(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 117242350 A
(43)申请公布日 2023.12.15

(21)申请号 202280032034.1
(22)申请日 2022.04.29
(30)优先权数据
21171496.9 2021.04.30 EP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2023.10.30
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2022/061580 2022.04.29
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2022/229438 EN 2022.11.03
(71)申请人 豪夫迈·罗氏有限公司
地址 瑞士巴塞尔
(72)发明人 F·格鲁内瓦尔德 V·J·R·杰格 M·克莱默 P·舒兹 M·冯霍尔蒂 S·韦伯 H·韦格迈尔 U-H·维恩休斯-泰伦
(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
专利代理师 权陆军 张华
(51)Int.Cl.
G01N 33/68(2006.01)

权利要求书3页 说明书23页

(54)发明名称

用于脓毒症的早期检测的IL6标志物组

(57)摘要

本发明涉及诊断学领域。具体地,本发明涉及用于评定具有疑似感染的受试者的方法,所述方法包括以下步骤:确定在所述受试者的样品中第一生物标志物的量,所述第一生物标志物为IL-6;确定在所述受试者的样品中第二生物标志物的量,其中所述第二生物标志物为肌酸酐或心肌肌钙蛋白;将所述生物标志物的量与所述生物标志物的参考进行比较及/或基于所述生物标志物的量来计算用于评定具有疑似感染的所述受试者的评分;以及基于所述比较和/或所述计算来评定所述受试者。本发明还涉及第一生物标志物和第二生物标志物或者与所述第一生物标志物特异性结合的检测剂和与所述第二生物标志物特异性结合的检测剂用于评定具有疑似感染的受试者的用途,所述第一生物标志物为IL-6,所述第二生物标志物为心肌肌钙蛋白或肌酸酐。此外,本发明进一步涉及一种用于评定具有疑似感染的受试者的计算机实现方法以及用于评定具有疑似感染的受试者的装置和试剂盒。

CN 117242350 A

1.一种用于评定具有疑似感染的受试者的方法,所述方法包括以下步骤:

(a)确定在所述受试者的样品中第一生物标志物的量,所述第一生物标志物为IL6;

(b)确定在所述受试者的样品中第二生物标志物的量,所述第二生物标志物为心肌肌钙蛋白诸如肌钙蛋白T或I或者肌酸酐;

(c)将所述生物标志物的量与所述生物标志物的参考进行比较及/或基于所述生物标志物的量来计算用于评定具有疑似感染的所述受试者的评分;以及

(d)基于在步骤(c)中进行的所述比较和/或所述计算来评定所述受试者。

2.根据权利要求1所述的方法,其中在步骤(b)中

(i)如果确定作为所述第二生物标志物的心肌肌钙蛋白的量,所述方法将进一步包括确定作为第三生物标志物的胆红素、丙氨酸转氨酶、天冬氨酸转氨酶、HAPT(触珠蛋白)或PSP(胰石蛋白)的量;或者

(ii)如果确定作为所述第二生物标志物的肌酸酐的量,所述方法将进一步包括确定作为第三生物标志物的白蛋白、胆红素、丙氨酸转氨酶、天冬氨酸转氨酶、心肌肌钙蛋白、ESM-1或HBP(肝素结合蛋白)的量。

3.根据权利要求1或2所述的方法,其中所述受试者为在急诊科就诊的受试者。

4.根据权利要求1至3中任一项所述的方法,其中所述评定为对发展脓毒症的风险的评定和/或对所述受试者的病况将恶化的风险的评定。

5.根据权利要求1至4中任一项所述的方法,其中所述参考为来源于至少一个已知处于发展脓毒症的风险的受试者的每种生物标志物的参考,优选地其中所述生物标志物中的每一者的量与对应参考基本相同或相似指示受试者处于发展脓毒症的风险,而所述生物标志物中的每一者的量与对应参考不同则指示受试者未处于发展脓毒症的风险,

且/或其中所述参考为来源于至少一个已知未处于发展脓毒症的风险的受试者的每种生物标志物的参考,优选地其中所述生物标志物中的每一者的量与对应参考基本相同或相似指示受试者未处于发展脓毒症的风险,而所述生物标志物中的每一者的量与对应参考不同则指示受试者处于发展脓毒症的风险。

6.根据权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述受试者患有感染或疑似患有感染。

7.根据权利要求1至6中任一项所述的方法,其中所述样品为血液样品或来源于其的样品(诸如血清或血浆样品),且/或其中所述受试者为人。

8.一种用于评定具有疑似感染的受试者的计算机实现方法,所述计算机实现方法包括以下步骤:

(a)接收在所述受试者的样品中第一生物标志物的量的值,所述第一生物标志物为IL6;

(b)接收在所述受试者的样品中第二生物标志物的量的值,所述第二生物标志物为心肌肌钙蛋白或肌酸酐;

(c)将所述生物标志物的量的值与所述生物标志物的参考进行比较及/或基于所述生物标志物的量来计算用于评定具有疑似感染的所述受试者的评分;以及

(d)基于在步骤(c)中进行的所述比较和/或所述计算来评定所述受试者,

其中任选地在步骤(b)中

(i)如果接收作为所述第二生物标志物的肌酸酐的量的值,所述方法将进一步包括接收作为第三生物标志物的白蛋白、胆红素、丙氨酸转氨酶、天冬氨酸转氨酶、心肌肌钙蛋白、ESM-1或HBP(肝素结合蛋白)的量的值;或者

(ii)如果接收作为所述第二生物标志物的心肌肌钙蛋白的量的值,所述方法将进一步包括接收作为第三生物标志物的胆红素、丙氨酸转氨酶、天冬氨酸转氨酶、HAPT(触珠蛋白)或PSP(胰石蛋白)的量的值。

9.一种用于评定具有疑似感染的受试者的装置,所述装置包括:

(a)测量单元,其用于确定在所述受试者的样品中第一生物标志物和第二生物标志物的量,所述第一生物标志物为IL6,所述第二生物标志物为心肌肌钙蛋白或肌酸酐,所述测量单元包括用于所述第一生物标志物和所述第二生物标志物的检测系统;和

(b)评估单元,其可操作地连接到所述测量单元,所述评估单元包括具有所述第一生物标志物和所述第二生物标志物的存储的参考的数据库,优选地,如权利要求1至7中任一项所指定,以及数据处理器,所述数据处理器包括指令,所述指令用于将所述第一生物标志物和所述第二生物标志物的量与参考进行比较及/或用于基于所述生物标志物的量对用于评定具有疑似感染的所述受试者的评分进行计算,优选地,如权利要求1至7中任一项所指定,以及用于基于所述比较来评定所述受试者,所述评估单元能够自动从所述测量单元接收所述生物标志物的量的值。

10.根据权利要求9所述的装置,其中所述测量单元确定并包括用于第三生物标志物的检测系统,并且其中所述数据库包括第三生物标志物的存储的参考,所述第三生物标志物

(i)在肌酸酐为所述第二生物标志物的情况下,为白蛋白、胆红素、丙氨酸转氨酶、天冬氨酸转氨酶、心肌肌钙蛋白、ESM-1或HBP(肝素结合蛋白);或者

(ii)在心肌肌钙蛋白为所述第二生物标志物的情况下,为胆红素、丙氨酸转氨酶、天冬氨酸转氨酶、HAPT(触珠蛋白)或PSP(胰石蛋白)。

11.根据权利要求9或10所述的装置,其中所述检测系统包括至少一种能够特异性检测所述生物标志物中的每一者的检测剂。

12.一种用于评定具有疑似感染的受试者的装置,所述装置包括评估单元,所述评估单元包括具有第一生物标志物和第二生物标志物的存储的参考的数据库,所述第一生物标志物为IL6,所述第二生物标志物为心肌肌钙蛋白或肌酸酐,以及数据处理器,所述数据处理器包括指令,所述指令用于将所述第一生物标志物和所述第二生物标志物的量与参考进行比较,优选地,如权利要求1至8中任一项所指定,以及用于基于所述比较来评定所述受试者,所述评估单元能够接收在所述受试者的样品中确定的所述生物标志物的量的值,其中任选地,所述数据库包括第三生物标志物的存储的参考,所述第三生物标志物

(i)在肌酸酐为所述第二生物标志物的情况下,为白蛋白、胆红素、丙氨酸转氨酶、天冬氨酸转氨酶、心肌肌钙蛋白、ESM-1或HBP(肝素结合蛋白);或者

(ii)在心肌肌钙蛋白为所述第二生物标志物的情况下,为胆红素、丙氨酸转氨酶、天冬氨酸转氨酶、HAPT(触珠蛋白)或PSP(胰石蛋白)。

13.i)第一生物标志物和第二生物标志物,或者ii)与所述第一生物标志物特异性结合的检测剂和/或与所述第二生物标志物特异性结合的检测剂用于评定具有疑似感染的受试者的用途,所述第一生物标志物为IL6,所述第二生物标志物为心肌肌钙蛋白或肌酸酐。

14.根据权利要求13所述的用途,其中另外使用第三生物标志物或与所述第三生物标志物特异性结合的检测剂,所述第三生物标志物

(i)在肌酸酐为所述第二生物标志物的情况下,为白蛋白、胆红素、丙氨酸转氨酶、天冬氨酸转氨酶、心肌肌钙蛋白、ESM-1或HBP(肝素结合蛋白),或者

(ii)在心肌肌钙蛋白为所述第二生物标志物的情况下,为胆红素、丙氨酸转氨酶、天冬氨酸转氨酶、HAPT(触珠蛋白)或PSP(胰石蛋白)。

15.一种用于评定具有疑似感染的受试者的试剂盒,所述试剂盒包括与第一生物标志物特异性结合的检测剂和与第二生物标志物特异性结合的检测剂,所述第一生物标志物为IL6,所述第二生物标志物为心肌肌钙蛋白或肌酸酐,

其中所述试剂盒任选地进一步包括特异性结合第三生物标志物的检测剂,所述第三生物标志物

(i)在肌酸酐为所述第二生物标志物的情况下,为白蛋白、胆红素、丙氨酸转氨酶、天冬氨酸转氨酶、心肌肌钙蛋白、ESM-1或HBP(肝素结合蛋白),或者

(ii)在心肌肌钙蛋白为所述第二生物标志物的情况下,为胆红素、丙氨酸转氨酶、天冬氨酸转氨酶、HAPT(触珠蛋白)或PSP(胰石蛋白)。

16.根据前述权利要求中任一项所述的方法、装置、用途或试剂盒,其中所述评定为对发展脓毒症的风险的评定。

17.根据前述权利要求中任一项所述的方法、装置、用途或试剂盒,其中预测在48小时内发展脓毒症的风险。

用于脓毒症的早期检测的IL6标志物组

[0001] 本发明涉及诊断学领域。具体地,本发明涉及用于评定具有疑似感染的受试者的方法,所述方法包括以下步骤:确定在所述受试者的样品中第一生物标志物的量,所述第一生物标志物为IL-6;确定在所述受试者的样品中第二生物标志物的量,其中所述第二生物标志物为肌酸酐或心肌肌钙蛋白;将所述生物标志物的量与所述生物标志物的参考进行比较及/或基于所述生物标志物的量来计算用于评定具有疑似感染的所述受试者的评分;以及基于所述比较和/或所述计算来评定所述受试者。本发明还涉及第一生物标志物和第二生物标志物或者与所述第一生物标志物特异性结合的检测剂和与所述第二生物标志物特异性结合的检测剂用于评定具有疑似感染的受试者的用途,所述第一生物标志物为IL-6,所述第二生物标志物为肌酸酐或心肌肌钙蛋白。此外,本发明进一步涉及一种用于评定具有疑似感染的受试者的计算机实现方法以及用于评定具有疑似感染的受试者的装置和试剂盒。

[0002] 感染,特别是在具有较严重的感染体征和症状的患者(诸如在急诊室就诊的患者)中发生的感染,有时可能发展成更危及生命的医疗状况,包括全身性炎症应答综合征(SIRS)和脓毒症。

[0003] 根据脓毒症-3的定义,脓毒症被定义为由宿主对感染的应答失调所引起的危及生命的器官功能障碍。由于脓毒症发展迅速,早期识别对于脓毒症患者管理和开始正确的治疗措施非常重要,该治疗措施包括在入院第一小时内的适当抗生素疗法,以及开始使用静脉输液和血管活性药物进行复苏(2016年拯救脓毒症运动指南)。每延误一小时,发病率和死亡率就会逐渐增加。

[0004] 脓毒症的诊断基于非特异性的临床体征和症状,并且可能容易被漏诊。因此,患者经常被误诊并且疾病的严重程度常常被低估。迄今为止,总体上尚无脓毒症诊断的金标准,特别是在急诊科。在高收入国家,c反应蛋白(CRP)、降钙素原(PCT)和白细胞(WBC)计数经常在急诊室中用于检测处于发展脓毒症风险的具有血流感染的患者,并与乳酸一起用于检测脓毒性休克。在低收入国家,诊断主要基于临床体征和症状,并且在某些情况下基于SIRS和SOFA标准。然而,在最新的指南中,除了乳酸之外,没有列出用于诊断脓毒症的生物标志物(临床化学、BGE和SOFA评分的血液学成分除外)。然而,PCT仅被推荐可潜在地降级抗生素疗法,然而证据并不充分。PCT在脓毒症诊断中的局限性主要是灵敏性和特异性普通。

[0005] WO 2007/009071公开了基于sFlt-1在测试受试者中诊断炎症性应答的方法。所公开的方法进一步包括分析VEGF、PlGF、TNF-α、IL-6、D-二聚体、P-选择素、ICAM-I、VCAM-I、Cox-2或PAI-I中的至少一者的水平。

[0006] EP 2174143 B1公开了一种用于患有非感染的原发疾病的患者的预后的体外方法,该方法包括确定降钙素原的水平。

[0007] 多种标志物已被认为可用于检测或诊断脓毒症。这些标志物包括PCT、Presepsin、GDF-15、sFLT、炎症标志物如CRP或白介素、或器官衰竭特异性标志物等(参见,例如,Spanuth,2014,Comparison of sCD14-ST(presepsin)witheight biomarkers for mortality prediction in patients admitted with acute heart failure,2014AACC年

会摘要.B-331;van Engelen,2018,Crit Care Clin 34(1):139-152)。

[0008] WO2015/031996描述了用于早期确定对疾病和/或治疗应答的关键或危及生命的应答的生物标志物。

[0009] 然而,仍然需要生物标志物,以便对表现出感染体征和症状的患者进行可靠且早期的评定。

[0010] 因此,本发明提供了满足这些需要的手段和方法。

[0011] 本发明涉及用于评定具有疑似感染的受试者的方法,该方法包括以下步骤:

[0012] (a)确定在所述受试者的样品中第一生物标志物的量,所述第一生物标志物为IL-6;

[0013] (b)确定在所述受试者的样品中第二生物标志物的量,其中所述第二生物标志物为肌酸酐或心肌肌钙蛋白;

[0014] (c)将所述生物标志物的量与所述生物标志物的参考进行比较及/或基于所述生物标志物的量来计算用于评定具有疑似感染的所述受试者的评分;以及

[0015] (d)基于在步骤(c)中进行的所述比较和/或所述计算来评定所述受试者。

[0016] 应当理解,如说明书和权利要求书中所用,“一”或“一个”可意指一个或多个,取决于其所用的上下文。因此,例如,对“一个”项目的提及可意指能够利用至少一个项目。

[0017] 如下文所使用的,术语“具有”、“包括”或“包含”或它们的任意语法变化形式以非排他性方式使用。因此,这些术语既可以指除了由这些术语引入的特征之外,在此上下文中描述的实体中不存在其他特征的情况,也可以指存在一个或多个其他特征的情况。作为示例,表述“A具有B”、“A包括B”和“A包含B”既可以指其中除B之外,A中不存在其他要素的情况(即,其中A由B单独且唯一地组成的情况),也可以指其中除B之外,实体A中还存在一个或多个其他要素(诸如要素C、要素C和要素D或甚至其他要素)的情况。术语“包含”还涵盖其中仅存在所提及的项目的实施方案,即,其具有在“由……组成”的意义上的限制性含义。

[0018] 进一步地,如下文所使用的,术语“特别地”、“更特别地”、“通常地”和“更通常地”或类似的术语与附加/替代特征结合使用,而不限制替代的可能性。因此,由这些术语引入的特征是附加/替代特征,并且无意以任何方式限制权利要求的范围。如技术人员将认识到的,本发明可以通过使用替代性特征来执行。类似地,由“在本发明的实施方案中”引入的特征或类似表述意图成为附加/替代特征,而对本发明的替代实施方案没有任何限制,对本发明的范围没有任何限制,并且对将以这种方式引入的特征与本发明的其他附加/替代或非附加/替代特征相结合的可能性也没有任何限制。

[0019] 进一步地,应当理解,如本文所用的术语“至少一个”意指根据本发明可以使用该术语后面提及的项目中的一者或多者。例如,如果该术语指示应使用至少一个采样单元,那么这可以被理解为一个采样单元或多于一个采样单元,即两个、三个、四个、五个或任何其他数量。根据该术语所指的项目,本领域技术人员理解该术语可以指的上限(如果有的话)。

[0020] 如本文所用的术语“约”意指相对于所述术语之后引用的任何数字,存在能够实现技术效果的区间精度。因此,如本文所指,约优选地是指精确数值或所述精确数值附近的±20%、优选±15%、更优选±10%、或甚至更优选±5%的范围。

[0021] 此外,说明书和权利要求中的术语“第一”、“第二”、“第三”等用于区分相似的元件,而不一定用于描述顺序或时间次序。

[0022] 本发明的方法可以由上述步骤组成,或者可以包括额外的步骤,诸如进一步评估步骤(d)中获得的评定的步骤、推荐治疗措施诸如治疗的步骤等。此外,它可以包括步骤(a)之前的步骤,诸如与样品预处理有关的步骤。然而,优选地,设想上述方法为离体方法,其不需要在人体或动物体上实施任何步骤。此外,该方法可由自动化辅助。通常,生物标志物的确定可以由机器人设备支持,而比较和评定可以由数据处理设备诸如计算机支持。

[0023] 如本文所使用,术语“评定”是指评定受试者是否患有脓毒症,是否处于患脓毒症的风险,是否表现出关于总体健康状况或关于脓毒症恶化的医学状况或者伴随脓毒症和/或感染的体征和症状。

[0024] 因此,如本文所使用,评定包括诊断脓毒症、预测发展脓毒症的风险和/或预测受试者健康状况的任何恶化,特别是关于伴随脓毒症和/或感染的体征和症状。通常,根据本发明所提及的评定为对发展脓毒症的风险的评定(以及因此对发展脓毒症的风险的预测)。替代性地,评定为对受试者状况将恶化的风险的预测。此外,应理解,如果预测到发展脓毒症的风险或健康状况恶化的风险,则通常在预测窗口内进行预测。更通常地,所述预测窗口为,优选地,在获得样品之后约8h、约10h、约12h、约16h、约20h、约24h、约48h、特别是至少约48h。此外,可以预测优选地在获得测试样品之后24或48小时内发展脓毒症的风险。

[0025] 在一实施例中,预测24小时内发展脓毒症的风险。

[0026] 在替代性实施例中,预测48小时内发展脓毒症的风险。

[0027] 48小时的时间段在实例部分进行测试。

[0028] 在又一实施例中,评定为对受试者的(健康)状况未来将恶化或不恶化的风险的预测。术语疑似患有感染和/或正在患有感染的受试者的“状况恶化”为本领域技术人员所熟知的。该术语通常涉及状况恶化,最终可能导致进一步的用药或其他干预。

[0029] 优选地,如果受试者的疾病严重程度增加、如果受试者的抗生素疗法加强、如果受试者被送入ICU或另一单位接受更高水平的护理、如果受试者需要紧急手术、如果受试者在医院内死亡、如果受试者在入院后30天内死亡、如果受试者在出院后30天内再次住院、如果受试者经历器官功能障碍或衰竭(如例如使用SOFA评分所测量)和/或如果受试者需要器官支持,则该受试者的状况恶化。

[0030] 本领域技术人员理解受试者的状况何时没有恶化。通常,如果受试者没有出现前一段中提到的结果,则受试者的状况不恶化。

[0031] 在一实施例中,如果受试者具有以下结果中的一种或多种,则受试者的状况恶化:如果受试者被送入ICU、如果受试者在医院内死亡、如果受试者在入院后30天内死亡、和/或如果受试者在出院后30天内再次住院。

[0032] 在一实施例中,对受试者的状况将恶化的风险的预测为对受试者的抗生素疗法被加强的风险的预测。

[0033] 在一实施例中,对受试者的状况将恶化的风险的预测为对受试者被送入ICU的风险的预测。因此,评定受试者是否处于被送入ICU的风险。

[0034] 在另一实施例中,对受试者的状况将恶化的风险的预测为对受试者在医院内死亡的风险的预测。因此,评定受试者是否处于在医院内死亡的风险。

[0035] 在又一实施例中,对受试者的状况将恶化的风险的预测为对受试者在入院后30天内死亡的风险的预测。因此,评定受试者是否处于在入院后30天内死亡的风险。

[0036] 在又一实施例中,对受试者的状况将恶化的风险的预测是对受试者在出院后30天内再次住院的风险的预测。因此,评定受试者是否有在出院后30天内再次住院的风险。

[0037] 在又一实施方案中,对受试者的状况将恶化的风险的预测为对受试者经历器官功能障碍或衰竭的风险的预测。器官功能障碍和衰竭可能是例如通过SOFA评分进行评定。因此,本发明进一步涉及预测受试者的SOFA评分(在获得测试样品之后)将增加或不增加的风险。SOFA评分的增加(诸如增加至少一分、至少两分、至少三分或至少四分等)被认为是状况恶化。相反,如果SOFA评分不增加(前提是受试者没有最高的SOFA评分),则病情通常不恶化。预测窗口可以是如上所述的用于预测发展脓毒症的风险的预测窗口,诸如24或48小时。

[0038] 序贯器官衰竭评定(SOFA)是一种经过验证的评分,结合了临床评定和实验室测量,可定量地描述器官功能障碍/衰竭。将呼吸、凝血、肝脏、心血管系统、中枢神经系统和肾脏功能障碍单独地评分,并汇总为SOFA评分,范围为0至24。优选地,SOFA评分如Vincent 1996中所述确定(Vincent等人Intense Care Med.1996Jul;22(7):707-10.doi:10.1007/BF01709751.PMID:8844239.)。

[0039] 在又一实施例中,对受试者的状况将恶化的风险的预测为对受试者需要器官支持的风险的预测,诸如对受试者需要血管活性疗法、血液动力学支持(诸如液体疗法)、供氧(例如通过通气或体外膜氧合)和/或肾脏替代疗法的风险的预测。预测窗口可以是如上所述的用于预测发展脓毒症的风险的预测窗口,例如在获得样品之后24或48小时内。

[0040] 在一实施例中,术语“评定”是指脓毒症的诊断。因此,诊断具有疑似感染的受试者是否患有脓毒症。优选地,评定是指脓毒症的早期检测。

[0041] 如本领域技术人员将理解的,尽管根据本发明做出的评定是优选的,但可能不会对100%的被研究的受试者都是正确的。该术语通常要求能够正确地评定统计上显著部分的受试者。本领域技术人员可使用各种众所周知的统计评定工具(例如,确定置信区间、确定p值、学生t检验、曼-惠特尼检验等)毫不费力地确定一部分是否具有统计学意义。详细信息请参见Dowdy和Wearden,Statistics for Research,John Wiley&Sons,New York1983。通常设想的置信区间为至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%。p值通常为0.2、0.1、0.05。

[0042] 如本文所使用,术语“受试者”是指动物,优选地指哺乳动物,且更通常是指人。通过本发明的方法进行调查的受试者应是具有疑似感染的受试者。如本文所使用,术语“疑似感染”意为受试者应表现出感染的临床参数、体征和/或症状。因此,根据本发明的受试者通常未患有感染或疑似患有感染的受试者。通常,受试者为在急诊科就诊的受试者。

[0043] 有利地,样品已在就诊时获得。优选地,样品在急诊科就诊时获得。然而,样品也可以在初级保健医生处就诊时获得。

[0044] 如本文所用的术语“样品”是指在生理条件下包含本文所述的第一、第二和/或第三生物标志物的任何样品。更通常地,样品为体液样品,例如血液样品或源自其的样品、尿液样品、唾液样品、淋巴液样品等。最通常地,所述样品为血液样品或源自其的样品。因此,样品可以是血液、血清或血浆样品。

[0045] 血液样品通常包括毛细血管、静脉或动脉血液样品。

[0046] 在一实施例中,样品为脑脊液样品。

[0047] 术语“脓毒症”在本领域是众所周知的。如本文所用,该术语指由宿主对感染反应

失调引起的危及生命的器官功能障碍。例如,脓毒症的定义可以在Singer等人(Sepsis-3 The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock.JAMA 2016;315:801-819)中找到,其全部公开内容通过引用并入本文。优选地,术语"脓毒症"是指根据Singer等人(前述)公开的脓毒症-3定义的脓毒症。

[0048] 通常,待测试的受试者应疑似患有感染。术语"感染"被技术人员很好地理解。如本文所用,术语"感染"优选地指由致病微生物侵对试者的身体组织的袭受、该微生物的增殖以及受试者的组织对该微生物的反应。在一个实施例中,感染为细菌感染。因此,受试者应疑似患有细菌感染。

[0049] 如本文别处阐述的,本发明允许对处于风险的患者进行早期鉴定。在本文阐述的预测的实施例中,待测试的受试者因此在获得样品时并未患有脓毒症。在特别优选的实施方案中,待测试的受试者优选地在获得样品时未患有脓毒性休克。Singer等人(前述)对术语"脓毒性休克"进行了定义。因此,如果满足以下标准,则受试者患有脓毒性休克。

[0050] • 脓毒症,即疑似/记录的感染以及总SOFA的变化随感染而来的评分≥2分

[0051] • 以及需要升压药来维持的持续性低血压MAP≥65mm Hg且血清乳酸水平>2mmol/L(18mg/dL),尽管进行了足够的容量复苏

[0052] 此外,设想待测试的受试者可能感染也可能不感染SARS-CoV-2。

[0053] 如本文所使用,术语"确定"是指对根据本发明提及的生物标志物的定性和定量确定,即该术语涵盖对所述生物标志物的存在或不存在的确定或者对所述生物标志物的绝对或相对量的确定。

[0054] 如本文所使用,术语"量"是指本文提及的化合物的绝对量、所述化合物的相对量或浓度以及与其相关或可从其得出的任何值或参数。此类值或参数包括来自通过直接测量从所述化合物获得的所有具体物理或化学性质的强度信号值,例如质谱或NMR谱中的强度值。此外,所包含的是通过在本说明书别处指定的间接测量获得的所有值或参数,例如,响应于化合物或从特异性地结合的配体获得的强度信号而从生物读出系统确定的反应水平。应理解的是,与上述量或参数相关的值也可以通过所有标准数学运算获得。在生物标志物为酶,诸如丙氨酸转氨酶(ALAT)或天冬氨酸转氨酶(AST或ASAT)的情况下,术语"量"还可以涵盖酶的活性。

[0055] 在本发明的方法中确定该量可以通过允许在所述第二分子从第一分子释放时检测所述第二分子的存在或不存在或量的任何技术来进行。合适的技术取决于生物标志物的分子性质和特性,并且在本文别处更详细地讨论。

[0056] 通常,根据本发明提及的生物标志物的量可以通过使用夹心、竞争或其他测定形式的免疫测定来确定。所述测定将产生指示生物标志物的存在或不存在或量的信号。其他合适方法包括测量生物标志物特有的物理或化学特性,诸如其精确的分子质量或NMR谱。所述方法包括,优选地,生物传感器、耦合到免疫测定的光学装置、生物芯片、分析装置(诸如质谱仪、NMR分析仪、表面等离子体共振测量设备或色谱装置)。此外,方法包括基于微量板ELISA的方法、全自动或机器人免疫测定(例如,可从罗氏获得)。根据本发明的合适的测量方法还可以包括沉淀(特别是免疫沉淀)、电化学发光(电致化学发光)、RIA(放射免疫测定)、ELISA(酶联免疫吸附测定)、电化学发光夹心免疫测定(ECLIA)、解离增强的镧系元素荧光免疫测定(DELFIA)、闪烁邻近测定(SPA)、比浊法、浊度法、乳胶增强比浊法或浊度法、

或固相免疫测试。本领域已知的其他方法诸如凝胶电泳、2D凝胶电泳、SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)或蛋白质印迹。更通常地,特别设想用于确定本文提及的生物标志物的技术在下面所附实例中描述。

[0057] 待根据本发明确定的生物标志物为本领域众所周知的。此外,用于确定生物标志物的量的方法是已知的。例如,可以如实例部分中所述测量生物标志物(参见实例1)。所测试的生物标志物中的一些为酶(ALAT和ASAT)。还可以通过确定在样品中所述酶的活性来确定这些生物标志物的量。

[0058] 白细胞介素-6(Interleukin-6,缩写为IL-6)是一种由T细胞和巨噬细胞分泌的白细胞介素,以刺激免疫反应,例如在感染期间和创伤后,尤其是烧伤或其他导致炎症的组织损伤。它既是促炎细胞因子又是抗炎细胞因子。在人类中,它由IL6基因编码。人IL-6的序列可以经由GenBank评定(多核苷酸序列参见NM_000600.3,氨基酸序列参见NP_000591.1)。IL-6通过细胞表面I型细胞因子受体复合物发出信号,该复合物由配体结合的IL-6Rα链(CD126)和信号转导组分gp130(也称为CD130)组成。CD130为多种细胞因子的常见信号转导,该多种细胞因子包括白血病抑制因子(LIF)、睫状神经营养因子、制瘤素M、IL-11和心肌营养素-1,并且几乎在大多数组织中普遍表达。相反,CD126的表达仅限于某些组织。当IL-6与其受体相互作用时,它触发gp130和IL-6R蛋白以形成复合物,从而激活受体。这些复合物将gp130的细胞内区聚集在一起,通过某些转录因子、Janus激酶(JAK)以及信号转导和转录激活因子来启用信号转导级联。

[0059] 标志物“肌酸酐”在本领域为众所周知的。在肌肉代谢中,肌酸酐是由肌酸和磷酸肌酸内源合成的。在肾功能正常的情况下,肌酸酐通过肾小球滤过排泄。针对急性和慢性肾脏疾病的诊断和监测以及针对肾透析的监测进行肌酸酐确定。尿液中的肌酸酐浓度可用作某些分析物(白蛋白、α-淀粉酶)排泄的参考值。肌酸酐可以如Popper等人(Popper H等人Biochem Z 1937;291:354)、Seelig和Wüst(Seelig HP,Wüst H.Ärztl Labor1969;15:34)或Bartels(Bartels H等人Clin Chim Acta 1972;37:193)所述来确定。例如,将氢氧化钠和苦味酸添加到样品中以开始形成肌酸酐-苦味酸复合物。在碱性溶液中,肌酸酐与苦味酸盐形成黄橙色复合物。颜色强度与肌酸酐浓度成正比,并且可以通过光度测定来测量。

[0060] 生物标志物内皮细胞特异性分子1(缩写为ESM-1)是本领域众所周知的。生物标志物通常也被称为内皮细胞特异性分子(endocan)。ESM-1是分泌蛋白,其主要在人肺和肾组织的内皮细胞中表达。公共领域数据表明,甲状腺、肺和肾中也表达,但在心脏组织中也表达,参见例如蛋白Atlas数据库中ESM-1的条目(Uhlén M.等人,Science 2015;347(6220):1260419)。该基因的表达受细胞因子调节。ESM-1是由20kDa成熟多肽和30kDa O-连接的聚糖链构成的蛋白聚糖(Bechard D等人,J Biol Chem2001;276(51):48341-48349)。在本发明的一个优选实施例中,在来自受试者的样品中测定人ESM-1多肽的量。人ESM-1多肽的序列是本领域众所周知的(例如参见Lassale P.等人,J.Biol.Chem.1996;271:20458-20464并且可以例如通过Uniprot数据库进行评定,参见条目Q9NQ30(ESM1_HUMAN)。通过选择性剪接产生ESM-1的两种同工型,即同工型1(具有Uniprot标识符Q9NQ30-1)和同工型2(具有Uniprot标识符Q9NQ30-2)。同工型1的长度为184个氨基酸。在同工型2中,缺少同工型1的氨基酸101至150。氨基酸1至19形成信号肽(可能会被裂解)。

[0061] 在一个优选实施例中,测定ESM-1多肽的同工型1、即具有如UniProt登录号

Q9NQ30-1所示的序列的同工型1的量。

[0062] 在另一个优选实施例中,测定ESM-1多肽的同工型2、即具有如UniProt登录号Q9NQ30-2所示的序列的同工型2的量。

[0063] 在另一个优选实施例中,测定ESM-1多肽的同工型1和同工型2、即总ESM-1的量。

[0064] 标志物"胆红素"在本领域为众所周知的。胆红素是双二烯类的成员,为一种直链四吡咯,其二吡咯单元为外乙烯基和内乙烯基类型两者。它是血红素降解的产物,通过胆绿素的还原在网状内皮系统中产生,并作为与血清白蛋白的复合物转运到肝脏。它具有抗氧化剂的作用。胆红素测量在大多数医学实验室中常规进行并且可以通过多种方法测量(诸如通过实例部分中描述的方法)。

[0065] 术语"心肌肌钙蛋白"通常是指人类心肌肌钙蛋白T或心肌肌钙蛋白I。然而,该术语还涵盖前述特定肌钙蛋白的变体,即,优选地,肌钙蛋白I的变体,更优选地,肌钙蛋白T的变体。此类变体至少具有与特定心肌肌钙蛋白相同的基本生物学和免疫学特性。特别地,如果它们可通过本说明书中所提及的相同特异性测定来检测到,例如通过使用特异性识别所述心肌肌钙蛋白的多克隆抗体或单克隆抗体的ELISA测定,则它们共享相同的基本生物学特性和免疫学特性。此外,应理解,如根据本发明所提及的变体应具有由于至少一个氨基酸取代、缺失和/或添加而不同的氨基酸序列,其中变体的氨基酸序列仍然优选地与特异性肌钙蛋白的氨基酸序列具有至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约92%、至少约95%、至少约97%、至少约98%或至少约99%同一性。变体可以是等位基因变体或任何其他物种特异性同源物、旁系同源物或直系同源物。此外,本文所提及的变体包括特异性心肌肌钙蛋白的片段或前述类型的变体,只要这些片段具有如上文所提及的基本免疫学特性和生物学特性。优选地,心肌肌钙蛋白变体具有与人肌钙蛋白T或肌钙蛋白I相当的免疫学特性(即表位组成)。因此,变体应可通过用于确定心肌肌钙蛋白浓度的上述手段或配体来识别。因此,变体应可通过用于确定心肌肌钙蛋白浓度的上述手段或配体来识别。此类片段可以是例如肌钙蛋白的降解产物。进一步包括优于翻译后修饰(诸如,磷酸化或十四烷基化)而不同的变体。优选地,肌钙蛋白I及其变体的生物学特性为在体内和体外抑制肌动球蛋白ATP酶或抑制血管生成的能力,这可以例如基于Moses等人1999PNAS USA 96(6):2645-2650)描述的测定法进行检测。优选地,肌钙蛋白T及其变体的生物学特性为与肌钙蛋白C和I形成复合物、结合钙离子或与原肌球蛋白结合的能力,优选地,在作为肌钙蛋白C、I和T的复合物或由肌钙蛋白C、肌钙蛋白I和肌钙蛋白T的变体形成的复合物存在的情况下。肌钙蛋白T或肌钙蛋白I可以通过本领域众所周知并且可商购的免疫测定法例如ELISA来测定。根据本发明特别优选的是使用例如可商购的hs-cTn测定仪以高灵敏性来确定肌钙蛋白T。

[0066] 丙氨酸转氨酶(ALAT)催化L-丙氨酸转氨化为α-酮戊二酸(α-KG),从而形成L-谷氨酸和丙酮酸。所形成的丙酮酸被乳酸脱氢酶(LDH)还原为乳酸,同时氧化还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)。吸光度的变化与丙氨酸转氨酶活性成正比,并且可以例如使用双色(340、700nm)率技术来测量。

[0067] 天冬氨酸转氨酶(AST或ASAT)催化L-天冬氨酸转氨化为α-酮戊二酸,从而形成L-谷氨酸和草乙酸。所形成的草酰乙酸通过苹果酸脱氢酶(MDH)还原为苹果酸,伴随还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)的同时氧化。由于NADH转化为NAD,吸光度随时间的变化与AST

活性成正比,并且可以例如使用双色(340、700nm)率技术进行测量。

[0068] 生物标志物“触珠蛋白”(缩写为HAPT)为本领域中众所周知的。在人类中,该蛋白质由HP基因编码。触珠蛋白捕获并与游离血浆血红蛋白结合,以允许肝脏回收血红素铁并防止肾脏损伤。触珠蛋白还充当抗氧化剂,具有抗细菌活性,并且在调节急性期反应的许多方面发挥作用。关于人触珠蛋白多肽的序列的信息可以通过Uniprot获得(参见UniProtKB-P00738(HPT_HUMAN))。

[0069] 胰石蛋白(简称PSP)是胰腺分泌的一种蛋白质,是Lithostathine-1-α胰岛细胞再生因子(ICRF)或朗格汉斯再生蛋白胰岛(REG)。在人类中,PSP多肽由REG1A基因编码为144个氨基酸的单一多肽,进一步被胰蛋白酶切割,产生133个氨基酸,该氨基酸在苏氨酸27上进行O-连接糖基化。人PSP的氨基酸序列可经由UniProt访问(参见P05451(REG1A_HUMAN))。

[0070] 生物标志物肝素结合蛋白(缩写为HBP)也称为37kDa的阳离子性抗微生物蛋白(CAP37)或天青杀素(azurocidin)。其为中性粒细胞中合成的37kDa糖蛋白。此外,其为源自中性粒细胞颗粒的抗菌剂以及结合肝素的单核细胞和成纤维细胞特异性趋化糖蛋白。HBP属于丝氨酸蛋白酶超家族。然而,它作为蛋白酶是无活性的。人HBP的氨基酸序列可经由UniProt获得(参见UniProtKB-P20160(CAP7_HUMAN))。

[0071] 在根据本发明的方法中,可以确定第三生物标志物。特别地,在本发明方法的步骤(b)中

[0072] (i)如果确定作为所述第二生物标志物的肌酸酐的量,所述方法将进一步包括确定作为第三生物标志物的白蛋白、胆红素、丙氨酸转氨酶、天冬氨酸转氨酶、心肌肌钙蛋白、ESM-1或HBP(肝素结合蛋白)的量;或者

[0073] (ii)如果确定作为所述第二生物标志物的心肌肌钙蛋白的量,所述方法将进一步包括确定作为第三生物标志物的胆红素、丙氨酸转氨酶、天冬氨酸转氨酶、HAPT(触珠蛋白)或PSP(胰石蛋白)的量。

[0074] 因此,本发明涉及至少两种生物标志物(即,如本文所指的第一和第二生物标志物)或至少三种生物标志物(即,如本文所指的第一、第二和第三生物标志物)的确定。

[0075] 第一生物标志物为IL6。第二生物标志物应为心肌肌钙蛋白或肌酸酐。

[0076] 在一实施例中,第二生物标志物为心肌肌钙蛋白,诸如心肌肌钙蛋白T或I,优选地,肌钙蛋白T。

[0077] 如果心肌肌钙蛋白为第二生物标志物,所述方法可以进一步包括确定作为第三生物标志物的胆红素、丙氨酸转氨酶、天冬氨酸转氨酶、HAPT(触珠蛋白)或PSP(胰石蛋白)的量。

[0078] 在一个实施例中,确定IL6、心肌肌钙蛋白和胆红素。

[0079] 在一个替代性实施例中,确定IL6、心肌肌钙蛋白和天冬氨酸转氨酶。

[0080] 在一个替代性实施例中,确定IL6、心肌肌钙蛋白和丙氨酸转氨酶。

[0081] 在一个替代性实施例中,确定IL6、心肌肌钙蛋白和触珠蛋白。

[0082] 在一个替代性实施例中,确定IL6、心肌肌钙蛋白和PSP。

[0083] 如果确定作为所述第二生物标志物的肌酸酐的量,所述方法可以进一步包括确定作为第三生物标志物作为第三生物标志物的白蛋白、胆红素、丙氨酸转氨酶、天冬氨酸转氨酶、心肌肌钙蛋白、ESM-1或HBP(肝素结合蛋白)的量。

[0084] 在一个实施例中,确定IL6、肌酸酐和白蛋白。

[0085] 在一个实施例中,确定IL6、肌酸酐心肌肌钙蛋白,诸如心肌肌钙蛋白T或I,优选肌钙蛋白T。

[0086] 在一个实施例中,确定IL6、肌酸酐和胆红素。

[0087] 在一个替代性实施例中,确定IL6、肌酸酐和天冬氨酸转氨酶。

[0088] 在一个替代性实施例中,确定IL6、肌酸酐和丙氨酸转氨酶。

[0089] 在一个替代性实施例中,确定IL6、肌酸酐和ESM1。

[0090] 在一个替代性实施例中,确定IL6、肌酸酐和HBP。

[0091] 如本文所使用,术语“参考”是指允许将受试者分配至患有疾病或病症或处于发展该疾病或病症风险的受试者组或未患有所述疾病或病症或未处于发展该疾病或病症的风险的受试者组的量或值。此类参考可以是将这些组彼此分开的阈值量。因此,参考应当是允许将受试者分配到患有疾病或病症或处于发展该疾病或病症的风险、或者未患有疾病或病症或未处于发展该疾病或病症的风险的受试者组中的量或评分。例如,参考应是允许将受试者分配到处于发展脓毒症的风险或未处于发展序列的风险的受试者组中的量或分数(在如上文阐述的预测窗口内,诸如约48小时内)。

[0092] 可以通过本文别处所提及的统计测试,基于来自已知患有疾病或病症或处于发展该疾病或病症的风险的受试者或受试者组或者已知未患有疾病或病症或处于发展该疾病或病症的风险的受试者或受试者组的生物标志物的量,毫不费力地计算分离两组的合适阈值量。适用于个体受试者的参考量可以根据各种生理参数诸如年龄、性别或亚群而变化。

[0093] 通常,所述参考为来源于至少一个已知处于发展脓毒症的风险的受试者的每种生物标志物的参考,优选地其中生物标志物中的每一者的量与对应参考基本相同或相似指示受试者处于发展脓毒症的风险,而生物标志物中的每一者的量与对应参考不同则指示受试者未处于发展脓毒症的风险。

[0094] 而且,通常,所述参考为来源于已知未处于发展脓毒症的风险的至少一个受试者的每种生物标志物的参考,优选地其中该生物标志物中每一者的量与对应参考基本相同或相似指示受试者未处于发展脓毒症的风险,而该生物标志物中的每一者的量与对应参考不同则指示受试者处于发展脓毒症的风险。

[0095] 术语“至少一位受试者”是指一位受试者或多于一位受试者,诸如至少10、50、100、200或1000位受试者。

[0096] 在一实施例中,生物标志物的量大于所述生物标志物的参考指示受试者处于(例如发展为脓毒症,例如在获得样品之后的某一时间段内)的风险。此外,生物标志物的量低于所述生物标志物的参考指示受试者未处于风险。(触珠蛋白和白蛋白除外:此处,生物标志物的量低于所述生物标志物的参考值指示受试者处于风险,而生物标志物的量大于所述生物标志物的参考值指示受试者未处于风险)。

[0097] 原则上,可以基于给定参数诸如生物标志物的平均值或均值,通过应用标准统计方法来计算受试者队列的参考量。特别是,测试(诸如旨在诊断发生事件或未发生事件的方法)的准确性通过其接收器操作特性(ROC)而被最好地描述(特别地参见Zweig 1993,Clin.Chem.39:561-577)。ROC曲线图是在观察到的整个数据范围内连续改变决策阈值所产生的所有灵敏度/特异性对的图。诊断方法的临床性能取决于其准确性,即其正确地将受试

者分配到某一预后或诊断中的能力。ROC曲线通过将适用于区分的整个阈值范围的敏感性对比1-特异性绘制成曲线而显示了两种分布之间的重叠。y轴上是敏感性,即真阳性分数,其被定义为真阳性测试结果数与真阳性测试结果数和假阴性测试结果数之积的比率。这也被称为存在疾病或病症时的阳性。其仅从受影响的子组计算。x轴上为假阳性分数,即1-特异性,其被定义为假阳性结果数与真阴性结果数和假阳性结果数之积的比率。这是一个特异性指数,并且完全由未受影响的子组计算得出。由于真阳性分数和假阳性分数是完全分开计算的,所以通过使用来自两个不同子组的测试结果,ROC曲线与同期群中事件的患病率无关。ROC图上的各点代表与对应于特定决策阈值的灵敏度/-特异性对。有完全区别(两种结果分布没有重叠)的测试具有穿过左上角的ROC曲线,其中真阳性分数为1.0或100%(完全敏感性),并且假阳性分数为0(完全特异性)。无区别(两个组的结果分布相同)的测试的理论曲线是从左下角到右上角的45°对角线。大多数曲线落在这两个极端之间。如果ROC曲线完全落到低于45°对角线,则可以通过将“阳性”的标准从“大于”逆转为“小于”或反之亦然来轻松纠正。定性地,曲线越接近左上角,则测试的总体准确性就越高。根据期望的置信区间,可以从ROC曲线导出阈值,从而允许分别在适当的敏感性和特异性平衡下对给定事件进行诊断或预测。因此,通常,通过建立如上所述的所述队列的ROC并由此导出阈值量,可以生成用于本发明的上述方法的参考,即允许区别处于风险的受试者与未处于风险的受试者的阈值。根据诊断方法所需的灵敏性和特异性,ROC曲线允许得出合适的阈值。应理解,最佳灵敏性是排除处于增加的风险或处于患有疾病的风险的受试者(即排除在外)所需的,而最佳特异性是针对据评定为处于增加的风险或据评定为患有疾病的受试者(即包括在内)设想的。

[0098] 本发明方法的步骤c)包括将生物标志物(即第一生物标志物、第二生物标志物和任选的第三生物标志物)的量与所述生物标志物的参考进行比较及/或基于生物标志物的量来计算用于评定具有疑似感染的受试者的评分。

[0099] 因此,第一生物标志物、第二生物标志物和任选的第三生物标志物的量可以分别与第一生物标志物的参考、第二生物标志物的参考和任选的第三生物标志物的参考进行比较。

[0100] 替代性地,可以基于生物标志物的量,即基于第一生物标志物、第二生物标志物和任选的第三生物标志物的量来计算评分。所述评分应允许评定具有疑似感染的受试者,诸如用于预测发展脓毒症的风险。任选地,可以将所述评分与合适的参考分数进行比较。

[0101] 如本文所使用,术语“比较”涵盖将本文提及的生物标志物的经确定的量与参考进行比较。应理解,如本文所使用,比较是指在量的值与参考值之间进行的任何类型的比较。然而,应理解,优选地,相同类型的值彼此比较,例如,如果在本发明的方法中确定绝对量并进行比较,则参考也应为绝对量,如果在本发明的方法中确定相对量并进行比较,则参考也应为相对量等。替代性地,如本文所使用,术语“比较”涵盖将计算的评分与合适的参考评分进行比较。可手动或计算机辅助进行比较。例如,可以将量的值与参考相互比较,并且可以由执行比较算法的计算机程序自动执行所述比较。执行所述评估的计算机程序将以适当的输出格式提供所需的评定。

[0102] 如上所述,还设想基于第一和第二生物标志物或者第一、第二或第三生物标志物的量(即单一评分)来计算评分(特别是单一评分),并且将该评分与参考评分进行比较。优

选地,评分基于在来自测试受试者的样品中第一和第二生物标志物的量,并且如果确定第三生物标志物的量,则基于在来自测试受试者的样品中第一、第二和第三生物标志物的量。

[0103] 所计算的评分结合了关于至少两种或三种生物标志物的量的信息。此外,在评分中,优选地根据生物标志物对建立评定的贡献对生物标志物进行加权。因此,个体标志物的值通常被加权并且将经过加权的值用于计算评分。合适的系数(权重)可以由本领域技术人员毫不费力地确定。还可以从已在至少两个生物标志物上训练的决策树或决策树集(集合)来计算评分。基于在本发明方法中应用的生物标志物的组合,各个生物标志物的权重以及决策树的结构可以是不同的。

[0104] 该评分可以被视为用于评定本文所阐述的受试者的分类器参数。特别地,它使人能够基于单一评分来提供评定。参考评分优选地是一个值,特别是允许用于评定本文所述的具有疑似感染的受试者的截断值。优选地,参考为单一值。因此,人们不必解释有关单个生物标志物含量的全部信息。使用如本文所述的评分系统,有利地,可以使用生物标志物的不同量纲或单位的值,因为这些值将被数学地转换成评分。因此,例如绝对浓度的值可以与峰面积比率组合成评分。可以基于期望的灵敏性或期望的特异性来选择待应用的参考评分。如何选择合适的参考评分为本领域众所周知的。

[0105] 有利地,在本发明的研究中已经发现,第一生物标志物与第二生物标志物和(优选地)第三生物标志物的组合允许对表现出感染体征和症状的患者进行可靠且早期的评定。例如,可以在已获得测试样品后五小时内对受试者作出评定。在这些研究中,对在急诊科就诊的医疗(非手术)紧急情况的患者进行了调查。为此,将患者细分为极有可能患有脓毒症的患者和疑似感染但未患脓毒症的患者。已确定了各种生物标志物的量,并通过逻辑回归分析对该生物标志物进行分析并将其数学地组合。接受者操作特征曲线下面积(AUC)用于评估生物标志物性能。AUC值为函数f(x)在区间[a][b]内的数学整数。还进行了生物标志物对和三联体的AUC研究。确定了与最佳单一生物标志物AUC相比,一起显示改善的AUC的生物标志物组合。结果描述于下面所附的实例中。

[0106] 特别是,如果这些患者在例如急诊部门就诊,则对发展严重并发症(诸如脓毒症、SIRS或整体健康状况普遍恶化)风险进行早期评定对于开始治疗措施(包括药物施用、物理或其他治疗性干预和/或住院)具有决定性作用。特别地,这些治疗性措施可以包括例如快速施用广谱抗生素、液体复苏、血管活性药物疗法、机械通气、其他器官支持(例如,连续血液滤过、体外膜氧合)。治疗性措施还涵盖分诊到更高级别的护理(例如重症监护病房、中级护理病房)。如果没有发展严重并发症的风险,则患者可以出院回家并在门诊接受治疗或入院接受低级别护理(例如普通病房)。感谢本发明,由于可以通过在早期阶段确定生物标志物来评定患者,因此可以防止危及生命的发展。在本发明的研究中鉴定的生物标志物对和三联体是医疗决策的可靠基础,并且可以以时间和成本有效的方式进行评定。

[0107] 因此,本发明的方法可以进一步包括建议或启用合适的治疗性措施。通常,所述合适的治疗性措施选自脓毒症管理的医学指南或建议,诸如脓毒症和感染性休克管理国际指南(Intensive Care Med,2017)。例如,治疗性措施可以是治疗脓毒症或进一步的诊断调查或执业医师认为必要的护理的其他方面。

[0108] 在一个实施例中,如果患者已经被评估为有风险,则要建议或启用的治疗措施选自

[0109] • 施用至少一种或多种光谱抗生素(诸如头孢菌素、β-内酰胺/β-内酰胺酶抑制剂(例如哌拉西林)或碳青霉烯)进行经验性广谱疗法,通常取决于可能被视为病原体和抗生素易感性的生物体

[0110] • 液体复苏

[0111] • 施用一种或多种血管加压药,诸如施用去甲肾上腺素,以及

[0112] • 施用一种或多种皮质类固醇,例如施用氢化可的松

[0113] 上文给出的定义比照适用于以下。

[0114] 本发明还涉及一种用于评定具有疑似感染的受试者的计算机实现方法,该计算机实现方法包括以下步骤:

[0115] (a)接收在所述受试者的样品中第一生物标志物的量的值,所述第一生物标志物为IL-6;

[0116] (b)接收在所述受试者的样品中第二生物标志物的量的值,其中所述第二生物标志物为肌酸酐或心肌肌钙蛋白;

[0117] (c)将所述生物标志物的量的值与所述生物标志物的参考进行比较及/或基于所述生物标志物的量来计算用于评定具有疑似感染的所述受试者的评分;以及

[0118] (d)基于在步骤(c)中进行的所述比较和/或所述计算来评定所述受试者。

[0119] 如本文所使用,术语"计算机实现"意为该方法以自动化方式在数据处理单元上执行,该数据处理单元通常包括在计算机或类似的数据处理装置中。数据处理单元应接收生物标志物的量的值。此类值可以是量、相对量或反映如本文别处详细描述的量的任何其他计算值。因此,应理解,上述方法不需要确定生物标志物的量,而是使用已经预定的量的值。

[0120] 通常,在所述方法的步骤(b)中

[0121] (i)如果接收作为所述第二生物标志物的肌酸酐的量的值,所述方法将进一步包括接收作为第三生物标志物的白蛋白、胆红素、丙氨酸转氨酶、天冬氨酸转氨酶、心肌肌钙蛋白、ESM-1或HBP(肝素结合蛋白)的量的值;或者

[0122] (ii)如果接收作为所述第二生物标志物的心肌肌钙蛋白的量的值,所述方法将进一步包括接收作为第三生物标志物的胆红素、丙氨酸转氨酶、天冬氨酸转氨酶、HAPT(触珠蛋白)或PSP(胰石蛋白)的量的值。

[0123] 原则上,本发明还设想了一种计算机程序、计算机程序产品或具有有形嵌入所述计算机程序的计算机可读存储介质,其中该计算机程序包括指令,该指令当在数据处理装置或计算机上运行时执行本发明的上述方法。具体地,本公开还包括:

[0124] -计算机或计算机网络,该计算机或计算机网络包括至少一个处理器,其中该处理器适于执行根据本说明书中所描述的实施例之一的方法,-一种计算机可加载数据结构,该计算机可加载数据结构适于当在计算机上执行该数据结构时,执行根据本说明书中所描述的实施例之一的方法,

[0125] -计算机脚本,其中该计算机程序适于当在计算机上执行该程序时,执行根据本说明书中所述的实施例之一的方法,

[0126] -一种计算机程序,其包括程序装置,该程序装置用于当在计算机上或在计算机网络上执行该计算机程序时,执行根据本说明书中所描述的实施例之一的方法,

[0127] -计算机程序,该计算机程序包括根据前述实施例的程序装置,其中该程序装置存

储在计算机可读的存储介质上，

[0128] -存储介质，其中数据结构存储在该存储介质上并且其中该数据结构适于在被加载到计算机或计算机网络的主存储装置和/或工作存储装置之后，执行根据本说明书中所述的实施例之一的方法，

[0129] -计算机程序产品，该计算机程序产品具有程序代码工具，其中这些程序代码工具可以存储或被存储在存储介质上，以用于在计算机上或在计算机网络上执行这些程序代码工具的情况下，执行根据本说明书中所述的实施例之一的方法，

[0130] -数据流信号，通常是加密的，包括本文别处定义的参数的数据，以及

[0131] -数据流信号，通常是加密的，包括由本发明的方法提供的评定。

[0132] 本发明涉及一种用于评定具有疑似感染的受试者的装置，该装置包括：

[0133] (a)测量单元，其用于确定在受试者的样品中第一生物标志物和第二生物标志物的量，该第一生物标志物为IL-6，该第二生物标志物为肌酸酐或心肌肌钙蛋白，所述测量单元包括用于第一生物标志物和第二生物标志物的检测系统；和

[0134] (b)评估单元，其可操作地连接到该测量单元，该评估单元包括具有第一生物标志物和第二生物标志物的存储的参考的数据库，优选地，如上文所指定；以及数据处理器，该数据处理器包括指令，该指令用于将第一生物标志物和第二生物标志物的量与参考进行比较及/或用于基于生物标志物的量对用于评定具有疑似感染的受试者的评分进行计算，优选地，如上文所指定，以及用于基于该比较来评定所述受试者，所述评估单元能够自动从该测量单元接收生物标志物的量的值。

[0135] 如本文所使用，术语“装置”涉及包括上述单元的系统，上述单元彼此可操作地连接的以允许根据本发明的方法确定生物标志物的量并对其进行评估，从而可以提供评定。

[0136] 分析单元通常包括至少一个反应区，该反应区具有用于第一和第二生物标志物以及优选地还有第三生物标志物的生物标志物检测剂，该检测剂以固定形式固定在待与样品接触的固体支持物或载体上。此外，在反应区中，可以应用允许检测剂与在样品中包含的生物标志物特异性结合的条件。

[0137] 反应区可以直接进行样品施加，或者它可以连接到施加样品的上样区。在后一种情况下，样品可以经由上样区和反应区之间的连接主动或被动地输送至反应区。此外，反应区还应连接到检测器。连接应使得检测器能够检测生物标志物与其检测剂的结合。合适的连接取决于用于测量生物标志物的存在或量的技术。例如，对于光学检测，在检测器与反应区之间可能需要光的传输，而对于电化学确定，例如在反应区与电极之间可能需要流体连接。

[0138] 检测器应适合于检测生物标志物的量的确定。随后可以将所确定的量传送至评估单元。所述评估单元包括数据处理元件，诸如计算机，该数据处理元件具有用于确定在样品中存在的量的实现算法。

[0139] 如根据本发明方法所指的处理单元通常包括中央处理单元(CPU)和/或一个或多个图形处理单元(GPU)和/或一个或多个专用集成电路(ASIC)和/或一个或多个张量处理单元(TPU)和/或一个或多个现场可编程门阵列(FPGA)等。例如，数据处理元件可以是通用计算机或便携式计算装置。还应理解，多个计算装置可以诸如在网络上或通过其他传输数据的方法一起使用，以进行本文所公开的方法的一个或多个步骤。示例性计算装置包括台式

计算机、膝上型计算机、个人数据助理(“PDA”)、蜂窝装置、智能或移动装置、平板计算机、服务器等。一般而言,数据处理元件包括能够执行多个指令(诸如软件程序)的处理器。

[0140] 评估单元通常包括或可以访问存储器。存储器为计算机可读介质并且可以包括例如位于计算装置本地或者计算装置可通过网络访问的单一存储装置或多个存储装置。计算机可读介质可以是可由计算装置访问的任何可用介质并且包括易失性和非易失性介质两者。进一步,计算机可读介质可以是可移动和不可移动介质中的一者或两者。作为示例而非限制,计算机可读介质可以包括计算机存储介质。示例性计算机存储介质包括但不限于RAM、ROM、EEPROM、闪存或任何其他存储技术、CD-ROM、数字多功能盘(DVD)或其他光盘存储、磁卡、磁带、磁盘存储器或其他磁存储装置,或者可以用于存储能够被计算装置访问并被计算装置的处理器执行的多个指令的任何其他介质。

[0141] 根据本公开的实施例,软件可包括指令,该指令当由计算设备的处理器执行时可进行本文公开的方法的一个或多个步骤。一些指令可以适合于产生控制其他机器的操作的信号,并且因此可以通过这些控制信号来操作以转换远离计算机本身的素材。这些描述和表示是数据处理领域的技术人员用来例如最有效地将其的工作内容传达给本领域的其他技术人员的手段。

[0142] 该多个指令还可以包括通常被认为是导致期望结果的自洽步骤序列的算法。这些步骤为那些需要对物理数量进行物理操作的步骤。通常,但不一定,这些数量采用能够被存储、传输、转换、组合、比较和以其他方式操纵的电或磁脉冲或信号的形式。有时,主要出于通用的原因,将这些信号称为值、字符、显示数据、数字等,作为对其中体现或表达这些信号的物理项目或表现形式的参考,被证明是方便的。然而,应该记住,所有这些和类似的术语都与适当的物理数量相关联,并且在这里仅用作应用于这些数量的方便标记。

[0143] 评估单元还可以包括或者可以访问输出装置。示例性输出装置包括例如传真机、显示器、打印机和文件。根据本公开的一些实施例,计算装置可以进行本文公开的方法的一个或多个步骤,并且此后经由输出装置提供与该方法的结果、指示、比率或其他因素相关的输出。

[0144] 通常,所述测量单元确定并包括用于第三生物标志物的检测系统,并且其中所述数据库包括第三生物标志物的存储的参考,所述第三生物标志物

[0145] (i)在肌酸酐为所述第二生物标志物的情况下,为白蛋白、胆红素、丙氨酸转氨酶、天冬氨酸转氨酶、心肌肌钙蛋白、ESM-1或HBP(肝素结合蛋白);或者

[0146] (ii)在心肌肌钙蛋白为所述第二生物标志物的情况下,为胆红素、丙氨酸转氨酶、天冬氨酸转氨酶、HAPT(触珠蛋白)或PSP(胰石蛋白)。

[0147] 更通常地,所述检测系统包括至少一种能够特异性检测该生物标志物中的每一者的检测剂。

[0148] 本发明进一步考虑了一种用于评定具有疑似感染的受试者的装置,该装置包括评估单元,该评估单元包括具有第一生物标志物和第二生物标志物的存储的参考的数据库,该第一生物标志物为IL-6,该第二生物标志物为肌酸酐或心肌肌钙蛋白,以及数据处理器,该数据处理器包括指令,该指令用于将第一生物标志物和第二生物标志物的量与参考进行比较,优选地,如上所指定,以及用于基于该比较来评定所述受试者,所述评估单元能够接收在受试者的样品中确定的生物标志物的量的值。

[0149] 通常,所述数据库包括第三生物标志物的存储的参考,所述第三生物标志物

[0150] (i)在肌酸酐为所述第二生物标志物的情况下,为白蛋白、胆红素、丙氨酸转氨酶、天冬氨酸转氨酶、心肌肌钙蛋白、ESM-1或HBP(肝素结合蛋白);或者

[0151] (ii)在心肌肌钙蛋白为所述第二生物标志物的情况下,为胆红素、丙氨酸转氨酶、天冬氨酸转氨酶、HAPT(触珠蛋白)或PSP(胰石蛋白)。

[0152] 原则上,本发明还涉及第一生物标志物和第二生物标志物的用途或者与所述第一生物标志物特异性结合的检测剂和与所述第二生物标志物特异性结合的检测剂用于评定具有疑似感染的受试者的用途,该第一生物标志物为IL-6,该第二生物标志物为肌酸酐或心肌肌钙蛋白。

[0153] 如本文所使用,术语“检测剂”通常是指与生物标志物特异性结合的任何试剂,即不与在样品中存在的其他组分发生交叉反应的试剂。通常,如本文所提及的特异性结合生物标志物的检测剂可以是抗体、抗体片段或衍生物、适体、生物标志物的配体、生物标志物的受体、已知结合和/或转化生物标志物的酶、或已知与生物标志物特异性结合的小分子。例如,本文中被称为检测剂的抗体包括能够结合抗原或半抗原的多克隆和单克隆抗体及其片段,诸如Fv、Fab和F(ab)2片段。本发明还包括单链抗体和人源化杂合抗体,其中表现出所需抗原特异性的非人类供体抗体的氨基酸序列与人受体抗体的序列组合。供体序列通常将至少包括供体的抗原结合氨基酸残基,但也可以包括供体抗体的其他结构和/或功能相关的氨基酸残基。此类杂合体可以通过本领域熟知的几种方法来制备。适体检测剂例如可以是核酸或肽适体。制备此类适体的方法为本领域众所周知的。例如,可以将随机突变引入作为适体基础的核酸或肽中。然后可以根据本领域已知的筛选程序,例如噬菌体展示,来测试这些衍生物的结合。检测剂的特异性结合意为它不应与在待分析样品中存在的另一种肽、多肽或物质实质上结合,即交叉反应。优选地,特异性结合的生物标志物应以比样品的任何其他成分高至少3倍、更优选至少10倍、甚至更优选至少50倍的亲和力结合。如果非特异性结合可以例如根据其在蛋白质印迹上的大小、或根据其在样品中相对较高的丰度而仍然明确地被区分和测量,则非特异性结合可以是可容忍的。

[0154] 检测剂可以永久地或可逆地融合或连接到可检测的标记。合适的标签为技术人员众所周知的。合适的可检测的标签是可通过合适的检测方法检测到的任何标签。典型的标签包括金颗粒、乳胶珠粒、吖啶酯(acridan ester)、鲁米诺、钌复合物、酶活性标签、放射性标签、磁性标签(“例如磁珠”,包括顺磁标签和超顺磁标签)和荧光标签。酶活性标签包括例如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、β-半乳糖苷酶、荧光素酶,以及它们的衍生物。用于检测的合适底物包括二氨基联苯胺(DAB)、3,3’-5,5’-四甲基联苯胺、NBT-BCIP(4-硝基蓝四唑氯化物和5-溴-4-氯-3-吲哚基磷酸盐,可作为现成储备溶液从罗氏诊断公司购得)、CDP-Star™(Amersham Bio-sciences)、ECF™(Amersham Biosciences)。合适的酶-底物组合可产生有色反应产物、荧光或化学发光,该有色反应产物、荧光或化学发光可根据本领域已知的方法(例如使用感光胶片或合适的摄像系统)来测量。对于酶反应的测量,上述给定的标准类似地适用。典型的荧光标记包括荧光蛋白(诸如GFP及其衍生物)、Cy3、Cy5、德克萨斯红、荧光素和Alexa染料(例如Alexa 568)。进一步的荧光标签可从Molecular Probes(Oregon)购得。同样,还考虑使用量子点作为荧光标签。典型的放射性标记包括35S、125I、32P、33P等。放射性标签可以通过任何已知且适当的方法检测,所述方法为例如感光胶片或

磷光成像仪。合适的标记可以是或包括标签,诸如生物素、洋地黄毒苷、His标签、谷胱甘肽-S-转移酶、FLAG、GFP、myc标签、甲型流感病毒血凝素(HA)、麦芽糖结合蛋白等。

[0155] 例如,在实例中描述了用于生物标志物(诸如AST、ALT、白蛋白和肌酐)的优选试剂。

[0156] 如果生物标志物为酶,诸如AST或ALT,则检测剂可以是酶的底物,或用于检测的任何试剂(参见实例)

[0157] 在一实施例中,ALT(ALAT)的检测剂为例如L-丙氨酸。

[0158] 在一实施例中,AST(ASAT)的检测剂为例如L-天冬氨酸。

[0159] 肌酸酐的检测剂为例如肌酸酐酶,或用于检测的任何试剂(参见实例)。

[0160] 白蛋白的检测剂为例如溴甲酚紫。

[0161] 胆红素的检测剂为,例如亚硝酸钠和磺胺酸,或用于检测的任何试剂(参见实例)。

[0162] 如本文所阐述的生物标志物的确定可以包括在分离步骤(例如通过LC或HPLC)之后进行的质谱法(MS)。如本文所使用,质谱法涵盖允许确定对应于待根据本发明确定的化合物(即生物标志物)的分子量(即质量)或质量变量的所有技术。优选地,如本文所使用,质谱法涉及GC-MS、LC-MS、直接输注质谱法、FT-ICR-MS、CE-MS、HPLC-MS、四极杆质谱法、任何顺序耦合质谱法诸如MS-MS或MS-MS-MS、ICP-MS、Py-MS、TOF或使用上述技术的任何组合方法。如何应用这些技术为本领域技术人员众所周知的。此外,合适的装置是可商购的。更优选地,本文所用的质谱法涉及LC-MS和/或HPLC-MS,即涉及与先前的液相色谱分离步骤可操作地连接的质谱法。优选地,质谱法为串联质谱法(也称为MS/MS)。串联质谱法,也称为MS/MS,涉及两个或多个质谱步骤,并且在阶段之间发生碎裂。在串联质谱分析中,两台质谱仪通过碰撞池串联连接。质谱仪与色谱装置耦合。已通过色谱法分离的样品在第一质谱仪中进行分选和称重,然后在碰撞池中通过惰性气体碎裂,并在第二质谱仪中对一个或多个片段进行分选和称重。在第二台质谱仪中对碎片进行分类和称重。通过MS/MS进行的鉴定更准确。

[0163] 在一实施例中,如本文所使用,质谱法涵盖四极MS。最优选地,所述四极MS如下进行:a)选择通过在质谱仪的第一分析四极杆中电离产生的离子的质量/电荷商(m/z),b)通过在另外的后续四极杆中施加加速电压来将在步骤a)中选择的离子碎裂,该四极杆填充有碰撞气体并充当碰撞室,c)在另外的后续四极杆中选择在步骤b)中通过碎裂过程产生的离子的质量/电荷商,由此该方法的步骤a)至c)至少进行一次,并且分析由于电离过程而存在于物质混合物中的所有离子的质量/电荷商,由此该四极杆充满碰撞气体,但分析过程中不施加加速电压。待根据本发明使用的所述最优选的质谱法的细节可以在WO2003/073464中找到。

[0164] 更优选地,所述质谱法为液相色谱(LC)MS,诸如高效液相色谱(HPLC)MS,特别是HPLC-MS/MS。如本文所使用,液相色谱法是指允许在液相或超临界相中分离化合物(即代谢物)的所有技术。

[0165] 对于质谱分析,样品中的分析物被电离以产生带电分子或分子碎片。然后,测量被电离的分析物、特别是被电离的生物标志物或其片段的质荷比。在电离之前,可以用蛋白酶例如用胰蛋白酶对样品进行切割。蛋白酶将蛋白质生物标志物切割成更小的碎片。

[0166] 因此,质谱分析步骤优选地包括电离步骤,其中待确定的生物标志物被电离。当

然,样品/洗出物中存在的其他化合物也被电离。生物标志物的电离可以通过任何认为合适的方法进行,特别是通过电子轰击电离、快原子轰击、电喷雾电离(ESI)、大气压化学电离(APCI)、基质辅助激光解吸电离(MALDI)。

[0167] 在一优选的实施例中,电离步骤(对于质谱法)通过电喷雾电离(ESI)进行。因此,质谱优选地为ESI-MS(或者如果进行串联MS:ESI-MS/MS)。电喷雾为一种软电离方法,其可在不破坏任何化学键的情况下形成离子。

[0168] 更通常地,另外使用第三生物标志物或与所述第三生物标志物特异性结合的检测剂,所述第三生物标志物

[0169] (i)在肌酸酐为所述第二生物标志物的情况下,为白蛋白、胆红素、丙氨酸转氨酶、天冬氨酸转氨酶、心肌肌钙蛋白、ESM-1或HBP(肝素结合蛋白),或者

[0170] (ii)在心肌肌钙蛋白为所述第二生物标志物的情况下,为胆红素、丙氨酸转氨酶、天冬氨酸转氨酶、HAPT(触珠蛋白)或PSP(胰石蛋白)。

[0171] 本发明还涉及用于评定具有疑似感染的受试者的试剂盒,所述试剂盒包含与第一生物标志物特异性结合的检测剂和与第二生物标志物特异性结合的检测剂,所述第一生物标志物为IL-6,所述第二生物标志物为肌酸酐或心肌肌钙蛋白。

[0172] 如本文所使用,术语“试剂盒”是指上述组分的集合,通常是分开提供的或者单独或在单一容器内提供的。容器通常还包括用于进行本发明方法的说明。这些说明可以是手册的形式,或者可以由计算机程序代码提供,该计算机程序代码当在计算机或数据处理装置上实现时能够进行或支持在本发明的方法中提及的确定和比较。计算机程序代码可提供于数据存储介质或装置诸如光学存储介质(例如,光盘)上或直接提供于计算机或数据处理装置上或可以以下载格式提供,诸如链接至可访问的服务器或云。此外,试剂盒通常可以包括用于校准目的的生物标志物参考量的标准品,如本文别处所详细描述。根据本发明的试剂盒还可以包括进行本发明的方法所必需的其他组分,诸如检测所释放的第二分子所需的溶剂、缓冲液、洗涤溶液和/或试剂。此外,其可以部分地或以其整体构成本发明的装置。

[0173] 更通常地,所述试剂盒进一步包括与第三生物标志物特异性结合的检测剂,所述第三生物标志物

[0174] (i)在肌酸酐为所述第二生物标志物的情况下,为白蛋白、胆红素、丙氨酸转氨酶、天冬氨酸转氨酶、心肌肌钙蛋白、ESM-1或HBP(肝素结合蛋白),或者

[0175] (ii)在心肌肌钙蛋白为所述第二生物标志物的情况下,为胆红素、丙氨酸转氨酶、天冬氨酸转氨酶、HAPT(触珠蛋白)或PSP(胰石蛋白)。

[0176] 应理解,上述术语的定义和解释相应地适用于本说明书和所附权利要求中描述的所有实施例。以下实施例为根据本发明设想的特定实施例:

[0177] 1.一种用于评定具有疑似感染的受试者的方法,所述方法包括以下步骤:

[0178] (a)确定在所述受试者的样品中第一生物标志物的量,所述第一生物标志物为IL6;

[0179] (b)确定在所述受试者的样品中第二生物标志物的量,所述第二生物标志物为肌酸酐或心肌肌钙蛋白;

[0180] (c)将所述生物标志物的量与所述生物标志物的参考进行比较及/或基于所述生物标志物的量来计算用于评定具有疑似感染的所述受试者的评分;以及

[0181] (d)基于在步骤(c)中进行的所述比较和/或所述计算来评定所述受试者。

[0182] 2.根据实施例1所述的方法,其中在步骤(b)中

[0183] (i)如果确定作为所述第二生物标志物的肌酸酐的量,所述方法将进一步包括确定作为第三生物标志物的白蛋白、胆红素、丙氨酸转氨酶、天冬氨酸转氨酶、心肌肌钙蛋白、ESM-1或HBP(肝素结合蛋白)的量;或者

[0184] (ii)如果确定作为所述第二生物标志物的心肌肌钙蛋白的量,所述方法将进一步包括确定作为第三生物标志物的胆红素、丙氨酸转氨酶、天冬氨酸转氨酶、HAPT(触珠蛋白)或PSP(胰石蛋白)的量。

[0185] 3.根据实施例1或2所述的方法,其中该受试者为在急诊科就诊的受试者。

[0186] 4.根据实施例1至3中任一项所述的方法,其中该评定为对发展脓毒症的风险的评定和/或对受试者的病况将恶化的风险的评定。

[0187] 5.根据实施例1至4中任一项所述的方法,其中所述参考为来源于至少一个已知处于发展脓毒症的风险的受试者的每种生物标志物的参考,优选地其中生物标志物中的每一者的量与对应参考基本相同或相似指示受试者处于发展脓毒症的风险,而生物标志物中的每一者的量与对应参考不同则指示受试者未处于发展脓毒症的风险。

[0188] 6.根据实施例1至4中任一项所述的方法,其中所述参考为来源于至少一个已知未处于发展脓毒症的风险的受试者的每种生物标志物的参考,优选地其中生物标志物中的每一者的量与对应参考基本相同或相似指示受试者未处于发展脓毒症的风险,而生物标志物中的每一者的量与对应参考不同则指示受试者处于发展脓毒症的风险。

[0189] 7.根据实施例1至6中任一项所述的方法,其中所述受试者患有感染或疑似患有感染。

[0190] 8.根据实施例1至7中任一项所述的方法,其中所述样品为血液样品或来源于其的样品。

[0191] 9.根据实施例1至8中任一项所述的方法,其中所述受试者为人。

[0192] 10.一种用于评定具有疑似感染的受试者的计算机实现方法,所述计算机实现方法包括以下步骤:

[0193] (a)接收在所述受试者的样品中第一生物标志物的量的值,所述第一生物标志物为IL6;

[0194] (b)接收在所述受试者的样品中第二生物标志物的量的值,所述第二生物标志物为肌酸酐或心肌肌钙蛋白;

[0195] (c)将所述生物标志物的量的值与所述生物标志物的参考进行比较及/或基于所述生物标志物的量来计算用于评定具有疑似感染的所述受试者的评分;以及

[0196] (d)基于在步骤(c)中进行的所述比较和/或所述计算来评定所述受试者。

[0197] 11.根据实施例10所述的方法,其中在步骤(b)中

[0198] (i)如果接收作为所述第二生物标志物的肌酸酐的量的值,所述方法将进一步包括接收作为第三生物标志物的白蛋白、胆红素、丙氨酸转氨酶、天冬氨酸转氨酶、心肌肌钙蛋白、ESM-1或HBP(肝素结合蛋白)的量的值;或者

[0199] (ii)如果接收作为所述第二生物标志物的心肌肌钙蛋白的量的值,所述方法将进一步包括接收作为第三生物标志物的胆红素、丙氨酸转氨酶、天冬氨酸转氨酶、HAPT(触珠

蛋白)或PSP(胰石蛋白)的量的值。

[0200] 12.一种用于评定具有疑似感染的受试者的装置,所述装置包括:

[0201] (a)测量单元,其用于确定在所述受试者的样品中第一生物标志物和第二生物标志物的量,所述第一生物标志物为IL6,所述第二生物标志物为肌酸酐或心肌肌钙蛋白,所述测量单元包括用于所述第一生物标志物和所述第二生物标志物的检测系统;和

[0202] (b)评估单元,其可操作地连接到该测量单元,该评估单元包括具有第一生物标志物和第二生物标志物的存储的参考的数据库,优选地,如实施例1至9中任一项所指定;以及数据处理器,该数据处理器包括指令,该指令用于将第一生物标志物和第二生物标志物的量与参考进行比较及/或用于基于生物标志物的量对用于评定具有疑似感染的受试者的评分进行计算,优选地,如实施例1至9中任一项所指定,以及用于基于该比较来评定所述受试者,所述评估单元能够自动从该测量单元接收生物标志物的量的值。

[0203] 13.根据实施例12所述的装置,其中所述测量单元确定并包括用于第三生物标志物的检测系统,并且其中所述数据库包括第三生物标志物的存储的参考,所述第三生物标志物

[0204] (i)在肌酸酐为所述第二生物标志物的情况下,为白蛋白、胆红素、丙氨酸转氨酶、天冬氨酸转氨酶、心肌肌钙蛋白、ESM-1或HBP(肝素结合蛋白);或者

[0205] (ii)在心肌肌钙蛋白为所述第二生物标志物的情况下,为胆红素、丙氨酸转氨酶、天冬氨酸转氨酶、HAPT(触珠蛋白)或PSP(胰石蛋白)。

[0206] 14.根据实施例12或13所述的装置,其中所述检测系统包括至少一种能够特异性检测生物标志物中的每一者的检测剂。

[0207] 15.一种用于评定具有疑似感染的受试者的装置,该装置包括评估单元,该评估单元包括具有用于第一生物标志物和第二生物标志物的存储的参考的数据库,该第一生物标志物为IL6,所述第二生物标志物为肌酸酐或心肌肌钙蛋白,以及数据处理器,该数据处理器包括指令,该指令用于将第一生物标志物和第二生物标志物的量与参考进行比较,优选地,如实施例1至11中任一项所指定,以及用于基于该比较来评定所述受试者,所述评估单元能够接收在受试者的样品中确定的生物标志物的量的值。

[0208] 16.根据实施例15所述的装置,其中所述数据库包括第三生物标志物的存储的参考,所述第三生物标志物

[0209] (i)在肌酸酐为所述第二生物标志物的情况下,为白蛋白、胆红素、丙氨酸转氨酶、天冬氨酸转氨酶、心肌肌钙蛋白、ESM-1或HBP(肝素结合蛋白);或者

[0210] (ii)在心肌肌钙蛋白为所述第二生物标志物的情况下,为胆红素、丙氨酸转氨酶、天冬氨酸转氨酶、HAPT(触珠蛋白)或PSP(胰石蛋白)。

[0211] 17.第一生物标志物和第二生物标志物或者与所述第一生物标志物特异性结合的检测剂和与所述第二生物标志物特异性结合的检测剂用于评定具有疑似感染的受试者的用途,所述第一生物标志物为IL6,所述第二生物标志物为肌酸酐或心肌肌钙蛋白。

[0212] 18.根据实施例17所述的用途,其中另外使用第三生物标志物或与所述第三生物标志物特异性结合的检测剂,所述第三生物标志物

[0213] (i)在肌酸酐为所述第二生物标志物的情况下,为白蛋白、胆红素、丙氨酸转氨酶、天冬氨酸转氨酶、心肌肌钙蛋白、ESM-1或HBP(肝素结合蛋白),或者

[0214] (ii)在心肌肌钙蛋白为所述第二生物标志物的情况下,为胆红素、丙氨酸转氨酶、天冬氨酸转氨酶、HAPT(触珠蛋白)或PSP(胰石蛋白)。

[0215] 19.一种用于评定具有疑似感染的受试者的试剂盒,所述试剂盒包括与第一生物标志物特异性结合的检测剂和与第二生物标志物特异性结合的检测剂,所述第一生物标志物为IL6,所述第二生物标志物为肌酸酐或心肌肌钙蛋白。

[0216] 20.根据实施例19所述的试剂盒,其中所述试剂盒进一步包括与第三生物标志物特异性结合的检测剂,所述第三生物标志物

[0217] (i)在肌酸酐为所述第二生物标志物的情况下,为白蛋白、胆红素、丙氨酸转氨酶、天冬氨酸转氨酶、心肌肌钙蛋白、ESM-1或HBP(肝素结合蛋白),或者

[0218] (ii)在心肌肌钙蛋白为所述第二生物标志物的情况下,为胆红素、丙氨酸转氨酶、天冬氨酸转氨酶、HAPT(触珠蛋白)或PSP(胰石蛋白)。

[0219] 21.根据前述实施例中任一项的方法、装置、用途或试剂盒,其中评定为对发展脓毒症的风险的评定。

[0220] 22.根据前述实施例中任一项所述的方法、装置、用途或试剂盒,其中预测在48小时内发展脓毒症的风险。

[0221] 本说明书通篇引用的所有参考文献均就上文具体提及的公开内容并且以其整体并入本文。

[0222] 实例1:生物标志物的确定

[0223] 下面简要介绍了用于确定GDF-15的Elecsys®电化学发光(ECL)技术和测定方法。经测试的标志物的浓度通过cobas e801分析仪确定。用cobas e801分析仪检测GDF-15是基于Elecsys®电化学发光(ECL)技术。简而言之,生物素标记和钌标记的抗体与相应量的未稀释样品结合,并在分析仪上温育。随后,在仪器上添加涂有链霉亲和素的磁性微粒并温育,以便促进生物素标记的免疫复合物的结合。在该温育步骤之后,将反应混合物转移到测量池中,在测量池中,磁珠被磁性捕获在电极的表面上。然后将含有用于后续ECL反应的三丙胺(TPA)的ProCell M缓冲液引入到测量池中,以便将结合的免疫测定复合物与游离的剩余颗粒分离。工作电极和对电极之间的电压感应然后引发反应,引致钌复合物以及TPA发射光子。所得的电化学发光信号由光电倍增管记录并转换为指示相应分析物的浓度水平的数值。

[0224] TNTHS或cTNTh(心肌肌钙蛋白T)用针对高灵敏性cTroponinT的商用ECLIA测定法测量,该测定法是一种为cobas Elecsys®ECLIA平台(来自德国的罗氏诊断公司的ECLIA测定法)开发的夹心免疫测定法。该测定法包括特异性结合cTnTh的生物素化和钌化单克隆抗体。对于每个血清样品使用50μL,并在cobas e801分析仪(Roche Diagnostics,Germany)上不经稀释地测量。

[0225] IL6(白细胞介素6)用针对白细胞介素-6的商用ECLIA测定法测量,该测定法是一种为cobas Elecsys®ECLIA平台(来自德国的罗氏诊断公司的ECLIA测定法)开发的夹心免疫测定法。该测定包括特异性结合IL-6的生物素化和钌化单克隆抗体。对于每个血清样品使用30μL,并在cobas e801分析仪(Roche Diagnostics,Germany)上不经稀释地测量。

[0226] ESM1(内皮细胞特异性分子1)用针对ESM-1的稳健原型ECLIA测定法测量,该测定

法是一种为cobas Elecsys® ECLIA平台(来自德国的罗氏诊断公司的ECLIA测定法)内部开发的夹心免疫测定法。该测定包括特异性结合ESM-1的生物素化和钌化单克隆抗体。对于每个血清样品使用20μL,并在cobas e601分析仪(Roche Diagnostics,Germany)上不经稀释地测量。

[0227] PSP(胰石蛋白)在商业Abionic平台(Abionic,Switzerland)上测量。纳米流体PSP(胰石蛋白)免疫测定从30μL EDTA血浆样品定量PSP。测试原理依赖于样品通过固定有抗PSP抗体的纳米尺寸的通道,该样品预先与含有荧光标记的检测抗体的溶液混合几秒钟。这些抗体捕获与荧光检测抗PSP抗体结合的PSP。abioSCOPE读取来自PSP传感器的荧光发射,并利用先进的信号处理,借助测定的嵌入式、特定批次校准将信号转换为浓度。

[0228] CREP2(肌酸酐):该酶促方法基于在肌酸酐酶、肌酸酶和肌氨酸氧化酶的帮助下将肌酸酐转化为甘氨酸、甲醛和过氧化氢。在过氧化物酶的催化下,释放的过氧化氢与4-氨基非那酮和HTIB a)反应,以形成醌亚胺色原体。所形成的醌亚胺色原体的颜色强度与在反应混合物中的肌酸酐浓度成正比。来自罗氏诊断公司(德国)的测定法。分析了1.7μL血浆。样品在cobas c 501分析仪(德国的罗氏诊断公司)上测量。

[0229] LDHI2(乳酸脱氢酶):UV测定乳酸脱氢酶催化L-乳酸转化为丙酮酸;NAD在此过程中被还原为NADH。L-乳酸+NAD+LDH丙酮酸+NADH+H+NADH形成的初始速率与催化LDH活性成正比。其通过光度测定地测量吸光度的增加来确定。来自罗氏诊断公司(德国)的测定法。分析了2.2μL血浆。样品在cobas c 501分析仪(德国的罗氏诊断公司)上测量。

[0230] HAPT2(触珠蛋白):一种针对人触珠蛋白的免疫比浊测定法,人触珠蛋白与特异性抗血清形成沉淀,通过比浊法确定该沉淀。分析了3,9μL血浆。样品在cobas c 501分析仪(德国的罗氏诊断公司)上测量。

[0231] HBP(肝素结合蛋白):HBP的确定基于比浊反应,该反应在存在聚乙二醇聚合物(PEG)的情况下在最佳pH条件下在循环HBP与结合至氯甲基微粒的禽类单特异性多克隆抗体之间发生。变化的幅度与测试样品中HBP的数量成正比。试剂来自Axis-Shield Diagnostics Ltd.(苏格兰)。分析了10μL血浆。样品在cobas c 501分析仪(德国的罗氏诊断公司)上测量。

[0232] 钙卫蛋白:Gentian(挪威)钙卫蛋白免疫测定是粒子增强比浊免疫测定(PETIA),用于人血浆和血清样品中的钙卫蛋白的体外诊断测试。样品在cobas c 501分析仪(德国的罗氏诊断公司)上测量。

[0233] BILI(胆红素):重氮化磺胺酸是由亚硝酸钠和磺胺酸在低pH值下组合形成的。样品中的胆红素(未结合)通过在咖啡因/苯甲酸盐/乙酸盐/EDTA混合物中稀释而溶解。添加重氮化磺胺酸后,溶解的胆红素(包括结合胆红素(单葡萄糖苷酸和二葡萄糖苷酸)和δ型2(与白蛋白共价结合的胆蛋白-胆红素))转化为重氮胆红素,重氮胆红素是一种代表总胆红素的红色发色团,其在540nm处吸收并使用双色(540、700nm)终点技术进行测量。使用样品空白校正。

[0234] ALAT(丙氨酸转氨酶):丙氨酸转氨酶催化L-丙氨酸转氨化为α-酮戊二酸(α-KG),从而形成L-谷氨酸和丙酮酸。所形成的丙酮酸被乳酸脱氢酶(LDH)还原为乳酸,同时氧化还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)。吸光度的变化与丙氨酸转氨酶活性成正比,并且可以使用双色(340、700nm)率技术来测量。

[0235] ASAT(天冬氨酸转氨酶):天冬氨酸转氨酶(AST)催化L-天冬氨酸转氨化为α-酮戊二酸,从而形成L-谷氨酸和草酰乙酸。所形成的草酰乙酸通过苹果酸脱氢酶(MDH)还原为苹果酸,伴随还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)的同时氧化。由于NADH转化为NAD,吸光度随时间的变化与AST活性成正比,并且使用双色(340、700nm)率技术进行测量。

[0236] ALB(白蛋白):在存在增溶剂的情况下,BCP在pH 4.9下与白蛋白结合。白蛋白-BCP复合物的量与白蛋白浓度成正比。该复合物在600nm处吸收,并使用多色(600、540、700nm)终点技术进行测量。

[0237] CRP(C-反应蛋白):涂有抗CRP单克隆抗体的聚苯乙烯颗粒与含有CRP和聚集体的样品发生反应。聚集引起光信号的散射。散射光的强度与在样品中CRP的浓度成正比。量化是与已知的CRP标准进行比较。

[0238] 实例2:来自TRIAGE研究的患者的分析

[0239] TRIAGE研究,瑞士阿劳州立医院(Kantonsspital Aarau)急诊科。(Schuetz 2013,BMC emergencymedicine,13(1),12)。

[0240] 所有连续因医疗紧急情况而寻求急诊科(ED)护理的患者均在ED入院时纳入。从总计4000位患者中,选择了在入院时具有疑似感染的患者子集,并根据以下条件分为极有可能脓毒症病例组或感染对照组:

[0241] • 病例(N=64):如果他们已入住ICU或符合Rhee 2017,“Incidence andTrends of Sepsis in US Hospitals Using Clinical vs Claims Data,2009-2014.”的标准,则极有可能在ED就诊后48小时内脓毒症病例恶化/严重程度更高。JAMA 318(13):1241-1249准则,则极有可能病情恶化/严重程度更高。

[0242] • 对照(N=207):具有疑似感染但在ED就诊后48h内无脓毒症的患者。

[0244] 通过逻辑回归对标志物进行数学组合,并使用“接受者操作特征曲线下面积”(AUC)作为标志物性能的一般测量。

[0245] 与单个标志物相比,具有改善了至少一个百分点的AUC的标志物对组合(双变量标志物组合)在表1中示出。

[0246] 表1:双变量标志物组合及其联合性能(AUC.bi)、第一标志物(AUC.1)和第二标志物(AUC.2)的单变量性能、以及双变量标志物与最佳单一标志物相比的性能改善(Impr.AUC)。

[0247]

标志物	AUC.bi	AUC.1	AUC.2	Impr.AUC
IL6 + CREP2	0.8414	0.7328	0.7903	0.0511
IL6 + TNTHS	0.8385	0.7328	0.7967	0.0419

[0248] 与双变量标志物对以及所有三种单一标志物相比,具有改善了至少一个百分点的AUC的标志物三重组合(三变量标志物组合)在表2中示出。

[0249] 表2:三变量标志物组合及其联合性能(AUC.tri),表1中列出的前两种标志物的双变量性能(AUC.bi),第一个标志物(AUC.1)、第二个标志物(AUC.2)和第三个标志物(AUC.3)的单变量性能,以及三变量标志物相对于双变量标志物的性能改善(Impr.AUC)。

[0250]

标志物	AUC.tri	AUC.bi	AUC.1	AUC.2	AUC.3	Impr.AUC
IL6 + CREP2 + ALB	0.8523	0.8414	0.7328	0.7903	0.6701	0.0109
IL6 + CREP2 + BILI	0.8648	0.8414	0.7328	0.7903	0.6829	0.0234
IL6 + CREP2 + ASAT	0.8790	0.8414	0.7328	0.7903	0.6939	0.0376
IL6 + CREP2 + ALAT	0.8692	0.8414	0.7328	0.7903	0.6004	0.0278
IL6 + CREP2 + TNTHS	0.8637	0.8414	0.7328	0.7903	0.7967	0.0223
IL6 + CREP2 + ESM1	0.8515	0.8414	0.7328	0.7903	0.7280	0.0101
IL6 + CREP2 + HBP	0.8565	0.8414	0.7328	0.7903	0.5094	0.0151
IL6 + TNTHS + BILI	0.8572	0.8385	0.7328	0.7967	0.6829	0.0187
IL6 + TNTHS + ASAT	0.8618	0.8385	0.7328	0.7967	0.6939	0.0233
IL6 + TNTHS + ALAT	0.8543	0.8385	0.7328	0.7967	0.6004	0.0158
IL6 + TNTHS + PSP	0.8516	0.8385	0.7328	0.7967	0.7372	0.0131
IL6 + TNTHS + HAPT2	0.8528	0.8385	0.7328	0.7967	0.5641	0.0143

[0251] 与单一标志物相比,没有改善的标志物双变量组合的示例在表3中示出。

[0252] 表3:双变量标志物组合及其联合性能(AUC.bi)、第一标志物(AUC.1)和第二标志物(AUC.2)的单变量性能、以及双变量标志物与最佳单一标志物相比的性能改善(Impr.AUC)。

[0253]

标志物	AUC.bi	AUC.1	AUC.2	Impr.AUC
IL6 + 钙卫蛋白	0.7235	0.7328	0.5801	-0.0094
IL6 + LDHI2	0.7315	0.7328	0.5740	-0.0013
IL6 + CRP	0.7321	0.7328	0.6194	-0.0008