



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103954748 B

(45)授权公告日 2016.08.17

(21)申请号 201410127951.5

(22)申请日 2014.04.01

(73)专利权人 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)

审查员 许珊萍

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。

细胞因子/趋化因子	H7N9患者 (N=25)			H1N1患者 (N=20)		
	Spearman	P-值	FDR	Spearman	P-值	FDR
IP-10/KCCL3	0.628	0.002	0.02	0.458	<0.001	<0.001
SCF/beta	-0.507	0.018	0.042	-0.657	<0.001	0.001
MIP-1A	—	—	—	0.544	<0.001	0.001
SCF/beta	—	—	—	-0.554	0.001	0.001
IP-10	-0.436	0.026	0.038	-0.52	0.001	0.001
IL-18	—	—	—	-0.501	0.005	0.01
MIP-1A	-0.568	0.007	0.032	-0.492	0.008	0.011
IL-18	-0.475	0.03	0.032	-0.418	0.009	0.01
—	—	—	—	-0.454	0.012	0.017
—	—	—	—	-0.399	0.023	0.028
标志物						
Pro/FC <sub>2</sub> ratio	—	—	—	0.463	0.001	0.001
CRP	—	—	—	-0.432	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,从所述的H7N9生物标记物中确定死亡风险的生物标记物;

步骤3)具体包括:A)建立H7N9患者相关免疫因子模型,所述的相关免疫因子为上述细胞因子及趋化因子;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;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 11,计算CRP及APACHE 11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;

B)H7N9患者相关免疫因子模型的数据分析,采用SPSS16.0对H7N9患者、H1N1患者及健康对照免疫因子进行比较和统计学分析;

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;

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;

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检验检测不同组的细胞因子及趋化因子间差异的显著性;

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PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> ratios及CRP的ROC曲线的曲线下面积。

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M1F、SCF、MCP-1、HGF、SCGF-beta、IL-18、IP-10及IFN- $\gamma$ 。

4. 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;所述的H7N9生物标记物同时包括M1F、SCF、MCP-1、HGF、SCGF-beta、IL-18、IP-10及IFN- $\gamma$ 。

5. 一种评估H7N9疾病严重程度的生物标记物,其特征在于,同时包括M1F、SCF、MCP-1、HGF、SCGF-beta、IL-18、IP-10及IFN- $\gamma$ 。

## 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:

[0009] 1)制备多例H7N9患者的血浆样本,

[0010] 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,

[0011] 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，

[0012] 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

[0013] 步骤2)所述的检测采用液相芯片技术。

[0014] 步骤3)所述的分析处理数据采用SPSS软件进行处理。

[0015] 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M1F、SCF、MCP-1、HGF、SCGF-beta、IL-18、IP-10及IFN- $\gamma$ 。

[0016] 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。

[0017] 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M1F、SCF、MCP-1、HGF、SCGF-beta、IL-18、IP-10及IFN- $\gamma$ 。

[0018] 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。

[0019] 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M1F、SCF、MCP-1、HGF、SCGF-beta、IL-18、IP-10及IFN- $\gamma$ 。

[0020] 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

[0021] 下面结合附图和实施例对本发明做进一步说明。

[0022] 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；

[0023] 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；

[0024] 其中，图1(A)和图1(B)中，

[0025] a：对照组与H1N1患者发病第1周组比较，

[0026] b：对照组与H1N1患者发病第2周组比较，

[0027] c：对照组与H1N1患者发病15天后组比较，

[0028] d：H1N1患者发病第1周组与发病第2周组比较，

[0029] e：H1N1患者发病第1周组与发病15天后组比较，

[0030] f：H1N1患者发病第2周组与发病15天后组比较，

[0031] g：对照组与H7N9患者发病第1周组比较，

[0032] h：对照组与H7N9患者发病第2周组比较，

[0033] i：对照组与H7N9患者发病15天后组比较，

[0034] j：H7N9患者发病第1周组与发病第2周组比较比较，

[0035] k：H7N9患者发病第1周组与发病15天后组比较，

[0036] l：H7N9患者发病第2周组与发病15天后组比较，

[0037] m：H1N1患者发病第1周组与H7N9患者发病第1周组比较，

[0038] n：H1N1患者发病第2周组与H7N9患者发病第2周组比较，

[0039] o：H1N1患者发病15天后组与H7N9患者发病15天后组比较；

- [0040] 图2是与H7N9感染者CT值高度相关的细胞因子/趋化因子；
- [0041] 图3是与H7N9感染者APACHE 11评分高度相关的细胞因子/趋化因子；
- [0042] 图4是与H7N9患者预后相关的细胞因子/趋化因子；
- [0043] 图5是 H7N9患者发病第二周血浆MIF的ROC曲线；
- [0044] 图6是H7N9患者发病第二周血浆SCF的ROC曲线；
- [0045] 图7是H7N9患者发病第二周血浆MCP-1的ROC曲线表；
- [0046] 图8是H7N9患者发病第二周血浆HGF的ROC曲线表；
- [0047] 图9是 H7N9患者发病第二周血浆SCGF-beta的ROC曲线表；
- [0048] 图10是H7N9患者发病第二周血浆 IP-10的ROC曲线表；
- [0049] 图11是H7N9患者发病第二周血浆IL-18 的ROC曲线表；
- [0050] 图12是 H7N9患者发病第二周血浆IFN-gamma 的ROC曲线表；
- [0051] 图13是 H7N9患者发病第二周CRP的ROC曲线表；
- [0052] 图14是 H7N9患者发病第二周 PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> 的ROC曲线。

### 具体实施方式

[0053] 本发明的具体方案由以下实施例给出：

[0054] H7N9患者血浆免疫因子的测定

[0055] (一)实验样本

[0056] 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。

[0057] 2、H1N1患者21例,平均年龄53.9岁,其中男性14人。

[0058] 3、对照样本6人,均取自健康志愿者。

[0059] (二)实验材料

[0060] 1,试剂Bio-Plex Pro Human Cytokine Array 27-Plex Group 1、21-Plex Group 11,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。

[0061] (三)实验步骤

[0062] 1、病例的采集

[0063] 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

[0064] 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。

[0065] 2、血浆的制备:

[0066] 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°C冰箱保存。

### [0067] 3、液相芯片处理

[0068] 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于胜任检测分析任务。

[0069] 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。

[0070] 1)每孔加入100ul wash buffer润板,弃上清,板底用滤纸吸干。

[0071] 2)每孔加入50ul coupled beads,洗板2次。

[0072] 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。

[0073] 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。

[0074] 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。

[0075] 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  $\mu$ 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。

### [0076] 4、芯片检测及数据的采集

[0077] 利用xPONENT 3.1 software进行初始数据分析。利用SPSS16.0进行统计分析。

### [0078] 5、数据分析

[0079] 1)H7N9患者相关免疫因子模型的建立

[0080] 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 $P < 0.05$

[0081] 2)H7N9患者相关免疫因子预测致命预后模型的建立

[0082] 收集患者采血当天的CRP及APACHE 11,计算CRP及APACHE 11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。

### [0083] 6、实验结果

[0084] 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1P-10、1L-2、1FN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 和1L-1  $\beta$ 等)、Th2型细胞因子(1L-4、1L-6、1L-10和1L-13)及TH17型细胞因子(1L-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。

[0085] 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1P-10, M1G, M1F, HGF及1L-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。

[0086] 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、M1F、1L-18、1P-10及M1G在患者发病第一周、第二周与患者的APACHE 11评分正相关,SCGF-beta在患者发病第二周与患者的APACHE 11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。

[0087] 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, 1L-18, 1P-10, M1F及SCGF-beta水平较好转组发病第二周显著升高,如图4所示。

[0088] 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PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> ratios及CRP的ROC曲线的曲线下面积。研究发现M1F, SCF, MCP-1, HGF, SCGF-beta, 1P-10, 1L-18及1FN- $\gamma$ 较其他免疫因子ROC的曲线下面积更高,且M1F、SCF、MCP-1、HGF及 SCGF-beta较PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> 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。

HINT (n=21)

	n=6			n=7			n=4		
	Mean	SD	p <sup>2</sup>	Mean	SD	p <sup>2</sup>	Mean	SD	p <sup>2</sup>
506-45F	0.08	0.36	0.002	310.58	45.43	0.026	41.04	0.026	0.825
30-10	301.24	125.46	0.001	7487.00	5533.3	0.003	2144.25	1125.56	0.011
31-30	0.79	0.36	0.008	21.88	9.48	0.033	16.36	11.72	0.133
603F	2.43	4.43	0.001	286.67	155.80	0.002	142.81	79.83	0.008
31-5	4.1	3.13	0.002	28.73	10.86	0.003	45.92	45.80	0.011
31-3	3.71	0.47	0.01	1.26	1.79	0.111	7.44	20.04	0.632
31-17A	5.33	4.32	0.013	23.78	8.51	0.003	28.47	21.46	0.019
3080	315.65	379.49	0.001	3448.07	3287.92	0.003	644.09	246.95	0.011
31-8	2.02	3.79	0.002	41.41	13.02	0.003	37.72	19.63	0.011
3103	160.94	34.04	0.001	823.23	874.19	0.003	1051.18	1480.78	0.134
303P-1	6.95	3.43	0.001	73.7	25.45	0.003	95.08	58.16	0.011
31-10erA	0.81	0.18	0.007	0.17	0.13	0.002	0.42	1.41	0.194
308-10erA	1.62	0.94	0.007	0.29	0.34	0.002	2.53	0.201	0.107
CT40X	307.74	307.64	0.017	537.13	356.67	0.775	361.24	17.06	0.832
30F-10erA	83.03	34.03	0.003	322.86	34.73	0.009	120.43	37.89	0.01
10F-10erA	16.58	2.44	0.183	35.01	19.78	0.002	73.88	62.96	0.019
31-13	2.04	0.57	0.001	21.37	8.04	0.004	22.1	6.58	0.011
31-1	3.65	3.79	0.003	11.92	3.41	0.003	16.93	10.82	0.011
31erA-MCF	2.00	0.33	0.001	3.16	0.65	0.005	3.48	0.67	0.01
31erA-MCF	14.24	5.07	0.002	44.8	6.35	0.003	53.23	22.44	0.011
31F-10erA	66.7	4.63	0.001	327.71	96.23	0.003	602.30	236.77	0.01
6-C3F	27.6	4.94	0.001	30.99	15.98	0.775	54.43	27.86	0.136
31-4	2.66	0.54	0.002	7.35	2.62	0.003	8.01	2.78	0.011
31-7	4.32	0.91	0.015	9.87	5.31	0.032	10.7	8.63	0.087
308	528.46	115.89	0.001	1808.45	925.83	0.006	1203.08	1089.82	0.02
31-9	7.02	3.79	0.001	40.93	19.76	0.003	51.68	36.78	0.011
308P-1-10erA	26.22	7.2	0.003	75.68	14.11	0.003	79.21	30.58	0.011
513	54.46	10.21	0.002	81.29	24.93	0.043	80.54	34.2	0.201
31-30A	113.89	19.29	0.005	192.57	46.78	0.015	209.5	110.24	0.033
31-13	69.08	30.36	0.003	202.13	139.9	0.008	81.82	26.57	0.286
3061-10erA	532.34	97.67	0.001	8836.57	2921.22	0.003	3551.35	700.71	0.011
31-120-30	7.08	2.35	0.002	61.63	27.06	0.002	47.98	17.75	0.011
308P-1-10erA	798.53	160.94	0.001	8854.71	4907.89	0.003	5178.5	6619.26	0.011
513P-10erA	43636.58	180736.42	0.003	63928.64	28331.33	0.008	83639.11	94719.48	0.67

图1(A)

Name	[mu24]		[mu21]		[mu11]		[mu10]		p <sup>o</sup>
	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD		
664-GF	339.06	177.26	<0.001	1311.4	<0.001	121.48	122.53	0.002	0.122
67-10	36542.29	66193.64	<0.001	54132.46	<0.001	14333.98	24994.73	0.021	<0.001
67-13	144.11	95.86	<0.001	46.73	<0.001	50.73	65.26	0.035	0.034
68CF	281.95	354.14	<0.001	61.89	<0.001	237.15	282.28	0.003	0.25
67-5	458.11	842.75	<0.001	114.1	<0.001	336.63	378.33	0.035	0.533
67-14	132.14	55.63	<0.001	24.31	<0.001	69.61	86.23	0.76	0.03
67-17a	248.4	250.25	<0.001	134.74	<0.001	229.82	382.22	0.263	0.374
68b	13436.62	15595.19	<0.001	2103.84	<0.001	1359.72	2058.98	0.088	0.033
67-8	209.28	128.51	<0.001	82.97	<0.001	131.89	129.64	0.007	0.139
67c	3547.17	18798.88	<0.001	524.95	<0.001	3026.33	3785.47	0.002	0.158
687-1	258.4	213.93	<0.001	34.97	<0.001	133.53	58.85	<0.001	0.002
67-18a	26.96	25.44	<0.001	17.68	<0.001	11.68	15.55	0.262	0.106
687-1a	58.81	37.73	<0.001	49.53	<0.001	23.6	26.74	0.362	0.081
676X	13967.68	6359.12	<0.001	3334.51	<0.001	3484.95	3629.94	0.382	<0.001
687-1a	2357.33	753.9	<0.001	366.95	<0.001	808.63	1245.6	0.36	0.039
676-1a	434.82	290.13	<0.001	163.85	<0.001	309.05	269.00	0.362	0.099
67-13	75.13	60.61	<0.001	37.98	<0.001	34.96	36.98	0.131	0.107
67-2	94.34	77.15	<0.001	54.12	<0.001	59.64	74.16	0.363	0.373
68a-RCF	47.61	30.17	<0.001	13.96	<0.001	34.69	26.84	0.308	0.002
68a-TCF	239.08	193.45	<0.001	71.85	<0.001	338.96	314.51	0.268	0.006
676-1a	3045.13	199.18	<0.001	339.26	<0.001	829.18	540.59	0.035	0.139
5-53F	408.91	172.93	<0.001	186.39	<0.001	170.85	199.04	0.19	0.346
67-4	35.91	17.48	<0.001	10.15	<0.001	18.1	20.49	0.363	0.022
67-7	56.7	42.43	<0.001	19.04	<0.001	32.28	30.13	0.262	0.138
687	6704.86	2789.16	<0.001	2885.6	<0.001	1519.05	1243.84	0.277	0.046
67-9	36.71	48.26	<0.001	37.7	<0.001	71.79	33.11	0.007	0.818
687-1a	191.45	148.54	<0.001	28.74	<0.001	176.87	115.12	<0.001	0.809
67	470.89	433.46	<0.001	120.13	<0.001	362.74	312.43	0.035	0.043
67-1a	808.90	508.89	<0.001	206.62	<0.001	289.36	358.3	0.638	0.071
67-13	509.35	421.82	<0.001	127.49	<0.001	44.3	10.93	0.256	<0.001
676-1a	333.97	213.4	<0.001	98.34	<0.001	346.35	4524.77	0.035	0.218
67-1a	46.3	98.69	<0.001	16.45	<0.001	22.93	28.53	0.035	0.743
687-1a	4619.49	2745.17	<0.001	1252.42	<0.001	6027.62	4289.65	<0.001	0.26
676-1a	111294.6	51239.37	<0.001	30544.73	<0.001	90321.47	25575.88	0.005	0.214

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	0.002	-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 <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub> 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	0.8	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	0.018	0.019
临床指标						
CRP	0.471	0.031	0.041	0.567	0.001	0.002
PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub>	-0.632	0.003	0.005	-0.473	0.02	0.024

图3

	疾病第一组					疾病第二组				
	好氧组 (n=12)		无氧组 (n=5)		P 值	好氧组 (n=16)		无氧组 (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	7582.12	—	2478.12	876.28	16230.9	8126.62	<0.001
MCP-1	185.02	119.67	395.86	373.37	—	104.44	68.94	1343.97	2115.3	0.001
SCF	334.6	296.8	746.49	608.28	—	144.21	129.21	762.14	530.1	0.001
HGF	2342.4	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	—	79015.19	36486.71	151362.42	66428.71	0.004
IP-10	81233.46	58401.52	120058.92	73759.23	—	19832.99	21839.53	70899.03	75499.28	0.008
IL-18	585.58	267.76	653.74	553.92	—	193.28	142.2	2326.1	2917.72	0.008
炎症指标	0.000	0.000	0.000	0.000	—	0.000	0.000	0.000	0.000	
CRP	84.43	70.29	122.24	75.41	—	49.62	56.2	121.91	57.35	0.005
PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub> ratio	190.12	68.47	167.29	128.16	—	204.53	65.88	130.15	99.32	0.021

图4

受试者下面积(AUC)	0.953
标准差	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) *	<0.0001
约登指数	0.8125
阈值	3556.6108
灵敏度	87.5
95% 置信区间	47.3 - 99.7
特异性	93.75
95% 置信区间	89.8 - 99.8
阳性预测值	87.5
95% 置信区间	44.0 - 99.6
阴性预测值	93.7
95% 置信区间	89.8 - 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. 已排除前患肺炎患者在内

图5

曲线下面积(AUC)	0.93
标准差	0.0497
95%置信区间	0.743 to 0.994
Z 统计量	8.653
显著性水平 P (双侧=0.5) *	<0.0001
约登指数	0.75
敏感度	296.33
特异性	87.5
95%置信区间	47.3 - 99.7
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

\* 已将多病的患病率考虑在内

图6

曲线下面积(AUC)	0.906
标准差	0.0604
95%置信区间	0.716 to 0.986
Z 统计量	6.728
显著性水平 P (双侧=0.5) <sup>a</sup>	<0.0001
约登指数	0.8125
置信	113.0517
准确度	100
95%置信区间	63.1 - 100.0
特异度	81.25
95%置信区间	54.4 - 98.0
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	—

<sup>a</sup> 已将预测的患病率考虑在内

图7

曲线下面积(AUC)	0.891
标准差	0.0748
95%置信区间	0.696 to 0.960
Z 统计量	5.223
显著性水平 P (双侧=0.5)*	<0.0001
约登指数	0.6875
置信	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

\* 已将我的患病率考虑在内

图8

曲线下面积(AUC)	0.867
标准差	0.0753
95%置信区间	0.667 to 0.970
Z 统计量	4.874
显著性水平 P (双侧=0.5) *	<0.0001
均数指数	0.625
例数	147812-8284
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
阴性预测值	100
95%置信区间	39.8 - 100.0
阳性预测值	50
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. 已排除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 (双侧=0.5) <sup>a</sup>	<0.0001
约登指数	0.625
例数	57464-7139
敏感率	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	32.4 - 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)	0.838
标准差	0.118
95%置信区间	0.629 to 0.954
Z 统计量	2.855
显著性水平 P (双侧=0.0043)	0.0043
约登指数	0.6875
熵值	385.5892
敏感性	75
95%置信区间	34.9 - 96.8
特异性	93.75
95%置信区间	69.6 - 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 - 99.5
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

\* 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 (单侧=0.5) <sup>a</sup>	0.0089
约登指数	0.5
数值	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 - 95.9
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

<sup>a</sup> 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 (双侧=0.5) <sup>a</sup>	<0.0001
约登指数	0.6875
灵敏度	79.8
特异性	87.5
95%置信区间	47.3 - 99.7
约登指数	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: 已排除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 (双侧=0.5) <sup>a</sup>	0.009
约登指数	0.75
置信	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. 已将疾病的存在率考虑在内

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	<a href="#">CN103954748B</a>	公开(公告)日	2016-08-17
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	CN103954748A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 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
<b>细胞因子/趋化因子</b>						
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
<b>临床指标</b>						
PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub> ratio	—	—	—	0.462	0.031	0.032
CRP	—	—	—	-0.438	0.016	0.021