



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101076806 B

(45) 授权公告日 2012. 01. 11

(21) 申请号 200580042470. 3

(22) 申请日 2005. 12. 09

(30) 优先权数据

0426982. 5 2004. 12. 09 GB

(85) PCT申请进入国家阶段日

2007. 06. 11

(86) PCT申请的申请数据

PCT/GB2005/004755 2005. 12. 09

(87) PCT申请的公布数据

W02006/061644 EN 2006. 06. 15

(73) 专利权人 英国国防部

地址 英国威尔特郡

(72) 发明人 M·C·杰克逊 R·A·卢卡塞夫斯基

A·M·亚特斯 M·J·皮尔斯

T·J·布鲁克斯

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 刘锴 黄可峻

(51) Int. Cl.

G06F 19/18(2011. 01)

G01N 33/68(2006. 01)

C12Q 1/68(2006. 01)

(56) 对比文件

US 2003/0207278 A1, 参见摘要, 说明书
0037 部分, 图 1-3.

WO 2004/043236 A2, 2004. 05. 27, 说明书第
0014, 0026, 0042, 0052, 0057 部分, 表 1.

US 6658287 B1, 2003. 12. 02, 图 4, 6-9.

WO 00/52472 A1, 2000. 09. 08, 全文.

R. Brause et al..Neural Networks
for Sepsis Prediction - the
MEDAN-Project..Journal Fur Anesthesie und
Intensivbehandlung11 1. 2004, 11(1), 全文.

审查员 张彬

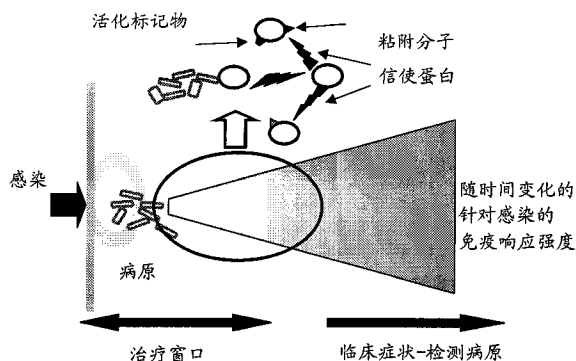
权利要求书 1 页 说明书 47 页 附图 4 页

(54) 发明名称

败血症的早期检测

(57) 摘要

本发明涉及一种检测感染早期征象尤其是鉴别最有可能发生败血症的个体的系统和方法。细胞因子和 / 或细胞活化标记物的特定组合的表达水平的测量, 可选地结合采用预测算法, 可以得到高的预测准确度。该方法适用于民用和军事环境。



1. 一种筛选血液样品以检测在临床症状和疾病发生前的 SIRS 或败血症的系统,其包括:

从所述样品获得的细胞中提取和纯化 RNA 的装置,

热循环控制装置或其它装置,以通过逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 扩增选自如下的至少 7 个细胞因子的 RNA 序列: FasL、MCP-1、TNF α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8、IL-10、INF- α 和 INF- γ ,

检测并定量所述 RT-PCR 的结果的装置,

经训练的基于计算机的神经网络,从而能够分析所述结果,和

显示装置,由此能够向操作者交流神经网络分析结论。

2. 如权利要求 1 所述的系统,其中所述神经网络是多层感知神经网络。

3. 如权利要求 1 所述的系统,其中所述神经网络产生对临床 SIRS 或败血症发生的二元是 / 否预测。

4. 如权利要求 1 所述的系统,其中至少 7 个细胞因子通过 RT-PCR 扩增。

5. 如权利要求 1 所述的系统,其中所有细胞因子通过 RT-PCR 扩增。

6. 根据权利要求 1 所述的系统,包括同时进行 RT-PCR 和 FACS 分析的装置。

7. 根据权利要求 1 所述的系统,进一步包括从标准临床测量结果获取和分析数据的装置。

8. 权利要求 1 所述的系统在制备用于诊断在临床症状和疾病发生前的 SIRS 或败血症的诊断装置的应用。

败血症的早期检测

[0001] 背景

[0002] 尽管严重感染和败血症的诊断、治疗以及支持疗法有很大的改进,但是它们仍然是很重要的死因,经常导致在急性发病中生存下来的人们产生长期的体弱或致残。尽管在其它健康成人中突然、极其严重的感染相对较为稀少,但是在免疫缺陷的个体、重症监护的重症患者、烧伤病人和年幼的儿童中,其风险增加。在部分病例中,表面上能够治疗的感染导致败血症的发生;表现为进行性循环衰竭的对感染不规律、不适当的应答导致肾衰竭和呼吸衰竭、凝血异常、严重并且无应答的低血压,并使得大约 30% 的病例死亡。在北美人群中败血症的发病率每年为人群的大约 0.3% (大约 750000 例),在老年人中死亡率增加至 40%,在最严重的病例即脓毒性休克中,死亡率增加至 50% (Angus 等,2001,Crit Care Med 29:1303-1310)。

[0003] 在感染了感染性微生物后,机体产生经典的炎症反应,首先为激活先天的非特异性免疫应答,然后为特异性的、获得性免疫应答。在细菌感染的情况中,在发展成为特异性的、抗原引发的免疫应答的很早之前,通过检测到细菌毒素,在发展到特异性的、抗原启动的免疫应答的很长一段时间以前,菌血症导致快速的发热 (30-90 分钟以内),并释放炎症细胞因子,例如白介素 1 (IL-1) 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)。

[0004] 在感染导致的革兰氏阴性菌血症中,例如伤寒、鼠疫、兔热病和布鲁氏菌病,或者在革兰氏阴性消化道微生物例如大肠杆菌、克氏杆菌、变形杆菌或假单胞菌导致的腹膜炎中,大部分是对来自细菌细胞壁的脂多糖 (LPS) 和其它组分的响应。循环 LPS,尤其是其成分脂质 A,激发了广泛的系统反应。其有可能与肝细胞的 Kupffer 细胞接触,首先导致 IL-1 的释放,并导致发热。循环系统中单核细胞和巨噬细胞的激活导致细胞因子的释放,例如 IL-6、IL-12、IL-15、IL-18、TNF- α 、巨噬细胞移动抑制因子 (MIF)、以及细胞因子类分子,例如高迁移群 B1 (HMGB1),其依次激活嗜中性粒细胞、淋巴细胞和血管内皮上调细胞粘附分子,并诱导前列腺素、氮氧化物合成酶、和急性期蛋白。血小板活化因子 (PAF)、前列腺素、白细胞三烯和凝栓质降解物的释放激活了血管内皮,调节血管紧张度,并激活外源性凝血级联。这些响应的不当调节导致并发败血症和脓毒性休克,即导致低血压的外周血管舒张,以及导致血栓形成和血管内凝血的异常凝血和血纤维蛋白溶解 (Cohen,2002,Nature 420:885-891)。

[0005] LPS 主要通过结合至血清 LPS-结合蛋白 (LBP) 以及单核细胞和巨噬细胞表达的 CD14 而作用于细胞。一旦结合 LPS 和 LBP 的复合物,CD14 与 co 受体、Toll 类受体 (TLR-4) 和另一组分 MD-2 一起作用,形成信号复合物,并启动巨噬细胞的激活和细胞因子的释放 (Palsson-McDermott & O'Neill,2004,Immunology 113:153-162)。Toll 类受体家族是一组细胞表面受体,涉及一类作为先天免疫系统激活剂的细菌和真菌配体,包括革兰氏阳性细胞壁结构、鞭毛蛋白和表征细菌 DNA 的 CpG 重复单元。

[0006] 在感染革兰氏阳性病原的情况下,脓毒性休克伴有外毒素的生成。例如,中毒性休克综合症,通常影响其它健康个体的脓毒性休克的一种特殊急性形式,是由于感染了金黄色葡萄球菌的特定株,其产生了被称为中毒性休克综合症毒素-1 (TSST-1) 的外毒素。一个

类似的综合症由特定的化脓性链球菌 A 菌株的入侵感染引起的,其通常伴有链球菌化脓性肠毒素 A (SPE-A)。某些革兰氏阳性外毒素(包括 TSST-1)被认为是主要由于其超抗原性能而起作用。通过将抗原呈递细胞上的 MHC II 型分子与特定类型的 T 细胞受体交联,超抗原能够非特异性地刺激 T 淋巴细胞。通常, T 细胞受体 (TCR)– 主要组织相容性复合物 (MHC) 的交互作用是高度特异的,只有携带特异性识别 MHC 呈递的短抗原衍生肽的 TCR 的 T 细胞才能够结合并被激活,以确保抗原特异性 T 细胞响应。超抗原规避了这种导致大规模的、不适当的 T 细胞激活的机制。然而, SPE-A 并不是有效的超抗原,其应当涉及某些其它机制。

[0007] 应当注意的是,临床败血症还可能来自某些病毒(例如,委内瑞拉马脑脊髓炎病毒, VEEV) 和真菌的感染,在此类情况中,可能涉及其它的机制。

[0008] 尽可能早地检测潜在严重感染的能力,尤其是在易感个体中预测败血症的发生显然是非常有利的。多年来,在尝试建立明确的确定临床疾病单元的标准方面投入了大量的努力,例如休克、败血症、脓毒性休克、中毒性休克和系统炎症反应综合症 (SIRS)。类似地,基于所测量的一系列临床、化学、生化、免疫学和细胞学参数,以及大量的评分系统、所提出的不同的预测成功性和准确性,在设计可靠的预测模型方面进行了许多尝试。

[0009] 根据美国胸内科医生学会 (ACCP) 和重症监护医学学会 (SCCM) 的 1991 年会议达成的共识,当患者具有以下一个以上症状时被认为具有 SIRS: 体温高于 38℃ 或低于 36℃, 心率高于 90/min, 涉及呼吸速率高于 20/min 或 PaCO₂ 低于 32mmHg 的换气过度, 白细胞计数高于 12000 个 /ul 或少于 4000 个 /ul (Bone 等, 1992, Crit Care Med 20 :864-874)。

[0010] “败血症”被定义为感染引起的 SIRS。被接受的是,可以在没有感染的情况下例如烧伤、胰腺炎和其它疾病状态中发生 SIRS。“感染”被定义为由致病或潜在致病的微生物侵入通常无菌的组织、液体或体腔而引发的病理过程。

[0011] “严重败血症”被定义为并发器官衰竭的败血症,其由 Marshall 等 (1995, Crit Care Med 23 :1638-1652) 或 Sequential Organ Failure Assessment (器官顺序衰竭评价, SOFA) 得分 (Ferreira 等, 2002, JAMA 286 :1754-1758) 来确定。

[0012] “脓毒性休克”是指(成人中)败血症加上急性循环衰竭状态,其特征为其它原因不能解释的持续性动脉低血压。

[0013] 为了评价重症监护患者中败血症的严重性,并进行合理的治疗规划,对败血症研究出了或者从更加通用的模型中改编得到了大量的临床严重程度模型。首先被广泛接受的系统为 Acute Physiology and Chronic Health Evaluation 得分(急性生理和慢性健康评价得分, APACHE, 以及其修定版 APACHE II 和 III) (Knaus 等, 1985, Crit Care Med 13 :818-829; Knaus 等, 1991, Chest 100 :1619-1636), 和被广泛采用的通用预测模型 Mortality Prediction Model (死亡率预测模型, MPM) (Lemeshow 等, 1993, JAMA 270 :2957-2963), 以及 Simplified Acute Physiology (SAPS) 得分(简化的急性生理得分) (Le Gall 等, 1984, Crit Care Med 12 :975-977)。对于更加严重的状况,包括败血症,研究出了更加专业的模型,例如 Multiple Organ Dysfunction Score (多器官障碍得分, MODS) (Marshall 等, 1995, Crit Care Med 23 :1638-1652), Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) 得分(器官顺序衰竭评价得分) (Ferreira 等, 2002, JAMA 286 :1754-1758) 和 Logistical Organ Dysfunction Score (LODS) (Logistical 器官障碍得分, Le Gall 等, 1996, JAMA 276 :802-810)。最近,提出了一个专门的模型 PIR0 (Levy 等, 2003,

Intensive Care Med 29 :530-538)。所有这些模型采用了广泛的普通和专业临床手段的组合,试图得到反映患者状况严重程度和可能结果的有用评分。

[0014] 除了上述的标准预测模型之外,对败血症和大量特异的血清标记物之间的关联进行了深入的研究,其目的是研究出特异性的诊断和预测检测,其中有:

[0015] C 反应蛋白 (CRP) 是来源于肝的一种血清急性期蛋白,其是公知的非特异性炎症标记物。最近 (Toh 等,2003,Intensive Care Med 29 :55-61),被称为脂蛋白复合 C- 反应蛋白 (LCCRP) 的依赖于钙的 CRP 和极低密度脂蛋白 (VLDL) 的复合物显示在败血症中涉及影响凝血机制。尤其是,称为活化部分凝血活酶时间的常见化验在败血症病例中显现出特定的模式,其已经被提出作为快速诊断检测的基础。

[0016] $\text{TNF-}\alpha$ 和 IL-1 是长久以来都知晓的在败血症中升高的原型急性炎症细胞因子 (Damas 等,1989, Critical Care Med 17 :975-978),已经报道其是成人呼吸窘迫综合症的器官衰竭中的有用预测物,上述综合症是败血症的一个严重并发症 (Meduni 等,1995, Chest 107 :1062-1073)。

[0017] 已经提出将活性补体产物 C3 (C3a) 和 IL-6 作为对宿主对微生物入侵响应的有用指示物,优于发热和白细胞计数 (Groeneveld 等,2001, Clin Diagn Lab Immunol 8 : 1189-1195)。在同一研究中,发现分泌型磷脂酶 A_2 并不是很可靠的标记物。

[0018] 前降钙素是降钙素的前肽前体,知道的是,其血清浓度响应于 LPS 而升高,并与 IL-6 和 $\text{TNF-}\alpha$ 水平相关。对其作为败血症预测物已经进行了评估 (AI-Nawas 等,1996, Eur J Med Res 1 :331-333)。采用 0.1ng/ml 为阈值,其正确地鉴定出 39% 的败血症患者。然而,其他报道提示,其没有采用系列 CRP 测定可靠 (Neely 等,2004, J Burn Care Rehab 25 : 76-80),但是其优于 IL-6 或 IL-8 (Harbarth 等, Am J Resp Crit Care Med 164 :396-402)。

[0019] 白细胞激活标记物的嗜中性粒细胞的表面表达的改变 (例如 CD11b, CD31, CD35, L- 选择蛋白, CD16) 已经作为 SIRS 的标记物,并被发现与 IL-6 和接下来的器官衰竭的发生相关 (Rosenbloom 等,1995, JAMA 274 :58-65)。类似地,还检查了血小板表面抗原的表达例如 CD63, CD62P, CD36 和 CD31,但是没有建立可靠的预测模型。

[0020] 最后,单核细胞 HLA-DR 表达的下调显示为败血症预后较差的预测物,其可能指示单核细胞的去活化,损害了 $\text{TNF-}\alpha$ 的生成。用 IFN- γ 进行治疗显示在所述病例中是有利的 (Docke 等,1997, Nature Med 3 :678-681)。

[0021] 然而,尽管这些标记物中的多个与败血症相关,某些指示了状况的严重程度,但是仍然没有一个标记物或标记物的组合显示作为可靠的诊断检测,更不用说作为败血症发展的预测物。2001 年国际败血症定义会议 (2001 International Sepsis Definition Conference) 得出结论:“采用生物标记物以诊断败血症是不成熟的”(Levy 等,2003, Intensive Care Med 29 :530-538)。

[0022] 从随着时间变化的复杂的变量组中提取可靠的诊断模式和可靠的预测指示物要求非常复杂的分析方法,所述变量包括传统的临床观察资料,临床化学,生化、免疫和细胞学数据。对于医学诊断应用采用专家系统和人工智能,包括神经网络已经发展了一定时间 (Place 等,1995, Clinical Biochemistry 28 :373-389 ;Lisboa,2002, Neural Networks 15 : 11-39)。通过采用多元 logistic 回归和采用 APACHE 得分以及上述的 1991 ACCP/SCCM SIRS 标准的神经网络模型 (Bone 等,1992, CritCare Med 20 :864-874),已经研究出了专门的系

统以试图预测败血症患者的生存 (Flanagan 等,1996, Clinical Performance & Quality HealthCare 4 :96-103)。所述研究提示,尽管两种方法都可以给出良好的预测结果,但是神经网络系统对预选择的阈值不是很敏感 (Rosenberg 对大量研究的结果进行了综述, 2002, Curr Opin Crit Care 8 :321-330)。Brause 等 (2004, Journal fur Anesthesie und Intesivbehandlung 11 :40-43) 提供了用于预测败血症的神经网络模型的例子。该模型 (MEDAN) 分析了一系列的标准临床手段,并将其结果与采用 APACHE II、SOFA、SAPS II 和 MODS 模型的结果比较。该研究得出以下结论,在可利用的标记物中,信息量最丰富的是收缩压和舒张压以及血小板计数。

[0023] 神经网络为能够确定复杂数据系统的模式的非线性函数。其通过采用大量的数学函数来实现,从而使所述网络能够在噪声数据集中确定结构。其原因是,来自一个系统的数据基于数据内变量之间的关系可以产生模式。如果在已知的“训练”期,神经网络看见足够多的所述数据点的例子,则其能够“学习”该结构,然而在以后的数据点或测试数据中确定这些模式。这样,神经网络通过对已经看到的数据内存在的模式进行建模,能够预测或对未来例子进行分类。然后通过所述网络正确对测试数据进行预测或分类的能力,对该网络的性能进行评估。所述神经网络的平行处理能力依赖于其处理元素的结构,所述结构根据生物神经元的模式安排成相互作用。通过连接权重调节一个或多个输入,以改变所述处理元素内的刺激水平。所述处理元素的输出与其激活水平有关,该输出可以是非线性或不连续的。因此,神经网络的训练包括根据元素之间的转移函数、互联结构的细节以及该系统遵循的学习规则调整互连权重 (Place 等,1995, Clinical Biochemistry 28 :373-389)。所述系统已经被应用到大量的临床情况中,包括创伤患者的健康结局模型 (Marble & Healy(1999)Art Intell Med 15 :299-307)。

[0024] Warner 等 (1996,Ann Clin Lab Sci 26 :471-479) 描述了一预测败血症结局的多参数模型,其采用测量“脓毒性休克因子”(患者在收治时是否具有脓毒性休克症状,其看上去比较简单)、IL-6、可溶性 IL-6 受体 (通过酶联免疫吸附试验测量) 以及 APACHE II 得分作为多层、前馈神经网络模型的四输入算法的组分。然而,该系统对于仍然没有临床表现的个体来说是非预测性的,而且有疑义的是,通过细胞因子例如 IL-6 的时间血清水平的升高,如果不是结果的话,其诊断在临床上是非常明显的。

[0025] Dybowski 等 (1996, Lancet 347 :1146-1150) 采用分类和回归树 (CART, Classification and Regression Tree) 从 157 个可能的败血症预测规则中选择输入,然而采用运行遗传算法的神经网络以选择预测标记物的最佳组合。其包括许多常规的临床值和代表指示物,而不是血清或细胞表面标记物。然而,存在的问题是已经明确诊断败血症而且已经非常严重的患者的预后。

[0026] 该遗传算法方法的进一步改进涉及采用人工免疫系统 (Artificial Immune Systems),所述系统的一个版本是人工免疫识别系统 (AIRS, Artificial Immune Recognition System) (Timmis 等, An overview of artificial immune system. In : Paton, Bolouri, Holcombe, Parish 和 Tateson (eds.) “Computation in cells and tissues : Perspectives and Tools for Thought”, Natural Computation Series, 51-86 页, Springer, 2004 ; Timmis (L. N. De Castro 和 J. Timmis, Artificial Immune Systems : A new computational intelligence approach. Springer-Verlag, 2002), 其是受到应用到人

工智能的生物免疫系统的克隆选择和亲和成熟过程的激发而改编的系统。

[0027] 从免疫学上说, AIRS 受到免疫系统的克隆选择理论的激发 (F. Burnett. The clonal selection theory of acquired immunity. Cambridge University Press, 1959)。克隆选择理论试图解释如何通过匹配、克隆、突变和选择的过程制造出能够确定感染物的抗体。AIRS 利用该过程, 通过匹配、克隆和突变的过程, 涉及一组能够用作未见数据项目的分类器的存储检测器。与其他免疫激发的方法不同, 例如负选择, AIRS 专门设计用于分类, 尤其是一次就完成的监督学习。

[0028] 美国专利申请 2002/0052557 描述了一种基于患者心率变化预测大量灾难性疾病发生的方法。再次, 在对所述数据进行建模和分析的可能方法中包括神经网络。

[0029] 国际专利申请 W000/52472 描述了一用于小儿的快速检测方法, 其基于血清或嗜中性粒细胞表面的 CD11b 或“CD11b 复合物” (Mac-1, CR3) 水平。该方法仅仅采用一种标记物, 该标记物是一种有争议的、响应于炎症的嗜中性粒细胞活化的公知标记物。

[0030] 分析所述复杂数据集的另一种方法是采用复杂的统计分析方法, 例如 logistic 回归, 所述复杂数据集的数据通常是定性和离散的, 而不是定量和连续的。尽管采用定性的二元因变量的 Logistic 回归就选择显著变量而言并不能够充分地辨别, 但是可以采用多变量方法。多元 logistic 回归模型和神经网络的输出均是连续的变量, 但是神经网络模型计算的似然性通常落在一个端点或另一个端点, 很少有值位于中间范围。在临床中, 这通常是有帮助的, 能够给出更加明确的结果 (Flanagan 等, 1996, Clinical Performance & Quality Health Care 4:96-103)。

[0031] 检测感染和 / 或败血症的最早征兆的能力就尽可能早地进行治疗而言具有显然的优势。状况严重程度和如果不治疗的可能结局的指示告知了关于治疗选择方案的结果。在脆弱的医院人群例如重症监护、烧伤或者免疫缺陷的人群, 以及在发生严重感染和之后发生败血症的风险升高的其它人群中, 这是非常重要的。对暴露的个体的最早期征兆进行检测的快速和可靠的手段将是有利的, 在战场和平民区中采用或怀疑使用生物武器就是一个例子。

[0032] 本发明的描述

[0033] 感染后, 免疫系统的细胞通过激活识别和对病原产生应答。其导致不同信使蛋白的生成 (例如细胞因子和化学因子 (chemokine)), 以及细胞表面活化标记物和粘附因子的表达 (附图 1)。这些的生成有利于细胞之间的通信, 使得针对某一特定因素产生协同的免疫响应。由于该炎性免疫响应对于感染的响应相对恒定, 并且发生在疾病过程的非常早的阶段, 因此监测所述标记物表达的改变可以预测败血症发展的早期阶段。本发明的目的是提供一种在临床症状和疾病发生之前早期检测严重感染的方法, 优选在干预治疗的窗口期 (附图 1)。

[0034] 第一方面, 本发明描述了在临床征象明显显现之前的几天检测感染、SIRS 或败血症的早期迹象的系统和方法。其还提供了能够预测所述状况的临床病程的时间的方法。该系统包括分析基于生物样品的一组或多组检验的结果, 优选血液样本。可选地, 也可以包括其它常规临床手段进行分析。

[0035] 第一组检验包括通过逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 放大细胞因子 mRNA 来确定血白细胞的一组化学因子和细胞因子的表达水平。该组包括 CD178 (FAS-L)、MCP-1 (单核细胞

趋化蛋白-1)、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8、IL-10、INF- α 和 INF- γ 。CD178 编码并表达为 II 型膜蛋白,但是可以被认为是一种细胞因子,原因是其被金属蛋白酶裂解而释放可溶性同质三聚体、可溶性 Fas1 或 sFas1。

[0036] 第二组检验包括确定一组表面标记物的细胞表面表达,包括 HLA-DR、CD54、CD11b、CD31、CD69、CD80、CD62L(L- 选择蛋白)、CD25 和 CD97。其可以通过标准方法实现,优选通过特异性的、经标记的抗体或其片段标记细胞来实现,以及通过流式细胞术分析。

[0037] 该分析中可以包括的第三组检验包括常规的临床数据,包括体温、心率、总白细胞计数和白细胞分类计数(单核细胞、淋巴细胞、粒细胞、嗜中性粒细胞)、血小板计数、血清肌酐、尿素、乳酸、碱过剩、pO₂、HCO₃⁻ 和 C- 反应蛋白。

[0038] 对一组或多组检验结果进行分析,优选通过神经网络程序进行分析,该程序能够对被采集样品的患者发展成败血症进行是 / 否的预测。

[0039] 在阳性预测结果的情况下,优选进行进一步的分析,预测明显临床征象和症状发生的时间。或者,采用多元 logistic 回归进行两种分析。

[0040] 可以逐个或同时进行检验组的分析。优选的是,将临床数据作为 PCR 数据的补充数据进入神经网络。同时,可以采用所述神经网络处理流式细胞数据。通过神经网络进行处理仅仅需要一组数据,但是输入一组、两组或全部的三组数据有好处,其原因是,这些额外的例子有助于“训练”神经网络,改善程序输出的可信度。

[0041] 另一方面,采用神经网络处理前记录临床数据,或所述数据的数据库可以用于训练神经网络,提高其预测能力。

[0042] 所述方法可以作为对重症监护病人的常规监测的一部分,而采集常规血液样品用作其它目的。还可以监测其它有感染和 / 或败血症倾向的医院患者。所述倾向条件包括先天的或获得性免疫缺陷(包括 HIV/AIDS) 或免疫抑制(例如普通外科手术患者、移植接受者或接受激素治疗的患者)、糖尿病、淋巴瘤、白血病或其它恶性肿瘤、贯穿或污染伤、烧伤或腹膜炎。另一方面,本发明的方法用于筛选传染性疾病爆发期间的个体,或者筛选已经或者被怀疑已经暴露于感染病原的个体,不论其是偶然的或是生物恐怖主义或者在武装冲突期间采用生物武器而故意导致的。

[0043] 因此,本发明提供了一种筛选生物样品以检测感染、SIRS 或败血症的早期阶段的方法,包括以下步骤:通过 RT-PCR 检测一组提供信息的生物标记物的表达和 / 或通过流式细胞术检测一组提供信息的细胞表面生物标记物的表达和 / 或监测一组标准临床测量结果;通过神经网络或多元统计分析来分析检测结果;根据明显感染发生的可能性和疾病发展的时机对所述样品进行分类。优选地,所述生物样品为血样。进一步优选地,对 RT-PCR 和 / 或流式细胞术和 / 或标准临床测量的结果进行第一分析,以产生关于 SIRS 或发展成败血症的可能性的预测。在一备选实施例中,其表达为概率。在一备选实施例中,其表达为二元是 / 否结果。

[0044] 可选地,当第一分析提示可能发生 SIRS 或败血症(定义为超过预定的任意概率阈值,或“是”预测结果),对所述结果进行第二次分析,以确定发展到明显临床征象的可能时机,或者给出关于所述临床疾病的可能严重性的指示。

[0045] 优选地,该组提供信息的通过 RT-PCR 检测表达的生物标记物由至少选自以下列表的 4 个、优选至少 6 个、更优选至少 7 个、最优选所有标记物组成,所述列表由

CD178 (FsaL)、MCP-1 (或者称为 CCL-2)、TNF α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8、IL-10、INF- α 和 INF- γ 组成。

[0046] 或者,通过流式细胞术检测其表达的提供信息的细胞表面生物标记物组由至少 1 个、优选至少 2 个、最优选至少三个选自以下列表的标记物组成,所述列表由 CD31、HLA-DR、CD54、CD11b、CD69、CD80、CD62L、CD25 和 CD97 组成。

[0047] 当对标准临床测量结果进行分析时,其由至少一个、优选至少三个、更优选至少五个选自以下列表的测量结果组成,所述列表由体温、心率、总白细胞计数和白细胞分类计数(单核细胞、淋巴细胞、粒细胞、嗜中性粒细胞)、血小板计数、血清肌酐、尿素、乳酸、碱过剩、 pO_2 、 HCO_3^- 和 C-反应蛋白组成。

[0048] 在一高度优选的实施方式中,通过神经网络进行所述分析。最优选的是,其为多层感知神经网络。

[0049] 优选地,所述神经网络能够在大于 70% 的病例中正确预测 SIRS 或败血症(在对照组中不能通过预防性治疗防止其发展的试验中确定)、优选在至少 80% 病例中,更优选在至少 85% 病例中,最优选在至少 95% 病例中。优选地是,SIRS 或败血症能够在明显临床征象发生的至少前一天预测到,更优选至少前两天,更加优选至少前三天,最优选在诊断出 SIRS 或败血症前的三天以上。

[0050] 在另一优选实施方式中,通过多元统计分析进行所述分析,优选包括主成分分析和/或判别函数分析。更优选地是,所述多元统计分析包括判别函数分析。

[0051] 另一方面,本发明提供了一种筛选生物样品的系统以检测感染、SIRS 或败血症的早期阶段,其包括:从所述样品获得的细胞中提取和纯化 RNA 的装置、热循环控制装置或其它通过逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)放大所选择的 RNA 序列的装置、检测并定量所述 RT-PCR 的结果的装置、能够分析所述结果的经训练的基于计算机的神经网络和由此能够向操作者交流神经网络分析结论的显示装置。

[0052] 注意:在该方面,可以采用判别函数分析对 RT-PCR 的结果进行分析,但是神经网络为优选的实施方式。

[0053] 或者,系统包括:对从生物样品获得的细胞上的特异性细胞表面标记物进行标记并对所述标记物的表达进行量化的装置、检测或对所述标记和量化的结果进行定量的装置、能够分析所述结果的经训练的基于计算机的神经网络和由此能够向操作者交流神经网络分析结论的显示装置。优选地,所述标记是通过标记抗体或抗体片段进行的,所述量化是通过荧光激活细胞分类(FACS)或其它形式的流式细胞术进行的。

[0054] 优选地,所述系统包括同时进行 RT-PCR 和 FACS 分析的装置,优选地,还可以包括分析其它常规临床检验结果,并将所有这些结果结合至该分析中。

[0055] 在另一方面,本发明提供了根据上述方法的任意实施方式的分析,以制备用于诊断 SIRS、败血症或感染的诊断装置、或者采用上述系统以制备诊断感染的诊断装置。

[0056] 还提供的是根据上述方法的早期诊断 SIRS、感染或败血症的一种方法。

[0057] 本发明的详细描述

[0058] 参考以下附图和例子对本发明进行详细描述。

[0059] 附图 1:感染后,免疫系统的细胞通过激活识别并对病原做出应答。其导致了不同信使蛋白(例如细胞因子和化学因子)的产生,以及活化标记物和粘附分子在细胞表面的

表达。这些的生成有利于细胞之间的通信,使得针对某一特定因素产生协同的免疫响应。由于该炎症免疫响应对于感染的响应相对恒定,并且发生在疾病过程的非常早的阶段,因此监测所述标记物表达的改变可以预测败血症发展的早期阶段。理想的是,在临床症状和疾病发生之前,在干预治疗的窗口期进行上述监测。

[0060] 附图 2:通过流式细胞术测量的 CD31 在粒细胞上表达的图形。来自诊断为败血症 ($n = 6$) 的患者的前三天血样,以及没有发生成为败血症的 ICU 患者 ($n = 24$) 的血样。每个符号表示对一个患者进行的一次测量。

[0061] 附图 3:根据表 4、模型 2 设计分析临床数据的神经网络。WCC = 白细胞计数,CRP = C-反应蛋白。

[0062] 附图 4:用金黄色葡萄球菌体外血液感染之后获得的细胞因子模式的改变。来自三个自愿者的血液数据详细见例 8。

[0063] 附图 5:体外金黄色葡萄球菌败血症模型的神经网络分析的结果。

[0064] 实施例 1:通过对细胞因子表达、细胞表面标记物和临床测量结果的神经网络分析对败血症进行预测。

[0065] 研究设计和患者

[0066] 对 Queen Alexandra 医院 ICU 部门研究败血症的发生,产生了 91 名患者的队列 (Dst1/CR08631)。他们在 ICU 期间,每天从这些患者中采集血样,一共有 24 名患者被诊断为发展成败血症。对被诊断为败血症的当天 (0 天) 采集的样品、诊断为败血症之前向后推六天的样品 (-6 天) 采用 RT-PCR 和流式细胞术分别分析活化标记物和细胞因子 mRNA 的表达。此外,记录标准医院数据和临床观察结果。以同样方式对来自对照组患者的样品进行处理以提供供传统统计分析用的数据。

[0067] 根据通常采用的实验室技术进行 RT-PCR。简言之,对于血液样品,取全血,在 RNA 稳定剂存在下裂解细胞。采用珠亲和结合分离出 RNA,其通过离心 (或适当的话,采用磁法) 进行分离,用去氧核糖核酸酶 DNase 消化除去污染的 DNA,对 RNA 进行 RT-PCT。

[0068] 荧光激活细胞分类 (FACS) 流式细胞术是本领域非常公知的,可以采用任何标准方法。

[0069] 数据分析

[0070] 生物系统的复杂性以及本研究所采用的标记物之间的复杂关系使得标准的线性数据分析方法得出不确定的结果。因此,不清楚所述数据是否存在某种模式,由此寻求一种更加有效的能够非线性建模的方法以应对所述数据集的复杂性。

[0071] 为了分析,对发生败血症之前 1 至 4 天的患者的数据进行核对,并与没有发展为败血症的 ICU 患者构成的年龄 / 性别匹配的对照组进行比较。单个样品提供测量多达 56 个不同参数的数据,将变量的选择性组合输入多层感知神经网络 (Proforma, Hanon Solution, Glasgow, Scotland)。

[0072] 采用后向传播算法用随机选择的 70% 经平衡的败血症和对照数据对每个网络进行训练,然后用剩余的 30% 数据进行检验。在该网络内对数据进行建模时进行五次尝试,每个模型对数据归纳的能力不同。最成功的模型为最能够对之前未能预见的患者进行正确分类的模型,所述患者来自败血症或非败血症对照组。

[0073] 结果

[0074] 表 2 显示了对测试患者进行正确分类或“评分”29/35 (或者 82.9%) 的成功模型的例子。

[0075] 表 2 :采用细胞因子 mRNA 变量 (第 1 至 4 天) 的分类显示

[0076]

	得分	样品正确预测 百分数 %
患者总数	29/35	82.9%
对照患者	16/20	80.0%
败血症患者	13/15	86.7%

[0077] 为了提高该模型的可信度,对其实施五次,每次采用随机选择的不同数据,以训练和检验网络。一旦完成,对每个模型的得分进行平均,以得到关于所述网络将患者分类到正确的败血症或非败血症对照组的能力的全面指示。

[0078] 一系列 5 个数据集的平均预测准确性为大约 80%,如表 3 所示。

[0079] 表 3 :仅采用 RT-PCR 数据预测败血症的神经网络 (5 个方案的分类性能分析)

[0080]

	命中/发生	%	命中/预测	%	概率 %	提高率 %	比率
模型1							
状况	23/27	85.2	N/A	N/A	50.0	35.2	1.7:1
败血症	9/13	69.2	9/9	100.0	48.1	51.9	2.1:1
对照	14/14	100.0	14/18	77.8	51.9	25.9	1.5:1
模型2							
状况	29/35	82.9	N/A	N/A	50.0	32.9	1.7:1
败血症	13/15	86.7	13/17	76.5	42.9	33.6	1.8:1
对照	16/20	80.0	16/18	88.9	57.1	31.7	1.6:1
模型3							
状况	32/40	80.0	N/A	N/A	50.0	30.0	1.6:1
败血症	20/22	90.9	20/26	76.9	55.0	21.9	1.4:1
对照	12/18	66.7	12/14	85.7	45.0	40.7	1.9:1
模型4							
状况	21/26	80.8	N/A	N/A	50.0	30.8	1.6:1
败血症	9/12	75.0	9/11	81.8	46.2	35.7	1.8:1
对照	12/14	85.7	12/15	80.0	53.8	26.2	1.5:1
模型5							
状况	23/29	79.3	N/A	N/A	50.0	29.3	1.6:1
败血症	12/15	80.0	12/15	80.0	51.7	28.3	1.5:1
对照	11/14	78.6	11/14	78.6	48.3	30.3	1.6:1

[0081] $128/157 = 81.5\%$

[0082] $79.3+85.2+80+82.9+80.8 = 408.2/5 = 81.64\%$

[0083] 表4列出了采用不同变量组合而构造的一系列网络的平均预测准确值。

[0084] 最成功的模型是采用细胞因子 mRNA 表达和流式细胞术数据的 CD31 表达百分率构建的 (平均准确率为 81.0%, 表 3, 模型 1), 临床数据得分也较高 (80.4%, 表 3, 模型 2)。

[0085] 表 4: 神经网络分析的结果

[0086]

模型	标记物	预测 准确性 (%)
1	FasL, MCP-1, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10	81.6
2	肌酐, 单核细胞, CRP, 淋巴细胞, 体温, 嗜中性粒细胞, 白细胞计数	80.4
3	FasL, MCP-1, IL-8, 白细胞计数, 体温, 肌酐	79.0

4	FasL, MCP-1, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 & IL-10, % CD31&肌酐	78.7
5	FasL, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 & IL-10	78.1
6	FasL, MCP-1, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, 肌酐, 单核细胞, CRP, 淋巴细胞, 体温, 嗜中性粒细胞, 白细胞计数	76.0
7	MCP-1, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10	76.0
8	血小板, HCO ₃ , PO ₂ , 尿素, 肌酐, 心率	70.7

[0087] 为了进一步检测我们的预测模型,我们采用临床症状发生之前的第1至4天获得的100%细胞因子数据对网络进行训练。然而,我们选择包括“第0天”败血症患者的检验数据和来自第-5、-6天以及第0、5、6天的数据,还从单独的自愿者研究中选择14名对照患者,他们中的7个在采样的9天内出现上呼吸道感染(URTI)的症状(Dst1/CR08631)。所述结果显示在下表5中。

[0088] 表5:在其它组的预测中细胞因子 mRNA 模型(第-4至-1天)的性能

[0089]

检测组	得分	样品正确预测百分率
第0天 败血症	8/9	89%
败血症 第-5天	7/9	78%
败血症 第-6天	5/6	83%

[0090] 该表显示了,我们的由临床败血症发生前4天所表达的模式而构建的模型正确地确认89%的第0天败血症患者、78%的第-5天败血症患者和83%的第-6天败血症患者,或进行“评分”。总体而言,采用神经网络的分析产生了大量的针对败血症的预测模型。仅仅采用细胞因子数据构建的模型证明能够持续成功地区分将发展成为败血症的个体和不会发展成为败血症的个体。

[0091] 实施例2:采用神经网络模型使得非败血症自愿者中没有假阳性结果

[0092] 表6显示了通过细胞因子 RT-PCR 对自愿者组的检测结果,该组中没有人出现 SIRS 或败血症表现。

[0093] 表6

[0094]

姓名	命中 / 发生	%	命中 / 预测	%	概率	提高	比率
总计	13/13	100.0	N/A	N/A	50.0%	50.0%	2.0 : 1
对照	13/13	100.0	13/13	100.0	100.0%	0.0%	1.0 : 1
败血症	0/0	N/A	0/0	0.0	0.0%	0.0%	N/A

[0095] 实施例 3 :采用临床数据,神经网络的败血症预测准确度超过 90%。

[0096] 采用下表 7 中描述的参数,采用临床数据而检验的神经网络模型见表 4 的模型 2,并进一步在附图 3 中描述:

[0097] 表 7 :分析临床数据的神经网络参数

[0098]

从输入至隐藏的权重					
输入	单元1	单元2	单元3	单元4	单元5
1	-3.04389	0.783085	-8.14579	-5.31918	-11.699
2	-2.40492	-3.28341	6.81119	-2.22889	10.3357
3	2 0.0835039	-2.25136	15.2575	-3.38677	11.4842
4	-16.2918	3.45666	-5.86258	8.93773	-1.57967
5	12.7828	4 5.2618	6.36791	7.45053	17.1156
6	34.3201	7.31471	-18.392	16.806	10.2057
7	-3.31337	-1.41443	-10.2639	-3.68324	1.4483
从偏性至隐藏的权重					
1	-0.407035	-9.38879	4.06257	-12.6877	-10.7582
从隐藏至输出的权重					
1	-8.79483	8.82026			
2	8.79794	-8.38064			
3	3.60783	-3.62177			
4	3.00073	-3.83778			
5	4.85609	-4.85559			
从偏性至输出的权重					
1	-2.64015	2.65373			

[0099] 表 8

[0100]

名称	命中 / 发生	%	命中 / 预测	%	概率	提高	比率
状况	14/15	93.3	N/A	N/A	50.0%	43.3%	1.9 : 1
败血症	8/8	100.0	8/9	88.9	53.3%	35.6%	1.7 : 1
对照	6/7	85.7	6/6	100.0	46.7%	53.3%	2.1 : 1

[0101] 实施例 4 :采用人工免疫识别系统

[0102] 表述

[0103] 初始 AIRS 系统 (A. Watins. An Artifical Immune RecognitionSystem. 密西西比州立大学 :MSc Thesis. ,2001) 采用简单的实值形状空间。近来,其它人将所述表述延伸至 Hamming 形状空间 (J. Hanamaker 和 L. Boggess. The effect of distance metrics on AIRS. InProc. Of Congress on Evolutionary Computation(CEC). IEEE,2004) 和 自

然语言 (D. Goodman, L. Bogess 和 A. Waktins. “An investigation into the source of power for AIRS, an artificial immune classification system”. In Proc. Int Joint Conference on Neural Networks, 第 1678-1683 页. IEEE, 2003)。AIRS 保持了一组人工识别球 (Artificial Recognition Balls, ARBs), 其含有被学习的数据矢量, 刺激水平和大量资源。在训练期间, 通过评价 ARB 中数据矢量对训练项目的亲和性来计算所述刺激水平, 匹配越强, 刺激越大。采用该刺激水平以规定 ARB 如何产生多个克隆, 并如何影响 ARB 的生存。

[0104] 亲和性测量

[0105] 其依赖于所采用的表述。已经提出大量的亲和性测量以用于 AIRS, 包括 Hamming 距离、Euclidean 距离等。在该研究中, 同时采用 Euclidean 和 Hamming 距离量度, 其中 Euclidean 的结果最佳。

[0106] 免疫算法

[0107] 实质上, AIRS 涉及两个群体, 一个存储库和一个 ARB 库 C。其有独立的训练和检验相, 检验相类似于 k-最近邻域分类器。在该训练相中, 将训练数据相呈给 M。然后随机启动该数据集, 实验证据将建议 AIRS 对初始启动点不敏感。所述训练项目与集 M 的所有存储单元匹配, 确定一个单元为较高匹配 Mcmatch。然后克隆并突变该 Mcmatch。克隆与刺激呈正比 (刺激越高, 克隆率越高), 突变与刺激呈反比 (刺激越高, 突变率越低)。将这些克隆插入 ARB 库, C。然后将该训练项目呈给 ARB 库的成员, 其中采用循环程序从而对新的候选存储单元进行克隆和突变。通过群控制处理, 生存由 ARB 可以要求的资源数量确定, 产生新的候选存储单元。该机制基于 J. Timmis 和 M. Neal. A resource limited artificial immune system. Knowledge Based Systems 14 (3/4): 121-130, 2001 中提出的资源分配算法。用该训练项目, 将该新的候选单元与 Mcmatch 相比。如果所述候选单元和 MVCmatch 之间的亲和性更高, 则该存储单元被所述候选单元取代。

[0108] 对每个训练项目都实施该过程, 存储集将含有大量能够用于分类的单元。以 k-最近邻域方式进行未见数据项的分类。

[0109] 实验设置

[0110] 尝试采用与将神经网络用于该数据集具有可比性的实验程序。对于所有研究, 采用标记物: asL, MCP-1, TNF- α , IL- β , IL-6, IL-8 和 IL-10。然而, 不可能完全精确地复制该数据集, 其原因是在神经网络的研究过程中就数据的前处理而言其信息是不完整的。

[0111] 实验 1

[0112] 在第一组实验中, 采用从败血症发生前 1 至 4 天的患者所收集的数据, 以及作为训练数据从对照组患者中收集的数据。尤其是, 采用显示败血症征象患者的第 1、2、3 和 4 天的组合数据, 随机收集对照组患者, 以训练 AIRS。一共采用了 59 个训练数据项目。为了检验 AIRS, 采用对对照组患者的随机收集, 以及来自所有天的组合数据 (排除已经在训练过程中用过的数据)。一共采用了 34 个检验数据点。AIRS 的设置参见表 9:

[0113] 表 9: AIRS 的参数设置

[0114]

参数	设置
Epochs 克隆率	10

突变率	0.8
群的初始大小	5
亲和阈值	0.2
刺激阈值	0.8
源数量	200

[0115] 实验 2

[0116] 对于我们的第二组实验,采用第 0、5 和 6 天的数据和对照患者对显示败血症征象的患者进行分类。采用与实验 1 想同的数据训练 AIRS 系统,同时采用相同的参数。

[0117] 结果

[0118] 所述结果与通过神经网络分析得到的结果不能直接相比,其原因是,很难从原始报告中严格确定在一段天数期间数据是如何首先组合,然后又如何分为训练和检验组的。因此,考虑所获得的结果时应当记住上述问题。

[0119] 实验 1

[0120] 对 AIRS 算法进行独立运行,然后计算平均和标准偏差。发现,AIRS 能够达到平均 73(2.96)% 的分类准确性。其与神经网络分析大约低 10%(采用相同的标记物)。然而,直接比较时应当注意。

[0121] 实验 2

[0122] 再次,对 AIRS 算法进行 10 次独立运行,然后计算平均值和标准偏差。此次,分析了败血症发作之前的天数(0、5 和 6)和对照组。再次,用第 1 至 4 天和对照组的数据对 AIRS 进行训练。所述结果参见表 10。

[0123] 表 10:在其他组中预测(括号内为标准差)

[0124]

检验组	准确度
败血症的第 0 天	83(7.6)%
败血症的第 5 天	96(6.1)%
败血症的第 6 天	91(8.2)%
对照	70(12.8)%

[0125] 从表 10 可以看出, AIRS 确定了高百分率的败血症患者(在第 5 和 6 天优于神经网络,但是应当再次注意上述可比性警告)。对照组修整的不是很好,低于预期结果,并且显著低于神经网络法。其可能是由于用于训练的败血症患者的数据多于非败血症患者的数据从而 AIRS 偏向于败血症患者。

[0126] 结论

[0127] AIRS 似乎能够事先确定潜在的败血症病例,在一定水平上与神经网络法具有可比

性。

[0128] 实施例 5 :采用 CD31 表达预测败血症

[0129] 研究设计和患者

[0130] 参见例 1。

[0131] 流式细胞术

[0132] 将血液收集至肝素钠容器中 (HMJ&S, Chessington, Surrey), 并在室温下运至实验室。将 100ul 等分血样与免疫荧光染料混合, 其体积采用生产商 (Beckman Coulter Limited, High Wycombe, Buckinghamshire, 和 Becton Dickinson UK Limited, Cowley, Oxford) 所推荐的。通过 CD3 和 CD4 共染色鉴别 T 辅助细胞, 通过同时染色 CD3 和 CD8 鉴别 T 细胞毒细胞。对这些细胞集落染色 HLA-DR, CD25, CD54 和 CD69。通过 CD19 染色鉴别 B 细胞, 并通过 CD80, CD86, CD25, CD54 检查。用 CD56 染色区分并用 CD11b, CD25, CD54 和 CD69 检查自然杀伤细胞。通过 CD14 染色选择单核细胞集落, 这些细胞用 CD11b, CD54, CD80, CD86 和 HLA-DR 染色作为探针。采用门控作用鉴别粒细胞集落, 其对 CD11b, CD69, CD31, CD54 和 CD62L 染色。将这些染料在室温下孵育 20 分钟。在每管中加入 500ul Optilyse C (Beckman Coulter Limited), 并立即进行涡旋混合。在室温下孵育样品 10 分钟, 以裂解红细胞, 然后加入 500ul Isoton (Beckman Coulter Limited), 以固定染料。立即对管进行涡旋混合, 在室温下孵育 10 分钟。然后在 Beckman CoulterEpics XL System 2 Flow Cytometer 中对细胞进行计数。

[0133] 统计

[0134] 采用 11.0 版本的 SPSS 软件包的二元 Logistic 回归模型对数据进行分析。该分析将对照组的免疫调节剂表达的均值与败血症患者的 7 个时间点的均值进行比较: 诊断之前 6 天、诊断前的第 5、4、3、2、1 天, 以及 0 天, 诊断败血症的当天。当数据点缺失时, 用该组的平均值代替, 以保证可接受的 n 值。如果代替的数据点不涉及被该模型高亮显示为可能预测物的标记物时, 仅仅报告模型结果。

[0135] 结果

[0136] 数据分析发现弱的证据, 预测效果 = 0.114。CD31 的表达减少指示, 诊断前 3 天是败血症的可能预测物, $p = 0.037$ ($n = 6$)。诊断前 6 天获得的结果是不确定的, 其原因在于该时期的样本量很小 ($n = 4$)。诊断前 5、4、2 或 1 天或者诊断当天没有发现有统计学显著意义的预测物。

[0137] 结论

[0138] 对从发展成为败血症之前的患者和没有发生该疾病的患者获得的流式细胞数据进行了比较。采用诊断败血症之前的患者的结果构建组, 对照组由没有发展成为败血症的年龄匹配的患者所测量的结果组成。由于数据的分布, 显示中位数和第 90 以及第 10 百分数的条图很难解释, 因此进行了统计分析。

[0139] 当对原始数据进行做图时 (参见附图 2), 可以看出, 6 个败血症患者中 4 个 (66.6%) 的 CD31 的表达低于对照组。可以看出, 对照组 (无败血症) 的数据点在 11.8% 至 100% 之间分布, 而诊断测量结果前三天内的 6 个数据点中的 4 个低于 9%。因此, CD31 可以在出现临床征象和症状之前的三天预测败血症的发生。其提示了, CD31 可能是一种有用的预测标记物, 尤其是结合其他提供信息的败血症标记物。

[0140] 实施例 6 :多变量统计分析以预测败血症

[0141] 介绍

[0142] 对出现败血症症状前 1-6 天的患者收集的数据进行多变量数据分析程序。测量包括流式细胞术、PCR 和经典临床观察资料。对数据矩阵采用主成分分析 (PCA), 对 3 类观察资料的每个进行单独考虑, 并组合成完整的数据集。采用判别函数分析 (DFA) 以确定就变量的均值而言组之间是否不同, 然后采用该变量预测组的从属关系 (例如新的病例)。对来自 PCA 的结果和三类观察资料的每个以及组合成的完整数据集进行上述分析。

[0143] 数据描述、处理和多变量方法

[0144] 在 PCA 之前, 通过产生概率密度函数对数据进行总结。由于 PCA 和 DFA 之前需要正态分布, 因此, 采用 Johnson 转换算法对非正态数据进行转换。

[0145] PCA 为减少维数的方法, 其试图将多变量数据矩阵分解为一些潜在变量, 其由变量的线性组合构成, 其解释了原始矩阵的方差的主要部分。这样, 可以确定数据集内参数之间的关联 (正或负)。

[0146] 实质上, DFA 与方差分析法 (ANOVA) 类似。可以将 DFA 问题转化成一元分析 ANOVA 问题。尤其是, 人们可以询问就某一特定变量的均值而言两个组之间是否显著不同。然而, 应当清楚的是, 如果一个变量的均值在不同组间显著不同, 则可以得出结论, 该变量在不同组间不同。

[0147] 在单个变量的情况下, 变量在不同组间是否不同的最终显著检验称为 F-test。F 实质上为数据组间方差与总 (平均) 组内方差的比率。如果组间方差显著较大, 则均值之间必定有显著差异。

[0148] 当考虑多变量时, 可以确定几个变量中的哪个对组间差异做出贡献。其导致总方差和协方差的矩阵; 以及总组内方差和协方差的矩阵。通过多变量 F-test 比较这些矩阵, 以确定组间是否存在显著差异 (就所有变量而言)。该过程与多元方差分析或 MANOVA 相同。如同在 MANOVA 中, 进行多元检验, 如果有统计学显著性, 检查变量中的哪些在组间具有显著不同的均值。这样, 即使多个变量的计算更加复杂, 但是主要推理仍然适用, 即寻求组间不同的变量, 如所观察到的均值差一样显而易见。

[0149] 采用完整数据矩阵 (包括替代的均值) 对临床、流式细胞术和 RT-PCR 数据进行 DFA, 将含有替代均值的一个或多个参数的数据点排除。采用模拟模型对由模型 1 得到的模型进行 PCA 得分分析。后者的目的是确定转化的数据矩阵 (PCA) 是否可以对观察资料进行分类。

[0150] 模型 1 观察数据的主成分分析 (PCA)

[0151] i) 基于临床数据的 PCA 模型

[0152] 在给定模型中衍生和使用的 PC 数量通常确定为特征值 > 1.6 的成分。对于临床数据 PC 满足该条件, 并且解释了数据集中 74.3% 的方差。由于每个 PC 与其它 PC 正交 (不相关), 一个临床参数与特定 PC 之间的关联确定了该 PC, 并解释了该参数如何影响数据集的方差。

[0153] 表 12 对每个参数的负荷进行了总结, 从临床数据得到 6 个 PC。负荷值 > 0.5 指示一特定参数对给定 PC 的强贡献。源自该数据集的 PC 可以解释如下:

[0154] PC1 其由 WCC、单核细胞、嗜中性粒细胞和血小板之间的强关联控制。肌酐和乳酸

之间存在强关联。这些组具有负关联 (PC1 比例尺的相反端)。BXS 和 HCO_3^- 高度相关, 对 PC1 和 PC2 的贡献相同。后面这些参数在 PC1 中与肌酐和乳酸相反。表 2 和附图 2 中总结了这些关联。

[0155] PC2 显示了由 WCC、单核细胞、嗜中性粒细胞和血小板构成的组与由 BXS 和 HCO_3^- 构成的组呈负关联。

[0156] PC3 该 PC 的特征在于体温、HR 和 CRP 之间的强关联, 如附图 3 所示

[0157] PC4 尽管对于该 PC, 许多参数显示显著性, 但是仅仅有 CRP 明确与该 PC 相关, 如附图 4 所示

[0158] PC5 在该组分中, pO_2 与尿素和 MAP 相反。

[0159] PC6 该 PC 专门解释了由淋巴细胞引入该数据集的方差。

[0160] 在解释 PC 负荷时, 相关联的临床参数提示, 这些样本 / 物理参数的水平在属于 PC1, 2 等的患者中升高或降低。其将在判别分析部分中进行。

[0161] ii) 基于流式细胞数据的 PCA 模型

[0162] 为了清楚和简便起见, 对参数进行简写, 如表 13 所示。9 个 PC 解释了该数据集的 80.5% 方差, 如表 14 的特征值矩阵所示, 表 15 中总结了相关负荷。所测量的参数之间的关联如附图 16 所示, 在衍生的 PC 中以下之间具有强关联:

[0163] fc1 和 fc3

[0164] fc5 和 fc6

[0165] fc7 和 fc8

[0166] fc9 与 fc10 和 fc11,

[0167] fc12 和 fc13

[0168] fc11 和 fc14

[0169] fc17 与 fc20 和 fc23

[0170] fc21 与 fc17, 20 和 22

[0171] fc23 与 fc20 和 fc22

[0172] fc28 和 fc29

[0173] 所述 PC 结构可以解释如下:

[0174]

PC1	CD3 CD4 中的 CD3 CD4 CD25, CD3 CD4 中的 CD3 CD4 HLA-DR, CD3 CD8 中的 CD3 CD8 CD25, CD19 中的 CD19 CD80, CD19 中的 CD19 CD86, CD14 中的 CD14 CD80, CD14 中的 CD14 CD86, CD19 中的 CD19 CD54, CD19 中的 CD19 CD25 和 CD56 中的 CD56 CD54 相关
PC2	CD19 中的 CD19 CD86 与 CD14 中的 CD14 HLA-DR, CD14 中的 CD14 HLA-DR CD11B, CD14 中的 CD14 HLA-DR CD11B CD54 相反

PC3	CD3 CD4 中的 CD3 CD4 CD54, CD3 CD4 中的 CD3 CD4 CD69, CD3 CD8 中的 CD3 CD8 CD54, CD3 CD8 中的 CD3 CD8 CD69
PC4	CD56 中的 CD56 CD59, CD69(%), CD11B CD69(%)
PC5	CD3 CD8 CD62L(%) 中的 CD3 CD8 CD54,
PC6	CD31(%)
PC7	没有 $EV > 0.5$ 的显著组分
PC8	CD54(%)
PC9	CD14 中的 CD14 CD11B

[0175] 通过仅仅考虑一对或一组中的一个参数,则可以除去 9 个参数,由此增加了该数据矩阵的 y 组分。然而,确定的是,仅仅对 CD31(%), CD54(%), CD62L(%), CD11B(%), CD69(%) 和 CD11B CD69(%) 进行统计分析 (fc24-fc29)。

[0176] 所选择的流式细胞变量的特征值矩阵显示在表 17 中,表 18 总结了所构建的 PCA 模型的负荷。采用 3 个 PC 解释了该数据集的 76.6% 的方差。该 PC 模型显示:

[0177]

PC1	CD69(%) 与 CD11B CD69(%) 相关
PC2	CD31(%), CD62L(%) 和 CD11B(%) 相关
PC3	由与 CD54(%) 相关的方差组成

[0178] iii) 基于 RT-PCR 数据的 PCA 模型

[0179] 表 19 指示,仅仅 3 个 PC 解释了 RT-PCR 数据的 72.9% 方差。该模型的负荷参见表 20。变量与每个 PC 之间的关联见附图 23 和 24,并显示了以下:

[0180]

PC1	Fas-1、MCP-1、TNF- α 、IL-6 和 IL-8 相关
PC2	IL-1 和 IL10 相关
PC3	IL-1 和 IL10 相反

[0181] IL-1 和 IL-10 在 PC2 中相关而在 PC3 中相反是非常有意思的。其显示,在某些病人中,这些变量可能高度相关或者相反,可能提供了一种有效的区分患者的方式。

[0182] iv) 基于组合的临床、流式细胞和 RT-PCR 数据的 PCA 模型

[0183] 表 21 总结了包括在最终模型中的参数和关联矩阵的相关特征值。表 21 指示,9 个 PC 的特征值大于 1,其解释了数据方差的 68.7%。该模型的负荷见表 22。分析允许对 PCA 模型进行如下解释:

[0184]

PC1	显示 WCC、嗜中性粒细胞、APTR、HCO ₃ ⁻ 、BXS、血小板、CD69(%) 和 CD 11B CD69(%) 呈正相关。该 PC 还使上述与相互关联的乳酸和肌酐相反
PC2	CD69(%)、CD 11B CD69(%)、WCC、嗜中性粒细胞、单核细胞和 INR 相关联。这些参数与 TNF- α 相反
PC3	PCR 参数 Fas-L、MCP-1、TNF- α 、IL-6 和 IL-8 强相关
PC4	CRP 和 IL-10 相反
PC5	流式细胞参数 CD31(%)、CD54(%)、CD62L(%) 和 CD69(%) 相关
PC6	CD62L(%) 与 HR 相关
PC7	与体温相关
PC8	与 IL-1 相关
PC9	与 P02 相关

[0185] 模型 2:基于观察资料和 PCA 得分数据的判别函数分析 (DFA)

[0186] 在下表 23 中解释了在 DFA 模型中所有模型定义中共有的术语,并显示了数值。

[0187] 模型

[0188] 分析的目的是建立如何能最佳地预测病例属于哪个组的“模型”。在以下讨论中,采用术语“在模型中”以指被包括在组员预测中的变量,如果它们没有被包括,则“不在模型中”。

[0189] ●前向逐步分析

[0190] 在逐步判别函数分析中,逐步建立判别模型。尤其是,在每步中,对所有变量进行检查并评价,以确定哪个对区分不同组的贡献最大。然后将该变量包括在该模型中。

[0191] ●后向逐步分析

[0192] 可以后向逐步分析;在此情况下,程序首先在模型中包括所有变量,然后在每一步中,除去对预测组员贡献最小的变量。这样,由于成功的判别函数分析,将在模型中仅仅保留“重要”的变量,也就是说,对区分不同组的贡献最大的变量。

[0193] ●进入 F,出去 F

[0194] 所述逐步法由各自进入的 F 和出去 F 值“指导”。一个变量的 F 值指示其在组间判别时具有的统计学显著性,即其是一个变量对预测组员的独特贡献的量度。总的来说,该程序继续选择将被保留在模型中的变量,只要这些变量的各自 F 值大于指定进入的 F;并且,如果变量的显著性低于指定排出的 F,则从模型中将这些变量排除(除去)。

[0195] ●容许度

[0196] 一个变量的容许值计算为该变量与模型中其它所有变量的 $1-R^2$ 。这样,容许度为

各个变量的冗余度的量度。例如,容许值为 0.10 意味着该变量与该模型中的其它变量的冗余为 90%。

[0197] ● Wilks' λ

[0198] 该参数给出了该模型的判别能力的量度,可以评价范围为 0(完全判别)至 1(不能判别)的值

[0199] ● 部分 λ

[0200] 这是与各个变量对该模型判别能力的独特贡献(正交测量)相关的 Wilks' λ 。

[0201] 就这一点,逐步判别分析的结果的常见错误解释是取表面值的统计显著性值。当该程序确定在下步分析中哪个变量被包括或排除时,其实际计算每个被考虑的变量的贡献的显著性。因此,本质上,由于逐步法“挑挑选选”将被包括在模型中的变量,以产生最大区别,则所述逐步法利用了几率。这样,当采用逐步法时,应知晓显著性水平不反映实际的错误率,即必须保持的错误拒绝 H_0 (组间无区别的无效假设)的概率。

[0202] ● 典型相关分析(CCA)

[0203] 这是评价变量之间关系的额外程序。尤其是,该操作允许对两组变量之间的关系进行说明。以下对表征该分析的参数进行详细说明。

[0204] ● 根的显著性(χ^2 检验)

[0205] 术语根用于描述单个判别函数(DF)。衍生的 DF 的统计学显著性通过连续 DF 的 χ^2 检验来检测。得到所有典型根的逐步减小的检验报告,该报告含有所有 DF 的显著性,然后在除去第一根之后,得到报告剩余根的显著性的第二条线,等等。由此得到解释的 DF 数量。

[0206] ● 判别函数系数

[0207] 产生两个输出,一个作为原始系数,一个作为标化系数。此处,原始意味着所述系数可以与所观察的数据结合以计算(原始)判别函数得分。标化系数是指通常用于解释的系数,其原因是,它们与标准变量有关,因此是指可比的尺度。

[0208] ● 特征值

[0209] 得到每个 DF 的特征值和每个函数所解释的方差的累积比例。该值在 PCA 和 DFA 中定义的方式相同。该值越大,DF 解释的方差的量越大。

[0210] ● 因子结构系数

[0211] 这些系数代表了变量和 DF 之间的关联,并通常采用以解释判别函数的“含义”。以类似于 PCA 的方式,对因子的解释应当基于因子结构系数。

[0212] ● 典型变量的均值

[0213] 当获知变量如何参与不同组间的判别时,下一逻辑步骤是确定每个 DF 的判别性质。回答该问题的第一步是检查典型均值。对于给定 DF,其典型均值越大,该 DF 的判别能力越大。

[0214] i) 基于临床数据的 PCA 得分的 DFA 模型

[0215] a) 含有替代均值

[0216] 表 19 总结了该分析的结果。0.4 的 Wilk' λ 值指示相对无效的分类模型。所述三个衍生的 DF 共解释了该数据集方差的 89.9%,DF 主要由 PC1,3 和 4 组成。因子结构系数指示:

- [0217] ● DF1 由 PC1 和较少程度上 PC4 所解释的方差组成
- [0218] ● DF2 专门由 PC3 解释的方差组成
- [0219] ● DF3 由 PC4 解释的方差组成
- [0220] 标化系数确定了这些关联。典型变量的均值指示：
- [0221] ● DF1 使第 1,2 和 3 天与第 5 和 6 天负相关
- [0222] ● DF2 确定了对照组的观察结果
- [0223] ● DF3 确定第 2 天的观察结果
- [0224] 该模型的分类及其与 PC 相关的判别性质的总结见表 25。该模型的分类矩阵见表 26。表 26 提示,可以对对照组和第 6 天的数据进行良好的分类,分别有 80%和 83%的观察结果被正确分类。然而,该模型的总分类能力较差,所有观察结果中仅有 48%被正确分类。
- [0225] b) 排除替代均值
- [0226] 表 24 总结了该分析的结果。0.45 的 Wilk' λ 值指示相对无效的分类模型。三个衍生的 DF 共解释了该数据集方差的 95%,DF 主要由 PC1,3 和 5 组成。因子结构系数指示：
- [0227] ● DF1 由 PC1 和 PC5 之间的负关联所解释的方差组成
- [0228] ● DF2 专门由 PC3 解释的方差组成
- [0229] ● DF3 由 PC3 解释的方差组成,但是其低于 DF2
- [0230] 标化系数确定了这些关联。典型变量的均值指示：
- [0231] ● DF1 使第 1,2 和 3 天与第 5 和 6 天负相关
- [0232] ● DF2 使第 1 和 6 天与对照组负相关
- [0233] ● DF3 确定第 6 天的观察结果
- [0234] 该模型的分类及其与 PC 相关的判别性质的总结见表 25。该模型的分类矩阵见表 26。表 26 提示,可以对对照组和第 6 天的数据进行良好的分类,分别有 83%和 67%的观察结果被正确分类。然而,该模型的总分类能力较差,所有观察结果中仅有 44%被正确分类,低于用均值代替的变量。
- [0235] 采用均值替代值和不采用均值替代值的类似预测效率证实了接下来包括这些值的进行 DFA 的方法。
- [0236] ii) 基于临床数据的转换值的 DFA 模型
- [0237] 为了提高观察资料的分类,从原始数据矩阵转化的变量值经过 DFA。其主题是由于 PCA 为维数减少的方法,可能某些数据量丢失了,对 PCA 得分进行 DFA 导致预测力低的模型。
- [0238] 表 27 总结了该分析的结果。0.22 的 Wilk' λ 值指示 PCA 得分分类模型的改进。五个衍生的 DF 共解释了该数据集的 99%方差,DF 由 BXS、CRP、乳酸、尿素、体温、肌酐、嗜中性粒细胞、pO₂ 和 HCO₃⁻ 以及其它对观察资料的分类没有影响的临床变量组成。因子结构系数指示：
- [0239] ● DF1 对与乳酸呈负相关的 BXS 和 HCO₃⁻ 之间的关联进行分类
- [0240] ● DF2 对显示 BXS、CRP 和 HCO₃⁻ 之间呈高度关联的观察资料进行分类
- [0241] ● DF3 对体温和肌酐具有负相关的样本进行分类
- [0242] ● DF4 对体温和 pO₂ 具有负相关的样本进行分类
- [0243] ● DF5 对尿素和嗜中性粒细胞具有负相关的样本进行分类

[0244] 该模型的分类及其与临床变量相关的判别性质的总结见表 31。该模型的分类矩阵见表 32。表 32 提示了可以对对照组和第 6 天的数据进行良好的分类, 分别有 80% 和 83% 的观察结果被正确分类。与 PCA 得分模型相比, 第 1, 2 和 5 天显著改善, 但是该模型的总体分类能力较差, 所有观察结果中有 55% 被正确分类。

[0245] iii) 基于流式细胞的 PCA 得分的 DFA 模型

[0246] 表 33 总结了该分析的结果。0.39 的 Wilk' λ 值指示相对无效的分类模型。两个衍生的 DF 共解释了该数据集的 71% 方差, DF 主要由 PC1, 3 和 5 组成。因子结构系数指示:

[0247] ● DF1 由 PC1 和 PC8 所解释的方差组成

[0248] ● DF2 专门由 PC5 解释的方差组成

[0249] 标化系数确定了这些关联。典型变量的均值指示:

[0250] ● DF1 使第 1 天与第 5 和 6 天负相关

[0251] ● DF2 确定第 3 天的观察结果

[0252] 该模型的分类及其与 PC 相关的判别性质的总结见表 34。该模型的分类矩阵见表 35。表 35 提示了可以对对照组和第 6 天的数据进行良好的分类, 两个组中均有 66% 的观察结果被正确分类。但是该模型的总体分类能力较差, 所有观察结果中仅有 44% 被正确分类。

[0253] iv) 基于流式细胞数据的 DFA 模型

[0254] 该模型的分类及其与变量相关的判别性质的总结见表 36。0.034 的 Wilk' λ 值指示优良的分类模型。三个衍生的 DF 共解释了该数据集的 74% 方差, DF 主要由 fc7-8、fc11、fc16、fc25、fc28、fc29 组成。因子结构系数指示:

[0255] ● DF1 将 fc7, 16, 28 相关, 而这些与 fc8 和 25 相反

[0256] ● DF2 将 fc7, 8, 16 和 25 相关, 而这些与 fc12 相反

[0257] ● DF3 与 fc11 相关

[0258] 表 37 总结了该信息。

[0259] 这些关联被标化系数证实。典型变量的均值指示:

[0260] ● DF1 使第 1 天与第 5 和 6 天相反

[0261] ● DF2 使对照组与第 3, 4 和 5 天相反, 将对照组与第 6 天相关

[0262] ● DF3 使第 2 和 3 天与第 4 天相反

[0263] 表 38 提示可以对所有组进行良好分类。该模型的总分类能力令人印象深刻, 全部观察资料中的 76.6% 被正确分类。

[0264] 对于 PCA 得分和转换的数据, RT-PCR 的 DFA 模型较差, Wilk' λ 值 > 0.8 , 它们被放弃, 不再考虑。

[0265] v) 基于组合的临床、流式细胞和 RT-PCR 数据的 DFA 模型

[0266] 该模型的分类及其与变量相关的判别性质的总结见表 39。0.0087 的 Wilk' λ 值指示优良的分类模型。四个衍生的 DF 共解释了该数据集的 89.2% 方差, DF 因子结构指示: BXS、fc25、fc22、fc11、体温、CRP、fc18、fc6、IL-6、INR、APTR、fc16、尿素、乳酸、Fas-L、fc13、fc1、fc3、MCP-1、fc28、IL-10、fc27、fc26、嗜中性粒细胞、fc14、WCC、fc29、血小板、p02 被包括在该模型中。所有其它参数不能满足逐步法标准, 因此从模型中删除。

[0267] 典型变量的均值指示:

- [0268] ● DF1 使第 1 天与第 5 和 6 天相反
- [0269] ● DF2 使对照组与第 6 天相关,将这些与第 3,4 和 5 天相反
- [0270] ● DF3 使对照组与第 5 天相关,将这些与第 2,3 和 6 天相反
- [0271] ● DF4 使第 4 和 5 天相反
- [0272] 表 40 显示了能够得到对于所有组的良好分类,最小准确分配率为 76%。该模型的总分类能力令人印象深刻,全部观察资料中的 86.9%被正确分类。
- [0273] 当采用该模型,对数据应用每个 DF 时,可以清楚地对患者组进行聚类,然后与其它组空间分离。
- [0274] 结论
- [0275] PCA 对所有类型的患者的测量变量之间具有高度关联。从分子生物学角度而言,这些关联中的多个是预料中的。某些 PCA 模型极大地减少了数据集的维数,但是所得到的得分不能空间地分离患者组。
- [0276] 对从 PCA 获得的得分的 DFA 显示令人失望的结果。当采用 PCA 得分时,该模型的判别能力为 44-56%。这些模型的低判别能力可能是 PCA 过程中数据集维数的减少和大量细节丢失的结果。在 DFA 中采用经转换的变量得到改进很多的模型。临床和流式细胞模型的判别能力分别为 55%和 76%。当对完整数据集(临床、流式细胞和 RT-PCR 变量)进行 DFA 时,观察到 86.9%的预测效率。因此,推荐测量并采用包括在下一模型中的变量(表 36)以对怀疑对败血症易感的新患者进行分类。
- [0277] 该模型令人印象最深刻的特征是其对症状发作前 6 天的患者正确分类的能力。因此可以监测关键的判别变量,并确定阈值水平,此时必须给予医学治疗。采用表 34 显示的参数,可以从患者获取数据,并采用转换算法,将数据输入 DFA 模型。然后,其能够将患者分类至适当的组中,有效率接近 90%。当用于临床实验室中,其可能具有很大的价值。
- [0278] 表 11 关联矩阵的特征值,以及对临床观察资料的相关统计
- [0279]

PC	特征值	总方差的 的百分率%	累积特征值	累积方差%
1	3. 73	24. 87	3. 73	24. 87
2	2. 50	16. 70	6. 23	41. 58
3	1. 53	10. 23	7. 77	51. 81
4	1. 22	8. 14	8. 99	59. 95
5	1. 10	7. 39	10. 10	67. 35
6	1. 04	6. 96	11. 14	74. 31
7	0. 87	5. 80	12. 01	80. 11

8	0.77	5.19	12.79	85.31
9	0.66	4.42	13.46	89.73
10	0.54	3.62	14.00	93.36
11	0.44	2.99	14.45	96.35
12	0.29	1.95	14.74	98.30
13	0.210	1.40	14.95	99.70
14	0.02	0.16	14.98	99.87
15	0.01	0.12	15.00	100.00

[0280] 表 12 临床测量对每个 PC 的负荷（与显示 95% CL 的特征值 > 0.5 相关）

[0281]

临床测量	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6
温度	0.14	0.08	0.60	-0.36	0.14	0.40
心率	0.15	-0.06	0.58	-0.48	0.11	-0.37
MAP	0.22	0.21	-0.29	-0.48	-0.54	-0.14
WCC	0.63	-0.74	0.00	0.05	0.02	-0.01
嗜中性粒细胞	0.58	-0.75	0.01	0.17	0.00	0.05
淋巴细胞	0.35	0.00	-0.14	-0.16	-0.19	-0.62
单核细胞	0.62	-0.66	0.08	-0.05	0.01	-0.01
血小板	0.53	-0.09	-0.37	0.05	0.22	0.04
CRP	-0.15	0.11	0.62	0.50	0.08	-0.36
PO2	-0.26	0.07	-0.36	0.12	0.53	-0.39
HCO3-	0.76	0.47	0.16	0.23	-0.13	-0.07
BXS	0.78	0.49	0.15	0.20	-0.11	-0.05
乳酸	-0.55	-0.46	0.16	-0.12	-0.08	-0.22

尿素	-0.30	-0.17	0.09	0.44	-0.58	0.04
肌酐	-0.69	-0.44	0.05	0.02	-0.19	-0.06

[0282] 表 13 流式细胞数据分析中采用的缩写

[0283]

缩写	流式细胞参数
fc1	CD3 CD4 中的 CD3 CD4 CD25
fc2	CD3 CD4 中的 CD3 CD4 HLA-DR
fc3	CD3 CD8 中的 CD3 CD8 CD25
fc4	CD3 CD8 中的 CD3 CD8 HLA-DR
fc5	CD3 CD4 中的 CD3 CD4 CD54
fc6	CD3 CD4 中的 CD3 CD4 CD69
fc7	CD3 CD8 中的 CD3 CD8 CD54

[0284]

fc8	CD3 CD8 中的 CD3 CD8 CD69
fc9	CD19 中的 CD19 CD80
fc10	CD19 中的 CD19 CD86
fc11	CD14 中的 CD14 CD80
fc12	CD14 中的 CD14 CD86
fc13	CD19 中的 CD19 CD54
fc14	CD19 中的 CD19 CD25
fc15	CD56 中的 CD56 CD54
fc16	CD56 中的 CD56 CD69
fc17	CD14 中的 CD14 CD54
fc18	CD14 中的 CD14 HLA-DR
fc19	CD14 中的 CD14 CD11B

fc20	CD14 中的 CD14 CD54 HLA-DR
fc21	CD14 中的 CD14 HLA-DR CD11B
fc22	CD14 中的 CD14 HLA-DR CD11B CD54
fc23	CD14 中的 CD14 CD11B CD54
fc24	CD31(%)
fc25	CD54(%)
fc26	CD62L(%)
fc27	CD11B(%)
fc28	CD69(%)
fc29	CD11B CD69(%)

[0285] 表 14 关联矩阵的特征值,以及对流式细胞数据的相关统计

[0286]

PC	特征值	总方差的 百分数%	累积特征值	累积方差%
1	7.16	24.68	7.16	24.68
2	3.81	13.12	10.96	37.80
3	2.63	9.07	13.59	46.88
4	2.43	8.39	16.03	55.27
5	1.90	6.54	17.93	61.81
6	1.62	5.59	19.55	67.41
7	1.46	5.05	21.01	72.45
8	1.21	4.19	22.23	76.64
9	1.10	3.78	23.32	80.42
10	0.87	3.00	24.19	83.42
11	0.85	2.93	25.04	86.36

12	0.71	2.44	25.75	88.80
13	0.63	2.17	26.38	90.97
14	0.53	1.82	26.91	92.78
15	0.39	1.36	27.30	94.14
16	0.35	1.21	27.65	95.35
17	0.34	1.16	27.99	96.51
18	0.31	1.07	28.30	97.58
19	0.20	0.68	28.50	98.26
20	0.12	0.42	28.62	98.68
21	0.10	0.34	28.72	99.02
22	0.08	0.27	28.79	99.29
23	0.07	0.23	28.86	99.52
24	0.05	0.18	28.91	99.70
25	0.04	0.13	28.95	99.83
26	0.02	0.08	28.98	99.91
27	0.01	0.05	28.99	99.96
28	0.01	0.03	29.00	99.99
29	0.00	0.01	29.00	100.00

[0287] 表 15 所有流式细胞数据对每个 PC 的负荷（与显示 95% CL 的特征值 > 0.5 相关）

[0288]

	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8	PC9
fc 1	0.59	-0.36	0.19	0.06	-0.13	-0.28	0.28	-0.11	-0.33
fc 2	0.61	-0.07	-0.20	-0.21	0.11	0.41	0.34	-0.01	-0.17
fc 3	0.62	-0.31	-0.07	0.14	0.14	-0.11	0.21	0.05	-0.31

fc 4	0.24	-0.03	-0.26	-0.19	0.11	0.44	0.46	-0.24	-0.03
fc 5	-0.06	-0.01	0.89	-0.24	-0.10	0.07	0.20	0.07	-0.10
fc 6	-0.11	-0.11	0.62	-0.02	-0.45	0.06	0.42	0.15	-0.07
fc 7	0.08	0.18	0.64	-0.39	0.50	0.05	-0.25	-0.09	-0.06
fc 8	0.14	0.29	0.63	-0.41	0.43	0.03	-0.24	-0.12	-0.07
fc 9	0.70	-0.52	0.17	0.05	-0.15	-0.01	-0.05	-0.03	0.18
fc 10	0.58	-0.57	0.05	0.14	-0.01	-0.06	-0.25	-0.35	0.11
fc 11	0.79	-0.35	-0.06	-0.09	0.02	0.30	0.04	0.03	0.14
fc 12	0.53	-0.36	0.06	0.15	-0.22	-0.09	-0.33	-0.44	0.02

[0289] 表 15 续

[0290]

fc 13	0.57	-0.27	0.23	-0.09	0.17	-0.06	0.01	-0.15	0.24
fc 14	0.74	-0.44	-0.01	0.03	0.09	0.13	0.00	0.22	0.16
fc 15	0.54	-0.19	0.11	0.18	0.08	0.13	-0.30	0.46	0.14
fc 16	0.31	-0.09	-0.21	-0.63	-0.07	0.45	-0.07	-0.03	-0.10
fc 17	0.73	0.26	0.02	0.26	0.03	-0.15	-0.13	0.19	-0.28
fc 18	0.49	0.64	-0.02	-0.10	-0.39	0.23	-0.15	-0.06	-0.07
fc 19	0.28	0.28	0.00	-0.27	-0.01	-0.32	0.40	0.01	0.60
fc 20	0.64	0.64	-0.05	0.09	-0.18	0.07	-0.16	0.01	-0.19
fc 21	0.52	0.65	0.01	-0.15	-0.38	0.08	-0.02	-0.07	0.16
fc 22	0.66	0.66	-0.02	0.01	-0.19	-0.07	-0.03	-0.01	0.06
fc 23	0.79	0.31	0.05	0.16	0.01	-0.29	0.02	0.15	0.05
fc 24	0.45	0.19	-0.05	-0.21	0.23	-0.53	0.33	-0.02	-0.04
fc 25	0.29	-0.15	-0.12	0.00	0.29	0.03	-0.01	0.54	-0.12
fc 26	0.10	0.35	-0.24	-0.03	0.55	0.12	0.02	0.04	0.24
fc 27	0.25	0.16	-0.37	-0.17	0.35	-0.29	0.03	-0.29	-0.27
fc 28	-0.08	-0.30	-0.25	-0.77	-0.27	-0.26	-0.19	0.16	-0.05
fc 29	-0.03	-0.29	-0.26	-0.77	-0.26	-0.29	-0.17	0.17	-0.04

[0291] 表 16 采用流式细胞变量的 PCA 模型的关联矩阵

[0292]

	fc 1	fc 2	fc 3	fc 4	fc 5	fc 6	fc 7	fc 8	fc 9	fc 10	fc 11	fc 12	fc 13	fc 14	fc 15
fc 1	1.00	0.34	0.69	0.09	0.13	0.18	-0.02	0.00	0.59	0.47	0.43	0.38	0.48	0.42	0.19
fc 2	0.34	1.00	0.43	0.53	-0.08	-0.08	0.02	0.03	0.33	0.26	0.57	0.17	0.22	0.54	0.24
fc 3	0.69	0.43	1.00	0.14	-0.11	-0.12	-0.03	-0.05	0.46	0.41	0.54	0.29	0.31	0.58	0.38
fc 4	0.09	0.53	0.14	1.00	-0.12	-0.07	-0.08	-0.02	0.10	0.06	0.32	0.06	0.10	0.13	0.00
fc 5	0.13	-0.08	-0.11	-0.12	1.00	0.80	0.53	0.51	0.09	-0.07	-0.05	-0.04	0.10	-0.04	-0.01
fc 6	0.18	-0.08	-0.12	-0.07	0.80	1.00	-0.02	-0.02	0.10	-0.07	-0.06	-0.03	0.03	-0.05	-0.09
fc 7	-0.02	0.02	-0.03	-0.06	0.53	-0.02	1.00	0.92	0.00	-0.04	0.00	-0.03	0.18	0.01	0.10
fc 8	0.00	0.03	-0.05	-0.02	0.51	-0.02	0.92	1.00	-0.02	-0.04	-0.01	-0.02	0.23	-0.04	0.07
fc 9	0.59	0.33	0.46	0.10	0.09	0.10	0.00	-0.02	1.00	0.73	0.76	0.61	0.52	0.76	0.48
fc 10	0.47	0.26	0.41	0.06	-0.07	-0.07	-0.04	-0.04	0.73	1.00	0.57	0.82	0.65	0.60	0.36
fc 11	0.43	0.57	0.54	0.32	-0.05	-0.06	0.00	-0.01	0.78	0.57	1.00	0.45	0.51	0.82	0.49
fc 12	0.38	0.17	0.29	0.06	-0.04	-0.03	-0.03	-0.02	0.61	0.62	0.45	1.00	0.30	0.41	0.30
fc 13	0.46	0.22	0.31	0.10	0.10	0.03	0.16	0.23	0.52	0.55	0.51	0.30	1.00	0.60	0.28
fc 14	0.42	0.54	0.58	0.13	-0.04	-0.05	0.01	-0.04	0.76	0.60	0.82	0.41	0.50	1.00	0.58
fc 15	0.19	0.24	0.38	0.00	-0.01	-0.09	0.10	0.07	0.48	0.35	0.49	0.30	0.28	0.58	1.00
fc 16	0.06	0.47	0.12	0.27	-0.01	-0.07	0.11	0.10	0.15	0.11	0.52	0.07	0.20	0.23	0.07
fc 17	0.41	0.31	0.38	0.00	-0.06	-0.09	0.03	0.09	0.34	0.26	0.37	0.28	0.32	0.38	0.44
fc 18	0.04	0.27	0.04	0.06	-0.02	-0.02	0.03	0.16	0.06	-0.06	0.21	0.13	0.08	0.07	0.12
fc 19	0.06	0.13	0.04	0.08	0.04	0.01	0.07	0.09	0.10	-0.06	0.16	-0.07	0.19	0.11	-0.01
fc 20	0.16	0.32	0.18	0.07	-0.10	-0.12	0.03	0.17	0.12	0.04	0.25	0.17	0.14	0.16	0.24
fc 21	0.06	0.25	0.05	0.12	0.00	-0.02	0.05	0.20	0.11	-0.05	0.22	0.14	0.10	0.10	0.09
fc 22	0.16	0.29	0.19	0.13	-0.07	-0.11	0.07	0.22	0.17	0.04	0.27	0.19	0.12	0.20	0.20
fc 23	0.40	0.29	0.40	0.06	-0.03	-0.08	0.06	0.14	0.41	0.28	0.44	0.31	0.33	0.44	0.44
fc 24	0.36	0.26	0.30	0.12	-0.01	-0.08	0.12	0.17	0.16	0.09	0.17	0.09	0.24	0.18	0.07
fc 25	0.07	0.23	0.22	0.08	-0.09	-0.09	0.00	0.03	0.20	0.12	0.28	0.04	0.14	0.37	0.26
fc 26	-0.24	0.15	-0.05	0.09	-0.20	-0.29	0.10	0.12	-0.17	-0.10	0.03	-0.23	0.09	0.01	0.01
fc 27	0.02	0.20	0.18	0.10	-0.25	-0.32	0.05	0.03	-0.04	0.09	0.11	0.11	0.07	0.07	-0.16
fc 28	0.03	0.00	-0.07	-0.01	-0.05	-0.04	-0.02	-0.02	0.07	0.01	0.01	0.01	-0.02	0.02	-0.07
fc 29	0.06	0.03	-0.04	-0.01	-0.05	-0.04	-0.04	-0.03	0.09	0.04	0.04	0.03	0.02	0.04	-0.04

[0293] 表 16 续

[0294]

	fc 16	fc 17	fc 18	fc 19	fc 20	fc 21	fc 22	fc 23	fc 24	fc 25	fc 26	fc 27	fc 28	fc 29
fc 1	0.08	0.41	0.04	0.06	0.16	0.06	0.16	0.40	0.36	0.07	-0.24	0.02	0.03	0.06
fc 2	0.47	0.31	0.27	0.13	0.32	0.25	0.29	0.29	0.26	0.23	0.15	0.20	0.00	0.03
fc 3	0.12	0.38	0.04	0.04	0.18	0.05	0.19	0.40	0.30	0.22	-0.05	0.18	-0.07	-0.04
fc 4	0.27	0.00	0.06	0.08	0.07	0.12	0.13	0.05	0.12	0.08	0.09	0.10	-0.01	-0.01
fc 5	-0.01	-0.06	-0.02	0.04	-0.10	0.00	-0.07	-0.03	-0.01	-0.09	-0.20	-0.25	-0.05	-0.05
fc 6	-0.07	-0.09	-0.02	0.01	-0.12	-0.02	-0.11	-0.08	-0.08	-0.09	-0.29	-0.32	-0.04	-0.04
fc 7	0.11	0.03	0.03	0.07	0.03	0.05	0.07	0.06	0.12	0.00	0.10	0.05	-0.02	-0.04
fc 8	0.10	0.09	0.16	0.09	0.17	0.20	0.22	0.14	0.17	0.03	0.12	0.03	-0.02	-0.03
fc 9	0.15	0.34	0.06	0.10	0.12	0.11	0.17	0.41	0.15	0.20	-0.17	-0.04	0.07	0.09
fc 10	0.11	0.26	-0.06	-0.06	0.04	-0.05	0.04	0.28	0.09	0.12	-0.10	0.09	0.01	0.04
fc 11	0.52	0.37	0.21	0.15	0.25	0.22	0.27	0.44	0.17	0.28	0.03	0.11	0.01	0.04
fc 12	0.07	0.28	0.13	-0.07	0.17	0.14	0.19	0.31	0.09	0.04	-0.23	0.11	0.01	0.03
fc 13	0.20	0.32	0.08	0.19	0.14	0.10	0.12	0.33	0.24	0.14	0.09	0.07	-0.02	0.02
fc 14	0.23	0.38	0.07	0.11	0.16	0.10	0.20	0.44	0.18	0.37	0.01	0.07	0.02	0.04
fc 15	0.07	0.44	0.12	-0.01	0.24	0.09	0.20	0.44	0.07	0.26	0.01	-0.16	-0.07	-0.04
fc 16	1.00	0.06	0.30	0.05	0.18	0.19	0.08	-0.01	-0.02	0.06	0.11	0.16	0.39	0.41
fc 17	0.06	1.00	0.43	0.04	0.77	0.33	0.60	0.84	0.34	0.24	0.15	0.24	-0.22	-0.18

fc 18	0.30	0.43	1.00	0.16	0.82	0.90	0.74	0.40	0.13	-0.01	0.07	0.11	-0.10	-0.09
fc 19	0.05	0.04	0.16	1.00	0.11	0.42	0.39	0.42	0.41	-0.02	0.12	0.15	0.05	0.08
fc 20	0.18	0.77	0.82	0.11	1.00	0.72	0.87	0.67	0.28	0.03	0.22	0.20	-0.21	-0.18
fc 21	0.19	0.33	0.90	0.42	0.72	1.00	0.86	0.50	0.25	0.01	0.06	0.09	-0.06	-0.05
fc 22	0.06	0.60	0.74	0.39	0.87	0.86	1.00	0.77	0.38	0.05	0.19	0.18	-0.16	-0.13
fc 23	-0.01	0.84	0.40	0.42	0.67	0.50	0.77	1.00	0.46	0.20	0.14	0.24	-0.18	-0.14
fc 24	-0.02	0.34	0.13	0.41	0.28	0.25	0.38	0.46	1.00	0.15	0.22	0.37	0.08	0.13
fc 25	0.06	0.24	-0.01	-0.02	0.03	0.01	0.05	0.20	0.15	1.00	0.05	0.16	0.03	0.03
fc 26	0.11	0.15	0.07	0.12	0.22	0.06	0.19	0.14	0.22	0.05	1.00	0.20	-0.17	-0.14
fc 27	0.16	0.24	0.11	0.15	0.20	0.09	0.18	0.24	0.37	0.16	0.20	1.00	0.05	0.09
fc 28	0.39	-0.22	-0.10	0.05	-0.21	-0.06	-0.16	-0.18	0.08	0.03	-0.17	0.05	1.00	0.98
fc 29	0.41	-0.18	-0.09	0.08	-0.18	-0.05	-0.13	-0.14	0.13	0.03	-0.14	0.09	0.98	1.00

[0295] 表 17 关联矩阵的特征值,以及对所选择的流式细胞变量的相关统计 (fc24-fc29)

[0296]

PC	特征值	总方差的 百分数%	累积特征值	累积方差%
1	2.06	34.26	2.06	34.26
2	1.60	26.64	3.65	60.90
3	0.94	15.71	4.60	76.60
4	0.76	12.70	5.36	89.31
5	0.63	10.45	5.99	99.76
6	0.01	0.24	6.00	100.00

[0297] 表 18 所选择的流式细胞数据对每个 PC 的负荷 (与显示 95% CL 的特征值 > 0.5 相关)

[0298]

	PC1	PC2	PC3
fc 24	-0.23	-0.72	-0.13
fc 25	-0.10	-0.40	0.87
fc 26	0.20	-0.60	-0.39
fc 27	-0.19	-0.72	-0.06

fc 28	-0.98	0.14	-0.05
fc 29	-0.98	0.09	-0.08

[0299] 表 19 关联矩阵的特征值,以及对 RT-PCR 数据的相关统计

[0300]

PC	特征值	总方差的 百分数%	累积特征值	累积方差%
1	2.9	41.0	2.9	41.0
2	1.2	17.6	4.1	58.6
3	1.0	14.4	5.1	73.0
4	0.6	8.3	5.7	81.3
5	0.6	7.9	6.2	89.2
6	0.4	6.2	6.7	95.4
7	0.3	4.6	7.0	100.0

[0301] 表 20RT-PCR 数据对每个 PC 的负荷 (与显示 95% CL 的特征值 > 0.5 相关)

[0302]

	PC1	PC2	PC3
Fas-L	0.68	-0.01	0.340
MCP-1	0.71	-0.38	-0.27
TNF-alpha	0.77	0.21	-0.25
IL-1	0.37	0.64	0.56
IL-6	0.72	-0.22	-0.20
IL-8	0.70	-0.28	0.389
IL-10	0.34	0.698	-0.48*

[0303] ● 95% CL 的临界显著性

[0304] 表 21 关联矩阵的特征值,以及对组合的临床、RT-PCR 和流式细胞变量的相关统计

[0305]

	特征值	总方差的 百分数%	累积特征值	累积%
1	4.550	15.167	4.550	15.167
2	3.861	12.870	8.411	28.037
3	3.295	10.982	11.706	39.019
4	2.028	6.760	13.734	45.779
5	1.816	6.052	15.549	51.831
6	1.520	5.065	17.069	56.896
7	1.234	4.113	18.303	61.010
8	1.153	3.844	19.456	64.854
9	1.139	3.797	20.595	68.650
10	0.958	3.192	21.553	71.842
11	0.931	3.104	22.484	74.946
12	0.906	3.021	23.390	77.968
13	0.825	2.748	24.215	80.716
14	0.740	2.466	24.955	83.182
15	0.685	2.284	25.640	85.466
16	0.611	2.036	26.251	87.502
17	0.559	1.863	26.810	89.365
18	0.542	1.808	27.352	91.173
19	0.480	1.601	27.832	92.774

[0306] 表 21 续

[0307]

20	0.441	1.469	28.273	94.244
21	0.371	1.235	28.644	95.479
22	0.333	1.108	28.976	96.588
23	0.299	0.998	29.276	97.586
24	0.250	0.833	29.526	98.419
25	0.175	0.585	29.701	99.003
26	0.139	0.462	29.840	99.465
27	0.114	0.381	29.954	99.846
28	0.020	0.068	29.974	99.914
29	0.018	0.059	29.992	99.973
30	0.008	0.027	30.000	100.000

[0308] 表 22 组合的临床、RT-PCR 和流式细胞数据对每个 PC 的负荷（与显示 95% CL 的特征值 > 0.5 相关）

[0309]

参数	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8	PC9
CD31 (%)	-0.02	-0.03	0.42	0.18	0.52	-0.07	-0.40	-0.17	0.03
CD54 (%)	-0.16	0.04	0.20	-0.09	0.48	0.48	0.06	0.18	-0.19
CD62L (%)	-0.41	-0.09	0.20	0.28	0.16	-0.21	0.01	-0.01	0.39
CD11B (%)	-0.13	-0.16	0.22	0.19	0.54	-0.13	-0.09	-0.19	0.05
CD69 (%)	0.49	-0.55	0.23	-0.27	0.13	-0.16	0.00	0.40	-0.25
CD11B CD69 (%)	0.48	-0.53	0.29	-0.27	0.14	-0.16	-0.03	0.40	-0.22
体温	0.20	0.06	0.30	-0.35	-0.02	0.37	0.47	0.17	0.30
HR	0.15	-0.12	0.13	-0.35	0.20	0.65	-0.03	-0.32	0.00
MAP	0.19	0.19	-0.15	0.10	-0.44	0.31	-0.30	0.04	-0.35
WCC	0.57	-0.64	0.14	0.38	0.01	0.06	0.02	-0.08	0.08
嗜中性粒细胞	0.53	-0.64	0.21	0.38	-0.01	-0.05	0.00	-0.06	0.12
淋巴细胞	0.31	-0.10	-0.32	0.01	-0.02	0.09	-0.06	-0.30	-0.28
单核细胞	0.56	-0.61	0.04	0.25	-0.04	0.19	0.06	-0.04	0.09
血小板	0.49	-0.02	-0.31	0.29	0.01	-0.15	0.26	0.04	-0.01
NR	-0.21	-0.71	0.09	0.10	-0.25	0.21	-0.24	-0.12	-0.04

APTR	-0.50	-0.49	-0.04	0.07	-0.33	0.11	-0.22	-0.08	-0.08
CRP	-0.07	-0.09	0.26	-0.63	0.14	-0.32	-0.23	-0.18	0.02
P02	-0.23	0.13	-0.10	0.18	0.45	-0.10	0.14	-0.12	-0.49
HC03-	0.79	0.32	-0.07	-0.25	-0.03	-0.12	-0.21	-0.06	0.01
BXS	0.80	0.33	-0.07	-0.24	-0.04	-0.11	-0.22	-0.08	0.03
乳酸	-0.50	-0.41	-0.02	-0.15	0.03	0.06	0.22	0.08	-0.08
尿素	-0.25	-0.15	0.21	-0.12	-0.24	-0.32	0.16	-0.08	-0.19
肌酐	-0.68	-0.45	0.16	-0.06	-0.15	-0.04	-0.03	0.10	-0.18
Fas-L	-0.05	0.12	0.77	-0.08	0.01	0.11	-0.16	-0.05	-0.05
MCP-1	0.12	0.19	0.61	0.07	-0.36	-0.09	0.20	-0.32	-0.13
TNF-alpha	0.14	0.49	0.57	0.32	0.01	0.24	0.13	0.05	-0.12
IL-1	-0.22	0.28	0.20	0.20	-0.12	0.11	-0.45	0.49	0.16
IL-6	0.07	0.19	0.66	0.15	-0.15	-0.20	0.20	-0.05	-0.25
IL-8	0.02	0.16	0.73	-0.05	-0.27	-0.04	-0.03	-0.01	0.16
IL-10	0.14	0.44	0.02	0.51	0.09	0.03	-0.05	0.21	-0.19

[0310] 表 23 所有 DFA 模型中使用的模型定义

[0311]

参数	值
引入变量	前向逐步
容许度	0.010
模型中包括的项	衍生
进入 F	1.00
除去 F	0.00
步骤数量	显著的

[0312] 表 24 基于含有替代均值的临床数据的 PCA 得分的 DFA 模型总结

[0313]

参数		值/项		
Wilks' λ		< 0.40		
模型中包括的变量		PC1, PC3, PC4		
χ^2		3个显著的DF		
累积比例		DF1	DF2	DF3
		56.7%	79.3%	89.9%
特征值		0.60	0.24	0.11
因子结构	PC1	0.63	0.02	0.15
	PC3	0.09	-0.87	0.39
	PC4	0.44	0.03	-0.51
标化等数	PC1	0.78	0.02	0.13
	PC3	0.12	-0.89	0.35
	PC4	0.61	0.04	-0.48
典型变量的均值	对照	-0.15	0.63	0.04
	第1天	0.51	-0.39	0.02
	第2天	0.57	-0.17	-0.64
	第3天	0.72	0.02	0.35
	第4天	0.21	0.02	0.43
	第5天	-1.80	-0.01	-0.28
	第6天	-1.33	-1.14	0.37

[0314] 表 25 基于含有替代均值的临床数据的 PCA 得分的判别 DFA 模型中变量组合的总结

[0315]

DF	PC	每个 PC 的组分
1	1	WCC, 单核细胞, 嗜中性粒细胞和血小板, BXS 和 HCO_3^- 与肌酐和乳酸负相关
	4	CRP
2	3	HR 和 CRP
3	4	CRP

[0316] 表 26 基于含有替代均值的临床数据的 PCA 得分的 DFA 模型的分类型矩阵

组	正确 百分数	对照 p=.28	1天 p=.23	2天 p=.14	3天 p=.08	4天 p=.11	5天 p=.09	6天 p=.05
对照	80	24	4	0	1	0	0	1
1天	36	12	9	3	0	0	0	1
2天	40	5	2	6	0	1	0	1
3天	11	1	5	1	1	1	0	0
4天	8	7	3	0	0	1	1	0
5天	50	2	2	0	0	0	5	1
6天	83	1	0	0	0	0	0	5
总计	48	52	25	10	2	3	6	9

[0318] 表 27 基于不含替代均值的临床数据的 PCA 得分的 DFA 模型的总结

参数		值/项		
Wilks' λ		< 0.45		
模型中包含的变量		PC1, PC3, PC5		
χ^2		3个显著的DF		
累积比例		DF1	DF2	DF3
		52%	89%	95%
特征值		0.49	0.35	0.05
因子结构	PC1	0.65	0.09	0.08
	PC3	-0.13	0.80	0.45
	PC5	-0.61	-0.32	-0.07
标化系数	PC1	0.79	0.10	0.06
	PC3	-0.15	0.87	0.38
	PC5	-0.73	-0.34	-0.06
典型变量的均值	对照	-0.18	0.56	-0.10
	第1天	0.54	-0.59	0.07
	第2天	0.45	-0.14	0.36
	第3天	0.81	0.40	-0.19
	第4天	0.22	-0.05	-0.27
	第5天	-1.61	-0.00	0.33
	第6天	-1.40	-1.90	-0.59

[0320] 表 28 基于不含替代均值的临床数据的 PCA 得分的判别 DFA 模型中变量组合的总结

[0321]

DF	PC	每个 PC 的组分
1	1	WCC, 单核细胞, 嗜中性粒细胞和血小板, BXS 和 HCO_3^- 与肌酐和乳酸负相关
	4	PO_2 与尿素和 MAP 相反
2	3	HR 和 CRP
3	4	CRP

[0322] 表 29 基于不含替代均值的临床数据的 PCA 得分的 DFA 模型的分类矩阵

[0323]

组	正确 百分率	对照 p=.34	1天 p=.21	2天 p=.13	3天 p=.06	4天 p=.10	5天 p=.09	6天 p=.03
对照	83	25	2	1	1	0	1	0
1天	47	9	9	1	0	0	0	0
2天	0	6	6	0	0	0	0	0
3天	0	3	3	0	0	0	0	0
4天	0	5	3	0	0	0	1	0
5天	25	4	2	0	0	0	2	0
6天	67	0	0	0	0	0	1	2
总计	44	52	25	2	1	0	5	2

[0324] 表 30 基于含有替代均值的经转换的临床数据的 DFA 模型的总结

[0325]

参数		值/项				
Wilks' λ		0.25				
模型中包括的变量		BXS, CRP, lactate, urea, temperature, creatinine, neut, PO ₂ , HCO ₃ ⁻				
χ^2		5个显著DF				
累积比例		DF1	DF2	DF3	DF4	DF5
		46%	74%	85%	94%	99%
特征值		0.78	0.47	0.18	0.15	0.09
因子结构	BXS	-0.62	0.58	-0.09	0.21	0.22
	CRP	0.12	0.63	0.16	-0.03	-0.31
	体温	0.17	0.03	-0.56	0.62	0.11
	乳酸	0.65	0.03	0.05	0.05	0.01
	尿素	-0.19	-0.18	-0.19	0.17	-0.57
	肌酐	0.42	-0.26	0.51	0.20	-0.19
	HCO ₃ ⁻	-0.54	0.67	-0.13	0.19	0.16
	PO ₂	0.16	-0.05	-0.04	-0.67	-0.31
	嗜中性粒细胞	-0.14	0.05	-0.24	-0.18	0.70
标化系数	BXS	-1.45	-0.78	0.84	0.09	1.00
	CRP	0.13	0.65	0.07	-0.20	-0.20
	体温	0.41	-0.02	-0.64	0.53	0.02
	乳酸	0.56	0.34	-0.22	-0.01	0.21
	尿素	-0.52	-0.22	-0.51	0.09	-0.60
	肌酐	0.13	-0.11	0.93	0.57	0.10
	HCO ₃ ⁻	1.02	1.45	-0.53	0.32	-0.88
	PO ₂	0.19	0.07	-0.28	-0.61	-0.21
	嗜中性粒细胞	-0.10	0.01	-0.30	-0.32	0.67
典型变量的均值	对照	-0.54	-0.90	-0.10	-0.14	-0.07
	第1天	-0.22	0.53	-0.35	-0.03	0.40
	第2天	-0.19	0.84	0.20	-0.58	-0.36
	第3天	-0.42	0.64	0.41	0.62	-0.28
	第4天	-0.34	-0.09	0.43	0.61	0.06
	第5天	2.05	-0.37	0.61	-0.23	0.27
	第6天	1.95	0.03	-1.05	0.47	-0.54

[0326] 表 31 基于含有替代均值的临床数据的 DFA 模型中变量组合的总结

[0327]

DF	确定 DF 的临床变量
1	与乳酸呈负相关的 BXS 和 HCO ₃ ⁻
2	BXS, CRP 和 HCO ₃ ⁻ 之间相关
3	体温和肌酐呈负相关
4	体温和 PO ₂ 呈负相关
5	尿素和嗜中性粒细胞呈负相关

[0328] 表 32 基于含有替代均值的临床数据的 DFA 模型的分类型矩阵

[0329]

组	正确 百分数	对照 p=.28	1天 p=.23	2天 p=.14	3天 p=.08	4天 p=.11	5天 p=.09	6天 p=.05
对照	80	24	5	1	0	0	0	0
1天	56	4	14	5	0	1	0	1
2天	60	2	2	9	1	0	0	1
3天	11	1	4	2	1	1	0	0
4天	8	7	4	0	0	1	0	0
5天	50	1	2	1	0	0	5	1
6天	83	0	0	0	0	0	1	5
总计	55	39	31	18	2	3	6	8

[0330] 表 33 基于含有替代均值的流式细胞数据的 PCA 得分的 DFA 模型的总结

[0331]

参数		值/项	
Wilks' λ		< 0.39	
模型中包括变量		PC1, PC5, PC8	
χ^2		2个显著的DF	
累积比例		DF1	DF2
		46 %	71 %
特征值		0.49	0.26
因子结构	PC1	0.30	-0.04
	PC5	-0.19	-0.59
	PC8	0.419	-0.14
标化系数	PC1	0.40	-0.04
	PC5	-0.25	-0.67
	PC8	0.56	-0.16
典型变量的均值	对照	-0.21	-0.35
	第1天	-0.71	-0.12
	第2天	-0.24	0.16
	第3天	0.14	1.44
	第4天	0.48	0.32
	第5天	0.88	-0.28
	第6天	1.99	-0.43

[0332] 表 34 基于含有替代均值的流式细胞数据的 PCA 得分的 DFA 模型中变量组合的总结

[0333]

DF	PC	每个DF的组分
1	1	fc 1-3, 9-15, 17, 20-23
	8	fc 19
2	5	fc 7 + 26

[0334] 表 35 基于含有替代均值的流式细胞数据的 PCA 得分的 DFA 模型的分矩阵

[0335]

组	正确 百分数	对照 p=.28	1天 p=.23	2天 p=.14	3天 p=.08	4天 p=.11	5天 p=.09	6天 p=.05
对照	66.6	20	7	0	1	0	1	1
1天	36.0	12	9	2	0	0	2	0
2天	13.3	4	8	2	1	0	0	0
3天	44.4	2	2	0	4	0	1	0
4天	33.3	3	2	1	0	4	1	1
5天	40.0	4	1	0	0	0	4	1
6天	66.6	1	1	0	0	0	0	4
总计	43.9	46	30	5	6	4	9	7

[0336] 表 36 基于含有替代均值的流式细胞数据的 DFA 模型的总结

[0337]

参数		值/项		
Wilks' λ		< 0.034		
模型中包括的变量		fc7-8, fc11, fc16, fc25, fc28, fc29		
χ^2		3个显著的DF		
累积比例		DF1	DF2	DF3
		46%	62%	74%
特征值		2.17	0.94	0.63
因子结构	fc7	0.06	-0.16	-0.10
	fc8	-0.06	-0.19	-0.07
	fc11	0.02	0.13	-0.24
	fc16	0.05	-0.14	0.14
	fc25	-0.34	-0.23	-0.08
	fc28	0.04	-0.02	0.02
	fc29	0.06	-0.03	0.01
标化系数	fc7	1.84	0.20	-1.03
	fc8	-1.66	-1.00	0.32
	fc11	0.87	1.89	-1.18
	fc16	-0.73	-1.33	0.80
	fc25	-0.86	-0.29	0.02
	fc28	-2.34	0.65	0.29
	fc29	2.64	0.12	-0.66
典型变量的均值	对照	0.50	-0.92	-0.40
	第1天	1.07	-0.32	0.12
	第2天	0.22	0.07	1.10
	第3天	0.20	1.75	1.26
	第4天	-0.39	1.49	-1.34
	第5天	-1.05	0.73	-0.55
	第6天	-5.27	-1.06	0.48

[0338] 表 37 基于含有替代均值的流式细胞数据的 DFA 模型中变量组合的总结

[0339]

DF	限定 DF 的临床变量
1	fc7, 16, 28 和 29 相关, 这些与 fc8 和 25 相反
2	fc7, 8, 16 和 25 相关, 这些与 fc12 相反
3	与 fc11 相关

[0340] 表 38 基于含有替代均值的临床数据的 DFA 模型的分类型矩阵

[0341]

组	正确 百分数	对照 p=.28	1天 p=.23	2天 p=.14	3天 p=.08	4天 p=.11	5天 p=.09	6天 p=.05
对照	80.0	24.0	2.0	0.0	1.0	2.0	1.0	0.0
1天	68.0	6.0	17.0	1.0	0.0	1.0	0.0	0.0
2天	73.3	3.0	1.0	11.0	0.0	0.0	0.0	0.0
3天	66.7	2.0	0.0	0.0	6.0	1.0	0.0	0.0
4天	91.7	1.0	0.0	0.0	0.0	11.0	0.0	0.0
5天	80.0	0.0	1.0	1.0	0.0	0.0	8.0	0.0
6天	83.3	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	5.0
总计	76.6	36.0	21.0	13.0	7.0	16.0	9.0	5.0

[0342] 表 39 基于组合的临床、RT-PCR 和流式细胞变量的 DFA 模型的总结

[0343]

参数		值/项			
Wilks' λ		< 0.0087			
模型中包括的变量		fc7-8, fc11, fc16, fc25, fc28, fc29			
χ^2		3个显著的DF			
累积比例		DF1	DF2	DF3	DF4
		44%	63%	79%	89%
特征值		3.79	1.60	1.34	0.86
因子结构	BXS	-0.30	0.08	-0.26	0.17
	fc 25	0.22	-0.23	-0.08	0.13
	fc 22	0.22	-0.03	0.08	0.28
	fc 11	-0.02	0.12	0.05	0.23
	体温	0.09	-0.11	-0.13	0.20
	CRP	0.01	0.16	-0.33	-0.16
	fc 18	0.15	0.01	-0.12	0.06
	fc 6	-0.03	0.01	-0.02	0.12
	IL-6	-0.11	-0.06	0.11	-0.07
	INR	0.00	0.06	0.03	0.12
	APTR	0.15	0.12	0.30	-0.03
	fc 16	-0.07	-0.09	-0.11	-0.07
	尿素	-0.02	-0.10	0.01	0.17
	乳酸	0.25	0.04	-0.05	-0.22
	Fas-L	0.00	0.15	-0.03	0.04
	fc 13	-0.04	-0.01	-0.07	0.11
	fc 24	0.00	-0.15	0.11	0.15
	fc 1	-0.01	0.12	-0.12	0.22
	fc 3	-0.02	0.04	-0.02	0.15
	MCP-1	-0.06	0.04	0.02	-0.02
	fc 28	-0.05	-0.03	-0.08	-0.01
	IL-10	0.01	-0.10	0.09	-0.07

[0344] 表 39 续. 基于组合的临床、RT-PCR 和流式细胞变量的 DFA 模型的总结

	fc 27	0.01	-0.12	0.08	-0.02
	fc 26	0.04	-0.10	0.19	-0.06
	嗜中性粒细胞	-0.11	-0.07	0.03	-0.04
	fc 14	0.00	0.09	0.08	0.19
	WCC	-0.10	-0.08	0.03	-0.01
	fc 29	-0.07	-0.04	-0.08	0.03
	血小板	-0.11	0.04	0.12	-0.03
	PO2	0.05	-0.07	0.03	-0.27
参数		值/项			
累积比例		DF1	DF2	DF3	DF4
		44%	63%	79%	89%
特征值		3.79	1.60	1.34	0.86
标化系数	BXS	-0.80	0.33	-0.21	-0.09
	fc 25	0.81	-0.52	-0.29	0.22
	fc 22	0.46	-0.58	0.05	0.68
	fc 11	0.04	2.00	0.53	0.96
	体温	0.51	-0.41	-0.07	0.23
	CRP	0.07	0.14	-0.58	-0.13
	fc 18	0.64	0.72	-0.53	-0.11
	fc 6	0.02	-0.29	0.17	0.08
	IL-6	-0.69	-0.36	0.28	-0.12
	INR	-0.90	0.03	-0.99	0.94
	APTR	0.82	0.62	1.28	-0.44
	fc 16	-0.63	-1.23	-0.54	-0.69
	尿素	-0.13	-0.38	0.06	0.58
	乳酸	0.14	0.12	-0.06	-0.68
	Fas-L	0.20	0.92	-0.04	0.05
	fc 13	-0.27	-0.82	-0.33	-0.07
	fc 24	-0.46	-0.72	0.11	0.15
	fc 1	1.04	0.84	0.09	0.12
	fc 3	-0.67	-0.46	-0.41	0.06
	MCP-1	0.33	0.01	-0.21	-0.05
	fc 28	3.20	0.89	-2.48	-0.21
	IL-10	0.22	-0.03	0.26	-0.16
	fc 27	0.12	0.14	0.23	-0.13
	fc 26	0.15	0.26	0.27	-0.01
	嗜中性粒细胞	0.83	0.74	0.27	-1.34
	fc 14	-0.43	-0.73	0.32	-0.88
	WCC	-0.70	-1.06	0.05	0.77
	fc 29	-2.73	-0.34	2.71	0.56
	血小板	-0.47	-0.06	0.33	0.27
	PO2	-0.17	-0.12	0.20	-0.45
典型变量的均值	对照	-0.39	-1.04	1.24	0.23
	第1天	-1.80	-0.51	-0.50	-0.19
	第2天	-0.65	0.70	-1.16	-1.17
	第3天	-0.40	1.12	-1.19	0.45
	第4天	0.38	2.02	0.20	1.77
	第5天	3.33	1.36	1.41	-1.45
	第6天	5.37	-2.44	-2.21	0.76

[0346] 表 40 基于组合的临床、RT-PCR 和流式细胞变量的 DFA 模型的分类矩阵

[0347]

组	正确 百分数	对照 p=.28	1天 p=.23	2天 p=.14	3天 p=.08	4天 p=.11	5天 p=.09	6天 p=.05
对照	90.0	27.0	0.0	1.0	1.0	1.0	0.0	0.0
1天	76.0	3.0	19.0	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0
2天	93.3	0.0	1.0	14.0	0.0	0.0	0.0	0.0
3天	77.8	1.0	0.0	1.0	7.0	0.0	0.0	0.0
4天	91.7	0.0	0.0	1.0	0.0	11.0	0.0	0.0
5天	90.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	9.0	0.0
6天	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	6.0
总计	86.9	31.0	20.0	21.0	8.0	12.0	9.0	6.0

[0348] 例 7:二元 logistic 回归分析以预测败血症

[0349] 采用二元 logistic 回归模型以单独分析来自发展为败血症和呈现阳性微生物结果的 ICU 患者的 RT-PCR、流式细胞结果和临床数据。该模型采用由年龄匹配的、没有诊断为败血症的作为对照组的 ICU 患者获得的结果。尽管该模型确定了大量的可能预测物,但是某些预测物似乎具有有限的用途,其原因在于,对有症状之前的败血症患者所获得的值在非败血症患者所获得的值的范围内。表 36 中列出了确实产生某些不同于非败血症数据的败血症前数据点的潜在预测标记物。然而,一旦组合,这些预测标记物仅仅从 24 个前败血症患者中确定 8 个。

[0350] 表 41 通过二元 logistic 回归分析确定的潜在预测标记物的总结

[0351]

时间点	总的预测效果	预测物	概率得分
诊断前 5 天	p=0.10	碱过剩	p=0.047
诊断前 4 天	p=0.042	IL-10	p=0.058
诊断前 3 天	p=0.095	血液碳酸氢盐	p=0.021
	p=0.114	CD 31	p = 0.037
	p=0.055	IL-10	p=0.052
诊断前 2 天	p=0.10	血液碳酸氢盐	p=0.017
		C反应蛋白	p=0.038
	P=0.085	TNF- α	p=0.022

[0352] 发现可以从 24 名稍后发展成为具有明确感染的 SIRS 的患者中预测出 8 个败血症的标记物组合并没有构成诊断检测。尽管粒细胞上的 CD31 的预测能力看上出有希望(66%),但是该标记物仅仅在表现出临床症状前 3 天有效。仅仅基于 CD31 的检验不能构成诊断检测,其原因是,如果有效,需要更大的诊断窗口。其可以通过发现更多的标记物来实现。然而,该研究可能已经发现,某些标记物可以在以后构成诊断检测的一部分,但是应当谨慎。在 20 世纪八十年代中期,HLA-DR 被认为可以预测感染和败血症的发生 (Spilltler, A. & Roth, E. 2003, Intensive Care Med, 第 29 卷, 第 1211-1213 页)。然而,近来的研究显示,该标记物的手术后水平不能预测 SIRS、败血症或感染并发症的发生 (Oczenski, W 等 2003, Intensive Care Med, 第 29 卷, 第 1253-1257 页, 以及 Perry, S 等 2003, Intensive Care Med, 第 29 卷, 第 1245-1252 页)。就 HLA-DR 而出现的所述相矛盾的报告显示为什么应谨慎使用本研究的结果。这些发现可能是由于区域因素,例如抗生素政策、诊断标准、临床实践、外科方法、治疗方案、环境因素以及患者的嗜好因素 (Angus, D. & Wax, R. 2001, Critical Care Medicine, 第 29 卷, 第 7 期 (增刊), 第 109-116 页)。需要进行涉及来自几个不同医

院、优选分布在不同卫生机构的更多病人的更大研究,以进一步评价确定用于预测败血症的标记物的用处。

[0353] 例 8 :败血症作为对生物武器反应的模型

[0354] 背景和方法

[0355] 由于所要求的发明的一个应用是早期检测由暴露于生物武器所导致的人为感染,因此,调查了败血症作为所述感染的模型的应用。预测假定的生物武器病原例如 *Burkholderia pseudomallei* 和弗朗西斯氏菌属 *tularensis* 产生严重的败血症 (见表 42), 其出于显而易见的原因而难以建模。

[0356] 然而,体外全血感染可以作为模型,并测量活化标记物表达和细胞因子应答。为了将该体外感染模型与体内的情况相比,选择金黄色葡萄球菌感染作为感染物模型,其可以直接与体内医源性感染数据相比。

[0357] 表 42

[0358]

感染	“不良”结果的形式
炭疽	败血症,脓毒性休克
布鲁氏菌病	败血症,脓毒性休克或慢性形式
鼻疽和类鼻疽	败血症,脓毒性休克或持续形式
鼠疫	败血症,脓毒性休克
兔热病	败血症,脓毒性休克
流行性斑疹伤寒	败血症
Q 热	败血症
埃博拉和马尔堡出血热	败血症,脓毒性 (中毒性感染, 血量减少) 休克
日本脑炎	败血症,脓毒性休克
天花	败血症,脓毒性休克
黄热病	败血症

[0359] 来自 25 名健康志愿者的血液在体外用金黄色葡萄球菌感染,在感染后 24 小时和 48 小时如前所述测量以下活化标记物和细胞因子水平。

[0360] FACS

[0361] 树突状细胞 :CD54, CD97, CCR6, CCR7

[0362] NK 细胞 :CD25, CD44, CD62L, CD69, CD97

[0363] 单核细胞 :CD44, CD54, CD62L, CD69, CD97, CD107a

[0364] 嗜中性粒细胞 :CD44, CD62L, CD69, CD107a

[0365] 实时 RT PCR

[0366] IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, MCP-1, TNF- α , sFasL

[0367] 将这些组的输入参数的每一个（即树突状细胞标记物、NK 细胞标记物、单核细胞标记物、嗜中性粒细胞标记物、24 小时的 RT PCR 数据、48 小时的 RT PCR 数据）用于训练其自身的神经网络模型。采用随机选择的感染或非感染血样以用于训练（70%）或接下来的检验（30%）。神经网络分析的检验期基于其正确预测输入参数检验组来自感染或非感染样本的次数百分数而给出预测准确度。每组输入参数的检验重复 5 次。每次进行检验时，采用新的随机选择的 70% 感染和非感染样品构建新的神经网络。根据由 5 个随机输入数据组构建的 5 个神经网络计算得到的 5 个预测准确度，计算其均值，从而对每组输入参数，得到平均预测准确度。该方法类似于在败血症患者研究中所采用的。

[0368] 结果

[0369] 由 RT PCR 结果得到最一致的结果。附图 4 显示了从三个受试者得到的数据，其显示所述轮廓变化的某些不一样的模式。然而，当进行上述的神经网络分析时，所述算法得到良好的感染样品对未感染对照的识别水平（附图 5）。

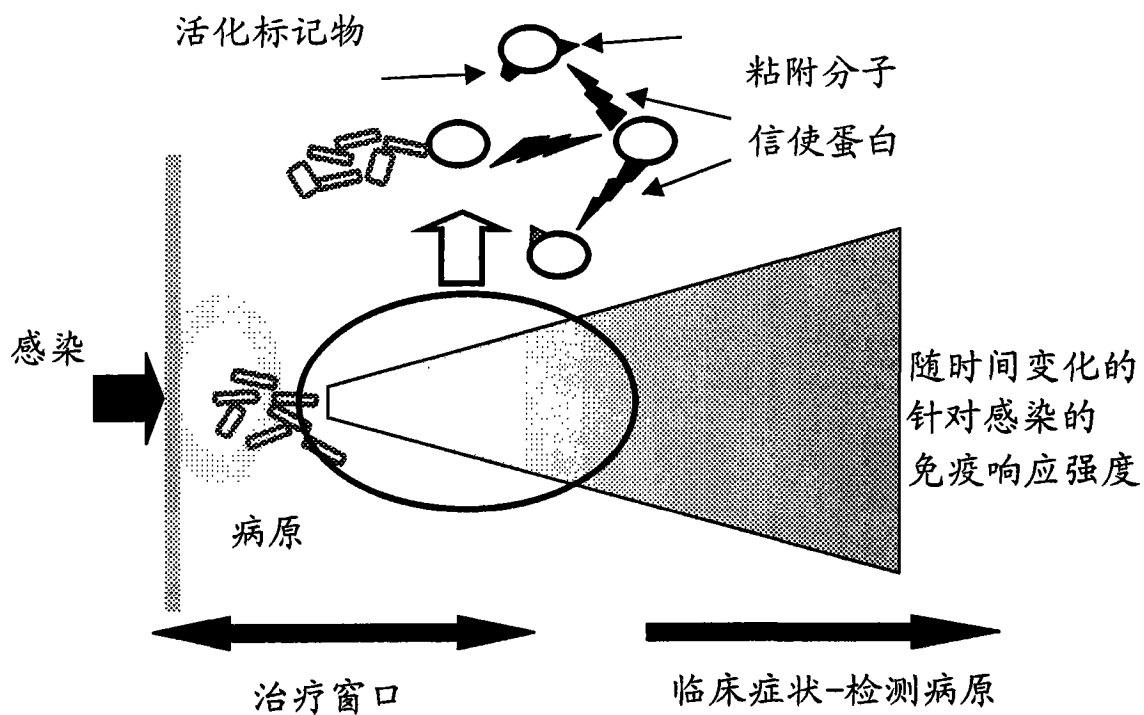


图 1

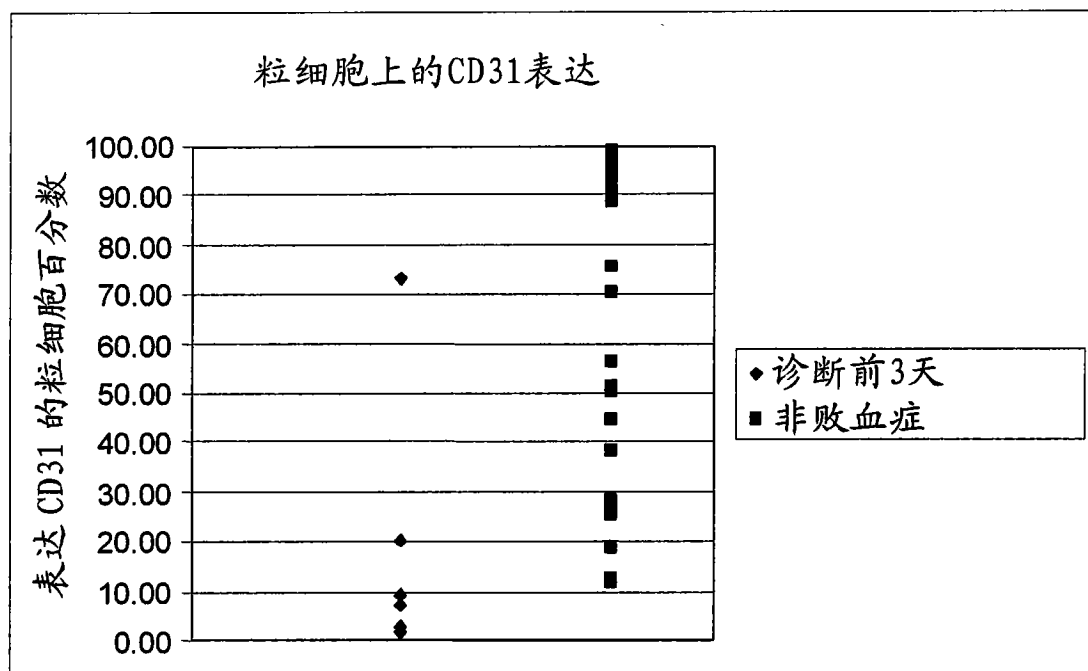


图 2

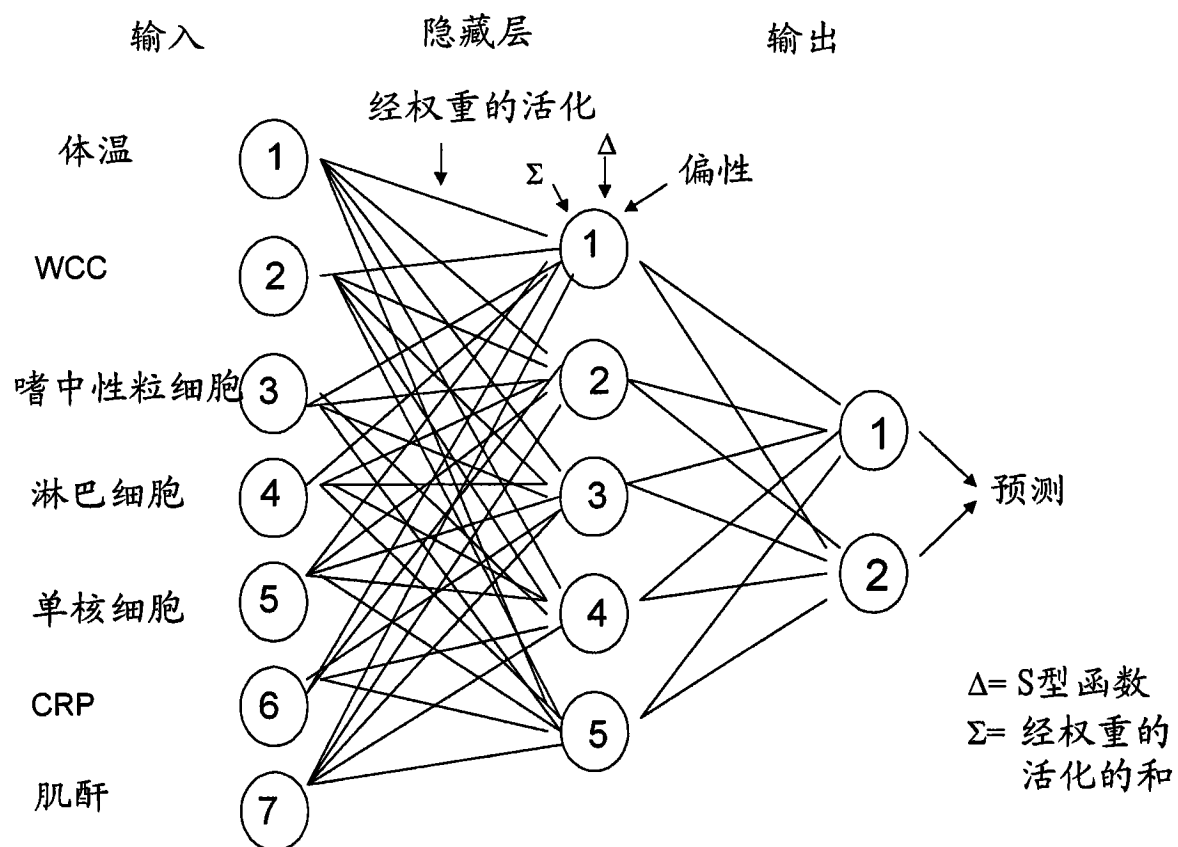


图 3

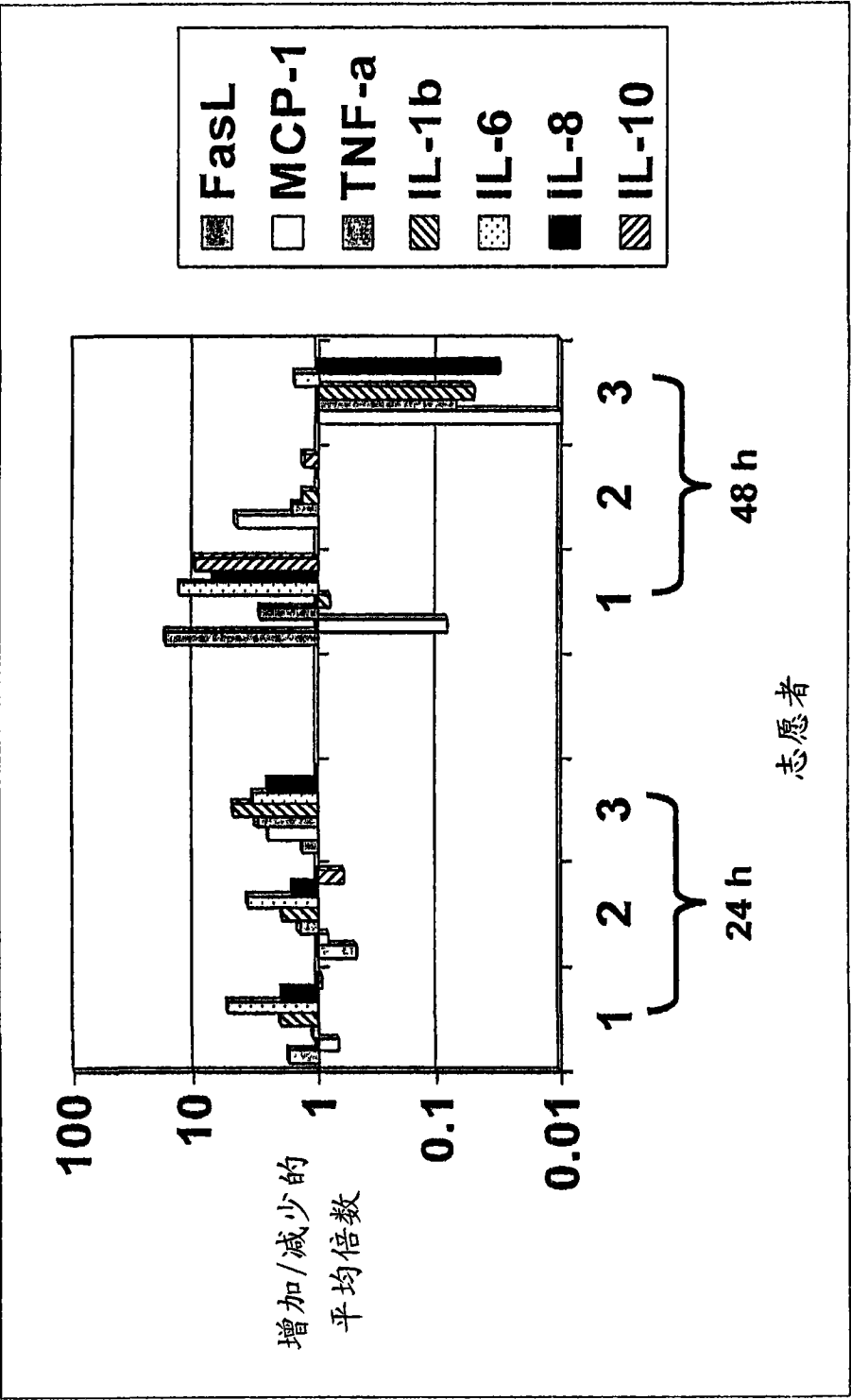


图 4

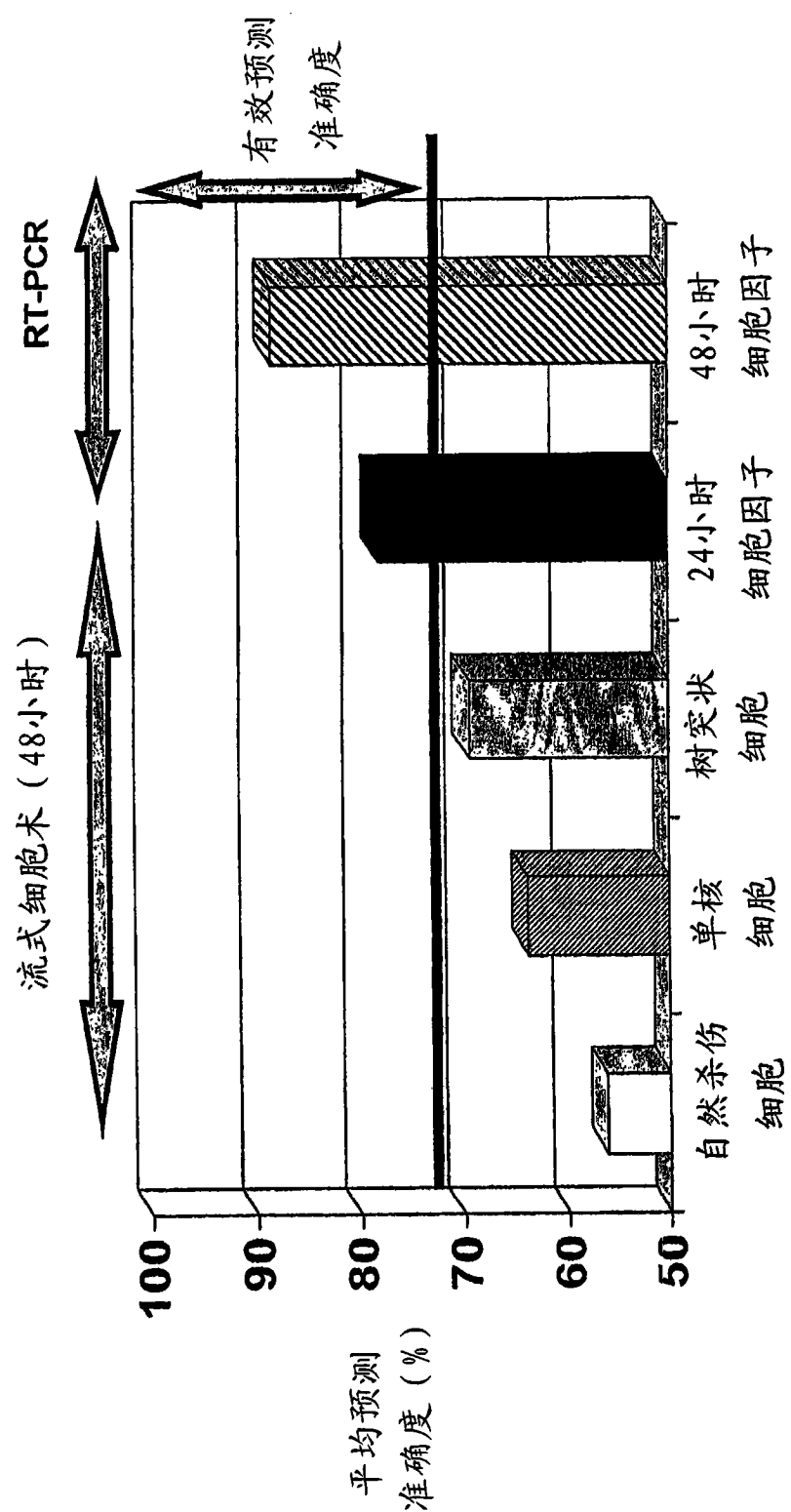


图 5