8	schwere Sepsis	1	23800	S	3	0.04	oberflächliche chirurgische Wundinfektion, Spinalabszesse	definitiv, definitiv	Gentamicin, Flucloxacillin, Clindamycin, Ceftriaxon
1015	10	5.12		12	sept. Schock	2	11100	S	3	1.3	Pneumonie	definitiv	Meropenem, Linezolid
2042	2	10.8	97.6	9	SIRS	2	18600	C	3	0.26			
5008	6	10	200	11	schwere Sepsis	2	17500	S	2	0.2	Pneumonie	wahrscheinlich	Oxacillin, Tiem, Klion, Diflucan
5009	3	2	250	8	schwere Sepsis	1	7900	S	2	0.05	Pneumonie, Gastroenteritis	wahrscheinlich, wahrscheinlich	Ampicillin, Ciprofloxacin, Unbekannt: fortum, Colimycin, unbekannt: V-fend, Herpesin
5010	2	0	164	8	sept. Schock	3	11600	S	2	0.06	Tracheobronchitis, Infektion des Gastrointestinaltraktes, Intraabdominelle Infektion	unwahrscheinlich, definitiv, definitiv	Cefuroxim, Metronidazol, Tiem, Vancomycin, Sulperazon, Amikacin, Flucozol
5018	2		280		sept. Schock	3	17000	S	2	0.3	Endokarditis	wahrscheinlich	Amoxicillin, Gentamicin
5019	1			0	SIRS			C		0.3			
5020	1				SIRS			C		0.3			

5023	1				SIRS			C	0.3				
6005	2		290.1	8	schwere Sepsis	2	6900	S	3	0.3	Cholezystitis	definitiv	
6008	2	6	111	7	sept. Schock	3	16800	S	3	0.56	Intraabdominelle Infektion	definitiv	Cefuroxim, Metronidazol
6024	2	2.46	49.8	10	schwere Sepsis	3	10400	S	2	0.03	Meningitis / Ventrikulitis, Kathetersepsis	definitiv, wahrscheinlich	Meropenem, Ceftriaxon
6035	3	4.72	103	13	sept. Schock	3	16100	S	4	0.11	Intraabdominelle Infektion	definitiv	Cefuroxim, Metronidazol
6036	10	0.65		8	sept. Schock	1	19200	S	2	0.16	Pneumonie	wahrscheinlich	Ciprofloxacin
6056	14	2.32	94.2	10	sept. Schock	3	19300	S	4	0.31	Pneumonie	wahrscheinlich	Ciprofloxacin, Imipenem
6061	10	0.52	78.8	8	sept. Schock	2	19900	S	4	0.21	Pneumonie, Katheter	wahrscheinlich, wahrscheinlich	Fluozol, Imipenem
6063	2	4.07	236	13	sept. Schock	2	14200	S	4	0.17	tiefe chirurgische Wundinfektion, Pneumonie, Tracheobronchitis	wahrscheinlich, wahrscheinlich, wahrscheinlich	Ceftriaxon, Clindamycin
6064	8	0.54	218	7	sept. Schock	3	17400	S	4	0.28	tiefe chirurgische Wundinfektion, Intraabdominelle Infektion, Pankreatitis	wahrscheinlich, wahrscheinlich, wahrscheinlich	Levofloxacin
6070	3	2.31	404	7	schwere Sepsis	2	10600	S	1	0.093	Pneumonie, Tracheobronchitis	wahrscheinlich, wahrscheinlich	Piperacillin / Tazobactam, Vancomycin
6075	3	37.6	269	9	sept. Schock	3	37900	S	3	0.43	Intraabdominelle Infektion	wahrscheinlich	Piperacillin / Tazobactam

6104	7	32.9	325	6	Sepsis	1	11800	S	3		Pneumonie	wahrscheinlich	Imipenem, Vancomycin
6120	3	36.8	478	12	sept. Schock	3	11600	S	2	0.22	Intraabdominelle Infektion	wahrscheinlich	Cefuroxim
6124	5	0.3	159	9	sept. Schock	3	9100	S	2	0.22	Pneumonie	definitiv	
6126	10	86.2	80.4	10	sept. Schock	4	13700	S	4	0.22	oberflaechliche chirurgische Wundinfektion	definitiv	
6141	5	1.18	247	7	sept. Schock	3	13800	S	4	0.17	Pneumonie	definitiv	Piperacillin / Tazobactam
7023	9	0.3	124	10	sept. Schock	2	14200	S	4	0.13	Pneumonie, Bakteriaemie	wahrscheinlich, unwahrscheinlich	Piperacillin / Tazobactam
7040	2	13.5	304	11	sept. Schock	2	28400	S	3	0.36	tiefe chirurgische Wundinfektion, Pneumonie, haematogen	definitiv, wahrscheinlich, wahrscheinlich	Meropenem, Vancomycin
7052	12	0.45	229	9	SIRS	2	12400	C	2	0.082			Levofloxacin
	13	0.37	230	10	SIRS	2	14200	C	2	0.1			Levofloxacin
	14	0.47	234	8	keine	2	11500	C	1	0.082			Levofloxacin
7077	9	0.65	335	10	SIRS	2	13700	C	3	0.27			Amoxicillin / Clavulansäure, Gentamicin
	10	0.74	415	9	sept. Schock	2	16400	S	3	0.25	Weichteilinfektion	definitiv	Amoxicillin / Clavulansäure, Gentamicin, Imipenem

	11	0.66	378	10	Sepsis	2	123000	S	4	0.2	Weichteilinfektion	definitiv	Gentamicin, Imipenem
7079	12	5.62	233	11	sept. Schock	3	37000	S	3	0.92	Mediastinitis	definitiv	Levofloxacin, Vancomycin
7084	2	6.11	135	7	schwere SIRS	1	13100	C	3	0.09			Cefazolin
	3	7.95	355	6	SIRS	1	14400	C	3	0.09			Cefazolin
	4	6.41	379	8	sept. Schock	1	10900	S	3	0.22	Pneumonie	wahrscheinlich	Cefazolin, Piperacillin / Tazobactam
	5	11.4	449	10	sept. Schock	2	10100	S	3	0.37	Pneumonie	wahrscheinlich	Piperacillin / Tazobactam
7096	2	1.24	134	7	schwere SIRS	2	12400	C	2	0.17			
	3	1.27	200	8	schwere SIRS	1	12700	C	3	0.062			
	4	0.62	164	6	SIRS	0	9600	C	2				
	5	0.5	120	8	schwere SIRS	1	15700	C	3				
	6	0.9	151	8	schwere SIRS	1	14800	C	3				Piperacillin / Tazobactam
	7	0.96	177	7	Sepsis	0	15400	S	2			Pneumonie	wahrscheinlich

	8	1.1	215	7	Sepsis	0	20800	S	2		Pneumonie	wahrscheinlich	Piperacillin / Tazobactam
7105	1	3.29	311	12	sept. Schock	3	14700	S	3	0.25	Myokarditis /Perikarditis	wahrscheinlich	Imipenem
7112	23	0.9	56.7	9	schwere Sepsis	2	13200	S	4		Pneumonie	wahrscheinlich	Cefepim, Flucozol, Levofloxacin
7119	3	1.31	288	7	schwere SIRS	2	19200	C	2	0.16			Piperacillin / Tazobactam
	4	0.61	295	5	keine	1	11900	C	1	0.01			
	5		228	4	SIRS	0	9000	C	2				
7120	2		153	6	sept. Schock	2	13000	S	2	0.73	Intraabdominelle Infektion	wahrscheinlich	Cefuroxim, Metronidazol
714	1	0.89	111	9	sept. Schock	3	17000	S	4	0.87	Intraabdominelle Infektion	definitiv	Metronidazol, Cefuroxim
749	8	2.88	173	8	Sepsis	0	16000	S	3		Tracheobronchitis	wahrscheinlich	Piperacillin / Tazobactam
8009	2	7.25	34.8	8	SIRS	2	10100	C	4	0.17			
	3	5.38	206	6	SIRS	1	5800	C	4	0.22			Piperacillin / Tazobactam
	4	4.4	256	8	SIRS	2	16600	C	4	0.23			Piperacillin / Tazobactam

	5	7.67	288	10	SIRS	4	18900	C	4	0.16			Meropenem, Piperacillin / Tazobactam
	6	6.56	136	10	SIRS	2	15800	C	4	0.2			Meropenem
	7	3.97	162	9	SIRS	4	23700	C	4	0.11			Meropenem
	8	2.47	207	11	SIRS	4	26200	C	4	0.39			Meropenem
	11	9.84	207	11	sept. Schock	4	28300	S	3	0.02	Pneumonie, Intraabdominelle Infektion	definitiv, definitiv	Meropenem
8011	2	0.3	82.9	5	SIRS	0	11400	C	2				
8026	2	3.28	83.8	4	SIRS	2	8900	C	3				Cefazolin
	3	3.01	205	7	SIRS	1	9200	C	3	0.052			Cefazolin
	4	1.55	70	5	SIRS	0	10800	C	3				Cefazolin
	5	0.77	39.6	4	SIRS	2	6900	C	3				Cefazolin
	6	0.35	23.6	3	SIRS	0	7200	C	2				Cefazolin
8034	2		42.5	1	SIRS	0	9000	C	2				

8039	2	1.39	53.8	6	SIRS	3	22500	C	4	0.12			Cefazolin
	3	0.84	178	7	SIRS	2	19900	C	4				Cefazolin
	4	0.86	197	8	SIRS	2	20800	C	4				Cefazolin, Piperacillin / Tazobactam
	5	0.63	131	10	SIRS	2	17.4	C	3				Piperacillin / Tazobactam, Erythromycin
	6	0.47	78.4	9	SIRS	2	14400	C	2				Piperacillin / Tazobactam
8044	2	0.43	48.3	1	SIRS	0	10700	C	3				Cefazolin
8052	2		84.7	0	SIRS	0	8700	C	2				
8056	3	0.82	128	5	SIRS	1	22000	C	2				Cefazolin
8058	3	22.7	72.7	11	SIRS	5	6300	C	2				Cefazolin, Piperacillin / Tazobactam
8073	2	0.5	67.5	4	SIRS	1	6800	C	2				
8086	2	0.35	37.7	5	SIRS	3	12400	C	3	0.042			
8096	2	21.9	117	10	SIRS	3	15300	C	3	0.32			Cefazolin

	3	14.5	294	12	SIRS	5	13500	C	4	1.3			Cefazolin
	4	9.38	291	14	SIRS	5	13900	C	3	0.78			Cefazolin
8101	3	1.27	92.9	8	SIRS	3	17900	C	4	0.17			Cefazolin, Piperacillin / Tazobactam
	4	1.23	213	11	SIRS	5	15000	C	4	0.23			Piperacillin / Tazobactam
	5	1.42	195	11	SIRS	3	22600	C	4	0.46			Piperacillin / Tazobactam
	6	3.64	233	14	sept. Schock	5	39500	S	4	0.94			Imipenem, Vancomycin, Piperacillin / Tazobactam
	7	6.59	184	17	sept. Schock	5	33600	S	4	1			Imipenem, Vancomycin
8102	2	1.83	35.6	5	SIRS	3	13100	C	4	0.016			
8103	2	0.52	55.8	1	SIRS	0	6900	C	2				Cefazolin
8108	2	0.3	73.7	3	SIRS	0	7300	C	2				
8111	2	6.82	67	7	SIRS	3	19700	C	4				Cefazolin
	4	3.82	182		SIRS	3	13800	C	2	0.4	Pneumonie	wahrscheinlich	Ciprofloxacin

	5	2.24	133	8	SIRS	3	14300	C	4	0.12			Ciprofloxacin
	6	0.82	67	5	SIRS	2	8700	C	3				Ciprofloxacin
	7	0.35	128	3	schwere Sepsis	1	10400	S	2		Tracheobronchitis	wahrscheinlich	Ciprofloxacin
	8	0.3	98.2	5	schwere Sepsis	3	19800	S	4	0.089	Tracheobronchitis	wahrscheinlich	Ciprofloxacin, Piperacillin / Tazobactam
8112	2	2.55			SIRS	3	14100	C	4	0.066			Cefazolin
	3	1.49	168	9	SIRS	3	17400	C	4	0.11			Cefazolin, Piperacillin / Tazobactam
	4	1.06	175	10	SIRS	4	13000	C	4	0.2			Piperacillin / Tazobactam
	5	0.88	151	14	SIRS	2	12500	C	4	0.077			Piperacillin / Tazobactam
	6	0.64	128	12	schwere Sepsis	3	13300	S	4	0.09	Pneumonie	wahrscheinlich	Piperacillin / Tazobactam
	7	0.44	113	12	sept. Schock	3	9000	S	3	0.11	Pneumonie	wahrscheinlich	
8116	2		81.1	10	SIRS	5	15100	C	3				
8122	4	0.3	171	4	SIRS	3	11200	C	2				

920	2	1.26	124	10	schwere Sepsis	5	10600	S	2	0.031	tiefe chirurgische Wundinfektion	definitiv	Meropenem
-----	---	------	-----	----	----------------	---	-------	---	---	-------	----------------------------------	-----------	-----------

Tabelle 5 zeigt Sepsis-relevante klinische Parameter aus den Verlaufsbögen der Patienten aus dem Testdatensatz, aufgezeichnet wurden klinische Parameter, durch die der Krankheitsverlauf dokumentiert wird.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1: Aufstellung eines Klassifikators zur Identifizierung von SIRS- und Sepsis-Patienten mit hoher Sensitivität/Spezifität

Patienten-Gruppen

Im ersten Schritt der Analyse (Training) wurden Proben von Patienten einer Intensiv-Station (ITS) eingeschlossen. Für die Sepsis-Gruppe wurden Patienten mit einem mikrobiologisch bestätigten Infektionsfokus ausgesucht, wobei die Probe vom ersten Tag der Sepsis berücksichtigt wurde. In die Kontroll-Gruppe wurden Patienten nach einer schweren Herz-OP ausgewählt (Kardiopulmonaler Bypass, CPB), die postoperativ eine sterile SIRS entwickelt haben. Die Kontrollgruppe wurde an die Sepsis-Gruppe bzgl. Patientenzahl, Alter, Geschlechtsaufteilung und Erkrankungsschwere angepasst, so dass der wesentliche Unterschied zwischen den Gruppen im Vorhandensein einer infektiösen Komplikation lag. Jeder Patient der Kontrollgruppe wurde mit je einer Probe vertreten. Der Trainingsdatensatz bestand aus 29 Sepsis- und 29 Kontrollfällen. Die wichtigsten klinischen Parameter wurden in der Tabelle 6 zusammengefasst.

Im zweiten Schritt (Validierung) wurde ein Testdatensatz untersucht, der aus 113 Proben von 65 Personen bestand (vgl. Tabellen 4 und 5). Dabei wurden Proben von weiteren Sepsis-Patienten untersucht, die ein breites Spektrum an klinischen Phänotypen mit dem Risiko einer generalisierten Infektion auszubilden, repräsentieren. Darüber hinaus wurden Proben über den Krankheitsverlauf von SIRS zu Sepsis ausgesucht. In die Analyse wurden höchstens Proben von den ersten 2 Tagen der Sepsis-Diagnose eingeschlossen.

Als Kontrolle dienten weitere Proben der SIRS-Patienten aus der Trainingsgruppe, technische Wiederholungen, Proben weiterer postoperativer Fälle und 5 gesunde

Kontrollen. Auch mit dieser Auswahl der Kontrollen wird die Anwendbarkeit des Verfahrens in einem breit angelegten Phänotyp sichergestellt.

Messung der Genexpression

Aus dem Blut der Patienten wurde Total-RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Diese wurde im Assay als Templat eingesetzt. Die Markerkandidaten zur Klassifizierung wurden in den Tabellen 2 und 3 zusammengefasst. Ans Ende der Tabelle wurden 3 sogenannte Referenzgene (auch Housekeepinggene) eingefügt (R1, R2 und R3). Sie ermöglichen eine relative Quantifizierung von Genexpression, die eine Aussage zur Abundanz des Targettranskriptes bezogen auf einen Kalibrator. Für jeden Organismus und jedes Gewebe sind solche Referenzgene spezifisch und müssen für die jeweilige Anwendung, hier die Unterscheidung einer infektiöser von einer nicht-infektiöser Ursache einer systemischen Entzündungsreaktion anhand von humanen Vollblut-Proben, sorgfältig ausgewählt werden. Ausgehend von den Genexpressionsprofilen aus dem Vollblut der Sepsis- und Kontrollpatienten wurden die stabilsten Gene mit der geringsten Variabilität ausgewählt und in der quantitativen PCR zur Normalisierung eingesetzt.

Experimentelle Ausführung

Blutabnahme und RNA-Isolation:

Das Vollblut der Patienten wurde auf der Intensivstation von den Patienten in PAXgene tubes abgenommen (PreAnalytix, Hombrechtikon, CH) und nach den Herstellervorgaben bis zur Aufarbeitung gelagert. Mit PAXGene Blood-RNA-Kits wurde gemäß den Vorgaben des Herstellers (Qiagen, Hilden, BRD) die RNA isoliert und bis zur Analyse bei -80 °C gelagert.

Reverse Transkription:

Von jeder Patienten-Probe wurden 0,5 µg der Total-RNA zu komplementärer DNA (cDNA) mit der reversen Transkriptase Superscript II (Invitrogen Deutschland, Karlsruhe, BRD) in einem 20 µl-Ansatz (enthält 1 µl 10 mM dNTP-Mix von Fermentas und 1 µl 0,5 µg/µl Oligo(dT)-Primer) umgeschrieben. Die RNA wurde anschließend

durch alkalische Hydrolyse aus dem Ansatz entfernt. Die Reaktionsansätze wurden nicht aufgereinigt, sondern mit Wasser auf 50 µl aufgefüllt.

Real-Time-PCR

Verwendet wurde der Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG - Kit der Firma Invitrogen (Invitrogen Deutschland, Karlsruhe, BRD). Die Patienten-cDNA wurde 1:25 mit Wasser verdünnt, davon wurde jeweils 1 µl in die PCR eingesetzt. Die Proben wurden jeweils in 3 Replikaten pipettiert.

PCR-Ansatz pro well (10 µl)	2µl Templat-cDNA 1:100
	1 µl forward primer, 10 mM
	1 µl reverse primer, 10 mM
	1 µl Fluorescein Reference Dye
	5 µl Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG

Es wurde ein Mastermix ohne Templat hergestellt, dieser wurde in 9 µl-Aliquots in die PCR-Platte aliquotiert, dazu wurden jeweils die Patienten-cDNAs pipettiert.

Das sich daran anschließende PCR-Programm bestand aus den folgenden Schritten::

95 °C	2 min (Aktivierung der Polymerase)	
95 °C	10 sec (Denaturierung)	} 40 x
58 °C	15 sec (Anlagerung)	
72 °C	20 sec (Extension)	
55 °C- 95 °C	10 sec (Erstellung der Schmelzkurve, Erhöhung der Anfangstemperatur nach jedem Schritt um 1 °C)	} 41 x

Verwendet wurde das iQ™5 Multicolor Real-Time-PCR Detection System der Firma BIORAD mit der dazugehörigen Auswertungssoftware. Die so genannten Ct-Werte (Anzahl der Zyklen) wurden als Messergebnis vom Programm automatisch im Bereich des linearen Anstiegs der Kurven berechnet. Die Messwerte wurden im String-Format abgespeichert.

Datenanalyse:

Die Datenanalyse wurde unter der freien Software R Project Version R 2.8.0 (R.app GUI 1.26 (5256), S.Urbaneck & S.M.Iacus, © R Foundation for Statistical Computing, 2008) durchgeführt, die unter www.r-project.org zur Verfügung steht.

Daten-Vorverarbeitung:

Die in die Analyse eingegangenen Datenmatrizen der gemessenen Ct-Werte wurden in den Tabellen 6 und 7 für jeweils den Training- und Testdatensatz dargelegt. Zum Normalisieren wurde für jede Probe der Mittelwert der 3 ausgewählten Housekeeper-Gene (R1, R2 und R3) berechnet. Von diesem Wert wurde der Ct-Wert jedes einzelnen Markers abgezogen. Jeder so gewonnene Delta Ct Wert spiegelt die relative Abundanz des Targettranskriptes bezogen auf den Kalibrator wider, wobei ein positiver Delta Ct Wert eine Abundanz höher als der Mittelwert der Referenzen und negativer Delta Ct Wert eine Abundanz kleiner als der Mittelwert der Referenzen bedeuten.

Tabelle 6: Ct-Werte des Trainingsdatensatzes pro Marker (Mittelwert der Dreifachbestimmung) und die Gruppenzugehörigkeit (letzte Spalte)

	M2	M3	M4	M5	M6	M8	M9	M10	M12	M13	M15	M16	M17	R1	R2	R3	Gruppe
2038_001	27.9	28.2	26.9	24.7	26.1	27.2	25.6	24.0	27.5	32.3	27.6	25.0	29.9	26.4	25.3	31.4	keine Sepsis
8001_001	26.1	28.2	25.9	22.9	24.8	26.7	24.0	24.1	25.2	31.5	25.6	24.1	27.2	25.2	23.1	30.0	keine Sepsis
8002_001	27.0	27.5	25.6	22.4	25.6	26.6	24.8	22.8	24.7	30.3	26.6	23.8	27.7	26.0	23.7	31.3	keine Sepsis
8009_001	28.3	28.4	28.1	26.3	27.9	27.4	25.7	25.1	25.9	32.2	28.2	27.3	29.4	27.6	27.2	32.5	keine Sepsis
8010_001	27.2	28.2	26.4	24.8	26.6	27.2	25.5	24.5	26.2	32.1	27.4	25.2	28.8	27.0	25.3	31.6	keine Sepsis
8011_001	25.5	26.8	26.1	23.8	25.3	27.3	24.4	24.4	25.4	31.1	27.0	25.2	28.1	26.0	25.0	30.1	keine Sepsis
8012_001	28.3	29.6	28.1	25.2	27.3	28.3	26.1	25.9	26.7	34.2	28.2	26.2	29.1	27.7	26.3	32.5	keine Sepsis
8025_002	26.8	28.8	25.9	24.8	25.4	26.7	25.8	24.6	24.9	32.4	27.1	24.9	29.0	26.3	25.3	29.9	keine Sepsis
8030_001	26.7	29.1	26.9	24.7	27.3	27.5	25.9	23.6	25.3	32.1	28.0	25.7	28.7	26.6	25.7	31.7	keine Sepsis
8032_003	26.9	27.9	28.3	26.7	26.6	27.4	26.2	24.4	25.9	32.5	28.7	25.6	28.4	26.3	26.3	32.6	keine Sepsis
8034_001	25.9	27.2	26.0	24.4	25.9	27.0	25.6	24.9	26.3	31.9	26.9	24.9	28.6	25.3	25.2	32.1	keine Sepsis
8044_001	26.3	27.2	25.4	24.4	25.2	26.3	24.5	24.7	25.8	30.7	25.8	24.7	26.8	25.7	25.2	30.5	keine Sepsis
8051_002	26.8	28.1	26.6	24.4	25.1	26.8	25.1	24.3	25.4	31.9	26.9	25.1	28.3	25.9	24.8	31.9	keine Sepsis
8052_001	27.4	28.7	27.8	24.8	25.9	26.6	25.2	24.7	26.4	31.7	27.7	25.9	28.9	26.5	25.9	33.2	keine Sepsis
8056_003	27.2	27.9	26.6	24.2	27.2	27.3	24.4	25.6	25.7	25.3	31.9	26.0	28.6	29.6	33.6	25.8	keine Sepsis
8058_001	27.5	29.1	27.5	26.0	27.3	28.8	26.3	24.9	27.0	32.2	27.7	25.2	29.5	27.2	26.2	32.2	keine Sepsis
8068_001	27.8	28.8	26.5	24.9	26.8	27.5	25.7	24.9	26.4	33.8	26.9	25.5	28.9	26.8	25.8	32.1	keine Sepsis
8073_001	26.8	27.9	27.3	24.8	26.0	27.4	25.0	23.3	25.6	33.2	26.9	25.2	29.1	26.3	24.9	31.5	keine Sepsis
8076_002	27.5	29.4	27.5	26.3	26.4	27.4	26.7	25.8	26.2	32.1	28.3	25.9	29.1	27.3	27.0	32.0	keine Sepsis

8084_003	28.7	29.4	27.1	25.9	26.3	27.4	25.6	24.2	25.7	33.5	28.1	26.7	28.4	26.3	26.1	32.4	keine Sepsis
8094_001	25.9	26.6	25.8	23.8	25.5	26.2	24.2	23.6	25.6	29.9	26.3	24.0	28.2	25.5	24.1	31.4	keine Sepsis
8096_001	27.5	28.5	25.7	24.1	26.8	26.9	25.8	24.3	25.8	33.1	26.7	25.5	28.2	26.4	25.4	31.5	keine Sepsis
8103_001	25.8	27.4	26.2	25.2	24.6	25.7	24.3	22.6	24.9	31.6	26.7	24.9	28.4	25.4	24.9	30.5	keine Sepsis
8108_001	26.1	27.6	26.0	25.0	25.9	27.0	24.9	24.3	26.2	32.3	27.2	24.9	29.0	26.3	25.4	32.3	keine Sepsis
8111_002	26.2	26.9	26.6	24.9	25.0	26.4	24.4	23.7	25.1	31.8	27.0	24.4	27.9	25.3	24.6	30.3	keine Sepsis
8112_002	27.4	28.3	25.6	24.3	25.8	25.7	25.3	24.7	25.0	32.2	26.3	24.0	28.9	26.0	24.5	31.4	keine Sepsis
8116_003	29.4	29.0	27.9	25.8	28.2	30.0	25.7	26.7	27.4	27.8	33.1	27.5	30.8	32.0	37.3	26.9	keine Sepsis
8122_001	28.1	29.4	27.1	24.0	26.5	27.1	24.9	24.9	26.6	33.4	27.2	25.7	28.2	26.4	25.3	32.0	keine Sepsis
814_001	26.5	27.3	26.0	25.8	25.9	24.5	24.4	23.4	23.1	31.0	25.8	25.7	27.5	25.2	24.5	30.0	keine Sepsis
1014_002	27.8	29.1	25.6	24.5	28.4	26.2	26.8	25.4	24.8	32.0	27.7	25.0	29.0	26.3	25.9	31.4	Sepsis
1020_001	29.2	28.6	23.9	22.8	28.7	28.2	26.0	26.3	27.6	31.7	28.0	23.8	28.5	26.2	23.7	30.1	Sepsis
1021_001	27.0	26.3	26.3	23.6	28.6	25.9	24.8	26.1	25.8	31.0	30.8	26.0	28.8	27.8	31.2	23.7	Sepsis
6008_001	27.7	28.6	25.3	23.0	26.5	27.3	25.3	23.6	25.1	32.0	27.2	24.6	29.2	26.2	24.5	30.9	Sepsis
6009_001	28.9	29.8	25.0	23.6	28.6	27.3	26.6	27.3	25.2	31.9	27.4	24.1	28.9	25.5	24.6	30.7	Sepsis
6025_001	28.9	27.6	24.7	23.3	27.5	26.7	26.4	26.7	23.5	26.7	26.3	24.5	26.5	28.3	26.2	28.7	Sepsis
6032_001	28.5	30.4	27.0	23.7	27.9	29.0	26.6	25.2	25.3	34.6	28.0	25.3	29.0	27.4	25.2	32.1	Sepsis
6035_001	27.0	28.2	24.5	24.1	25.7	26.4	26.0	25.5	26.6	32.1	26.9	24.2	28.0	25.8	24.8	31.0	Sepsis
6040_001	27.4	28.1	23.6	21.7	28.4	26.1	27.1	23.8	24.4	29.6	26.0	25.3	26.5	25.5	25.3	30.1	Sepsis
6046_001	28.6	30.0	26.1	24.4	28.7	27.5	27.7	25.6	25.4	32.5	28.5	25.8	28.5	26.6	26.2	31.6	Sepsis
6048_001	29.6	30.7	27.0	26.7	29.7	29.4	28.2	26.9	26.9	34.5	28.9	26.3	29.8	26.8	27.4	32.7	Sepsis
6062_001	29.6	31.7	25.9	23.9	29.6	27.8	27.4	26.7	27.4	33.6	28.6	24.3	28.6	26.5	25.6	31.7	Sepsis
6065_001	28.1	28.6	26.2	24.4	28.9	30.0	26.5	26.2	26.5	34.8	27.7	24.9	29.4	26.4	25.7	32.5	Sepsis
6070_001	28.4	29.9	26.8	25.2	27.6	28.0	26.8	26.9	26.0	34.9	28.8	25.9	29.9	27.4	26.4	32.3	Sepsis
6073_001	29.7	31.6	26.3	24.9	29.7	29.3	28.9	26.9	25.7	33.7	29.9	25.9	29.9	27.4	27.6	32.4	Sepsis
6075_001	31.6	33.2	24.0	23.4	32.5	27.2	28.5	26.9	27.3	34.0	27.3	24.3	27.2	26.1	26.5	32.8	Sepsis
6078_001	27.3	30.0	24.7	24.6	28.0	27.8	26.4	25.2	26.4	31.6	28.0	24.8	28.0	26.7	26.2	32.6	Sepsis
6081_001	30.4	30.7	27.2	24.2	30.1	29.3	29.1	27.8	27.5	33.6	30.4	26.9	29.6	29.4	28.7	33.9	Sepsis
6082_001	30.5	32.5	27.8	26.1	29.6	30.4	28.0	28.0	28.5	33.0	29.8	27.8	30.6	28.1	26.4	31.5	Sepsis
6084_001	28.2	27.4	25.2	24.7	27.3	28.4	26.0	26.8	25.9	27.6	32.1	25.5	29.2	29.0	32.0	24.8	Sepsis
6085_001	29.1	30.0	27.2	24.4	28.1	28.5	27.1	26.0	26.0	33.5	29.1	25.2	29.3	27.5	26.1	32.0	Sepsis
6098_001	28.2	29.1	26.8	24.9	25.7	28.5	26.4	25.0	25.8	32.9	27.7	24.8	29.6	26.5	24.8	32.2	Sepsis
6104_001	28.4	27.7	26.7	23.9	26.8	27.9	26.3	24.1	25.8	25.2	31.3	25.7	28.4	29.8	32.4	25.0	Sepsis
6110_001	28.7	31.0	26.6	24.2	27.9	27.3	28.0	26.8	26.8	33.7	28.9	26.4	28.9	27.8	26.6	33.6	Sepsis
6115_001	30.1	31.2	28.8	24.9	27.9	29.3	26.7	26.1	27.5	34.1	29.2	27.3	31.1	28.4	26.6	32.4	Sepsis
6125_001	28.3	29.2	26.5	23.4	26.9	27.8	25.5	24.7	26.7	32.4	28.2	25.3	29.2	27.0	25.4	31.3	Sepsis
829_001	28.7	31.3	25.5	24.8	28.5	27.1	26.1	26.5	25.5	31.3	27.5	24.6	27.6	24.9	24.2	30.5	Sepsis
942_001	30.0	31.9	27.7	25.2	27.7	27.7	25.8	25.4	25.9	33.8	28.7	25.8	28.8	26.8	24.6	31.7	Sepsis
987_001	26.7	28.2	25.8	22.5	25.5	26.0	24.9	24.6	26.0	31.9	26.7	24.2	28.6	26.2	24.2	31.7	Sepsis

Tabelle 7: Ct-Werte des Testdatensatzes pro Marker (Mittelwert der Dreifachbestimmung, fehlende Werte wurden mit NA notiert und aus der Analyse ausgeschlossen) und die Gruppenzugehörigkeit (letzte Spalte). Die ersten 5 Proben gehören zu gesunden Probanden, die anderen zu den Patienten, die in der Tabelle 4 beschrieben wurden. Die zugehörige Experiment-ID setzt sich zusammen aus der Fallnummer und der Proben-ID (eingeführt mit 2 Nullen), eine zusätzliche 1 markiert eine Wiederholung

Experiment ID	M2	M3	M4	M5	M6	M8	M9	M10	M12	M13	M15	M16	M17	R1	R2	R3	Gruppe
12A	27.84	28.1	27.5	26.6	26.2	24.2	24.7	22.7	23.9	31.4	27.3	27.8	28.8	25.7	24.2	30.2	keine Sepsis
2A	26.72	28.2	27.3	27.7	26.7	24.5	24.4	22.5	23.6	32.6	26.9	27.9	29.4	26.5	24.9	31.1	keine Sepsis
2C	28.18	28.4	27.8	26.0	27.0	26.2	24.3	25.1	24.9	31.1	27.2	28.2	29.4	26.3	24.8	31.6	keine Sepsis
7A	27.31	27.6	27.4	26.1	25.3	24.9	24.0	22.9	22.8	30.2	26.4	27.5	28.7	25.2	24.1	30.8	keine Sepsis
7C	27.94	27.6	27.3	25.4	25.4	25.5	24.0	23.0	23.9	30.8	26.1	27.2	28.7	25.0	23.8	30.2	keine Sepsis
8011_001_1	23.06	23.8	23.5	21.3	22.3	26.9	21.3	18.7	22.8	26.6	23.8	22.5	25.2	22.6	21.4	28.0	keine Sepsis
8034_001_1	25.82	26.6	25.5	23.8	25.7	26.7	24.3	24.7	25.7	31.5	25.7	24.4	28.4	25.2	24.6	30.8	keine Sepsis
8044_001_1	24.31	24.4	23.5	22.5	23.9	25.1	22.0	22.9	23.8	28.6	23.2	22.4	25.5	23.1	23.0	29.5	keine Sepsis
8052_001_1	26.64	27.2	27.1	23.6	25.3	26.7	24.3	24.0	24.9	32.2	26.3	25.2	28.0	26.0	25.0	31.6	keine Sepsis
8073_001_1	25.93	27.1	26.9	25.3	25.5	27.4	25.3	23.8	24.7	30.5	27.1	25.6	28.6	27.1	25.8	31.4	keine Sepsis
8103_001_1	23.68	23.9	22.7	21.4	21.7	23.2	22.1	19.9	21.7	27.9	21.3	21.6	26.0	23.3	18.9	27.3	keine Sepsis
8108_001_1	25.79	25.5	24.0	21.0	24.4	26.5	23.4	22.5	24.1	30.1	25.6	23.2	26.1	24.4	23.4	31.3	keine Sepsis
5019_001	27.41	28.0	27.2	25.5	26.3	25.5	24.6	24.4	24.5	32.4	27.2	26.0	28.8	26.5	25.5	32.0	keine Sepsis
5020_001	23.28	25.3	25.4	24.3	24.0	24.7	23.1	22.3	23.1	27.4	25.1	23.9	27.0	24.7	23.5	27.8	keine Sepsis
5023_001	25.14	25.5	25.4	25.1	24.6	25.0	22.9	22.8	23.3	31.6	26.0	23.3	27.5	24.5	24.0	30.2	keine Sepsis
8026_001	27.06	27.8	27.5	24.4	26.3	28.6	24.5	24.1	26.3	31.8	27.1	26.0	27.9	26.8	25.7	32.0	keine Sepsis
8056_002	26.30	28.4	25.9	25.2	26.3	27.7	25.5	23.9	26.1	31.4	27.3	24.5	27.7	25.6	26.0	31.8	keine Sepsis
8058_002	27.73	29.7	27.7	24.9	26.2	28.0	24.7	23.5	25.3	32.7	27.5	24.7	29.3	26.4	24.4	30.7	keine Sepsis
8086_001	25.46	25.9	25.5	24.1	24.4	26.2	23.1	22.9	23.7	30.7	25.1	24.1	27.6	24.9	24.0	30.2	keine Sepsis
8122_003	27.51	28.3	26.0	22.3	25.3	26.0	23.6	23.8	24.6	31.5	25.4	25.4	27.2	25.0	24.2	30.0	keine Sepsis
2042_001	28.20	31.6	28.5	24.3	28.3	30.3	26.8	25.4	27.8	34.1	29.1	25.8	29.9	29.1	26.4	33.4	keine Sepsis
8102_001	27.30	29.7	27.8	24.9	26.9	28.9	24.8	23.4	26.7	33.0	28.1	26.2	30.1	26.9	25.5	31.7	keine Sepsis
8111_001	25.79	27.0	26.7	23.7	25.0	27.0	23.9	24.8	26.0	32.0	26.5	24.5	29.1	26.0	24.4	31.4	keine Sepsis
8112_001	24.47	24.8	23.5	21.9	24.7	26.1	22.6	22.8	22.9	30.1	23.3	22.8	28.3	22.0	21.7	29.4	keine Sepsis
8116_001	26.60	30.1	27.8	24.6	26.7	28.7	25.8	24.5	26.6	32.8	28.1	25.9	29.8	27.0	25.9	32.1	keine Sepsis
8039_001	25.09	27.1	25.8	23.2	24.6	25.2	22.6	23.1	23.8	31.2	25.6	26.1	27.8	25.3	23.8	29.9	keine Sepsis
8039_002	25.19	26.7	24.9	23.1	24.1	28.7	22.9	26.3	22.9	30.1	25.1	25.6	27.8	24.7	23.5	30.3	keine Sepsis
8039_003	26.72	27.7	26.1	24.1	25.1	25.5	24.0	24.3	25.1	32.1	27.2	25.6	28.6	26.2	25.1	30.8	keine Sepsis
8039_004	27.61	30.2	26.3	24.3	26.5	30.6	24.4	27.6	25.4	33.2	27.3	26.5	28.7	26.3	25.2	31.3	keine Sepsis
8039_005	26.85	25.9	25.7	25.7	24.9	27.2	25.2	25.3	25.8	30.7	26.1	25.8	27.5	25.2	24.1	30.7	keine Sepsis
7052_001	28.40	29.9	26.8	24.2	27.7	26.6	25.7	24.3	25.0	34.3	28.0	26.5	28.6	26.6	25.8	31.2	keine Sepsis
7052_002	29.62	31.3	27.1	24.0	29.0	27.2	26.4	25.3	26.2	33.2	29.0	26.2	29.8	26.9	25.9	31.7	keine Sepsis
7052_003	29.62	31.0	28.1	24.2	29.0	27.4	26.7	26.0	27.2	33.4	29.0	27.8	29.5	28.3	26.8	32.7	keine Sepsis
7119_001	26.68	27.4	26.5	24.2	25.2	26.1	24.5	23.3	24.4	31.2	26.2	24.5	28.4	25.9	23.8	31.5	keine Sepsis
7119_002	27.97	29.1	28.6	25.1	27.2	26.6	26.0	24.7	26.0	32.6	27.7	26.3	29.1	26.9	25.9	32.1	keine Sepsis
7119_003	28.56	29.1	28.3	24.8	26.8	26.7	25.6	24.7	25.3	31.8	27.6	27.1	29.4	26.6	25.7	30.7	keine Sepsis
8026_001_1	28.10	28.8	33.3	25.0	26.8	28.2	25.6	24.4	26.2	32.4	27.5	26.6	28.4	27.0	26.3	33.4	keine Sepsis
8026_002	29.11	29.6	32.7	25.1	27.5	28.6	26.0	25.2	26.1	32.9	27.8	26.1	29.0	27.1	25.7	32.5	keine Sepsis
8026_003	32.38	33.0	35.0	26.2	29.9	30.5	27.4	26.4	27.7	34.9	29.3	28.5	30.0	31.6	28.1	34.4	keine Sepsis

8026_004	29.79	30.5	32.2	25.4	28.7	28.9	27.7	26.8	27.0	NA	29.1	28.1	29.8	28.5	26.9	32.5	keine Sepsis
8026_005	28.06	28.6	32.0	24.5	26.1	27.0	25.3	24.0	24.9	32.5	27.4	26.7	24.9	25.7	24.8	31.5	keine Sepsis
7077_001	27.22	28.8	27.3	24.1	27.8	27.1	26.5	25.6	25.8	32.6	28.1	25.9	29.8	27.1	25.6	31.5	keine Sepsis
7077_002	25.50	27.6	25.8	23.0	26.2	25.5	25.3	24.5	25.3	31.5	27.4	25.2	28.4	25.1	24.8	30.4	Sepsis
7077_003	26.50	28.4	27.5	24.3	27.8	27.1	26.0	25.4	26.1	32.1	27.4	26.6	29.4	26.6	25.2	30.7	Sepsis
7084_001	26.16	28.2	27.0	23.6	26.1	27.4	25.3	24.2	27.0	33.3	26.8	24.7	29.9	26.0	25.5	32.0	keine Sepsis
7084_002	26.19	27.7	26.2	22.6	26.6	27.0	25.8	24.1	25.1	32.2	25.8	23.5	29.1	25.7	24.0	31.2	keine Sepsis
7084_003	27.42	30.0	28.2	23.9	28.6	28.5	27.0	25.6	26.2	32.9	26.9	24.6	30.3	26.5	25.1	31.5	Sepsis
7084_004	26.61	29.9	25.8	23.9	27.9	28.2	27.2	25.4	25.5	33.0	26.3	23.6	29.7	26.8	25.7	32.2	Sepsis
7096_001	25.59	27.0	26.9	23.2	25.3	26.0	23.7	23.3	24.6	31.4	26.7	25.4	28.7	25.8	23.8	29.9	keine Sepsis
7096_002	26.40	28.4	26.9	23.6	24.8	29.7	24.5	23.7	24.6	31.0	27.6	26.2	28.2	25.8	24.4	30.9	keine Sepsis
7096_003	27.50	29.5	27.6	23.8	26.0	26.4	24.6	23.9	25.1	32.5	27.8	26.7	28.9	26.5	25.0	31.2	keine Sepsis
7096_004	25.80	27.9	25.8	23.6	25.8	29.8	24.2	23.9	25.1	30.7	26.5	24.5	28.5	25.2	24.5	30.6	keine Sepsis
7096_005	26.01	27.7	26.3	23.2	25.2	26.1	24.1	23.8	24.0	31.7	26.3	24.5	29.1	25.6	23.6	30.3	keine Sepsis
7096_006	27.14	28.5	26.9	24.2	26.8	31.2	25.4	24.7	25.0	32.4	27.8	25.5	29.6	26.5	25.2	31.1	Sepsis
7096_007	25.97	27.5	24.9	22.7	25.3	25.6	24.3	23.9	24.6	31.3	26.5	23.8	28.4	25.0	23.8	30.2	Sepsis
8009_001_1	27.01	27.5	31.7	25.0	26.5	26.9	24.0	23.8	24.3	32.4	27.0	26.1	28.0	26.0	25.6	31.6	keine Sepsis
8009_002	25.06	26.4	24.9	22.9	24.7	NA	22.9	22.1	23.9	31.4	26.2	23.7	26.9	24.6	23.5	31.0	keine Sepsis
8009_003	24.75	24.6	21.8	20.7	24.6	NA	23.1	22.5	22.1	29.7	23.5	20.6	24.3	22.7	21.2	28.7	keine Sepsis
8009_004	27.57	28.9	29.6	23.6	26.8	27.2	25.7	23.8	23.7	33.1	26.8	23.4	27.8	26.0	24.4	31.8	keine Sepsis
8009_005	28.02	28.1	30.2	24.6	27.5	27.4	25.5	24.7	25.0	33.7	27.0	24.0	27.8	25.9	24.5	31.1	keine Sepsis
8009_006	27.17	28.1	28.9	24.6	26.5	26.3	25.6	24.0	24.9	32.2	26.5	23.3	27.5	25.3	23.9	30.7	keine Sepsis
8009_007	26.97	28.5	28.9	23.8	27.6	25.8	25.8	23.9	24.7	33.1	26.5	23.4	28.2	25.1	23.9	30.3	keine Sepsis
8009_010	29.35	29.7	30.3	25.8	28.6	28.1	26.6	25.7	26.8	34.4	27.8	24.9	29.1	26.6	25.4	32.8	Sepsis
8096_001_1	28.75	30.6	26.1	25.0	28.7	27.2	27.5	26.2	25.7	35.8	28.2	25.4	29.2	27.0	25.8	31.6	keine Sepsis
8096_002	27.69	28.8	25.8	24.2	27.3	26.6	25.6	24.4	24.0	32.7	27.7	24.8	28.3	26.2	26.0	31.6	keine Sepsis
8096_003	28.48	31.4	27.0	23.1	28.0	26.1	26.5	26.2	24.5	33.2	28.8	26.6	28.8	26.4	25.6	31.2	keine Sepsis
8112_001_1	27.42	28.7	27.0	25.3	27.3	30.1	26.5	27.2	26.7	32.6	27.5	25.9	30.0	26.4	25.6	32.8	keine Sepsis
8112_002_1	27.36	28.9	26.8	25.4	26.6	31.7	26.3	26.7	26.5	32.7	27.4	25.2	29.4	26.5	25.2	32.3	keine Sepsis
8112_003	27.18	28.8	27.3	24.2	26.5	29.1	26.2	26.3	24.7	32.3	27.4	25.1	29.6	26.2	24.8	31.9	keine Sepsis
8112_004	27.83	29.8	27.7	25.9	26.9	32.0	27.0	26.7	25.5	33.1	28.0	25.9	29.0	26.6	24.9	31.4	keine Sepsis
8112_005	28.19	30.0	27.4	24.8	26.9	30.3	26.4	26.7	25.8	34.1	27.9	26.2	29.3	26.4	24.7	31.2	Sepsis
8112_006	28.64	30.2	27.7	26.0	27.6	32.2	26.9	27.1	26.4	34.2	28.0	26.9	30.3	27.1	25.8	32.7	Sepsis
8101_001	24.47	25.9	24.7	21.9	24.3	24.5	23.0	22.5	25.1	30.6	25.1	23.3	26.5	24.2	23.3	30.6	keine Sepsis
8101_002	24.87	27.0	25.3	22.8	25.2	24.8	23.9	23.2	24.0	30.8	25.6	23.7	26.7	24.5	23.5	17.6	keine Sepsis
8101_003	24.48	25.7	23.7	22.2	24.2	29.5	23.7	23.5	24.8	31.1	25.0	22.3	26.4	24.0	23.2	31.0	keine Sepsis
8101_004	24.88	26.9	24.1	22.3	24.6	24.9	24.2	23.7	23.6	30.2	24.9	22.2	25.7	24.1	22.6	29.2	Sepsis
8101_005	23.84	26.4	22.4	22.6	24.9	24.2	23.9	22.8	24.9	28.9	24.6	22.4	25.0	24.1	22.9	28.7	Sepsis
8111_003	25.77	26.7	24.8	23.1	24.9	24.9	24.2	24.0	26.1	31.0	25.3	23.3	27.3	24.4	23.1	30.1	keine Sepsis
8111_004	25.15	26.7	26.0	22.5	24.1	24.4	23.6	24.2	25.5	30.1	25.6	23.5	27.3	25.6	24.4	30.0	keine Sepsis
8111_005	25.32	26.6	26.8	22.7	24.7	25.1	23.6	23.2	24.2	30.4	25.8	24.4	27.5	25.1	24.3	31.4	keine Sepsis
8111_006	26.53	26.9	25.3	23.2	25.9	25.3	24.7	25.7	26.2	31.4	25.7	24.1	28.3	24.6	24.8	30.6	Sepsis
8111_007	25.88	26.8	26.5	23.6	25.8	26.5	25.6	26.0	27.1	29.4	26.4	23.6	28.4	26.0	24.1	28.5	Sepsis
6008_002	25.89	26.1	22.4	20.5	26.0	25.6	24.5	22.5	22.8	28.4	23.4	21.9	28.2	23.0	22.6	28.1	Sepsis
6063_001	26.45	26.8	25.0	23.0	25.6	25.7	24.3	23.3	25.0	30.9	25.9	23.5	28.3	25.2	23.6	30.0	Sepsis
6141_001	27.23	29.9	25.6	23.9	28.0	27.9	26.4	26.0	26.6	31.8	27.2	24.1	27.9	25.2	25.0	31.6	Sepsis

1013_001	28.86	30.9	26.9	23.6	28.4	27.1	26.0	25.6	26.3	33.3	28.1	25.0	25.5	26.6	24.6	31.6	Sepsis
6024_002	26.64	28.5	25.3	21.9	26.1	24.8	24.7	23.9	23.7	32.2	26.0	24.7	28.3	25.6	25.1	31.2	Sepsis
7040_001	28.55	31.1	26.1	23.7	28.4	26.3	26.8	25.7	26.1	33.9	27.6	24.7	28.5	26.1	25.0	31.5	Sepsis
7079_002	27.32	30.4	26.3	23.6	28.6	26.6	27.1	26.5	25.8	30.7	27.2	25.3	28.6	26.4	25.0	29.8	Sepsis
920_001	29.50	31.4	29.1	26.0	28.2	27.5	26.6	25.1	25.8	32.7	28.6	27.0	29.1	27.4	25.5	30.7	Sepsis
6036_001	28.82	30.0	26.8	24.6	28.7	26.5	27.1	25.3	24.0	34.7	27.7	26.7	29.5	26.8	25.9	31.3	Sepsis
6056_001	26.28	27.9	25.4	24.6	27.6	26.0	25.5	25.3	27.2	31.0	26.5	25.5	27.5	25.7	24.8	30.1	Sepsis
6061_001	28.63	29.0	27.0	25.2	28.2	26.5	26.3	25.6	26.2	32.6	26.7	25.5	30.0	26.4	25.0	30.8	Sepsis
7023_001	26.83	29.2	26.5	24.3	26.5	25.5	25.7	24.5	25.5	34.7	26.3	25.9	28.6	27.4	25.7	31.7	Sepsis
7112_001	28.60	29.5	31.3	25.9	27.9	27.9	25.4	26.3	25.3	33.8	27.0	24.7	30.1	26.1	24.9	31.6	Sepsis
6064_001	28.63	30.0	30.0	22.8	29.6	26.2	26.2	26.2	26.1	33.8	27.1	24.3	28.9	25.6	25.1	30.6	Sepsis
6120_001	27.58	30.7	25.7	23.4	29.0	27.8	27.2	27.3	27.2	33.7	28.1	24.6	28.6	26.4	25.3	31.4	Sepsis
7105_001	27.19	28.6	32.3	22.7	26.6	26.4	25.1	25.1	24.6	31.7	27.7	24.4	29.1	26.0	25.2	30.8	Sepsis
7120_001	29.38	29.8	29.6	24.4	29.3	28.2	26.9	26.3	26.2	33.5	27.9	24.7	28.2	26.6	25.7	32.2	Sepsis
749_001	27.59	28.8	26.4	23.5	26.5	25.6	24.0	25.1	25.3	31.2	26.3	25.1	28.6	25.1	24.1	30.5	Sepsis
5008_001	26.87	27.9	31.2	22.0	26.5	26.1	24.5	24.0	25.5	32.3	27.2	24.8	28.3	25.6	24.3	30.8	Sepsis
5009_001	25.52	26.2	29.7	22.3	25.9	25.5	23.2	24.2	26.3	30.8	26.0	24.2	27.4	25.0	23.4	29.0	Sepsis
5010_001	27.96	29.1	29.5	22.8	28.8	27.4	28.5	26.3	27.0	32.6	27.9	25.6	27.8	26.1	26.7	31.9	Sepsis
5018_001	28.47	30.4	30.0	23.7	28.4	27.6	26.8	26.6	26.7	34.0	27.3	25.3	29.2	26.2	25.9	31.9	Sepsis
1015_001	29.77	30.5	26.7	24.8	28.8	28.3	26.7	26.1	26.8	34.5	28.3	25.0	29.3	26.9	25.5	30.5	Sepsis
6005_001	29.27	30.0	26.9	23.5	28.3	26.4	26.8	24.9	21.6	33.4	27.7	24.9	28.8	26.2	25.6	32.1	Sepsis
6035_002	28.80	28.0	26.3	25.0	28.0	27.4	26.9	26.2	25.7	32.8	27.1	25.6	29.1	26.6	25.3	31.6	Sepsis
6070_002	29.09	31.0	27.7	24.7	28.2	28.9	26.9	25.8	27.4	34.1	29.8	26.5	29.8	28.1	26.4	33.0	Sepsis
6075_002	29.35	30.6	25.6	25.8	28.9	28.7	26.8	26.4	27.2	32.6	28.0	24.6	28.5	26.3	25.4	31.6	Sepsis
6104_002	30.63	32.3	28.8	25.8	28.5	28.5	27.2	27.2	26.8	34.4	28.9	27.2	29.0	27.5	26.3	32.1	Sepsis
6124_001	30.50	31.3	26.7	24.8	29.1	26.7	28.1	25.0	26.1	32.7	28.3	26.0	28.5	27.0	26.4	31.9	Sepsis
6126_001	30.72	28.6	27.6	24.5	27.8	26.2	26.0	24.7	24.5	31.4	26.8	25.7	26.9	25.9	24.7	30.4	Sepsis
714_001	32.80	31.9	27.6	27.5	29.9	30.3	29.8	28.0	25.2	NA	29.5	26.8	31.6	28.9	28.0	33.5	Sepsis

Klassifikation:

Ziel der Klassifikation war die Bestimmung des Markersets, der die beste Trennung zwischen Proben von Patienten mit und ohne Sepsis ermöglicht.

Um die Gen-Marker nach ihrer Trennungsgüte anzuordnen, wurde die lineare Diskriminanzanalyse (LDA) [Hastie et al., 2001] zusammen mit der Methode der vorwärts Selektion verwendet, wobei die Trennbarkeit mit dem F-Wert bewertet wurde [Hocking, R. R., 1976].

Die Berechnung erfolgte unter der Verwendung der Funktion `lda` aus der R-Bibliothek MASS. Für p Marker wurden die Gewichte (w_0, \dots, w_p) der Diskriminanzfunktion f_{LD} , die durch die Formel

$$f_{LD}(x_1, \dots, x_p) = \sum_{i=1}^p w_i x_i - w_0$$

definiert ist, aus den Trainingsdaten berechnet. Jede Trainings-Probe wurde nacheinander klassifiziert, wofür in der vorangegangenen Formel für x_i die Delta Ct-Werte der Probe eingesetzt wurden. Die Gewichte der Diskriminanzfunktion wurden so berechnet, dass ein positiver Wert der Funktion die Zuordnung zur Gruppe mit einer infektiösen Komplikation und ein negativer Wert der Funktion die Zuordnung zur Gruppe ohne eine infektiöse Komplikation bedeuten.

Die Klassifikationsprozedur wurde für eine aufsteigende Anzahl von Markern wiederholt, wobei sukzessiv die Marker-Kandidaten in die Diskriminanzanalyse eingeschlossen wurden, die den höchsten Beitrag zur Trennungsgüte leisteten (vorwärts Selektion). Dieser Analyseschritt wurde für 1000 Bootstrap-Stichproben wiederholt, die durch zufälliges Ziehen mit Zurücklegen aus dem Trainingsdatensatzes gewonnen wurden. Die in jeder Wiederholung ermittelten Marker-Ranks wurden über die 1000 Läufe gemittelt. Die Marker-Kandidaten wurden nach dem mittleren Rank aufsteigend angeordnet. Diese Anordnung bedeutet, dass der Marker mit dem kleinsten mittleren Rank der war, der am häufigsten den meisten Beitrag zur Trennungsgüte leistete und der Marker mit dem höchsten mittleren Rank für die Trennung in meisten Wiederholungen wenig beitrug.

Die Güte des ermittelten Marker-Rankings wurde geprüft, in dem die Trennbarkeit der Trainingsgruppen für Markersets mit aufsteigender Markerzahl bewertet wurde. Dafür wurde die lineare Diskriminanzanalyse mit einer einfachen Kreuzvalidierung verwendet. Für p Marker wurden die Gewichte (w_0, \dots, w_p) der Diskriminanzfunktion f_{LD} aus dem reduzierten Trainingsdaten berechnet, in dem nacheinander eine Probe weggelassen wurde. Diese Probe wurde nacheinander klassifiziert, wofür in der vorangegangenen Formel für x_i die Delta Ct-Werte der Probe eingesetzt wurden.

Um zu prüfen, dass die Trennungsgüte nicht primär vom Klassifikationsverfahren sondern von der Marker-Auswahl abhängt, wurde abschließend die einfache Kreuzvalidierung auch für die quadratische Diskriminanzanalyse (QDA) [Hastie et al., 2001] in gleicher Weise wiederholt. Die Berechnung erfolgte unter der Verwendung der Funktion `qda` aus der R-Bibliothek MASS.

Die Klassifikationsergebnisse des Trainingsdatensatzes wurden für die Matrix des Testdatensatzes validiert. Aus dem Trainingsdatensatz wurde für jedes Markersets mit aufsteigender Markerzahl die Diskriminanzfunktion bestimmt und zu Klassifikation der Test-Proben verwendet. Die Güte der Klassifikation wurde mittels der Receiver Operating Characteristic (ROC) – Kurve bewertet, in der die Rate der richtig Positiven (Sensitivität) gegen die Rate der falsch Positiven (1-Spezifität) für eine aufsteigenden Folge der Klassifikationsschwellen abgebildet wird [Fawcett T., 2006]. Für die Bewertung wurde aus jeder ROC-Kurve die Fläche unter der Kurve (AUC) berechnet und die höchste erreichbare Klassifikationseffizienz (Anteil der korrekt klassifizierten Proben) bestimmt.

Ergebnisse

Die Ergebnisse der oben beschriebenen Klassifikationsanalyse wurden in der Tabelle 8 zusammengefasst. Die Ranking-Prozedur ergab die folgende Anordnung der Marker-Kandidaten: M6, M15, M9, M7, M2, M10, M4, M12, M17, M3, M8, M13, M16. Die Kreuzvalidierungsrate der LDA und der QDA stieg deutlich für die ersten 3 Marker auf 94.8%. Die beste Trennung der Trainingsgruppen mit 96,6 % wurde mit LDA für die ersten 6 Marker erreicht, bei der 56 aus 58 Proben richtig klassifiziert wurden (QDA liefert ein Maximum bei 3 Markern folgend mit 7 Markern). Für mehr als 7 Markern wurde keine Verbesserung der Klassifikation erreicht.

Für den unabhängigen Testdatensatz wurde die größte Fläche unter der ROC-Kurve von mehr als 85% für die ersten 6 und 7 Markern erreicht, die beste Klassifikation mit 81,4% lieferten die ersten 7 Markern.

Tabelle 8: Ergebnisse der Klassifikationsoptimierung. Fett markiert ist der maximale Wert der jeweiligen Spalte, der das beste Ergebnis bzgl. der Markerkombination widerspiegelt.

Marker-ranking	Trainingsdaten (n= 58)				Testdaten (n = 113)	
	mittlerer Rank (1000 Bootstraps)	Kreuzvalidierungsrate (%)		Fläche unter der ROC-Kurve, AUC (%)	Klassifikations-Effizienz (%)	
		LDA	QDA			
M6	3.3	70.7	74.1	60.1	60.2	
M15	4.1	79.3	81.0	68.1	68.1	
M9	4.4	94.8	94.8	84.0	78.8	

M7	5.7	93.1	87.9	84.3	77.9
M2	5.7	93.1	89.7	83.8	75.2
M10	7.0	96.6	87.9	85.2	78.8
M4	7.1	91.4	93.1	85.4	81.4
M12	7.2	89.7	89.7	83.9	78.8
M17	8.7	91.4	89.7	82.5	77.9
M3	8.9	91.4	87.9	81.9	78.8
M8	9.4	89.7	84.5	80.3	75.2
M13	9.4	87.9	81.0	79.2	73.5
M16	10.3	87.9	77.6	78.4	73.5

Da in der Klassifikationsanalyse die besten Ergebnisse überwiegend mit den ersten 7 Markern aus der obigen Tabelle erreicht wurden, wurde für weitere Klassifikationen die 7-Marker-LDA verwendet, deren Diskriminanzfunktion f_{LD} aus dem Trainingsdatensatz bestimmt wurde. Die zugehörigen Gewichte (w_0, \dots, w_7) wurden in der Tabelle 9 dargelegt.

Basierend auf dieser Funktion wurde ein auf die Sepsis bezogener diagnostischer Parameter, ein sogenannter SIQ-Score (SIQ) wie folgt eingeführt. Für eine neue unabhängige Probe bekommt man als Klassifikationsergebnis einen dimensionsfreien Wert der Diskriminanzfunktion. Ein positiver Wert klassifiziert die Probe als infektiös und ein negativer Wert als nicht infektiös. Für typische Vertreter der jeweiligen Gruppe erhält man absolut höhere Werte, schwer klassifizierbare Proben erreichen Werte nahe Null. Der Streubereich der Diskriminanz-Werte entspricht i.a. der Variabilität der Delta Ct- Datenmatrix. So erreichte man in der Klassifikation Diskriminanzwerte von ca. -5 bis 5. Um die Unterschiede deutlicher hervorzuheben, wurde der SIQ-Score (SIQ) als der 10-fache Wert der Diskriminanzfunktion mit den Gewichten aus der Tabelle 9 eingeführt. Dementsprechend variierten die SIQ-Werte der Testdaten von ca. -50 bis 50.

Tabelle 9: Gewichte der Diskriminanzfunktion, die aus dem Trainingsdatensatz ermittelt wurden.

w0	w1 (M6)	w2 (M15)	w3 (M9)	w4 (M7)	w5 (M2)	w6 (M10)	w7 (M4)
0.160	0.733	-0.722	-1.006	0.188	-0.387	-0.268	0.161

In der linearen Diskriminanzanalyse wird i.a. die Diskriminanzfunktion so bestimmt, dass die Trennungsschwelle zwischen den beiden Trainingsgruppen bei Null liegt. Mittels der ROC-Kurve kann bei einem unabhängigen Testdatensatz ermittelt werden, bei welchem Schwellen-Wert die beste Trennung der zugehörigen Test-Gruppen erreicht wird. In Fig. 1 wird die ROC-Kurve zur Klassifikation der Testdaten mittels des SIQ-Scores dargestellt und es wird das Verhältnis zwischen richtig Positiven (Sensitivität) und falsch Positiven (1-Spezifität) markiert, grau gestrichelt für den Schwellenwert von Null und schwarz gestrichelt für die beste erreichte Klassifikation von 81,4%. Dieses Klassifikationsergebnis wurde für den Schwellenwert von SIQ = - 4.9 erreicht. Aus Fig. 1 wurde ersichtlich, dass durch die Verschiebung der Schwelle von 0 auf -4.9 einen Sensitivität-Gewinn von ca. 63% auf über 80% zu Kosten der Spezifität von ca. 81% auf ca. 80% erreicht wird. Dieses Ergebnis spiegelt die Diskrepanz zwischen den vorausgewählten Patienten des Trainingsdatensatzes und dem heterogenen Kollektiv des Testdatensatzes wider. Die Klassifikationsgüte, die mit der aktualisierten Klassifikationsschwellen von SIQ = -4.9 erreicht wurde, wird in der Tabelle 10 dargestellt.

Damit wird demonstriert, dass die beschriebene Erfindung für die Unterscheidung zwischen infektiöser und nicht- infektiöser Genese bei systemischen Reaktionen des Organismus, wie z.B. SIRS, Sepsis, postoperative Komplikationen, chronischem und/oder akutem Organdysfunktion, Schock-Reaktion, Entzündungsreaktion und/oder Trauma, differentialdiagnostisch angewendet werden kann.

Tabelle 10: Güte der Klassifikation für den Testdatensatz mittels des SIQ-Scores bei einer Schwelle

		Goldstandard		Summe (n)	Vorhersage- werte
		Sepsis (n)	keine Sepsis (n)		
SIQ-Score (Schwelle = -4.9)	positiv (n)	32.7% (37)	12.4% (14)	45.1% (51)	72.5%
	negativ (n)	6.2% (7)	48.7% (55)	54.9% (62)	88.7%
Summe (n)		38.9% (44)	61.1% (69)	100.0% (113)	
		Sensitivität 84.1%	Spezifität 79.7%	Effizienz 81.4%	

Beispiel 2: Frühe Sepsis-Erkennung

Im Testdatensatz des 1. Ausführungsbeispiels wurden für den Fall Nr. 8112 4 Proben vor und 2 Proben nach der Entwicklung der Sepsis untersucht (vgl. Tabellen 4 und 7). In der Klassifikationsanalyse wurde ein SIQ-Score über dem Wert von -4.9 bereits 2 Tage vor der klinischen Manifestation der Sepsis erreicht. Der Verlauf des im 1. Ausführungsbeispiel eingeführten SIQ-Scores sowie der Verlauf weiterer Sepsis-relevanten klinischen Parametern (PCT, CRP, SOFA, Körpertemperatur, Schockbehandlung) wird in Fig. 2 dargestellt. Aus Fig. 2 wird ersichtlich, dass SIQ-Score der einzige Parameter ist, der vorzeitig die infektiöse Komplikation widerspiegelt. Damit wird demonstriert, dass die beschriebene Erfindung für die frühe Erkennung von infektiösen Komplikationen, wie Sepsis und/oder generalisierter Infektion, angewendet werden kann.

Beispiel 3: Beobachtung des Therapieverlaufs

Im Testdatensatz des 1. Ausführungsbeispiels wurden für den Fall Nr. 7084 2 Proben vor und 2 Proben nach der Entwicklung der Sepsis untersucht (vgl. Tabellen 4 und 7). Für das 3. Ausführungsbeispiel wurden 5 nachfolgenden Proben dieses Patienten in gleicher Weise, wie es im 1. Beispiel beschrieben wurde, vermessen und ausgewertet (vgl. Tabelle 11). In Fig. 3 wurden die ermittelten Werte des im 1. Ausführungsbeispiel eingeführten SIQ-Scores zusammen mit den Sepsis-relevanten klinischen Parameter PCT, CRP, SOFA, Körpertemperatur sowie der Dosierung von Katecholaminen (norepinephrine), die die Schock-Behandlung reflektiert, dargestellt. Aus Fig. 3 wird ersichtlich, dass SIQ-Score ein Tag vor der klinischen Manifestation der Sepsis über den Schwellenwert von - 4.9 ansteigt und in der akuten Phase über der Schwelle bleibt. Nach der klinischen Manifestation der Sepsis wurden eine entsprechende Antibiotika-Therapie und eine Schockbehandlung begonnen (vgl. Tabelle 4 und Fig. 3). Die akute Phase wurde mit dem Absetzen der Katecholamine (Schock-Behandlung) am 8. Tag beendet. Der verbesserte Zustand des Patienten spiegelt sich auch im Abfallen des SOFA-Scores ab dem 7. Tag wider. Nach der

akuten Phase nimmt auch der SIQ-Score ab und fällt am 8. Tag unter die Schwelle von -4.9. Die Parameter PCT und CRP nehmen ebenfalls ab, bleiben aber über dem zugehörigen diagnostischen Entscheidungswert. Damit wird demonstriert, dass die beschriebene Erfindung für die Verlaufskontrolle und/oder Therapiekontrolle von z.B. Antibiotika-Therapie und/oder adjunktive klinische Maßnahmen und/oder operative Sanierungsmaßnahmen angewendet werden kann.

Tabelle 11: Ct-Werte des Trainingsdatensatzes pro Marker (Mittelwert der Dreifachbestimmung) und die Gruppenzugehörigkeit (letzte Spalte)

Experiment ID	M2	M3	M4	M5	M6	M8	M9	M10	M12	M13	M15	M16	M17	R1	R2	R3	
7084_001	26.2	28.2	27.0	23.6	26.1	27.4	25.3	24.2	27.0	33.3	26.8	24.7	29.9	26.0	25.5	32.0	keine Sepsis
7084_002	26.2	27.7	26.2	22.6	26.6	27.0	25.8	24.1	25.1	32.2	25.8	23.5	29.1	25.7	24.0	31.2	keine Sepsis
7084_003	27.4	30.0	28.2	23.9	28.6	28.5	27.0	25.6	26.2	32.9	26.9	24.6	30.3	26.5	25.1	31.5	Sepsis
7084_004	26.6	29.9	25.8	23.9	27.9	28.2	27.2	25.4	25.5	33.0	26.3	23.6	29.7	26.8	25.7	32.2	Sepsis
7084_005	24.8	28.3	25.1	22.8	27.2	27.6	26.4	24.6	24.1	29.5	26.1	22.4	28.4	25.7	24.1	28.7	Sepsis
7084_006	26.6	28.9	26.0	23.5	26.7	30.9	26.5	24.8	25.3	32.1	26.6	23.0	29.5	25.9	24.7	31.8	Sepsis
7084_007	25.4	27.5	25.2	23.7	26.7	28.0	25.0	23.8	22.1	31.5	25.7	21.9	28.8	25.0	23.3	31.7	Sepsis
7084_008	24.8	26.7	24.4	23.0	26.4	30.5	25.4	24.3	24.0	31.1	25.2	21.5	28.9	24.6	23.5	31.5	Sepsis
7084_009	25.9	28.0	25.8	23.7	27.4	28.3	25.4	24.3	25.9	32.3	26.8	23.6	29.3	26.3	24.6	31.7	Sepsis

LITERATUR

ACCP/SCCM (1992), Crit. Care Med 20, 864-74

Alberti C, Brun-Buisson C, Goodman SV, Guidici D, Granton J, Moreno R, Smithies M, Thomas O, Artigas A, Le Gall JR; European Sepsis Group (2003) Influence of systemic inflammatory response syndrome and Sepsis on outcome of critically ill infected patients. Am J Respir Crit Care Med 168, 77-84.

Altschul et al.: J Mol Biol 215:403-410; 1990

Amin K, Kauffman CA (2003), Fever of unknown origin. Postgrad med 114(3), 69-75

Baker SG, und Kramer B (2006), Identifying genes that contribute most to good classification in microarray. *BMC Bioinformatics* 7, 407

Benson D.A., Karsch-Mizrachi I., Lipman D.J., Ostell J., Sayers E.W. GenBank. *Nucleic Acids Res.* 2009 Jan;37(Database issue):D26-31.

Blake PG (2008) Complicated peritonitis - the biggest cause of technique failiure. *Perit Dial Int.* 28(4):327-328

Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger EP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ, the ACCP/SCCM Consensus Conference Committee (1992) Definitions for Sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in Sepsis. *Chest* 101,1656–1662

Box GEP, Cox DR (1964) An analysis of transformations (with discussion). *J Roy Stat Soc B* 26, 211-252

Buneß A, Huber W, Steiner K, Sültmann H, Poustka A (2005) ArrayMagic: two-colour cDNA microarray quality control and preprocessing. *Bioinformatics* 21, 554 - 556.

Breiman L (2001) Random Forests. *Machine Learning* 45(1), 5-32

Brun-Buisson C, Doyon F, Carlet J, Dellamonica P, Gouin F, Lepoutre A, Mercier JC, Offenstadt G, Regnier B (1995) Incidence, risk factors, and outcome of severe Sepsis and septic shock in adults. A multicenter prospective study in intensive care units. French ICU Group for Severe Sepsis. *JAMA* 274, 968-974

Brun-Buisson C, Roudot-Thoraval F, Girou E, Grenier-Sennelier C, Durand-Zaleski I (2003) The costs of septic syndromes in the intensive care unit and influence of hospital-acquired Sepsis. *Intensive Care Med* 29, 1464-1471

Bustin SA (2002) Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endicronol* 29, 23-29

Calandra T, Cohen J. (2005) International Sepsis Forum Definition of Infection in the ICU Consensus Conference. *Critical Care Med* 33(7), 1538-48.

Carrigan SD Scott G Tabrizian M (2004) Toward resolving the challenges of Sepsis. *Clin Chem* 50(8), 1301-1314

DE 10 2007 036 678 Verwendung von Polynukleotiden zur Erfassung von Genaktivitäten für die Unterscheidung zwischen lokaler und systemischer Infektion

DE 102007036678.9 (nicht veröffentlicht)

Ding BY and Gentleman R (2004) Classification using generalized partial least squares. *Bioconductor Project Working Papers*. Paper 5.

http://www.begress.com/bioconductor/paper5_9

Efron B (1979) Bootstrap Methods: Another Look at the Jackknife. *The Annals of Statistics* 7(1), 1-26

Fawcett, T. (2006). An introduction to ROC analysis. *Pattern Recognition Letters*, 27, 861-874.

FDA: In Vitro Diagnostic Multivariate Index Assays. Draft Guidance for Industry, Clinical Laboratories, and FDA Staff (2003)

<http://www.fda.gov/cdrh/oivd/guidance/1610.pdf>

Feezor RJ, Baker HV, Xiao W et al. (2004) Genomic and Proteomic Determinants of Outcome in Patients Undergoing Thoracoabdominal Aortic Aneurysm Repair. *J Immun* 172, 7103-7109

Klein D (2002) Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends Mol Med* 8(6), 257-260

Koulaouzidis A, Bhat S, Saeed AA (2009) Spontaneous bacterial peritonitis. *World J Gastroenterol.* 15(9):1042-9.

Mayhall G (2001) Ventilator-Associated Pneumonia or Not? Contemporary Diagnosis. *Emerging Infection Disease CDC* 7(2)

Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, et al. (1999) Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 286, 531-537

T. Hastie, R. Tibshirani, J. Friedman (2001) „The Elements of Statistical Learning“, Springer series in statistics, ISBN 0-387-95284-5.

Hocking, R. R. (1976) "The Analysis and Selection of Variables in Linear Regression" *Biometrics*, 32.

Hollander M., Wolfe D., (1973), *Nonparametric statistical inference*. New York: John Wiley & Sons.

Huber W, von Heydebreck A, Suelmann H, Poustka A, Vingron M (2003) Parameter estimation for the calibration and variance stabilization of microarray data. *Stat Appl in Genetics and Mol Biology* 2(1), Article 3

Huggett J, Dheda K, Bustin S et al. (2005) Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations *Genes Immun* 6(4), 279-284

Increase in National Hospital Discharge Survey rates for septicemia--United States, 1979-1987. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1990 39, 31-34

Johnson SB, Lissauer M, Bochicchio GV, Moore R, Cross AS, Scalea TM. (2007) Gene Expression Profiles Differentiate Between Sterile SIRS and Early Sepsis *Annals of Surgery* 245(4), 611-621

Knaus WA , Draper EA, Wagner DP, Zimmermann JE (1985) Prognosis in acute organ-system failure. *Ann Surg* 202, 658-693

Kofoed K, Andersen O, Kronborg G, Tvede M, Petersen J, Eugen-Olsen J, Larsen K (2007), Use of plasma C-reactive protein, procalcitonin, neutrophils, macrophage migration inhibitory factor, soluble urokinase-type plasminogen activator receptor, and soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in combination to diagnose infections: a prospective study. *Critical Care* 11, R38

Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M et al. (2006) The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 27, 95-125

Kumar A, Roberts D, Wood KE et al. (2006) Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit Care Med* 34(6), 1589-1596

Le-Gall JR, Lemeshow S, Leleu G, Klar J, Huillard J, Rue M, Teres D, Artigas A (1995) Customized probability models for early severe Sepsis in adult intensive care patients. *Intensive Care Unit Scoring Group. JAMA* 273, 644-650

Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G et al. (2003) 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med* 29, 530-538

Liu H, Li J, Wong L (2005) Use of extreme patient samples for outcome prediction from gene expression data. *Bioinformatics* 21(16), 3377-3384

MAQC Consortium. The MicroArray Quality Control (MAQC) project shows inter-and intraplatform reproducibility of gene expression measurements. *Nat Biotechnol* 2006, 24:, 1151-61

Mathiak G, Kabir K, Grass G, et al. (2003) Lipopolysaccharides from different bacterial sources elicit disparate cytokine responses in whole blood assays. *Int J Mol Med* 11(1), 41-44

Marshall JC, Vincent JL, Fink MP et al. Measures, markers, and mediators: toward a staging system for clinical sepsis. A report of the Fifth Toronto Sepsis Roundtable, Toronto, Ontario, Canada, October 25-26, 2000 und Crit Care Med. 2003, 31: 1560-1567

Mayhall CG (2001) Ventilator-Associated Pneumonia or Not? Contemporary Diagnosis. Emerg Infect Dis 7(2), 200-204

Nolan T, Hands RE, Bustin SA (2006) Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. Nat Protoc 1(3), 1559-1582

Opal SM, Lim Y-P, Siryaporn E, et al. (2005) Longitudinal studies of inter-alpha inhibitor proteins in severely septic patients : A potential clinical marker and mediator of severe sepsis. Clin Invest 35(2), 387-292

Pachot A, Lepape A, Vey S, et al. (2006) Systemic transcriptional analysis in survivor and non-survivor septic shock patients: a preliminary study. Immunol Lett 106(1), 63-71. Epub 2006 May 17

Pile JC (2006) Evaluating postoperative fever: a focused approach. Clev Clin J Med. 73 (supp.1) 62-66

Pruitt K.D., Tatusova T., Maglott D.R. NCBI reference sequences (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins. Nucleic Acids Res. 2007 Jan;35(Database issue):D61-5.

Ramilo O, Allman W, Chung W, Mejias A, Ardura M, Glaser C, Wittkowski KM, Piqueras P, Bancherau J, Palucka K A, Chaussabel D, (2007) Gene expression patterns in blood leukocytes discriminate patients with acute infections. Blood 109, 2066-2077

R Development Core Team (2006) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>

Rocke DM, Durbin B. (2001) A model for measurement error for gene expression arrays. *J Comput Biol* 8, 557-569

Roth AR, Basello DO, (2003) Approach to the adult patient with fever of unknown origin. *Am Fam Phys* 68(11) 2223-2228

Ruokonen E et al. (1999) Procalcitonin concentrations in patients with neutropenic fever. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 18(4), 283-5

Ruokonen E et al. (2002) Procalcitonin and neopterin as indicators of infection in critically ill patients. *Acta Anaesthesiol Scand* 46(4), 398-404

Simon L, Gauvin F, Amre DK, Saint-Lois P, Lacroix J, (2004) Serum procalcitonin and C-reactive protein levels as marker of bacterial infection: A systematic review and meta analysis. *Clin Infect Dis* 39, 206-217

Simon R. (2005) Roadmap for Developing and Validating Therapeutically Relevant Genomic Classifiers. *J Clin Oncol* 23, 7332-7341

Sponholz C, Sakr Y, Reinhart K, Brunkhorst F, (2006) Diagnostic value and prognostic implications of serum procalcitonin after cardiac surgery: a systematic review of the literature, *Critical Care* 10, R145

Suprin E et al. (2000) Procalcitonin: a valuable indicator of infection in a medical ICU *Intensive Care Med* 26(9), 1232-1238

Tang BMP, Eslick GD, Craig JC et al. (2007a) Accuracy of procalcitonin for sepsis diagnosis in critically ill patients : systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 7, 210-217

Tang BMP, McLean AS, Dawes IW, Huang SJ, Lin RCY (2007b) The Use of Gene-Expression Profiling to Identify Candidate Genes In Human Sepsis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 176(7), 676-684

The NCBI handbook [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2002 Oct.

US 20060246495 Diagnosis of sepsis

US 6960439 Identification, monitoring and treatment of disease and characterization of biological condition using gene expression profiles

Vandesompele J, Preter De K, Pattyn F, et al. (2002) Accurate normalisation of real-time quantitative PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* 3(7), research0034.1-0034.11

Valasek MA, Repa JJ (2005) The power of real-time PCR. *Advan Physiol Educ* 29, 151-159

Vapnik V., (1999). *The Nature of Statistical Learning Theory*. Springer, New York.

Whitcombe D, Theaker J, Guy SP et al. (1999) Detection of PCR products using selfprobing amplicons and fluorescence. *Nat Biotechnol* 17, 904-907

WO 2006/100203 Verwendung von Geneaktivitäts-Klassifikatoren für die in vitro Klassifizierung von Genexpressionsprofilen von Patienten mit infektiösem/nichtinfektiösem

WO 2004/087949 Verfahren zur Erkennung akuter, generalisierter entzündlicher Zustände (SIRS), Sepsis, sepsisähnlichen Zuständen und systemischen Infektionen

WO 2005/083115 Verfahren zur Erkennung von Sepsis

WO 2005/106020 Verfahren zur Erstellung von Kriterien zur Vorhersage des Krankheitsverlaufs bei Sepsis

WO 2006/042581 Verfahren zur Unterscheidung zwischen nichtinfektiösen und infektiösen Ursachen eines Multiorganversagens

WO 2007/144105 Verfahren zur Feststellung der lokalen Entzündung eines Fiebers unklarer Genese

WO 2007/124820 Verfahren zur in vitro-Überwachung postoperativer Veränderungen nach Lebertransplantation

WO 2003/084388 Early detection of sepsis

Wong ML, Medrano JF (2005) Real-time PCR for mRNA quantification. *Biotechniques* 39(1) 1-11

Zeni F, Freeman B, Natanson C (1997) Anti-inflammatory therapies to treat sepsis and septic shock: A reassessment. *Crit Care Med* 25(7), 1095-1100

Ansprüche

1. Verfahren zur in vitro Erfassung und/oder Früherkennung und/oder Unterscheidung und/oder Verlaufsbeobachtung und/oder Beurteilung von pathophysiologischen Zuständen, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus: SIRS, Sepsis und deren Schweregraden; sepsisähnlichen Zuständen; septischem Schock; Bakteriämie, infektiösem/nicht-infektiösem Multiorganversagen; Früherkennung dieser Zustände; Fokuskontrolle; Kontrolle von chirurgischen Sanierungsmaßnahmen des Infektionsfokus; Responder/non-Responder für eine bestimmte Therapie; Therapiekontrolle; Unterscheidung zwischen infektiöser und nicht- infektiöser Genese bei systemischen Reaktionen des Organismus, wie z.B. SIRS, Sepsis, postoperative Komplikationen, chronischem und/oder akuter Organdysfunktion, Schock-Reaktion, Entzündungsreaktion und/oder Trauma; wobei das Verfahren folgende Schritte umfasst:
 - a) Isolierung von Probennukleinsäuren aus einer von einem Patienten stammenden Probe;
 - b) Bestimmung von Genaktivitäten mittels einer Mehrzahl von wenigstens drei Polynukleotiden, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus M2, M3, M4, M6, M7, M8, M9, M10, M12, M13, M15, M16 und M17; und/oder deren Isoformen und/oder deren Genloci und/oder deren Transkripten und/oder Fragmenten mit einer Länge von mindestens 5 Nucleotiden davon, zur Bildung wenigstens eines für die Erfassung und/oder Unterscheidung und/oder den Verlauf von pathophysiologischen Zuständen eines Patienten charakteristischen Multigenbiomarkers; wobei die Polynucleotide gemäß folgender Tabelle definiert sind:

Polynucleotid	Transkriptvariante/ <i>cis</i> -regulatorische Sequenzen	Accession Number	SEQ ID
M2	M2_1	NM_001031700	1
	M2_2	NM_016613	2
	M2_3	NM_001128424	3
M4	M4_1	NM_203330	4
	M4_2	NM_000611	5
	M4_3	NM_203329	6
	M4_4	NM_203331	7
	M4_5	NM_001127223	8
	M4_6	NM_001127225	9
	M4_7	NM_001127226	10
	M4_8	NM_001127227	11
M6	M6_1	NM_001831	12
	M6_2	NM_203339	13
M7	M7_1	NM_031311	14
	M7_2	NM_019029	15
M9	M9	NM_006682	16
M10	M10	NM_033554	17
M15	M15_1	NM_003580	18
	M15_2	NM_001144772	19
M3	M3_A	NM_001123041	20
	M3_B	NM_001123396	21
M8	M8	NM_025209	22
	M8_ <i>cis</i>	AI807985	23
M12	M12	NM_002185	24
	M12_ <i>cis</i>	DB155561	25
M13	M13	NM_001080394	26
M16	M16	NM_003268	27
M17	M17	NM_182491	28

- c) Bestimmung von Genaktivitäten wenigstens eines internen Referenzgens, auf die die unter b) bestimmten Genaktivitäten bezogen, insbesondere normalisiert, werden;
- d) Bilden eines Wertes aus den einzelnen bestimmten Genaktivitäten des Multigenbiomarkers, der den pathophysiologischen Zustand anzeigt.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Referenzgen ausgewählt wird aus Polynukleotiden der Gruppe bestehend aus R1, R2 und R3 und/oder deren Isoformen und/oder deren Genloci und/oder deren Transkripten und/oder Fragmenten mit einer Länge von mindestens 5 Nucleotiden davon, wobei die Referenzgene gemäß folgender Tabelle definiert sind:

Referenzgene	Transkriptvariante/cis-regulatorische Sequenzen	Accession Number	SEQ ID
R1	R1_A	NM_001228	29
	R1_B	NM_033355	30
	R1_C	NM_033356	31
	R1_E	NM_033358	32
	R1_F	NM_001080124	33
	R1_G	NM_001080125	34
R2	R2_1	NM_002209	35
	R2_2	NM_001114380	36
R3	R3	NM_003082	37

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass als Polynukleotidsequenzen Genloci, sense und/oder antisense Stränge von prä-mRNA und/oder mRNA, small RNA, insbesondere scRNA, snoRNA, micro RNA, siRNA, dsRNA, ncRNA oder transposable Elemente zur Erfassung der Genexpressionsprofile verwendet werden.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass in Schritt b) die Genaktivität von 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, oder 12 Polynucleotiden, oder von sämtlichen 13 Polynucleotiden bestimmt wird, wobei die Polynucleotide ausgewählt werden aus der Gruppe, bestehend aus: M2, M3, M4, M6, M7, M8, M9, M10, M12, M13, M15, M16 und M17 und/oder deren Isoformen und/oder deren Genloci und/oder deren Transkripten und/oder Fragmenten mit einer Länge von mindestens 5 Nucleotiden davon, wobei die Polynucleotide gemäß folgender Tabelle definiert sind:

Polynucleotid	Transkriptvariante/ <i>cis</i> -regulatorische Sequenzen	Accession Number	SEQ ID
M2	M2_1	NM_001031700	1
	M2_2	NM_016613	2
	M2_3	NM_001128424	3
M4	M4_1	NM_203330	4
	M4_2	NM_000611	5
	M4_3	NM_203329	6
	M4_4	NM_203331	7
	M4_5	NM_001127223	8
	M4_6	NM_001127225	9
	M4_7	NM_001127226	10
	M4_8	NM_001127227	11
M6	M6_1	NM_001831	12
	M6_2	NM_203339	13
M7	M7_1	NM_031311	14
	M7_2	NM_019029	15
M9	M9	NM_006682	16
M10	M10	NM_033554	17
M15	M15_1	NM_003580	18
	M15_2	NM_001144772	19
M3	M3_A	NM_001123041	20
	M3_B	NM_001123396	21
M8	M8	NM_025209	22
	M8_ <i>cis</i>	AI807985	23
M12	M12	NM_002185	24
	M12_ <i>cis</i>	DB155561	25
M13	M13	NM_001080394	26
M16	M16	NM_003268	27
M17	M17	NM_182491	28

und/oder wobei eine Anzahl von 7 Polynucleotiden bevorzugt ist.

5. Verwendung von wenigstens drei Polynucleotiden, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus: M2, M3, M4, M6, M7, M8, M9, M10, M12, M13, M15, M16 und M17 und/oder deren Isoformen und/oder deren Genloci und/oder deren Transkripten und/oder Fragmenten mit einer Länge von mindestens 5 Nucleotiden davon, zur Bildung wenigstens eines Multigenbiomarkers zur Herstellung eines Multiplex-Assays als Hilfsmittel zur *in vitro* Erfassung und/oder Früherkennung und/oder Unterscheidung und/oder Verlaufsbeobachtung und/oder Beurteilung von pathophysiologischen Zuständen eines Patienten, wobei der pathophysiologische

Zustand ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: SIRS, Sepsis und deren Schweregraden; sepsisähnlichen Zuständen; septischem Schock; Bakteriämie, infektiösem/nicht-infektiösem Multiorganversagen; Früherkennung dieser Zustände; Fokuskontrolle; Kontrolle von chirurgischen Sanierungsmaßnahmen des Infektionsfokus; Responder/non-Responder für eine bestimmte Therapie; Therapiekontrolle; Unterscheidung zwischen infektiöser und nicht- infektiöser Genese bei systemischen Reaktionen des Organismus, wie z.B. SIRS, Sepsis, postoperative Komplikationen, chronischem und/oder akuter Organdysfunktion, Schock-Reaktion, Entzündungsreaktion und/oder Trauma; wobei die Polynucleotide gemäß folgender Tabelle definiert sind:

Polynucleotid	Transkriptvariante/ <i>cis</i> -regulatorische Sequenzen	Accession Number	SEQ ID
M2	M2_1	NM_001031700	1
	M2_2	NM_016613	2
	M2_3	NM_001128424	3
M4	M4_1	NM_203330	4
	M4_2	NM_000611	5
	M4_3	NM_203329	6
	M4_4	NM_203331	7
	M4_5	NM_001127223	8
	M4_6	NM_001127225	9
	M4_7	NM_001127226	10
	M4_8	NM_001127227	11
M6	M6_1	NM_001831	12
	M6_2	NM_203339	13
M7	M7_1	NM_031311	14
	M7_2	NM_019029	15
M9	M9	NM_006682	16
M10	M10	NM_033554	17
M15	M15_1	NM_003580	18
	M15_2	NM_001144772	19
M3	M3_A	NM_001123041	20
	M3_B	NM_001123396	21
M8	M8	NM_025209	22
	M8_ <i>cis</i>	AI807985	23
M12	M12	NM_002185	24
	M12_ <i>cis</i>	DB155561	25
M13	M13	NM_001080394	26
M16	M16	NM_003268	27
M17	M17	NM_182491	28

6. Verwendung nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass der Multigenbiomarker eine Kombination von mehreren Polynukleotid-, insbesondere Gensequenzen ist, anhand deren Genaktivitäten mittels einer Interpretationsfunktion eine Klassifikation durchgeführt und/oder ein Index gebildet wird.
7. Verwendung nach Anspruch 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Genaktivitäten mittels enzymatischer Verfahren, insbesondere Amplifikationsverfahren, bevorzugt Polymereasekettenreaktion (PCR), vorzugsweise Real-Time-PCR, insbesondere sondenbasierte Verfahren wie Taq-Man, Scorpions, Molecular Beacons; und/oder mittels Hybridisierungsverfahren, insbesondere solchen auf Microarrays; und/oder direkter mRNA-Nachweis, insbesondere Sequenzierung oder Massenspektrometrie; und/oder isothermale Amplifikation, erfasst werden.
8. Verwendung nach einem der Ansprüche 5 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass aus den einzelnen bestimmten Genaktivitäten ein Index gebildet wird, der nach entsprechender Kalibrierung ein Maß für den Schweregrad und/oder den Verlauf des pathophysiologischen Zustands ist, wobei vorzugsweise der Index auf einer leicht interpretierbaren Skala angezeigt wird.
9. Verwendung nach einem der Ansprüche 5 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass man die erhaltenen Genaktivitätsdaten zur Herstellung von Software für die Beschreibung mindestens eines pathophysiologischen Zustands und/oder einer Untersuchungsfrage und/oder als Hilfsmittel für Diagnosezwecke und/oder für Patientendatenmanagement-Systeme, insbesondere für die Verwendung zur Patientenstratifikation und als Einschlusskriterium für klinische Studien, einsetzt.
10. Verwendung nach einem der Ansprüche 5 bis 9, wobei zur Erstellung der Genaktivitätsdaten solche spezifischen Genloci, sense und/oder antisense Stränge von prä-mRNA und/oder mRNA, small RNA, insbesondere scRNA, snoRNA, micro RNA, siRNA, dsRNA, ncRNA oder transposable Elemente, Gene und/oder Genfragmente mit einer Länge von mindestens 5 Nucleotiden verwendet werden, welche eine Sequenzhomologie von mindestens ca. 10%, insbesondere ca. 20%, vorzugsweise ca. 50%, besonders bevorzugt ca. 80% zu den

Polynukleotidsequenzen M2, M3, M4, M6, M7, M8, M9, M10, M12, M13, M15, M16 und M17 aufweisen.

11. Verwendung nach einem der Ansprüche 5 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 oder 12 Polynucleotide, oder sämtliche 13 Polynucleotide verwendet werden, wobei die Polynucleotide ausgewählt werden aus der Gruppe, bestehend aus: M2, M3, M4, M6, M7, M8, M9, M10, M12, M13, M15, M16 und M17 und/oder deren Isoformen und/oder deren Genloci und/oder deren Transkripten und/oder Fragmenten mit einer Länge von mindestens 5 Nucleotiden davon, wobei die Polynucleotide gemäß folgender Tabelle definiert sind:

Polynucleotid	Transkriptvariante/ <i>cis</i> -regulatorische Sequenzen	Accession Number	SEQ ID
M2	M2_1	NM_001031700	1
	M2_2	NM_016613	2
	M2_3	NM_001128424	3
M4	M4_1	NM_203330	4
	M4_2	NM_000611	5
	M4_3	NM_203329	6
	M4_4	NM_203331	7
	M4_5	NM_001127223	8
	M4_6	NM_001127225	9
	M4_7	NM_001127226	10
	M4_8	NM_001127227	11
M6	M6_1	NM_001831	12
	M6_2	NM_203339	13
M7	M7_1	NM_031311	14
	M7_2	NM_019029	15
M9	M9	NM_006682	16
M10	M10	NM_033554	17
M15	M15_1	NM_003580	18
	M15_2	NM_001144772	19
M3	M3_A	NM_001123041	20
	M3_B	NM_001123396	21
M8	M8	NM_025209	22
	M8_ <i>cis</i>	AI807985	23
M12	M12	NM_002185	24
	M12_ <i>cis</i>	DB155561	25
M13	M13	NM_001080394	26
M16	M16	NM_003268	27
M17	M17	NM_182491	28

und/oder wobei eine Anzahl von 7 Polynucleotiden bevorzugt ist.

12. Verwendung mindestens eines Polynucleotids, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus: M2, M3, M4, M6, M7, M8, M9, M10, M12, M13, M15, M16 und M17 und/oder deren Isoformen und/oder deren Genloci und/oder deren Transkripten und/oder Fragmenten mit einer Länge von mindestens 5 Nucleotiden davon, wobei die Polynucleotide gemäß folgender Tabelle definiert sind:

Polynucleotid	Transkriptvariante/ <i>cis</i> -regulatorische Sequenzen	Accession Number	SEQ ID
M2	M2_1	NM_001031700	1
	M2_2	NM_016613	2
	M2_3	NM_001128424	3
M4	M4_1	NM_203330	4
	M4_2	NM_000611	5
	M4_3	NM_203329	6
	M4_4	NM_203331	7
	M4_5	NM_001127223	8
	M4_6	NM_001127225	9
	M4_7	NM_001127226	10
	M4_8	NM_001127227	11
M6	M6_1	NM_001831	12
	M6_2	NM_203339	13
M7	M7_1	NM_031311	14
	M7_2	NM_019029	15
M9	M9	NM_006682	16
M10	M10	NM_033554	17
M15	M15_1	NM_003580	18
	M15_2	NM_001144772	19
M3	M3_A	NM_001123041	20
	M3_B	NM_001123396	21
M8	M8	NM_025209	22
	M8_ <i>cis</i>	AI807985	23
M12	M12	NM_002185	24
	M12_ <i>cis</i>	DB155561	25
M13	M13	NM_001080394	26
M16	M16	NM_003268	27
M17	M17	NM_182491	28

zur Herstellung eines Assays zur Beurteilung, ob bei einem Patienten ein pathophysiologischer Zustand vorliegt, und/oder zur Feststellung des Schweregrades und/oder des Verlaufs eines pathophysiologischen Zustands.

13. Verwendung nach einem der Ansprüche 5 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass der pathophysiologische Zustand ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: SIRS, Sepsis und deren Schweregraden; sepsisähnlichen Zuständen; septischem Schock; Bakteriämie, infektiösem/nicht-infektiösem Multiorganversagen; Früherkennung dieser Zustände; Fokuskontrolle; Kontrolle von chirurgischen Sanierungsmaßnahmen des Infektionsfokus; Responder/non-Responder für eine bestimmte Therapie; Therapiekontrolle; Unterscheidung zwischen infektiöser und nicht-infektiöser Genese bei systemischen Reaktionen des Organismus, wie z.B. SIRS, Sepsis, postoperative Komplikationen, chronischem und/oder akuter Organdysfunktion, Schock-Reaktion, Entzündungsreaktion und/oder Trauma.
14. Verwendung nach einem der Ansprüche 5 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Probennukleinsäure RNA, insbesondere Gesamt-RNA oder mRNA, oder DNA, insbesondere cDNA, ist.
15. Verwendung nach Anspruch 13 oder 14, dadurch gekennzeichnet, dass zur Beurteilung des pathophysiologischen Zustands neben wenigstens einem der Polynucleotide, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus: M2, M3, M4, M6, M7, M8, M9, M10, M12, M13, M15, M16 und M17 und/oder deren Isoformen und/oder deren Genloci und/oder deren Transkripten und/oder Fragmenten mit einer Länge von mindestens 5 Nucleotiden davon, wobei die Polynucleotide gemäß folgender Tabelle definiert sind:

Polynucleotid	Transkriptvariante/ <i>cis</i> -regulatorische Sequenzen	Accession Number	SEQ ID
M2	M2_1	NM_001031700	1
	M2_2	NM_016613	2
	M2_3	NM_001128424	3
M4	M4_1	NM_203330	4
	M4_2	NM_000611	5
	M4_3	NM_203329	6
	M4_4	NM_203331	7
	M4_5	NM_001127223	8

	M4_6	NM_001127225	9
	M4_7	NM_001127226	10
	M4_8	NM_001127227	11
M6	M6_1	NM_001831	12
	M6_2	NM_203339	13
M7	M7_1	NM_031311	14
	M7_2	NM_019029	15
M9	M9	NM_006682	16
M10	M10	NM_033554	17
M15	M15_1	NM_003580	18
	M15_2	NM_001144772	19
M3	M3_A	NM_001123041	20
	M3_B	NM_001123396	21
M8	M8	NM_025209	22
	M8_cis	AI807985	23
M12	M12	NM_002185	24
	M12_cis	DB155561	25
M13	M13	NM_001080394	26
M16	M16	NM_003268	27
M17	M17	NM_182491	28

noch wenigstens ein weiterer Marker verwendet wird, welcher ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: klinischen Laborparametern, insbesondere Procalcitonin (PCT), C-reaktives Protein (CRP); Leukocytenzahl; Cytokinen; Interleukinen und genetischen, transkriptomischen und proteomischen Markern.

16. Primer zur Durchführung des Verfahrens gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei der Primer gemäß folgender Tabelle ausgewählt ist:

Marker und Referenzgene	Primer für quantitative PCR/resultierende Amplikon	SEQ ID
M2	M2-fw	38
	M2-rev	39
	M2-Amplikon	40
M4	M4-fw	41
	M4-rev	42
	M4-Amplikon	43
M6	M6-fw	44
	M6-rev	45
	M6-Amplikon	46
M7	M7-fw	47
	M7-rev	48

	M7-Amplikon	49
M9	M9-fw	50
	M9-rev	51
	M9-Amplikon	52
M10	M10-fw	53
	M10-rev	54
	M10-Amplikon	55
M15	M15-fw	56
	M15-rev	57
	M15-Amplikon	58
M3	M3-fw	59
	M3-rev	60
	M3-Amplikon	61
M8	M8-fw	62
	M8-rev	63
	M8-Amplikon	64
M12	M12-fw	65
	M12-rev	66
	M12-Amplikon	67
M13	M13-fw	68
	M13-rev	69
	M13-Amplikon	70
M16	M16-fw	71
	M16-rev	72
	M16-Amplikon	73
M17	M17-fw	74
	M17-rev	75
	M17-Amplikon	76
R1	R1-fw	77
	R1-rev	78
	R1-Amplikon	79
R2	R2-fw	80
	R2-rev	81
	R2-Amplikon	82
R3	R3-fw	83
	R3-rev	84
	R3-Amplikon	85

17. Kit zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 4, enthaltend mindestens einen Multigenbiomarker, welcher eine Mehrzahl von Polynukleotidsequenzen umfasst, die ausgewählt werden aus der Gruppe, bestehend aus: M2, M3, M4, M6, M7, M8, M9, M10, M12, M13, M15, M16 und M17 und/oder deren Isoformen und/oder deren Genloci und/oder deren

Transkripten und/oder Fragmenten mit einer Länge von mindestens 5 Nucleotiden davon, wobei die Polynucleotide gemäß folgender Tabelle definiert sind:

Marker und Referenzgene	Transkriptvariante/ <i>cis</i> -regulatorische Sequenzen	Accession Number	SEQ ID
M2	M2_1	NM_001031700	1
	M2_2	NM_016613	2
	M2_3	NM_001128424	3
M4	M4_1	NM_203330	4
	M4_2	NM_000611	5
	M4_3	NM_203329	6
	M4_4	NM_203331	7
	M4_5	NM_001127223	8
	M4_6	NM_001127225	9
	M4_7	NM_001127226	10
	M4_8	NM_001127227	11
M6	M6_1	NM_001831	12
	M6_2	NM_203339	13
M7	M7_1	NM_031311	14
	M7_2	NM_019029	15
M9	M9	NM_006682	16
M10	M10	NM_033554	17
M15	M15_1	NM_003580	18
	M15_2	NM_001144772	19
M3	M3_A	NM_001123041	20
	M3_B	NM_001123396	21
M8	M8	NM_025209	22
	M8_ <i>cis</i>	A1807985	23
M12	M12	NM_002185	24
	M12_ <i>cis</i>	DB155561	25
M13	M13	NM_001080394	26
M16	M16	NM_003268	27
M17	M17	NM_182491	28

wobei der Multigenbiomarker spezifisch für einen pathophysiologischen Zustand eines Patienten ist und solche Zustände einschließt, die ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus: SIRS, Sepsis und deren Schweregraden; sepsisähnlichen Zuständen; septischem Schock; Bakteriämie, infektiösem/nicht-infektiösem Multiorganversagen; Früherkennung dieser Zustände; Fokuskontrolle; Kontrolle von chirurgischen Sanierungsmaßnahmen des Infektionsfokus; Responder/non-Responder

für eine bestimmte Therapie; Therapiekontrolle; Unterscheidung zwischen infektiöser und nicht- infektiöser Genese bei systemischen Reaktionen des Organismus, wie z.B. SIRS, Sepsis, postoperative Komplikationen, chronischem und/oder akuter Organdysfunktion, Schock-Reaktion, Entzündungsreaktion und/oder Trauma.

18. Kit nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass die Polynukleotidsequenzen auch Genloci, sense und/oder antisense Stränge von prä-mRNA und/oder mRNA, small RNA, insbesondere scRNA, snoRNA, micro RNA, siRNA, dsRNA , ncRNA oder transposable Elemente umfassen.
19. Kit nach Anspruch 17 oder 18, dadurch gekennzeichnet, dass der er wenigstens ein Referenzgen enthält, welches ausgewählt ist, aus der Gruppe bestehend aus: R1, R2 und R3 und/oder deren Isoformen und/oder deren Genloci und/oder deren Transkripten und/oder Fragmenten mit einer Länge von mindestens 5 Nucleotiden davon, wobei die Referenzgene gemäß folgender Tabelle definiert sind:

Referenzgene	Transkriptvariante/cis-regulatorische Sequenzen	Accession Number	SEQ ID
R1	R1_A	NM_001228	29
	R1_B	NM_033355	30
	R1_C	NM_033356	31
	R1_E	NM_033358	32
	R1_F	NM_001080124	33
	R1_G	NM_001080125	34
R2	R2_1	NM_002209	35
	R2_2	NM_001114380	36
R3	R3	NM_003082	37

ROC Kurve (Testdaten, 7 Marker)

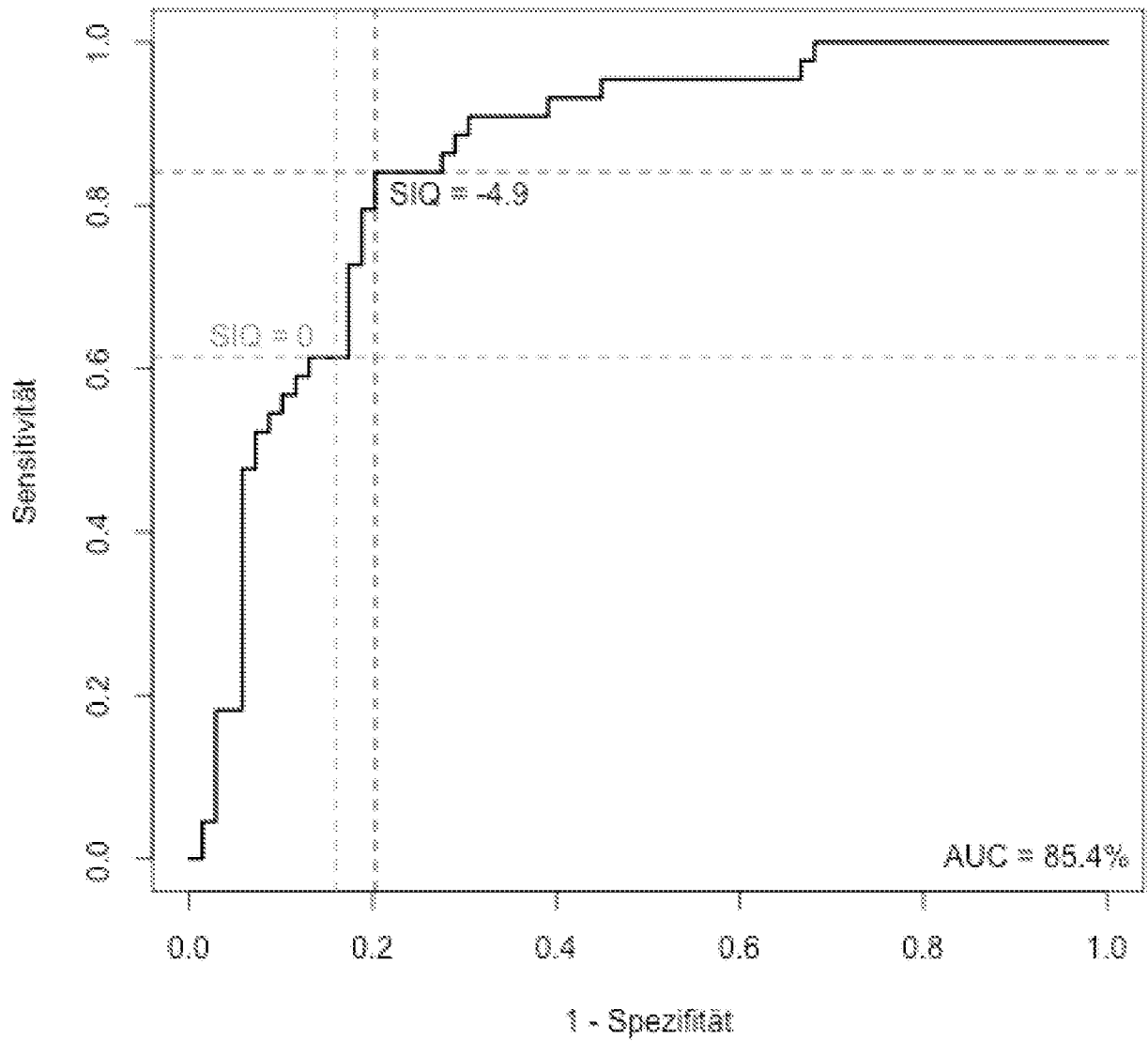
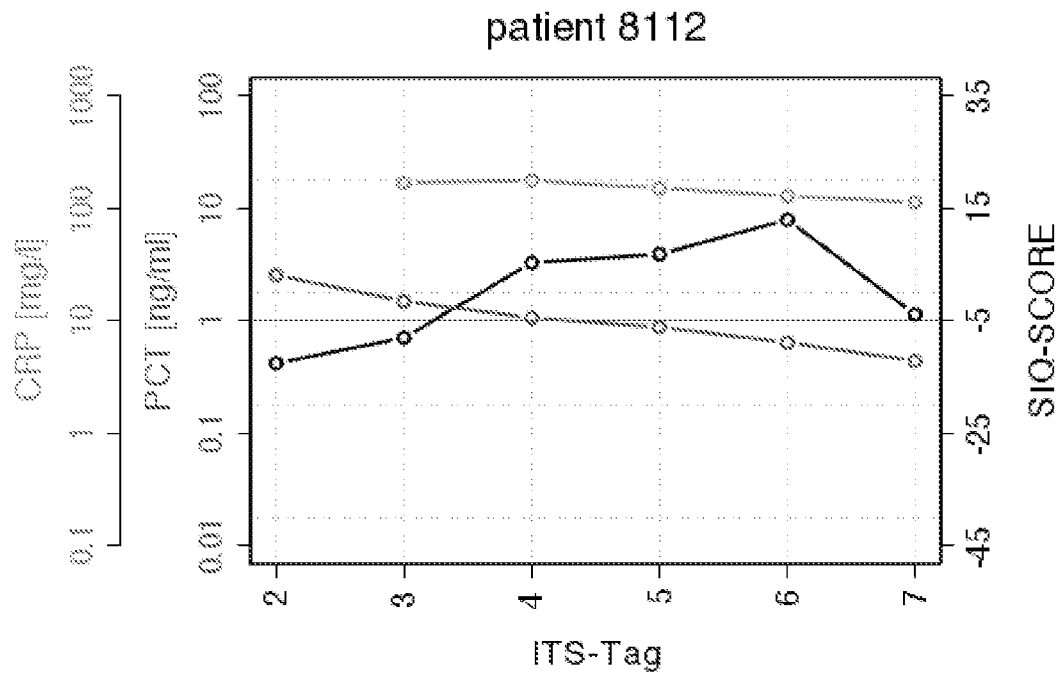


Fig. 1

(A)



(B)

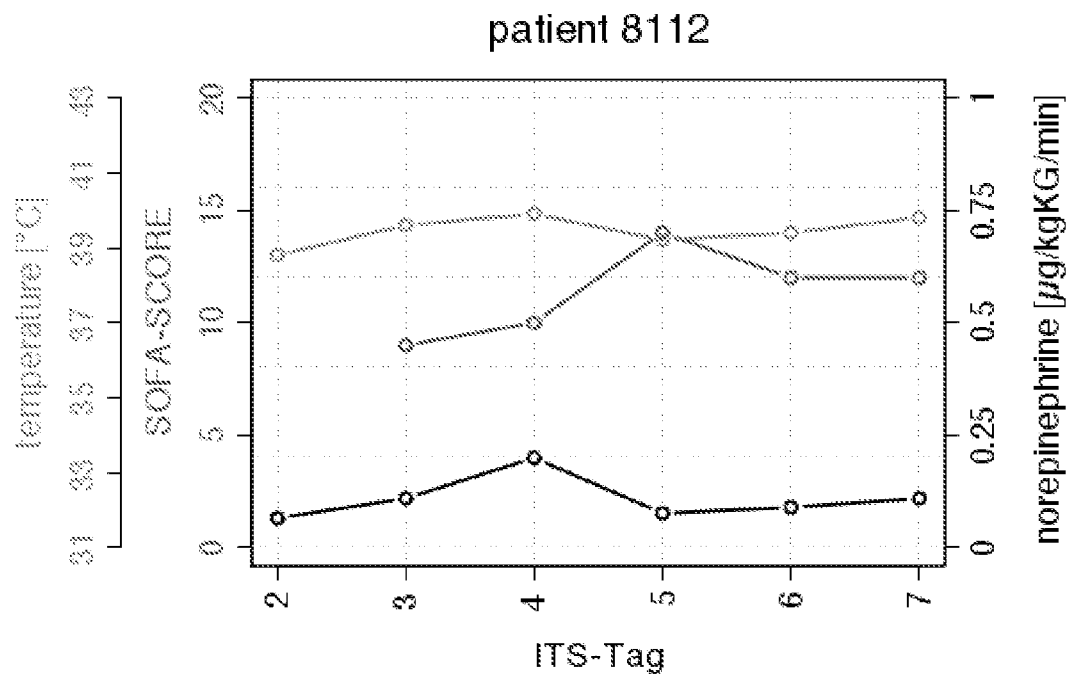
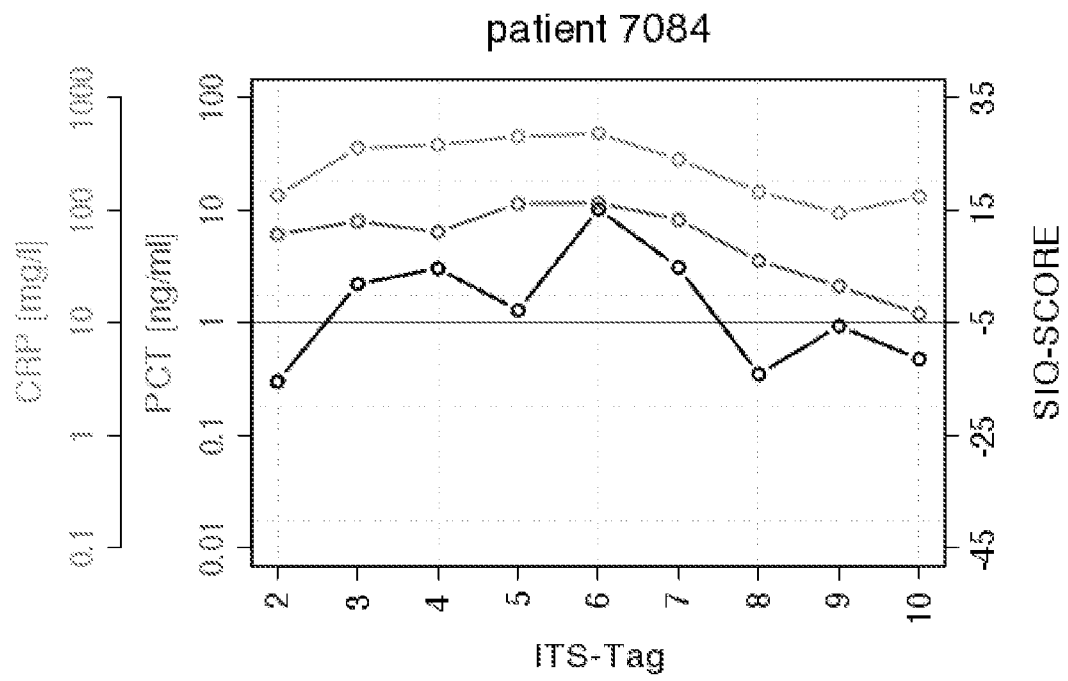


Fig. 2

(A)



(B)

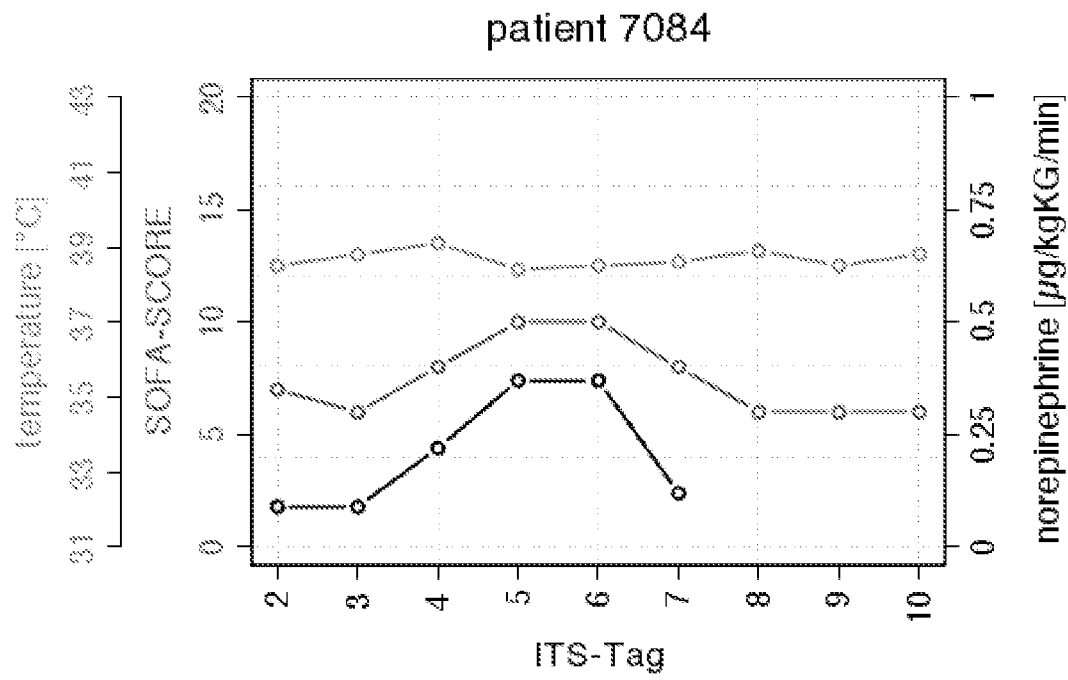


Fig. 3

ROC Kurve (Testdaten)

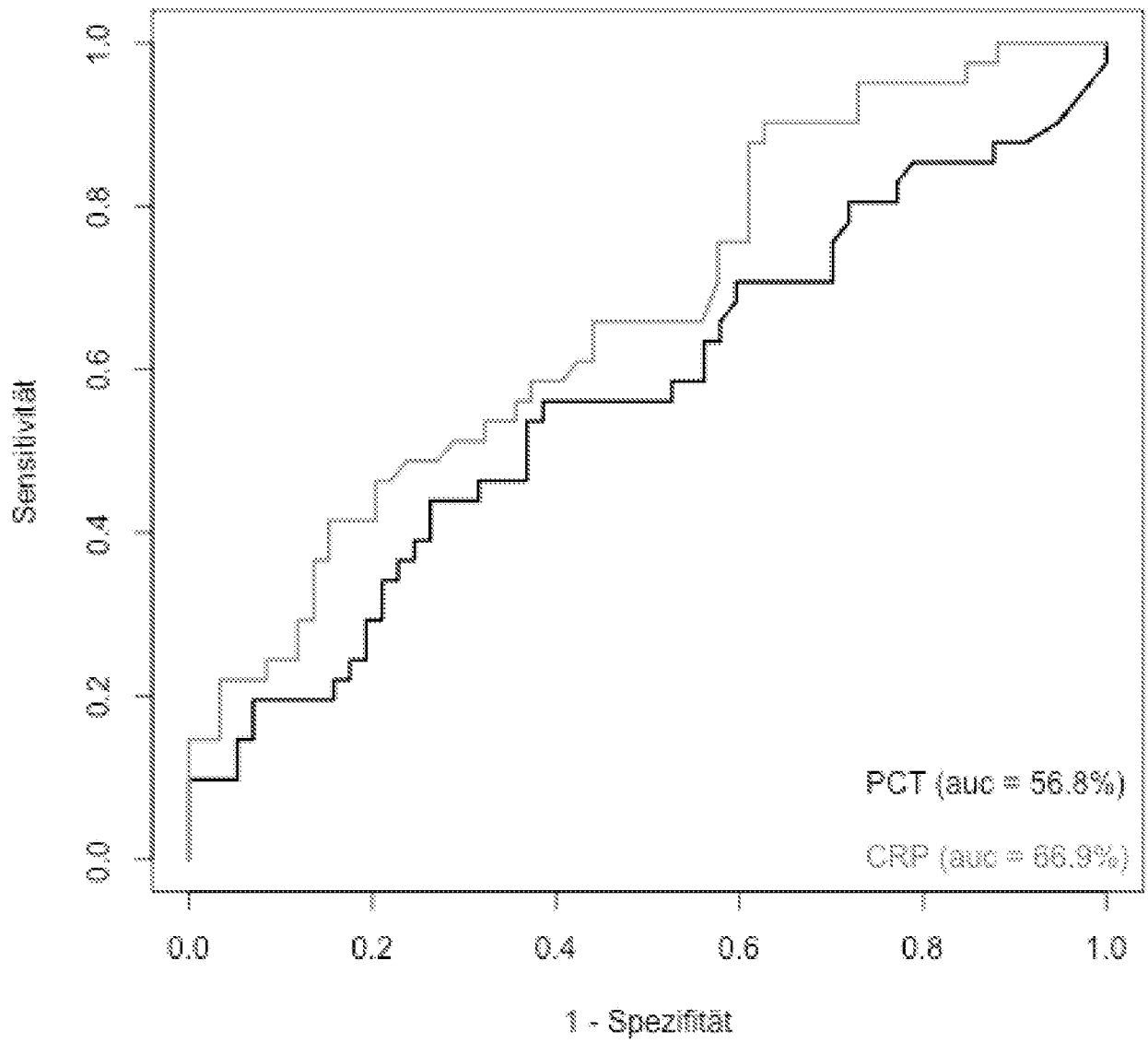


Fig. 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2010/063659

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12Q1/68
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2009/018962 A1 (SIRS LAB GMBH [DE]; RUSSWUM STEFAN [DE]) 12 February 2009 (2009-02-12)	1,3-7, 9-14,17, 18
Y	page 28 - page 33; claims 1-26; tables 1-5; sequence 1 the whole document	2,8,15, 16,19

X	WO 2004/087949 A2 (SIRS LAB GMBH [DE]; RUSSWURM STEFAN [DE]; REINHART KONRAD [DE]; SALUZ) 14 October 2004 (2004-10-14)	5,7, 10-14
Y	claims 1-29; sequences 2492,6390,6421 the whole document	1-4,6,8, 9,15-19

X	WO 2005/106020 A1 (SIRS LAB GMBH [DE]; RUSSWURM STEFAN [DE]; DEIGNER HANS-PETER [DE]) 10 November 2005 (2005-11-10)	5,7, 10-14
Y	claims 1--24; sequences 108,168 the whole document	1-4,6,8, 9,15-19

	-/--	

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 February 2011

Date of mailing of the international search report

03/03/2011

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Barz, Wolfgang

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2010/063659

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2008/107114 A2 (SIRS LAB GMBH [DE]; RUSSWURM STEFAN [DE]; SALUZ HANS PETER [DE]; DEIGN) 12 September 2008 (2008-09-12)	16
Y	the whole document	2,19
X	----- DATABASE Geneseq [Online] 28 December 2007 (2007-12-28), "Viral regulatory miRNA SEQ ID NO 83277.", XP002569108, retrieved from EBI accession no. GSN:AJI30956 Database accession no. AJI30956 * abstract; compound	16
X	& WO 2004/048511 A2 (ROSETTA GENOMICS LTD [IL]; BENTWICH ITZHAK [IL]) 10 June 2004 (2004-06-10) sequence 83277	16
Y	----- DATABASE Geneseq [Online] 5 May 2005 (2005-05-05), "DNA encoding a PRO polypeptide, SEQ ID NO 4336.", XP002569109, retrieved from EBI accession no. GSN:ADY18530 Database accession no. ADY18530 the whole document	17-19
Y	----- DATABASE EMBL [Online] 22 October 2005 (2005-10-22), "Homo sapiens cDNA clone THYMU3033922, 5' end, mRNA sequence.", XP002569110, retrieved from EBI accession no. EMBL:DB155561 Database accession no. DB155561 the whole document	17-19
Y	----- DATABASE Geneseq [Online] 2 April 2009 (2009-04-02), "Human immune reaction-related CD59 DNA - SEQ ID 1.", XP002569111, retrieved from EBI accession no. GSN:AWF59723 Database accession no. AWF59723 the whole document & DE 10 2007 036678 A1 (SIRS LAB GMBH [DE]) 5 February 2009 (2009-02-05)	17-19
----- -/--		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2010/063659

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	<p>WO 2009/115478 A2 (SIRS LAB GMBH [DE]; RUSSWURM STEFAN [DE]) 24 September 2009 (2009-09-24) claims 1-15; table 32; sequences 572,695,696,706,710,718,721,722 & DATABASE EMBL [Online]</p> <p>16 October 2009 (2009-10-16), "Sequence 710 from Patent W02009115478.", retrieved from EBI accession no. EMBL:HC023706 Database accession no. HC023706 compound</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2010/063659

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

1-19 (in parts)

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

The International Searching Authority has found that the international application contains multiple (groups of) inventions, as follows:

1. Claims 1-19 (in part)

Use of at least one polynucleotide M2 for producing an assay in order to evaluate the presence of a pathophysiological state in a patient, and/or for detecting the severity and/or the course of a pathophysiological state.

Use of at least three polynucleotides selected from the group consisting of: M2, M3, M4, M6, M7, M8, M9, M10, M12, M13, M15, M16 and M17, one of the polynucleotides being M2, for forming at least one multigene biomarker for producing a multiplex assay as an aid for the in vitro detection and/or early detection and/or differentiation and/or sequence observation and/or evaluation of pathophysiological states of a patient, wherein the pathophysiological state is selected from the group comprising: SIRS, sepsis, ... and/or trauma.

Method for the in vitro detection and/or early detection and/or differentiation and/or sequence observation and/or evaluation of pathophysiological states, wherein the pathophysiological state is selected from the group comprising: SIRS, sepsis, ... and/or trauma; comprising the determination of gene activities by means of a plurality of at least three polynucleotides selected from the group consisting of: M2, M3, M4, M6, M7, M8, M9, M10, M12, M13, M15, M16 and M17, one of the polynucleotides being M2, for forming at least one multigene biomarker which is characteristic for the detection and/or differentiation and/or the course of pathophysiological states of a patient; determination of gene activities of at least one internal reference gene, to which the defined gene activities are related, in particular normalized; forming a value from the individual defined gene activities of the multigene biomarker, which indicates the pathophysiological state.

Primer suitable for carrying out the method according to one of the claims 1 to 4, wherein the primer is selected from SEQ ID NOs. 38-40 (M2).

Kit for carrying out the method according to one of the claims 1 to 4, containing at least one multigene biomarker which comprises a plurality of polynucleotide sequences which are selected from the group consisting of: M2, M3, M4, M6, M7, M8, M9, M10, M12, M13, M15, M16 and M17, one of the polynucleotides being M2.

2-13. Claims 1-19 (in part)

Idem invention 1, but with polynucleotide M3, M4, M6, M7, M8, M9, M10, M12, M13, M15, M16 or M17 (instead of M2).

14. Claim 16 (in part)

Primer suitable for carrying out the method according to one of the claims 1 to 4, the primer being selected from SEQ ID NOs. 77-79 (R1).

15. Claim 16 (in part)

Primer suitable for carrying out the method according to one of the claims 1 to 4, the primer being selected from SEQ ID NOs. 80-82 (R2).

16. Claim 16 (in part)

Primer suitable for carrying out the method according to one of the claims 1 to 4, the primer being selected from SEQ ID NOs. 83-85 (R3).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2010/063659

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:

a. (means)

on paper

in electronic form

b. (time)

in the international application as filed

together with the international application in electronic form

subsequently to this Authority for the purposes of search

2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2010/063659

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009018962 A1	12-02-2009	CA 2699433 A1	12-02-2009
		DE 102007036678 A1	05-02-2009
		EP 2179054 A1	28-04-2010
		JP 2010535017 T	18-11-2010
		US 2010203534 A1	12-08-2010

WO 2004087949 A2	14-10-2004	EP 1611255 A2	04-01-2006
		US 2008070235 A1	20-03-2008

WO 2005106020 A1	10-11-2005	CA 2561817 A1	10-11-2005
		DE 102004015605 A1	20-10-2005
		US 2010086909 A1	08-04-2010

WO 2008107114 A2	12-09-2008	AT 493517 T	15-01-2011
		CA 2679017 A1	12-09-2008
		DE 102007010252 A1	04-09-2008
		EP 2118315 A2	18-11-2009
		JP 2010519893 T	10-06-2010

WO 2009115478 A2	24-09-2009	CA 2718741 A1	24-09-2009
		DE 102008000715 A1	24-09-2009
		GB 2470707 A	01-12-2010

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2010/063659

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

INV. C12Q1/68

ADD.

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherhierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

C12Q

Recherhierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherhierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, WPI Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 2009/018962 A1 (SIRS LAB GMBH [DE]; RUSSWUM STEFAN [DE]) 12. Februar 2009 (2009-02-12)	1,3-7, 9-14,17, 18
Y	Seite 28 - Seite 33; Ansprüche 1-26; Tabellen 1-5; Sequenz 1 das ganze Dokument	2,8,15, 16,19

X	WO 2004/087949 A2 (SIRS LAB GMBH [DE]; RUSSWURM STEFAN [DE]; REINHART KONRAD [DE]; SALUZ) 14. Oktober 2004 (2004-10-14)	5,7, 10-14
Y	Ansprüche 1-29; Sequenzen 2492,6390,6421 das ganze Dokument	1-4,6,8, 9,15-19

X	WO 2005/106020 A1 (SIRS LAB GMBH [DE]; RUSSWURM STEFAN [DE]; DEIGNER HANS-PETER [DE]) 10. November 2005 (2005-11-10)	5,7, 10-14
Y	Ansprüche 1--24; Sequenzen 108,168 das ganze Dokument	1-4,6,8, 9,15-19

	-/--	

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

24. Februar 2011

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

03/03/2011

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Barz, Wolfgang

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2010/063659

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 2008/107114 A2 (SIRS LAB GMBH [DE]; RUSSWURM STEFAN [DE]; SALUZ HANS PETER [DE]; DEIGN) 12. September 2008 (2008-09-12)	16
Y	das ganze Dokument	2,19
X	----- DATABASE Geneseq [Online] 28. Dezember 2007 (2007-12-28), "Viral regulatory miRNA SEQ ID NO 83277.", XP002569108, gefunden im EBI accession no. GSN:AJI30956 Database accession no. AJI30956 * Zusammenfassung; Verbindung	16
X	& WO 2004/048511 A2 (ROSETTA GENOMICS LTD [IL]; BENTWICH ITZHAK [IL]) 10. Juni 2004 (2004-06-10) Sequenz 83277	16
Y	----- DATABASE Geneseq [Online] 5. Mai 2005 (2005-05-05), "DNA encoding a PRO polypeptide, SEQ ID NO 4336.", XP002569109, gefunden im EBI accession no. GSN:ADY18530 Database accession no. ADY18530 das ganze Dokument	17-19
Y	----- DATABASE EMBL [Online] 22. Oktober 2005 (2005-10-22), "Homo sapiens cDNA clone THYMU3033922, 5' end, mRNA sequence.", XP002569110, gefunden im EBI accession no. EMBL:DB155561 Database accession no. DB155561 das ganze Dokument	17-19
Y	----- DATABASE Geneseq [Online] 2. April 2009 (2009-04-02), "Human immune reaction-related CD59 DNA - SEQ ID 1.", XP002569111, gefunden im EBI accession no. GSN:AWF59723 Database accession no. AWF59723 das ganze Dokument & DE 10 2007 036678 A1 (SIRS LAB GMBH [DE]) 5. Februar 2009 (2009-02-05)	17-19
	----- -/--	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2010/063659

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X,P	<p>WO 2009/115478 A2 (SIRS LAB GMBH [DE]; RUSSWURM STEFAN [DE]) 24. September 2009 (2009-09-24) Ansprüche 1-15; Tabelle 32; Sequenzen 572,695,696,706,710,718,721,722 & DATABASE EMBL [Online]</p> <p>16. Oktober 2009 (2009-10-16), "Sequence 710 from Patent WO2009115478.", gefunden im EBI accession no. EMBL:HC023706 Database accession no. HC023706 Verbindung -----</p>	1-19

Feld Nr. II Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein internationaler Recherchenbericht erstellt:

1. Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche diese Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich

2. Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, dass eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich

3. Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefasst sind.

Feld Nr. III Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Diese Internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, dass diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1. Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.

2. Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung solcher Gebühren aufgefordert.

3. Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
1-19 (teilweise)

4. Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Dieser internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfasst:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- Der Anmelder hat die zusätzlichen Recherchegebühren unter Widerspruch entrichtet und die gegebenenfalls erforderliche Widerspruchsgebühr gezahlt.
- Die zusätzlichen Recherchegebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt, jedoch wurde die entsprechende Widerspruchsgebühr nicht innerhalb der in der Aufforderung angegebenen Frist entrichtet.
- Die Zahlung der zusätzlichen Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, dass diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: 1-19(teilweise)

Verwendung mindestens des Polynukleotids M2 zur Herstellung eines Assays zur Beurteilung, ob bei einem Patienten ein pathophysiologischer Zustand vorliegt, und/oder zur Feststellung des Schweregrades und/oder des Verlaufs eines pathophysiologischen Zustands.

Verwendung von wenigstens drei Polynukleotiden ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus: M2, M3, M4, M6, M7, M8, M9, M10, M12, M13, M15, M16 und M17, wobei eines der Polynukleotide M2 ist, zur Bildung wenigstens eines Multigenbiomarkers zur Herstellung eines Multiplex-Assays als Hilfsmittel zur in vitro Erfassung und/oder Früherkennung und/oder Unterscheidung und/oder Verlaufsbeobachtung und/oder Beurteilung von pathophysiologischen Zuständen eines Patienten, ausgewählt aus SIRS, Sepsis, ... und/oder Trauma.

Verfahren zur in vitro Erfassung und/oder Früherkennung und/oder Unterscheidung und/oder Verlaufsbeobachtung und/oder Beurteilung von pathophysiologischen Zuständen, ausgewählt aus SIRS, Sepsis, ... und/oder Trauma; umfassend die Bestimmung von Genaktivitäten mittels einer Mehrzahl von wenigstens drei Polynukleotiden, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus M2, M3, M4, M6, M7, M8, M9, M10, M12, M13, M15, M16 und M17, wobei eines der Polynukleotide M2 ist, zur Bildung wenigstens eines für die Erfassung und/oder Unterscheidung und/oder den Verlauf von pathophysiologischen Zuständen eines Patienten charakteristischen Multigenbiomarkers; Bestimmung von Genaktivitäten wenigstens eines internen Referenzgens, auf die die bestimmten Genaktivitäten bezogen, insbesondere normalisiert, werden; Bilden eines Wertes aus den einzelnen bestimmten Genaktivitäten des Multigenbiomarkers, der den pathophysiologischen Zustand anzeigt.

Primer geeignet zur Durchführung des Verfahrens gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei der Primer ausgewählt ist aus SEQ ID NOs:38-40 (M2).

Kit zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 4, enthaltend mindestens einen Multigenbiomarker, welcher eine Mehrzahl von Polynukleotidsequenzen umfasst, die ausgewählt werden aus der Gruppe, bestehend aus: M2, M3, M4, M6, M7, M8, M9, M10, M12, M13, M15, M16 und M17, wobei eines der Polynucleotide M2 ist.

2-13. Ansprüche: 1-19(teilweise)

Wie Erfindung 1, aber mit Polynukleotid M3, M4, M6, M7, M8, M9, M10, M12, M13, M15, M16 oder M17 (anstelle von M2).

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

14. Anspruch: 16(teilweise)

Primer geeignet zur Durchführung des Verfahrens gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei der Primer ausgewählt ist aus SEQ ID NOs:77-79 (R1).

15. Anspruch: 16(teilweise)

Primer geeignet zur Durchführung des Verfahrens gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei der Primer ausgewählt ist aus SEQ ID NOs:80-82 (R2).

16. Anspruch: 16(teilweise)

Primer geeignet zur Durchführung des Verfahrens gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei der Primer ausgewählt ist aus SEQ ID NOs:83-85 (R3).

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2010/063659

Feld Nr. I Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz(en) (Fortsetzung von Punkt 1 b) auf Blatt 1)

1. Hinsichtlich der **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz**, die in der internationalen Anmeldung offenbart wurde und für die beanspruchte Erfindung erforderlich ist, ist die internationale Recherche auf folgender Grundlage durchgeführt worden:
 - a. (Form)
 in Papierform
 in elektronischer Form
 - b. (Zeitpunkt)
 in der eingereichten internationalen Anmeldung
 zusammen mit der internationalen Anmeldung in elektronischer Form
 bei dieser Behörde nachträglich für die Zwecke der Recherche eingereicht wurde.
2. Wurden mehr als eine Version oder Kopie eines Sequenzprotokolls und/oder einer dazugehörigen Tabelle eingereicht, so sind zusätzlich die erforderlichen Erklärungen, dass die Information in den nachgereichten oder zusätzlichen Kopien mit der Information in der Anmeldung in der eingereichten Fassung übereinstimmt bzw. nicht über sie hinausgeht, vorgelegt worden.
3. Zusätzliche Bemerkungen:

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2010/063659

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 2009018962 A1	12-02-2009	CA 2699433 A1	12-02-2009
		DE 102007036678 A1	05-02-2009
		EP 2179054 A1	28-04-2010
		JP 2010535017 T	18-11-2010
		US 2010203534 A1	12-08-2010

WO 2004087949 A2	14-10-2004	EP 1611255 A2	04-01-2006
		US 2008070235 A1	20-03-2008

WO 2005106020 A1	10-11-2005	CA 2561817 A1	10-11-2005
		DE 102004015605 A1	20-10-2005
		US 2010086909 A1	08-04-2010

WO 2008107114 A2	12-09-2008	AT 493517 T	15-01-2011
		CA 2679017 A1	12-09-2008
		DE 102007010252 A1	04-09-2008
		EP 2118315 A2	18-11-2009
		JP 2010519893 T	10-06-2010
		US 2010184608 A1	22-07-2010

WO 2009115478 A2	24-09-2009	CA 2718741 A1	24-09-2009
		DE 102008000715 A1	24-09-2009
		GB 2470707 A	01-12-2010
