

T cells and implications for autoimmunity[J]. J Neuroimmune Pharmacol, 2010, 5(2):198-209.

[4] Dardalhon V, Awasthi A, Kwon H, et al. IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells[J]. Nat Immunol, 2008, 9(12):1347-1355.

[5] Veldhoen M, Uyttenhove C, van Snick J, et al. Transforming growth factor-beta reprograms the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset[J]. Nat Immunol, 2008, 9(12):1341-1346.

[6] Wong MT, Ye JJ, Alonso MN, et al. Regulation of human Th9 differentiation by type I interferons and IL-21[J]. Immunol Cell Biol, 2010, 88(6):624-631.

[7] Ma CS, Tangye SG, Deenick EK. Human Th9 cells: inflammatory cytokines modulate IL-9 production through the induction of IL-21[J]. Immunol Cell Biol, 2010, 88(6):621-623.

[8] Zou Q, Wu B, He X, et al. Increasing a robust antigen-specific cytotoxic T lymphocyte response by FMDV DNA vaccination with IL-9 expressing construct [DB/OL]. J Biomed Biotechnol, [2010-2-6]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2860767/?tool=pubmed>.

[9] Putheti P, Awasthi A, Popoola J, et al. Human CD4 memory T cells can become CD4+ IL-9+ T cells[J]. PLoS One, 2010, 5(1):e8706.

[10] Avery DT, Bryant VL, Ma CS, et al. IL-21-induced isotype switching to IgG and IgA by human naive B cells is differentially regulated by IL-4[J]. J Immunol, 2008, 181(3):1767-1779.

[11] Angkasekwinai P, Chang SH, Thapa M, et al. Regulation of IL-9 expression by IL-25 signaling[J]. Nat Immunol, 2010, 11(3):250-256.

[12] Tay SS, Plain KM, Bishop GA. Role of IL-4 and Th2 responses in allograft rejection and tolerance[J]. Curr Opin Organ Transplant, 2009, 14(1):16-22.

[13] Forbes E, van Panhuys N, Min B, et al. Differential requirements for IL-4/STAT6 signalling in CD4 T-cell fate determination and Th2-immune effector responses[J]. Immunol Cell Biol, 2006, 88(3):240-243.

[14] Chang HC, Han L, Jabeen R, et al. PU. 1 regulates TCR expression by modulating GATA-3 activity[J]. J Immunol, 2009, 183(8):4887-4894.

[15] Yang XO, Nurieva R, Martinez GJ, et al. Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs[J].

Immunity, 2008, 29(1):44-56.

[16] Joetham A, Matsubara S, Okamoto M, et al. Plasticity of regulatory T cells: subversion of suppressive function and conversion to enhancement of lung allergic responses[J]. J Immunol, 2008, 180(11):7117-7124.

[17] Chang HC, Sehra S, Goswami R, et al. The transcription factor PU. 1 is required for the development of IL-9-producing T cells and allergic inflammation[J]. Nat Immunol, 2010, 11(6):527-534.

[18] Renaud JC, Goethals A, Houssiau F, et al. Human P40/IL-9. Expression in activated CD4+ T cells, genomic organization, and comparison with the mouse gene[J]. J Immunol, 1990, 144(11):4235-4241.

[19] Hoyle GW, Brody AR. IL-9 and lung fibrosis: a Th2 good guy? [J]. J Respir Cell Mol Bio, 2001, 24(4):365-367.

[20] Ahyi AN, Chang HC, Dent AL, et al. IFN regulatory factor 4 regulates the expression of a subset of Th2 cytokines[J]. J Immunol, 2009, 183(3):1598-1606.

[21] Angkasekwinai P, Park H, Wang YH, et al. Interleukin 25 promotes the initiation of proallergic type 2 responses[J]. J Exp Med 2007, 204(7):1509-1517.

[22] Elyaman W, Bradshaw EM, Uyttenhove C, et al. IL-9 induces differentiation of Th17 cells and enhances function of FoxP3+ natural regulatory T cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(31):12885-12890.

[23] Lu LF, Lind EF, Gondek DC, et al. Mast cells are essential intermediaries in regulatory T-cell tolerance[J]. Nature, 2006, 442(7106):997-1002.

[24] Pae S, Cho JY, Dayan S, et al. Chronic allergen challenge induces bronchial mast cell accumulation in BALB/c but not C57BL/6 mice and is independent of IL-9[J]. Immunogenetics, 2009, 62(8):499-506.

[25] Osterfeld H, Ahrens R, Strait R, et al. Differential roles for the IL-9/IL-9 receptor alpha-chain pathway in systemic and oral antigen-induced anaphylaxis[J]. J Allergy Clin Immunol, 2010, 125(2):469-476.

[26] Jager A, Dardalhon V, Sobel RA, et al. Th1, Th17, and Th9 effector cells induce experimental autoimmune encephalomyelitis with different pathological phenotypes[J]. J Immunol, 2009, 183(11):7169-7177.

(收稿日期:2011-01-31)

• 综 述 •

血流感染诊断的研究进展

张 艳 综述, 华 川 审校

(中国人民解放军第二五二医院检验科, 河北保定 071000)

关键词: 研究; 分子诊断技术; 血流感染

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.14.031

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)14-1594-03

血流感染(BSI)是指各种病原微生物侵入血循环,在血液中繁殖,释放毒素和代谢产物,并诱导细胞因子释放,引起全身感染、中毒和全身炎性反应(SIRS),进一步导致血压下降、凝血和纤溶系统的改变,引起全身多器官功能障碍综合征(MODS),是一种严重的全身感染性疾病。

1 血流感染的诊断标准

1.1 美国疾病控制与预防中心(CDC)1996年BSI诊断标准

(1)血培养1次或1次以上阳性,阳性病原体与其他感染部位无关。(2)患者至少有以下1项症状或体征:发热(38℃)、寒战或低血压,同时至少满足以下任意1项:①若血培养为常见的皮肤寄植菌(如类白喉棒状杆菌、杆菌属、丙酸杆菌属、微球菌)需有不同时间2次或2次以上的血培养阳性。②若血培养为上述常见皮肤寄植菌,血培养仅1次阳性则需同时有静脉导管培养为阳性的同一病原菌且已开始正确的抗微生物治疗。

③血抗原测定阳性(如流感嗜血杆菌、肺炎链球菌、脑膜炎奈瑟菌或 B 群链球菌),且症状、体征、实验室结果不能用其他部位的感染来解释。

1.2 2001 年中华人民共和国卫生部医院感染诊断标准(试行)将 BSI 分为社区获得性血流感染(CABSI)及医院血流感染(NBSI)。NBSI 依其致病菌在感染部位的不同又可分为:(1)原发性院内血流感染,是指血液培养分离出的致病菌与其他部位之感染无关;(2)继发性 NBSI,是指血液培养分离的微生物与另一部位院内感染(如泌尿道感染、呼吸道感染)有关。BSI 的临床诊断,体温高于 38 °C 或低于 36 °C,可伴有寒战,并合并下列情况之一:(1)有入侵门户或迁徙病灶;(2)有全身中毒症状而无明显感染灶;(3)有皮疹或出血点、肝脾肿大、血液中性粒细胞增多伴核左移,且无其他原因可解释;(4)收缩压低于 12 kPa (90 mmHg) 或较原收缩压下降超过 5.3 kPa (40 mmHg)。

1.3 BSI 的病原学诊断 在临床诊断的基础上,符合下述两条之一即可诊断:(1)血培养分离出病原微生物,若为常见皮肤菌,如类白喉棒状杆菌、肠杆菌、丙酸杆菌等,需在不同时间采血有 2 次或多次培养阳性。(2)血液中检测到病原体的抗原物质。

2 BSI 的诊断技术

2.1 血培养 目前血培养仍被公认为 BSI 诊断的金标准。BSI 的诊疗路径主要分为 3 个阶段,即经验治疗阶段、获得初级检验报告后的治疗阶段以及获得正式检验报告后的治疗阶段,这 3 个阶段的抗感染治疗均需要依靠实验室的检验信息作为指导。一般情况下,血培养的危急报告是立即启动经验治疗的提示,随后实验室将继续对该血培养进行密切关注,并随时将有价值的检验信息向临床报告。血培养的重要性显而易见。

目前虽然血培养的方法和技术日趋完善,大大提高了检测的敏感性,但现在的检测周期长,仍需要数小时甚至数天的孵育才能够检测到微生物的生长。对于较难生长的病原菌、已经过抗生素治疗的患者或存在导管相关性 BSI 的病例敏感性仍不高。如引起肺结核的分枝杆菌,其生长缓慢,经常要培养几周才能得到供生物化学分析、鉴定和株系/亚种分型的纯净培养物。如果不能对细菌进行快速、精确的鉴定,将影响医生给予患者最合适的治疗,可能引发无效治疗和细菌耐药性。

2.2 分子诊断技术 随着分子生物学的发展,对细菌的分子诊断技术日趋成熟,可有效地缩短细菌鉴定周期,为临床治疗争取宝贵的时间。目前主要分为 4 大类:PCR 技术、荧光原位免疫杂交(FISH)、DNA 微阵列、蛋白技术。

2.2.1 PCR 通过 PCR 方法检测细菌核糖体基因(rRNA),如 16S rRNA 序列分析法。16S rRNA 是细菌染色体上编码 rRNA 相对应的 DNA 序列,存在于所有细菌的染色体基因中,也存在于衣原体、立克次体等原核生物中,但不存在于病毒、真菌等非原核生物中。16S rRNA 内部结构由可变区和保守区组成;保守区为所有细菌所共有,细菌间无差别,有分子化石之称;可变区在不同细菌之间存在不同程度的差异,具有属或种的特异性。可设计不同引物对所有细菌或特定细菌进行 PCR 检测^[4-7],以早期判断是否存在细菌感染,进一步分析扩增产物鉴定病原菌的种属,弥补了细菌培养和血清学检测的不足。

2.2.2 FISH^[8-9] FISH 的基本原理是将 DNA(或 RNA)探针用特殊的核苷酸分子标记,然后将探针直接杂交到染色体上,再用与荧光素分子偶联的单克隆抗体与探针分子特异性结合来检测 DNA 序列在染色体上的定性、定位、相对定量分析。FISH 具有安全、快速、灵敏度高,探针能长期保存并能同时显

示多种颜色等优点。Kempf 等^[10]研究发现,FISH 鉴定葡萄球菌可节省 26 h 的时间,对链球菌的鉴定可节省 46 h 的时间,对革兰阴性杆菌的鉴定可节省 40 h 的时间。利用数量有限的探针,在 2 h 内,可鉴定 96.5% 的血培养中的病原菌。FISH 快速鉴定血培养标本中的病原菌后,如果标本为单一菌生长,还可直接用标本做药敏试验^[11],大大缩短了抗生素敏感结果报告时间,有着非常重要的临床意义。

2.2.3 DNA 微阵列 DNA 微阵列,又叫 DNA 芯片,是一种发展十分迅速的技术,其灵活、敏感,可用于分析整个基因组的表达、突变和多态性。其基本原理是序列特异性核酸杂交,其核心技术即将基因特异的探针固定在膜上,再与荧光标记的诱变物的基因组或 cDNA 靶杂交。利用 DNA 芯片可以进行细菌菌种的鉴定和抗药性基因的研究。

Lancet 于 2009 年 12 月 10 日发表的 1 项由芬兰和英国学者合作完成的观察性研究表明,基于 DNA 的微阵列分析平台能够快速检测及鉴定包括细菌在内的多种病原体。为了评价一种新型败血症分子检测方法,研究者对来自 3 318 例临床可疑败血症患者的 2 107 份血培养阳性标本进行对照研究,通过扩增 50 种细菌的 *gyrB*、*parE*、*mecA* 基因,进行 PCR 和微阵列检测。结果显示该方法的临床敏感度和特异度分别为 94.7% 和 98.8%,检测耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的敏感度和特异度均达 100%,结果获取时间较常规血培养法平均缩短 18 h。总之,DNA 微阵列平台在细菌种类确定方面具有较高的敏感度和特异度,结果回报速度快于当前作为金标准的血培养法,有利于对败血症进行基于临床证据的早期快速治疗。

2.2.4 蛋白技术 这是一种应用振动光谱学方法鉴定中细菌的技术,它无需提取、扩增或荧光标记,而是基于振动光谱学的原理,应用傅立叶-拉曼变换红外光谱仪检测样本中蛋白的组成。Maquelin 等^[12]采用此方法对阳性血培养标本进行鉴定,敏感度分别达 92%(拉曼光谱)和 98%(红外光谱)。

3 结 语

血液中病原菌的早期快速诊断对于发热、感染患者有重要意义,尽快明确病原菌,可为临床医生及时、合理用药治疗提供重要依据。目前大家公认的血液病原学金标准是血培养。然而,血培养有一定的局限性,所需周期长;对于较难生长的病原菌、已经过抗生素治疗的患者或存在导管相关性 BSI 的病例敏感性不够。然而必须认识到,目前血培养的结果对于临床医师的经验性用药治疗起着重要作用。近年来,多种分子检测方法相继出现并逐渐应用于实践。这些检测方法迅速、特异性强、敏感性高,但也仍存在一些问题,如缺乏抗生素敏感性检测,并且有时其敏感性过高,存在假阳性的可能。随着临床微生物实验室的发展,这些新检测方法前景广阔,其应用价值会愈加显著。

参考文献

- [1] Bonnal C, Mourvillier B, Bronchard R, et al. Prospective assessment of hospital-acquired bloodstream infections: how many may be preventable[J]. Qual Saf Health Care, 2010, 19(5): 1-5.
- [2] Ammerlaan HS, Troelstra A, Kruitwagen CL, et al. Quantifying changes in incidence of nosocomial bacteremia caused by antibiotics-susceptible and antibiotic-resistant pathogen[J]. J Antimicrob Chemother, 2009, 63(5): 1064-1070.
- [3] Beekmann SE, Diekema DJ, Chapin KC, et al. Effects of rapid detection of bloodstream infections on length of hospitalization and hospital charges[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(7): 3119-3125.
- [4] Peters RP, van Agtmael MA, Danner SA, et al. New developments

- in the diagnosis of bloodstream infections[J]. Lancet Infect Dis, 2004, 4(12):751-760.
- [5] Fenollar F, Raoult D. Molecular diagnosis of bloodstream infections caused by non-cultivable bacteria[J]. Int J Antimicrob Agents, 2007, 30(Suppl 1):S7-15.
- [6] Schrenzel J. Clinical relevance of new diagnostic methods for bloodstream infections[J]. Int J Antimicrob Agents, 2007, 30(Suppl 1):S2-6.
- [7] Palka-Santini M, Cleven BE, Eichinger L, et al. Large scale multiplex PCR improves pathogen detection by DNA microarrays[J]. BMC Microbiol, 2009, 9:1.
- [8] Gescher DM, Kovacevic D, Schmiedel D, et al. Fluorescence in situ hybridization (FISH) accelerates identification of Gram-positive cocci in positive blood cultures[J]. Int J Antimicrob Agents, 2008, 32(Suppl 1):S51-59.
- [9] Peters RP, Savelkoul PH, Simoons-Smit AM, et al. Faster identification of pathogens in positive blood cultures by fluorescence in situ hybridization in routine practice[J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(1):119-123.
- [10] Kempf VAJ, Trebesius K, Autenrieth IB. Fluorescent in situ hybridization allows rapid identification of microorganisms in blood cultures[J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(2):830-838.
- [11] 孙敬, 汤学夫. 脑外科术后气管插管吸出物的细菌检验方法[J]. 中华医院感染学杂志, 2000, 10(4):317-318.
- [12] Maquelin K, Kirschner C, Choo-Smith LP, et al. Prospective study of the performance of vibrational spectroscopies for rapid identification of bacterial and fungal pathogens recovered from blood cultures[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(1):324-329.

(收稿日期:2011-01-11)

• 综 述 •

量子点在生物医学领域应用的研究进展

龚 敏, 李金密 综述, 邓少丽 审校

(第三军医大学大坪医院检验科, 重庆 400042)

关键词:量子点; 体内成像; 体外成像

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.14.032

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)14-1596-03

在生物医学领域中,人们对生命现象的观察和研究已经深入到单细胞、单分子水平。因此提高生命过程中蛋白质、核酸、多肽等重要生物分子检测的灵敏度已成为研究者努力的方向。荧光分析法是生命科学研究中十分重要的方法之一,其检测灵敏度很大程度上取决于标记物的发光强度和光化学稳定性。目前使用的有机荧光染料由于其不可克服的荧光性能缺陷,极大地限制了其应用。

纳米技术的发展为生命体系中化学、生物信息的快速、原位、实时、动态和高灵敏获取提供了新的途径,通过纳米材料标记、示踪来解释一些生命现象已成为目前世界范围内的热点交叉研究领域。近年来,量子点(QDs)作为一类新型的荧光标记材料已成为纳米技术在生命科学领域发展最快的学科之一。由于其独特的光学特性,QDs已经被广泛应用于无机离子传感器、有机小分子传感器、生物大分子传感器、生物标记、细胞标签、动物成像及治疗等领域,成为纳米技术、纳米生物技术和纳米医学领域连接的桥梁。

1 QDs 及其特点

QDs 主要是由 II~IV 族或 III~V 族元素组成的无机纳米颗粒,粒径范围 2~20 nm。由于其物理尺寸小于激子的波尔半径,从而导致量子尺寸效应、表面效应和量子隧穿效应等,使 QDs 具有独特的光学和电学性质。1998 年,有学者同时在 Science 上报了 QDs 应用于生物标记和细胞成像领域的开创性的研究成果,初步解决了 QDs 作为生物探针的靶向性和生物相容性问题,促使 QDs 真正进入生物荧光标记领域,也标志着 QDs 在生物学领域的应用开始起步^[1-2]。对 QDs 在生物医学方面的应用产生深远影响。

与传统的有机荧光物相比,QDs 具有其独特的理化特性:(1)波长可调谐,可通过控制 QDs 的大小或组成材料比例来调节其发光颜色;(2)一元激发,多元发射,不同波长的 QDs 可用同一波长激发;(3)荧光光谱窄且对称;(4)强度高且不易漂白,

QDs 荧光强度是荧光素的 20 倍,稳定性是其 100 倍,可经受多次激发而不易漂白。因此在肿瘤的活体成像与靶向治疗及分子诊断领域展现出巨大的潜能^[3-5]。

2 QDs 在生物医学中的应用

QDs 最广泛的应用是被作为荧光探针对生物体系进行研究。不同材料的 QDs 可代替各种荧光染料分子与生物分子相偶联,用于细胞器定位、信号转导原位杂交、胞内组分的运动和迁移等研究。另外,由于 QDs 上存在的修饰基因与一些药物键合后会其引起其荧光性质的变化,故也可用于药物的分析测定。

2.1 QDs 在体外成像中的应用 QDs 的体外成像意味着实验条件是人为控制的,只有通过重新调整才可能发生在体内的过程中,目前 QDs 的体外成像主要应用于细胞成像、生物分子的细胞内追踪和组织染色。

2.1.1 在细胞成像中的应用 QDs 最有前途的应用领域是在生物体系中作为荧光探针,将不同材料制成的 QDs 与生物分子相偶联,就可以代替很多的荧光染料分子,从而在细胞生物学研究中发挥巨大的作用。QDs 应用于细胞成像方面的工作主要分为以下 2 大类:(1)固定细胞的成像(细胞和组织的成像);(2)离体活细胞成像(膜表面受体的显像,细胞器及胞内特定大分子的示踪)。

Wu 等^[6]改进了 QDs 的修饰方法,利用抗原-抗体及生物素-亲和素特异性结合成功实现了 3T3 鼠纤维原细胞及人乳腺癌 SK-BR-3 细胞的双色 QDs 标记。利用偶联了链霉亲和素的绿色 QDs 与生物素抗鼠 IgG 的特异性结合标记 3T3 鼠纤维原细胞骨架纤维微管,用偶联了链霉亲和素的红色 QDs 与生物素-IgG 及抗核抗体结合标记 3T3 鼠纤维原细胞核。SK-BR-3 细胞膜上的 Her2 则用偶联了 IgG 的绿色 QDs 标记。

Jaiswal 等^[7]报道了利用 QDs 标记活细胞并首次证明 QDs 可以用于活细胞的超长时间标记示踪。分别采用 2 种不