



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103954748 A

(43) 申请公布日 2014. 07. 30

(21) 申请号 201410127951. 5

(22) 申请日 2014. 04. 01

(71) 申请人 浙江大学

地址 310027 浙江省杭州市西湖区浙大路
38 号

(72) 发明人 李兰娟 郭静 陈瑜

(74) 专利代理机构 杭州求是专利事务有限公
司 33200

代理人 林松海

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006. 01)

权利要求书1页 说明书5页 附图13页

(54) 发明名称

筛选体外血浆中 H7N9 生物标记物的方法及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种筛选体外血浆中 H7N9 生物标记物的方法及其应用。1) 制备多例 H7N9 患者的血浆样本, 2) 检测血浆样本的细胞因子及趋化因子, 获得细胞因子及趋化因子的数据, 3) 比较 H1N1 患者、健康对照血浆中的细胞因子及趋化因子, 分析处理数据, 获得 H7N9 生物标记物, 4) 从步骤 3) 所述的 H7N9 生物标记物中确定死亡风险的生物标记物。本发明从免疫分子角度对 H7N9 患者的细胞因子及趋化因子进行检测分析, 从而建立有效的 H7N9 免疫分子图谱, 并将其用于体外评估 H7N9 患者死亡风险。该方法的灵敏度及特异性均优于传统的检测方法。

	发病第一周 (N=21)			发病第二周 (N=30)		
	Spearman	P 值	FDR	Spearman	P 值	FDR
细胞因子/趋化因子						
IP-10/MIG	-0.629	0.002	0.02	-0.833	<0.001	<0.001
SCF/beta	-0.507	0.019	0.043	-0.697	<0.001	<0.001
NGF/MIF	---	---	---	-0.597	<0.001	0.003
SCGF/beta	---	---	---	-0.584	0.001	0.002
HGF	-0.486	0.026	0.038	-0.53	0.003	0.006
IL-18	---	---	---	-0.501	0.005	0.01
MCP-1	-0.569	0.007	0.032	-0.492	0.006	0.011
IL-6	-0.475	0.03	0.038	-0.49	0.006	0.01
---	---	---	---	-0.454	0.012	0.017
---	---	---	---	-0.399	0.029	0.033
临床指标						
PaO ₂ /FiO ₂ ratio	---	---	---	0.462	0.031	0.032
CRP	---	---	---	-0.438	0.016	0.021

1. 一种筛选体外血浆中 H7N9 生物标记物的方法,其特征在于,包括下列步骤:
 - 1) 制备多例 H7N9 患者的血浆样本,
 - 2) 检测血浆样本的细胞因子及趋化因子,获得细胞因子及趋化因子的数据,
 - 3) 比较 H1N1 患者、健康对照血浆中的细胞因子及趋化因子,分析处理数据,获得 H7N9 生物标记物,
 - 4) 从步骤 3) 所述的 H7N9 生物标记物中确定死亡风险的生物标记物。
2. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,步骤 2) 所述的检测采用液相芯片技术。
3. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,步骤 3) 所述的分析处理数据采用 SPSS 软件进行处理。
4. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,步骤 3) 所述的 H7N9 生物标记物为至少包括以下生物标记物中多种的组合,所述的生物标记物选自 MIF、SCF、MCP-1、HGF、SCGF-beta、IL-18、IP-10 及 IFN- γ 。
5. 一种 H7N9 疾病的严重程度的评估方法、监测疾病进展或评价治疗的方法,其特征在于,通过定量或定性比较患者与正常对照的 H7N9 生物标记物得知疾病严重程度,或者监测疾病进展,或者评价治疗。
6. 根据权利要求 5 所述的方法,其特征在于,所述的 H7N9 生物标记物为至少包括以下生物标记物中多种的组合,所述的生物标记物选自 MIF、SCF、MCP-1、HGF、SCGF-beta、IL-18、IP-10 及 IFN- γ 。
7. 一种评估 H7N9 疾病严重程度的试剂盒,其特征在于,主要在于定量检测 H7N9 生物标记物。
8. 根据权利要求 7 所述的方法,其特征在于,所述的 H7N9 生物标记物为至少包括以下生物标记物中多种的组合,所述的生物标记物选自 MIF、SCF、MCP-1、HGF、SCGF-beta、IL-18、IP-10 及 IFN- γ 。

筛选体外血浆中 H7N9 生物标记物的方法及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物检测技术领域,尤其涉及新的免疫标志物 -H7N9 患者血浆细胞因子及趋化因子,可在体外检测 H7N9 患者死亡的风险。

背景技术

[0002] 人禽流感病毒依据禽甲型流感病毒外膜血凝素 (H) 和神经氨酸酶 (N) 蛋白抗原性不同,目前已发现并确定为 17 个 H 亚型 (H1~H17) 和 10 个 N 亚型 (N1 ~ N10)。上述 H 亚型和 N 亚型相互组合形成了上百种不同 HxNx 亚型的禽甲型流感病毒,禽类特别是水禽一般是这些流感病毒的自然宿主,且主要在禽类中存在和传播流行。

[0003] 2013 年以前 H7N9 亚型流感病毒仅在禽类中发现,在荷兰、日本及美国等地曾发生过禽间暴发疫情,但未发现过人感染情况。2013 年 3 月底,新型的 H7N9 亚型禽流感病毒在上海和安徽两地率先发现。从 2013 年 4 月至 2014 年 3 月 7 日,全国人感染 H7N9 禽流感确诊病例总计 384 例,其中死亡 100 例。之前报道的 111 例患者中,76.6% 的患者收住 ICU 治疗,其中有 70% 的患者发展为急性呼吸窘迫综合征。患者平均年龄为 61 岁,65 岁以上患者比例达 42.3%,31.5% 患者为女性。尽管进行了综合的治疗,患者死亡率仍高达 27%。

[0004] H7N9 感染者外周血中存在高细胞因子血症。据报道 H5N1 感染患者的血中也存在高细胞因子血症。然而,尚无预测疾病严重程度及预后的生物标志物报道。重症 H7N9 感染者死亡率高,尽管迫切需要预测潜在致命禽流感感染的疾病进展及预后的生物标志物,但是目前尚无公开的报道。

[0005] 液相芯片,也称为微球体悬浮芯片,是基于 xMAP 技术的生物芯片技术平台,它是在不同荧光编码的微球上进行抗原-抗体、酶-底物、配体-受体的结合反应及核酸杂交反应,通过红、绿两束激光分别检测微球编码和报告荧光来达到定性和定量的目的,一个反应孔内可以完成多达 100 种不同的生物学反应,是继基因芯片、蛋白芯片之后的新一代高通量分子检测技术平台。

发明内容

[0006] 为了克服现有技术的不足,本发明的目的是提供筛选体外血浆中 H7N9 生物标记物的方法及其应用。本发明建立了一套有效的方法,用于在分离的血浆中体外检测 H7N9 患者细胞因子及趋化因子水平用以评估 H7N9 患者死亡的风险,即通过测定 H7N9 患者、H1N1 患者及健康对照组的细胞因子及趋化因子,进行差异分析,寻找新的免疫标志物,从而对 H7N9 患者进行更全面的早期筛查和检测。

[0007] 本发明解决其技术问题所采用的技术方案如下所述。

[0008] 一种筛选体外血浆中 H7N9 生物标记物的方法,包括下列步骤:

- 1) 制备多例 H7N9 患者的血浆样本,
- 2) 检测血浆样本的细胞因子及趋化因子,获得细胞因子及趋化因子的数据,
- 3) 比较 H1N1 患者、健康对照血浆中的细胞因子及趋化因子,分析处理数据,获得 H7N9

生物标记物，

4) 从步骤 3) 所述的 H7N9 生物标记物中确定死亡风险的生物标记物
步骤 2) 所述的检测采用液相芯片技术。

[0009] 步骤 3) 所述的分析处理数据采用 SPSS 软件进行处理。

[0010] 步骤 3) 所述的 H7N9 生物标记物为至少包括以下生物标记物中多种的组合，所述的生物标记物选自 MIF、SCF、MCP-1、HGF、SCGF-beta、IL-18、IP-10 及 IFN- γ 。

[0011] 一种 H7N9 疾病的严重程度的评估方法、监测疾病进展或评价治疗的方法，通过定量或定性比较患者与正常对照的 H7N9 生物标记物得知疾病严重程度，或者监测疾病进展，或者评价治疗。

[0012] 所述的 H7N9 生物标记物为至少包括以下生物标记物中多种的组合，所述的生物标记物选自 MIF、SCF、MCP-1、HGF、SCGF-beta、IL-18、IP-10 及 IFN- γ 。

[0013] 一种评估 H7N9 疾病严重程度的试剂盒，主要在于定量检测 H7N9 生物标记物。

[0014] 所述的 H7N9 生物标记物为至少包括以下生物标记物中多种的组合，所述的生物标记物选自 MIF、SCF、MCP-1、HGF、SCGF-beta、IL-18、IP-10 及 IFN- γ 。

[0015] 本发明的有益效果是：由于本发明应用液相芯片技术，从免疫分子角度对 H7N9 患者的细胞因子及趋化因子进行检测分析，从而建立有效的 H7N9 免疫分子图谱，并将其用于体外评估 H7N9 患者死亡风险。该方法的灵敏度及特异性均优于传统的检测方法。

附图说明

[0016] 下面结合附图和实施例对本发明做进一步说明。

[0017] 图 1 (A) 是比较 6 例健康对照组、21 例 H1N1 患者细胞因子 / 趋化因子水平；

图 1 (B) 是比较 6 例健康对照组、21 例 H1N1 患者与 46 例 H7N9 患者细胞因子 / 趋化因子水平；

其中，图 1 (A) 和图 1 (B) 中，

a: 对照组与 H1N1 患者发病第 1 周组比较，

b: 对照组与 H1N1 患者发病第 2 周组比较，

c: 对照组与 H1N1 患者发病 15 天后组比较，

d: H1N1 患者发病第 1 周组与发病第 2 周组比较，

e: H1N1 患者发病第 1 周组与发病 15 天后组比较，

f: H1N1 患者发病第 2 周组与发病 15 天后组比较，

g: 对照组与 H7N9 患者发病第 1 周组比较，

h: 对照组与 H7N9 患者发病第 2 周组比较，

i: 对照组与 H7N9 患者发病 15 天后组比较，

j: H7N9 患者发病第 1 周组与发病第 2 周组比较比较，

k: H7N9 患者发病第 1 周组与发病 15 天后组比较，

l: H7N9 患者发病第 2 周组与发病 15 天后组比较，

m: H1N1 患者发病第 1 周组与 H7N9 患者发病第 1 周组比较，

n: H1N1 患者发病第 2 周组与 H7N9 患者发病第 2 周组比较，

o: H1N1 患者发病 15 天后组与 H7N9 患者发病 15 天后组比较；

图 2 是与 H7N9 感染者 CT 值高度相关的细胞因子 / 趋化因子 ;
图 3 是与 H7N9 感染者 APACHE II 评分高度相关的细胞因子 / 趋化因子 ;
图 4 是与 H7N9 患者预后相关的细胞因子 / 趋化因子 ;
图 5 是 H7N9 患者发病第二周血浆 MIF 的 ROC 曲线 ;
图 6 是 H7N9 患者发病第二周血浆 SCF 的 ROC 曲线 ;
图 7 是 H7N9 患者发病第二周血浆 MCP-1 的 ROC 曲线表 ;
图 8 是 H7N9 患者发病第二周血浆 HGF 的 ROC 曲线表 ;
图 9 是 H7N9 患者发病第二周血浆 SCGF-beta 的 ROC 曲线表 ;
图 10 是 H7N9 患者发病第二周血浆 IP-10 的 ROC 曲线表 ;
图 11 是 H7N9 患者发病第二周血浆 IL-18 的 ROC 曲线表 ;
图 12 是 H7N9 患者发病第二周血浆 IFN-gamma 的 ROC 曲线表 ;
图 13 是 H7N9 患者发病第二周 CRP 的 ROC 曲线表 ;
图 14 是 H7N9 患者发病第二周 PaO₂/FiO₂ 的 ROC 曲线。

具体实施方式

[0018] 本发明的具体方案由以下实施例给出 :

H7N9 患者血浆免疫因子的测定

(一) 实验样本

1、H7N9 患者 46 例,发病 2 周内的患者 35 例,血浆样本 80 份。平均年龄 61 岁,其中男性 22 人。

[0019] 2、H1N1 患者 21 例,平均年龄 53.9 岁,其中男性 14 人。

[0020] 3、对照样本 6 人,均取自健康志愿者。

(二) 实验材料

1,试剂 Bio-Plex Pro Human Cytokine Array 27-Plex Group I、21-Plex Group II,滤纸,1ml 排枪,200ul 排枪,1ml 无菌枪头,200ul 无菌枪头,10ul 无菌枪头 2,仪器 Luminex200,水平震荡仪,磁力架,1.5mlEP 管,2mlEP 管。

(三) 实验步骤

1、病例的采集

H7N9 患者的确诊根据流行病学接触史、临床表现及实验室检查结果,可作出人感染 H7N9 禽流感的诊断。在流行病学史不详的情况下,根据临床表现、辅助检查和实验室检测结果,特别是从患者呼吸道分泌物标本中分离出 H7N9 禽流感病毒,或 H7N9 禽流感病毒核酸检测阳性,或动态检测双份血清 H7N9 禽流感病毒特异性抗体水平呈 4 倍或以上升高,可作出人感染 H7N9 禽流感的诊断

H1N1 患者确诊:出现流感样临床表现,同时有以下一种或几种实验室检测结果:(1)甲型 H1N1 流感病毒核酸检测阳性(可采用 real-time RT-PCR 和 RT-PCR 方法);(2)分离到甲型 H1N1 流感病毒;(3)双份血清甲型 H1N1 流感病毒的特异性抗体水平 4 倍或 4 倍以上升高。

2、血浆的制备:

患者及对照组于清晨空腹取外周血 3ml 置于 EDTA 抗凝的一次性玻璃采血管内,4° C

3000 转离心 10min, 分离得到的血浆 -80℃ 冰箱保存。

[0024] 3、液相芯片处理

值得指出的是, 本发明以液相芯片为例对细胞因子及趋化因子进行检测, 对于本领域技术人员来说其它高通量的方法也足以胜任检测分析任务。

[0025] 根据说明书配置标准品、coupled beads、detection antibodies 以及 Streptavidin-PE。detection antibodies 用前 15 分钟配置, Streptavidin-PE 用前 10 分钟配置。

[0026] 1) 每孔加入 100ul wash buffer 润板, 弃上清, 板底用滤纸吸干。

[0027] 2) 每孔加入 50ul coupled beads, 洗板 2 次。

[0028] 3) 加入标准品、样本。封口避光后将孔板置于振荡器上室温下孵育 30 分钟。

[0029] 4) 用 wash buffer 洗板 3 次。每孔加入 25ul detection antibody, 封口避光后将孔板置于振荡器上室温下孵育 30 分钟。

[0030] 5) 将孔板置于磁力架上, 弃去上清, 板底用滤纸吸干, 用 wash buffer 洗板 3 次。每孔加入 50ul streptavidin-PE, 封口避光后将孔板置于振荡器上室温下孵育 10 分钟。

[0031] 6) 将孔板置于磁力架上, 弃去上清, 板底用滤纸吸干, 用 wash buffer 洗板 3 次。每孔加入 125 μ l assay buffer, 封口避光, 1, 100 rpm 振荡器震荡 30 秒。Luminex 上机检测及其数据分析。

[0032] 4、芯片检测及数据的采集

利用 xPONENT 3.1 software 进行初始数据分析。利用 SPSS16.0 进行统计分析。

[0033] 5、数据分析

1) H7N9 患者相关免疫因子模型的建立

根据距离发病时间的不同将 46 份 H7N9 患者血浆样本、21 份 H1N1 患者血浆样本分为发病第一周样本 (H1N1 样本 10 份, H7N9 样本 24 份), 发病第二周样本 (H1N1 样本 7 份, H7N9 样本 11 份), 发病 15 天以后的血浆样本 (H1N1 样本 4 份, H7N9 样本 11 份)。健康对照血浆 6 例。建立免疫因子的 H7N9 患者血浆差异模型。利用 Mann-Whitney U 检验检测不同组的细胞因子及趋化因子间差异的显著性。Spearman's rank correlation coefficient analysis 用于免疫因子与病毒载量及疾病严重程度的相关性分析。Benjamini & Hochberg method 用于控制多重检验的假阳性率。ROC 曲线用于预测分析。设定双侧检验显著性水平为 $P < 0.05$

2) H7N9 患者相关免疫因子预测致命预后模型的建立

收集患者采血当天的 CRP 及 APACHE II, 计算 CRP 及 APACHE II 对 H7N9 患者疾病严重程度及死亡预测的灵敏度、特异度、阳性预测值、阴性预测值, 评价该模型的有效性。

[0034] 6、实验结果

1) H7N9 患者相关免疫因子模型的数据分析: 采用 SPSS16.0 对 46 例 H7N9 患者、21 例 H1N1 患者及 6 例健康志愿者免疫因子进行比较和统计学分析, 结果显示所检测的 H7N9 禽流感患者外周血 48 种细胞因子及趋化因子中有 34 种在发病 1 周组较健康对照组表达有显著差异 ($P < 0.05$), 水平显著升高。H7N9 禽流感患者发病第 1 周组有 28 种细胞因子及趋化因子水平显著高于发病同期的 H1N1 患者。以上升高的细胞因子包括 Th1 型细胞因子 (如 IP-10、IL-2、IFN- γ 、TNF- α 和 IL-1 β 等)、Th2 型细胞因子 (IL-4、IL-6、IL-10 和 IL-13)

及 TH17 型细胞因子(IL-17),H7N9 禽流感患者发病第 2 周组有类似的变化趋势。这些均表明 H7N9 禽流感患者存在显著的细胞因子风暴。如图 1 (A)、1 (B) 所示。

[0035] 2) H7N9 患者相关免疫因子与患者病毒载量的相关性分析:采用 SPSS16.0 进行 Spearman's rank correlation coefficient analysis,研究发现 IP-10, MIG, MIF, HGF 及 IL-18 在患者发病第一周、第二周与患者的病毒载量正相关;SCF, beta-NGF 及 SCGF-beta 在患者发病第二周与患者的病毒载量正相关。研究结果表明 H7N9 病毒诱导了高细胞因子血症,如图 2 所示。

[0036] 3) H7N9 患者相关免疫因子与患者疾病严重程度的相关性分析:采用 SPSS16.0 进行 Spearman's rank correlation coefficient analysis,研究发现 SCF、HGF、MIF、IL-18、IP-10 及 MIG 在患者发病第一周、第二周与患者的 APACHE II 评分正相关,SCGF-beta 在患者发病第二周与患者的 APACHE II 评分正相关。研究结果表明 H7N9 病毒诱导的高细胞因子血症与疾病的严重程度正相关,如图 3 所示。

[0037] 4) H7N9 患者相关免疫因子与患者致命预后的相关性分析:根据患者的死亡与否,将患者分为好转组及死亡组,通过 Mann-Whitney U 检验发现死亡患者发病第二周相关免疫因子 HGF, SCF, IL-18, IP-10, MIF 及 SCGF-beta 水平较好转组发病第二周显著升高,如图 4 所示。

[0038] 5) H7N9 患者相关免疫因子预测患者致命的预后:采用 SPSS16.0 计算所有显著升高的相关免疫因子以及 PaO₂/FiO₂ ratios 及 CRP 的 ROC 曲线的曲线下面积。研究发现 MIF, SCF, MCP-1, HGF, SCGF-beta, IP-10, IL-18 及 IFN- γ 较其他免疫因子 ROC 的曲线下面积更高,且 MIF、SCF、MCP-1、HGF 及 SCGF-beta 较 PaO₂/FiO₂ ratios 及 CRP 的曲线下面积更高,更能预测患者致命的预后,如图 5- 图 14 所示。

B

	炎症因子 (n=24)			H7N9 (n=46)			无症状 (n=11)			无症状 (n=11)		
	Mean	SD	P ^a	Mean	SD	P ^b	Mean	SD	P ^c	Mean	SD	P ^d
GMA-CSF	339.06	172.28	<0.001	193.73	121.14	<0.001	111.48	122.53	0.007	0.026	<0.001	0.122
IP-10	96542.29	66191.64	<0.001	54232.48	28556.77	<0.001	14333.58	24884.23	0.021	0.088	<0.001	0.003
IL-10	144.11	95.86	<0.001	70.49	46.73	<0.001	50.79	65.28	0.035	0.026	0.002	0.094
VEGF	297.95	354.14	<0.001	90.04	61.86	<0.001	237.15	282.28	0.003	0.014	0.356	0.25
IL-6	458.11	842.75	<0.001	114.1	49.48	<0.001	130.63	178.33	0.035	0.002	0.006	0.533
IL-5	133.14	95.03	<0.001	99.01	39.31	<0.001	66.61	86.23	0.76	0.434	0.03	0.209
IL-17A	348.4	250.25	<0.001	159.73	134.74	<0.001	239.82	382.19	0.263	0.028	0.024	0.374
MIG	13436.62	15595.19	<0.001	3981.05	2103.34	<0.001	1959.72	2058.38	0.088	0.241	0.003	0.033
IL-8	293.28	128.54	<0.001	217.84	82.97	<0.001	131.89	129.64	0.007	0.095	0.002	0.139
HGF	5547.17	18788.88	<0.001	793.22	514.05	<0.001	2028.33	3785.47	0.002	0.915	0.186	0.158
MCP-1	234.3	313.91	<0.001	116.23	33.97	<0.001	124.53	58.85	<0.001	0.11	0.136	0.922
IL-1beta	26.96	25.44	<0.001	17.68	6.19	<0.001	11.68	15.55	0.362	0.374	0.008	0.106
MIP-1alpha	58.81	37.73	<0.001	40.63	14.24	<0.001	23.6	26.74	0.362	0.207	0.004	0.081
CTACK	10967.08	6259.12	<0.001	10824.17	3393.51	<0.001	3484.85	3669.94	0.482	0.456	<0.001	0.001
SDF-1alpha	2357.38	753.9	<0.001	2891.82	386.95	<0.001	908.63	1246.6	0.96	0.059	0.003	0.003
TNF-alpha	434.82	290.12	<0.001	325.33	163.85	<0.001	200.05	269.00	0.362	0.522	0.009	0.093
IL-13	75.13	60.61	<0.001	47.5	17.98	<0.001	34.46	36.68	0.131	0.241	0.017	0.107
IL-2	94.34	77.15	0.002	54.12	48.13	0.007	50.64	74.16	0.363	0.085	0.031	0.373
beta-NGF	47.61	30.17	<0.001	53.22	13.96	<0.001	14.49	26.94	0.208	0.384	<0.001	0.002
basic-FGF	229.08	103.46	<0.001	154.9	71.89	<0.001	108.96	134.51	0.268	0.036	0.005	0.1
IFN-gamma	1045.33	595.16	<0.001	828.95	333.26	<0.001	519.18	548.59	0.035	0.57	0.016	0.123
G-CSF	406.91	172.93	<0.001	371.00	186.39	<0.001	170.85	199.04	0.19	0.346	0.002	0.02
IL-4	35.95	17.48	<0.001	28.06	10.15	<0.001	18.1	20.49	0.365	0.207	0.012	0.139
IL-7	56.7	42.63	<0.001	43.13	19.04	<0.001	32.28	39.19	0.362	0.499	0.046	0.107
MIF	6704.86	8785.16	<0.001	3968.82	2085.6	<0.001	1519.66	1243.84	0.227	0.434	<0.001	0.006
IL-9	80.73	48.26	<0.001	55.12	37.7	<0.001	72.79	33.11	0.007	0.098	0.07	0.818
MIP-1beta	191.45	148.52	<0.001	88.35	28.74	<0.001	176.87	115.12	<0.001	0.007	0.859	0.017
SCF	470.99	433.46	0.008	274.65	120.33	<0.001	162.74	112.44	0.035	0.374	0.026	0.045
IL-1ra	808.00	508.89	<0.001	404.85	206.62	<0.001	289.18	358.3	0.688	0.007	<0.001	0.071
IL-18	500.35	421.82	0.002	627.91	122.49	0.007	120.18	43.3	0.044	0.256	<0.001	0.003
PDGF-bb	3314.97	2131.4	0.002	1635.8	949.34	0.005	3445.35	4524.77	0.035	0.016	0.214	0.718
IL-12p70	46.3	48.89	0.004	21.49	16.45	0.016	22.93	28.51	0.056	0.075	0.286	0.743
RANTES	4618.49	2745.17	<0.001	2947.19	1253.42	<0.001	6027.62	4280.65	<0.001	0.055	0.394	0.02
SCF-beta	111894.6	51239.37	0.001	80444.73	23216.23	0.016	90322.47	25575.08	0.005	0.062	0.214	0.25

图 1 (B)

	发病第一周 (N=21)			发病第二周 (N=30)		
	Spearman	P 值	FDR	Spearman	P 值	FDR
细胞因子/趋化因子						
IP-10 MIG	-0.629	0.002	0.02	-0.833	<0.001	<0.001
SCF beta	-0.507	0.019	0.043	-0.697	<0.001	<0.001
NGF MIF	—	—	—	-0.597	<0.001	0.003
SCGF-beta	—	—	—	-0.584	0.001	0.002
HGF	-0.486	0.026	0.038	-0.53	0.003	0.006
IL-18	—	—	—	-0.501	0.005	0.01
MCP-1	-0.569	0.007	0.032	-0.492	0.006	0.011
IL-6	-0.475	0.03	0.038	-0.49	0.006	0.01
	—	—	—	-0.454	0.012	0.017
	—	—	—	-0.399	0.029	0.033
临床指标						
PaO ₂ /FiO ₂ ratio	—	—	—	0.462	0.031	0.032
CRP	—	—	—	-0.438	0.016	0.021

图 2

	发病第一周 (N=21)			发病第二周 (N=32)		
	Spearman	P 值	FDR	Spearman	P 值	FDR
细胞因子/趋化因子						
SCF	0.656	0.001	0.003	0.8	<0.001	<0.001
HGF	0.747	0.000	0.000	0.796	<0.001	<0.001
SCGF-beta	—	—	—	0.713	<0.001	<0.001
MIF	0.446	0.043	0.047	0.648	<0.001	<0.001
IL-18	0.704	0.000	0.001	0.607	<0.001	0.001
IP-10	0.6	0.004	0.007	0.575	0.001	0.001
MIG	0.643	0.002	0.004	0.557	0.001	0.002
IL-6	—	—	—	0.483	0.005	0.009
MCP-1	0.439	0.046	0.046	0.463	0.008	0.011
beta-NGF	0.499	0.021	0.032	0.43	0.014	0.019
临床指标						
CRP	0.471	0.031	0.041	0.567	0.001	0.002
PaO ₂ /FiO ₂	-0.632	0.003	0.006	-0.473	0.02	0.024

图 3

	发病第一周					发病第二周					
	好转组 (n=12)		死亡组 (n=5)		P 值	好转组 (n=16)		死亡组 (n=8)		P 值	
	Mean	SD	Mean	SD		Mean	SD	Mean	SD		
细胞因子/趋化因子											
MIF	6788.97	11052.77	8350.28	7592.12	—	2478.12	976.28	10230.9	8136.02	<0.001	
MCP-1	185.02	119.67	395.86	373.37	—	104.44	68.94	1143.97	2113.3	0.001	
SCF	334.6	296.8	748.49	608.28	—	144.21	129.21	762.14	530.1	0.001	
HGF	2142.4	5417.31	19960.04	36874.91	—	516.96	384.82	4824.59	4796.72	0.002	
SCGF-beta	106784.14	57776.73	127463.78	47259.38	—	73015.19	36486.71	151362.42	69428.71	0.004	
IP-10	81233.46	58401.52	120058.92	73759.23	—	19832.99	21839.53	70899.03	75499.28	0.008	
IL-18	335.58	267.76	653.74	553.92	—	193.28	142.2	2326.1	2917.72	0.008	
临床指标											
CRP	84.43	70.29	122.24	75.41	—	49.82	58.2	121.91	57.35	0.005	
PaO ₂ /FiO ₂ ratio	190.12	68.47	167.29	128.16	—	204.58	65.88	130.15	99.32	0.021	

图 4

曲线下面积(AUC)	0.953
标准误	0.0397
95% 置信区间	0.781 to 0.998
Z 统计量	11.412
显著性水平 P (面积=0.5) ^a	<0.0001
约登指数	0.8125
阈值	3556-6108
敏感性	87.5
95%置信区间	47.3 - 99.7
特异性	93.75
95%置信区间	69.8 - 99.8
阳性预测值	87.5
95%置信区间	44.0 - 99.8
阴性预测值	93.7
95%置信区间	69.8 - 99.8
阳性似然比	14
95%置信区间	2.1 - 95.1
阴性似然比	0.13
95%置信区间	0.02 - 0.8

a: 已将疾病的患病率考虑在内

图 5

曲线下面积(AUC)	0.93
标准误	0.0497
95%置信区间	0.748 to 0.994
Z 统计量	8.653
显著性水平 P (面积=0.5) ^a	<0.0001
约登指数	0.75
阈值	296.38
敏感性	87.5
95%置信区间	47.3 - 99.7
特异性	87.5
95%置信区间	61.7 - 98.4
阳性预测值	77.8
95%置信区间	37.5 - 97.7
阴性预测值	93.3
95%置信区间	68.1 - 99.8
阳性似然比	7
95%置信区间	1.9 - 26.3
阴性似然比	0.14
95%置信区间	0.02 - 0.9

a: 已将疾病的患病率考虑在内

图 6

曲线下面积(AUC)	0.906
标准误	0.0604
95%置信区间	0.716 to 0.986
z 统计量	6.728
显著性水平 P (面积=0.5) ^a	<0.0001
约登指数	0.8125
阈值	113.0517
敏感性	100
95%置信区间	63.1 - 100.0
特异性	81.25
95%置信区间	54.4 - 96.0
阳性预测值	72.7
95%置信区间	39.0 - 94.0
阴性预测值	100
95%置信区间	75.3 - 100.0
阳性似然比	5.33
95%置信区间	1.9 - 14.8
阴性似然比	0
95%置信区间	—

a: 已将疾病的患病率考虑在内

图 7

曲线下面积(AUC)	0.891
标准误	0.0748
95% 置信区间	0.696 to 0.980
z 统计量	5.223
显著性水平 P (面积=0.5) ^a	<0.0001
约登指数	0.6875
阈值	955.8417
敏感性	75
95%置信区间	34.9 - 96.8
特异性	93.75
95%置信区间	69.8 - 99.8
阳性预测值	85.7
95%置信区间	42.1 - 99.6
阴性预测值	88.2
95%置信区间	63.6 - 98.5
阳性似然比	12
95%置信区间	1.7 - 83.5
阴性似然比	0.27
95%置信区间	0.08 - 0.9

a: 已将疾病的患病率考虑在内

图 8

曲线下面积(AUC)	0.867
标准误	0.0753
95% 置信区间	0.667 to 0.970
Z 统计量	4.874
显著性水平 P (面积=0.5) ^a	<0.0001
约登指数	0.625
阈值	147912.8264
敏感性	50
95%置信区间	15.7 - 84.3
特异性	100
95%置信区间	79.4 - 100.0
阳性预测值	100
95%置信区间	39.8 - 100.0
阴性预测值	80
95%置信区间	56.3 - 94.3
阳性似然比	—
95%置信区间	—
阴性似然比	0.5
95%置信区间	0.3 - 1.0

a: 已将疾病的患病率考虑在内

图 9

曲线下面积(AUC)	0.836
标准误	0.0825
95%置信区间	0.629 to 0.954
z 统计量	4.074
显著性水平 P (面积=0.5) ^a	<0.0001
约登指数	0.625
阈值	57464-7139
敏感性	50
95%置信区间	15.7 - 84.3
特异性	93.75
95%置信区间	69.8 - 99.8
阳性预测值	80
95%置信区间	28.4 - 99.5
阴性预测值	78.9
95%置信区间	54.4 - 93.5
阳性似然比	8
95%置信区间	1.1 - 60.3
阴性似然比	0.53
95%置信区间	0.3 - 1.1

a: 已将疾病的患病率考虑在内

图 10

曲线下面积(AUC)	0.836
标准误	0.118
95%置信区间	0.629 to 0.954
z 统计量	2.855
显著性水平 P (面积=0.5) ^a	0.0043
约登指数	0.6875
阈值	385.5692
敏感性	75
95%置信区间	34.9 - 96.8
特异性	93.75
95%置信区间	69.8 - 99.8
阳性预测值	85.7
95%置信区间	42.1 - 99.6
阴性预测值	88.2
95%置信区间	63.6 - 98.5
阳性似然比	12
95%置信区间	1.7 - 83.5
阴性似然比	0.27
95%置信区间	0.08 - 0.9

^a: 已将疾病的患病率考虑在内

图 11

曲线下面积(AUC)	0.777
标准误	0.108
95%置信区间	0.563 to 0.920
z 统计量	2.579
显著性水平 P (面积=0.5) ^a	0.0099
约登指数	0.5
阈值	323.0447
敏感性	50
95%置信区间	15.7 - 84.3
特异性	93.75
95%置信区间	69.8 - 99.8
阳性预测值	80
95%置信区间	28.4 - 99.5
阴性预测值	78.9
95%置信区间	54.4 - 93.9
阳性似然比	8
95%置信区间	1.1 - 60.3
阴性似然比	0.53
95%置信区间	0.3 - 1.1

a: 已将疾病的患病率考虑在内

图 12

曲线下面积(AUC)	0.859
标准误	0.0832
95%置信区间	0.657 to 0.966
z 统计量	4.322
显著性水平 P (面积=0.5) ^a	<0.0001
约登指数	0.6875
阈值	79.8
敏感性	87.5
95%置信区间	47.3 - 99.7
特异性	81.25
95%置信区间	54.4 - 96.0
阳性预测值	70
95%置信区间	32.8 - 94.1
阴性预测值	92.9
95%置信区间	66.1 - 99.8
阳性似然比	4.67
95%置信区间	1.6 - 13.4
阴性似然比	0.15
95%置信区间	0.02 - 1.0

a: 已将疾病的患病率考虑在内

图 13

曲线下面积(AUC)	0.833
标准误	0.128
95%置信区间	0.577 to 0.966
Z 统计量	2.61
显著性水平 P (面积=0.5) ^a	0.009
约登指数	0.75
阈值	128
敏感性	75
95%置信区间	34.9 - 96.8
特异性	100
95%置信区间	66.4 - 100.0
阳性预测值	100
95%置信区间	47.8 - 100.0
阴性预测值	81.8
95%置信区间	48.2 - 97.7
阳性似然比	—
95%置信区间	—
阴性似然比	0.25
95%置信区间	0.08 - 0.8

^a: 已将疾病的患病率考虑在内

图 14

专利名称(译)	筛选体外血浆中H7N9生物标记物的方法及其应用		
公开(公告)号	CN103954748A	公开(公告)日	2014-07-30
申请号	CN201410127951.5	申请日	2014-04-01
[标]申请(专利权)人(译)	浙江大学		
申请(专利权)人(译)	浙江大学		
当前申请(专利权)人(译)	浙江大学		
[标]发明人	李兰娟 郭静 陈瑜		
发明人	李兰娟 郭静 陈瑜		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/54313 G01N33/56983 G01N2333/11		
其他公开文献	CN103954748B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种筛选体外血浆中H7N9生物标记物的方法及其应用。
 1) 制备多例H7N9患者的血浆样本, 2) 检测血浆样本的细胞因子及趋化因子, 获得细胞因子及趋化因子的数据, 3) 比较H1N1患者、健康对照血浆中的细胞因子及趋化因子, 分析处理数据, 获得H7N9生物标记物, 4) 从步骤3) 所述的H7N9生物标记物中确定死亡风险的生物标记物。本发明从免疫分子角度对H7N9患者的细胞因子及趋化因子进行检测分析, 从而建立有效的H7N9免疫分子图谱, 并将其用于体外评估H7N9患者死亡风险。该方法的灵敏度及特异性均优于传统的检测方法。

	发病第一周 (N=21)			发病第二周 (N=30)		
	Spearman	P 值	FDR	Spearman	P 值	FDR
细胞因子/趋化因子						
IP-10 MIG	-0.629	0.002	0.02	-0.833	<0.001	<0.001
SCF beta-	-0.507	0.019	0.043	-0.697	<0.001	<0.001
NGF MIF	-	-	-	-0.597	<0.001	0.003
SCGF-beta	-	-	-	-0.584	0.001	0.002
HGF	-0.486	0.026	0.038	-0.53	0.003	0.006
IL-18	-	-	-	-0.501	0.005	0.01
MCP-1	-0.569	0.007	0.032	-0.492	0.006	0.011
IL-6	-0.475	0.03	0.038	-0.49	0.006	0.01
	-	-	-	-0.454	0.012	0.017
	-	-	-	-0.399	0.029	0.033
临床指标						
PaO ₂ /FIO ₂ ratio	-	-	-	0.462	0.031	0.032
CRP	-	-	-	-0.438	0.016	0.021