

- [18] Tourdias T, Mori N, Dragonu I, et al. Differential aquaporin 4 expression during edema build-up and resolution phases of brain inflammation[J]. *Neuroinflammation*, 2011, 8(1):143.
- [19] Fukuda AM, Pop V, Spagnoli D, et al. Delayed increase of astrocytic aquaporin 4 after juvenile traumatic brain injury: possible role in edema resolution? [J]. *Neuroscience*, 2012, 222(2):366-378.
- [20] Papadopoulos MC, Manley GT, Krishna S, et al. Aquaporin-4 facilitates reabsorption of excess fluid in vasogenic brain edema[J]. *FASEB J*, 2004, 18(11):1291-1293.
- [21] Sun MC, Honey CR, Berk C, et al. Regulation of aquaporin-4 in a traumatic brain injury model in rats[J]. *Neurosurg*, 2003, 98(3):565-569.
- [22] Manley GT, Fujimura M, Ma T, et al. Aquaporin-4 deletion in mice reduces brain edema after acute water intoxication and ischemic stroke[J]. *Nat Med*, 2000, 6(2):159-163.
- [23] Yang B, Zador Z, Verkman AS. Glial cell aquaporin-4 overexpression in transgenic mice accelerates cytotoxic brain swelling[J]. *Biol Chem*, 2008, 283(22):15280-15286.
- [24] 鲁宏, 胡惠, 何占平. 氯化钴诱发缺氧对体外星形胶质细胞水通道蛋白 4 表达的影响[J]. *中华神经外科杂志*, 2011, 44(2):117-121.
- [25] 胡惠, 鲁宏, 何占平. 水通道蛋白 4 mRNA 沉默可抑制离体缺氧星形胶质细胞水通道蛋白 4 的表达[J]. *解剖学杂志*, 2011, 34(1):47-50.
- [26] Hu H, Lu H, He ZP. Gene interference regulates aquaporin-4 expression in swollen tissue of rats with cerebral ischemic edema correlation with variation in apparent diffusion coefficient [J]. *Neural Regen Res*, 2012, 7(14):1659-1666.
- [27] Lu H, Hu H, He ZP. Reperfusion of the rat brain tissues following acute ischemia; the correlation among diffusion-weighted imaging, histopathology, and aquaporin-4 expression[J]. *Clin Med J*, 2011, 124:3148-3153.
- [28] 陈通, 孙善全. 水通道蛋白-4 在大鼠创伤性脑水肿中的表达及其意义[J]. *重庆医学*, 2012, 41(13):1249-1251.
- [29] Shenaq M, Kassem H, Peng C, et al. Neuronal damage and functional deficits are ameliorated by inhibition of aquaporin and HIF1alpha after traumatic brain injury (TBI) [J]. *Neurol Sci*, 2012, 323(1/2):134-140.
- [30] Lo Pizzo M, Schiera G, Di Liegro I, et al. Aquaporin-4 distribution in control and stressed astrocytes in culture and in the cerebrospinal fluid of patients with traumatic brain injuries[J]. *Neurol Sci*, 2013, 34(8):1309-1314.
- [31] Kiening KL, van Landeghem FK, Schreiber S, et al. Decreased hemispheric Aquaporin-4 is linked to evolving brain edema following controlled cortical impact injury in rats[J]. *Neurosci Lett*, 2002, 324(2):105-108.
- [32] 张曙光, 潘天鸿, 何放林, 等. 重型颅脑损伤患者脑挫伤组织水通道蛋白-4 的表达及意义[J]. *中华创伤杂志*, 2010, 26(7):589-591.

(收稿日期:2013-11-08)

• 综 述 •

特异性免疫治疗的血清学标志物研究进展

李 晶 综述, 伦立民[△], 王 清 审校

(青岛大学医学院附属医院东区检验科, 山东青岛 266101)

关键词: 特异性免疫治疗; 变应性疾病; 血清学

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2014. 07. 032

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)07-0873-04

特异性免疫治疗 (allergy specific immunotherapy, SIT) 也称变应原特异性免疫治疗、脱敏治疗, 通过给予特异性致敏的变应原, 持续并逐渐增量刺激机体, 最终使机体对变应原刺激适应或耐受, 减轻或消除变应原引起的临床症状。SIT 现已成为一种标准化治疗方法, 在 IgE 介导的变应性疾病中有效, 尤其适用于药物治疗无效的人群^[1]。常用皮下免疫治疗 (subcutaneous immunotherapy, SCIT) 和舌下免疫治疗 (sublingual immunotherapy, SLIT) 两种方法。使用草或树木花粉、屋尘螨、昆虫毒液和动物毛发等各种类型的变应原都可证实 SIT 有临床疗效。已证实 SIT 的临床疗效在停止治疗后仍将持续若干年, 这是 SIT 相对于抗 IgE 药和抗过敏药的明显优点^[1-2]。

1 SIT 机制

SIT 是针对 IgE 介导的变应性疾病的对因治疗方法, 可诱导产生长期的临床免疫耐受^[3]。近期研究表明 SCIT 和 SLIT 的机制基本相同^[3-4]。SIT 产生的长期耐受与 Th2/Th1 比值失衡的纠正有关。研究报道表明 SIT 治疗后, CD4⁺ CD25⁺

Foxp3⁺ 调节 T 细胞数量增加, 其产生的白细胞介素 10 (IL-10) 和转化生长因子 β 也明显增加, 且以依赖的方式抑制 CD4⁺ CD25⁺ T 细胞反应和 Th2 型细胞因子释放^[5-6]。IL-10 在 SIT 中起到潜在的双重作用, 它既能抑制 CD4⁺ Th2 细胞的反应, 又可诱导抗体类型转换。这些抗体有抗炎活性, 能够抑制嗜碱性粒细胞释放组胺, 抑制 IgE 介导的 B 细胞抗原提呈及后续的变应原特异性 Th2 细胞活化^[7]。SIT 过程中观察到 IgE/IgG4 比值降低, 表明外周耐受已诱导形成, 这与调节性 CD4⁺ CD25⁺ T 细胞活性增高及异常 Th2 细胞反应被抑制有关^[8]。

2 SIT 临床疗效潜在的替代性或预测性血清学标志物

研究外周或靶器官 T 或 B 细胞反应的异常改变及靶器官炎症反应是实验室评价 SIT 疗效的良好标志物, 可以预测治疗是否起作用, 指导是否需要停止治疗。然而, 这类研究非常复杂, 不同实验室间的多中心临床试验难以标准化。本文侧重于综述能稳定储存、不同实验室间能够标准化、多中心临床试验中经常使用到的血清学标志物。

2.1 变应原特异性 IgE (sIgE) 及总 IgE (total IgE, TIgE) 变应性疾病患者在暴露于相应致敏原后外周和靶器官局部的 sIgE 水平将会增高。对儿童变应性鼻炎患者进行的屋尘螨 SLIT 研究表明: 治疗组和对照组屋尘螨和粉尘螨 sIgE 在治疗后都升高, 但两组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)^[8]; 另一项变应性鼻炎屋尘螨 SLIT 研究表明: 粉尘螨 sIgE 在治疗后轻度增高, 而屋尘螨 sIgE 和 TIgE 治疗前后无差异^[9]; 哮喘患者屋尘螨 SIT 研究中 sIgE 先升高, 后又降低到治疗前基线水平^[10]。这说明 sIgE 和 TIgE 在 SIT 治疗过程中不能客观反映临床疗效。

最近一项临床研究对血清 sIgE/TIgE 比值能否作为 SIT 临床疗效潜在的预测性指标进行了评价。32 名屋尘螨过敏患者接受 2 年 SIT 治疗, 检测治疗前血清基线 sIgE 和 TIgE 水平, 计算 sIgE/TIgE 比值, 并评价该比值与临床疗效的相关性, 结果显示基线 sIgE/TIgE 比值有优越的诊断和预测价值, 其诊断和预测 cut-off 值为 16.2%, 能成功预测 SIT 对个体有无疗效^[11]。而另有研究表明尽管 SIT 治疗有反应者 sIgE/TIgE 比值较无反应者高, 但两者比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)^[12]。sIgE/TIgE 能否作为 SIT 有无疗效的预测性标志物还需大量的大样本随机双盲安慰剂对照研究。

2.2 嗜酸性粒细胞计数和嗜酸性粒细胞阳离子蛋白 (eosinophil cationic protein, ECP) 嗜酸性粒细胞参与变态性反应, ECP 是嗜酸性粒细胞释放的毒性蛋白之一, 二者在变应性疾病的病理生理中起重要作用。SIT 可减少嗜酸性粒细胞聚集和活化, 据文献报道, 经 SIT 治疗后血清及靶器官 ECP 水平显著低于治疗前, 而嗜酸性粒细胞无明显改变^[9,13]。但目前尚未发现二者与 SIT 疗效有相关性。

2.3 变应原特异性 IgG 抗体 (sIgG) 对 SIT 治疗患者进行 IgG 亚型检测发现血清 sIgG1 和 sIgG4 抗体增高^[14]。SIT 的临床疗效与 IgG 水平是否有相关性仍具有争议, 不同的临床试验有不同的 IgG 反应。一项牧草花粉 SCIT 双盲安慰剂对照临床试验的结果为: IgG1 水平在研究的第 12 个月达到峰值, 增长了近 60 倍, IgG4 水平在治疗结束时增长了近 4 000 倍。这暗示高水平的抗体反应伴随着良好的临床疗效^[14]。然而有其他 SLIT 研究表明: sIgG 仅有较低水平增高而临床疗效却非常明显^[15]。一项牧草花粉 SLIT 研究表明: 临床疗效和 sIgG 水平的增高有关系, 尽管增高程度比在 SCIT 研究中低^[16]。Keles 等^[17]对屋尘螨过敏性哮喘患者进行了单独 SCIT 组、单独 SLIT 组和 SCIT、SLIT 联合组间的比较, 结果表明 3 种方法具有相等的临床疗效, 但只有 SCIT 组和联合组 sIgG4 水平明显增高。Yukselen 等^[18]对变应性鼻炎和哮喘患者进行的屋尘螨 SIT 研究也证明只有 SCIT 组 sIgG4 水平明显增高。总之, sIgG 是人体对 SIT 的免疫学反应, 伴随 SIT 产生。尽管 sIgG1 或 sIgG4 水平提高了, 许多研究都无法证明其水平与临床疗效间的相关性, 其在免疫耐受中的作用及预测价值仍需更多的临床试验来证实。目前普遍认为: SIT 疗效与具有抑制活性的 sIgG 尤其是 sIgG4 有关。抑制性 IgG 能和 IgE 竞争, 抑制嗜碱性粒细胞活化, 阻断 IgE 介导的 B 细胞对 T 细胞的抗原提呈^[7,19]。

2.4 变应原特异性 IgA IgA 是一种非炎症性抗体, 已有报道 SIT 治疗后变应原特异性 IgA2 及其多聚体水平增高^[4,6]。变应原特异性 IgA 水平与 SIT 的临床疗效是否有相关性还需

更多的研究。

2.5 IgE 介导的变应原提呈及抑制 B 细胞表面的 FcεR I 和 FcεR II (IgE 低亲和力受体, 即 CD23) 能通过 IgE 相互作用介导抗原结合, 促进后续的抗原处理和提呈及特异性 T 细胞活化。CD23 以三聚体形式表达于抗原提呈细胞尤其是变应原激活的 B 细胞表面, 能在外周或黏膜表面与变应原-IgE 复合体结合。变应原-IgE-CD23 复合物形成后被内化并转运到内体中, 变应原衍生肽随后被装载到 HLA 分子上, 最终提呈给 T 细胞。IgE、变应原和 B 细胞上 CD23 的多少都影响变应原提呈过程^[7]。变应原-IgE-CD23 复合物促进变应原提呈, 导致极其高效的 T 细胞活化。Wachholz 等^[19]证明了在牧草花粉过敏反应中特异性 T 细胞克隆的增殖反应与 B 细胞表面结合的 sIgE 含量呈正比。进行桦树花粉 SIT 治疗进一步证实了这一发现^[20]。变应原-IgE-CD23 复合物的含量能间接反映出体内 T 细胞的反应, 该复合物可通过流式细胞术的方法检测^[21]。

van Neerven 等^[7]发现进行桦树花粉 SIT 后患者血清能够抑制 IgE 介导的 B 细胞对 T 细胞的抗原提呈, 导致 T 细胞增殖降低, 使其产生的细胞因子量也降低。Wachholz 等^[19]在进行牧草花粉 SIT 时也有同样发现。SIT 过程中可产生具有抑制或阻断活性、能和 IgE 竞争结合抗原的血清抗体, 这些抗体是血清中的 IgG 成分。IgA 抗体也被证明有阻断能力。SIT 过程中常伴有 sIgG4 水平增高, 血清中 IgG 相关的阻断活性与 sIgG 水平有关。抑制性 sIgG 可阻断 sIgE 与 CD23 的作用, 阻断 IgE 介导的变应原提呈过程及后续的效应 Th2 细胞活化。IgG4 抗体在阻断 FcεRI 介导的嗜碱性粒细胞组胺释放中也有功能性作用。IgG4 不能形成免疫复合物, 不能固定补体, 是一种非炎症性免疫球蛋白。抑制性 IgG4 能够有效地抑制变应原-IgE 相互作用, 抑制其他类型免疫球蛋白复合物的形成, 在免疫反应中有抗炎作用。

2.5.1 IgE-FAB 分析 IgE-FAB 分析是一种在体外检测变应原提呈的方法, 能反映 SIT 过程中 IgG 相关的血清抑制活性。已证实 SIT 治疗后血清中存在能抑制 IgE-FAB 的物质, 经纯化为 IgG4^[3]。

在一项为期 4 年的单中心随机双盲牧草花粉 SCIT 研究中, 所有患者在接受 2 年 SCIT 治疗之后, 一组患者继续治疗 2 年, 另一组进行安慰剂注射治疗 2 年。用症状药物联合评分表示 SIT 的临床疗效。症状药物联合评分在 2 年治疗后所有患者均明显降低, 在 4 年后继续治疗组和安慰剂组仍都保持降低^[3]。血清阻断 IgE-FAB 活性与治疗前基线水平相比在 2 年治疗后明显增高, 4 年后两组仍明显增高。而 IgG4 水平在继续治疗组 4 年的治疗中持续增高, 安慰剂组 2 年治疗后升高, 4 年后又降低趋于回到基线水平。IgG1 抗体也有类似改变。据此得出临床疗效和抗体阻断活性间关系: 症状药物联合评分与血清阻断 IgE-FAB 活性有相关性而与 IgG4 水平无相关性^[3]。而在另一项为期 5 年的随机双盲安慰剂对照牧草花粉 SLIT 研究中, 患者进行 3 年 SLIT 治疗后随访 2 年。3 年治疗有良好的临床疗效且可持续 2 年。sIgG4、IgE 阻断因子及血清抑制 FAP 活性在治疗中都增高, 且在 2 年随访中也保持增高。据此得出临床疗效与三者有相关性^[22]。除 IgG4 水平之外, 该研究与上一研究结果一致。这可能是由于 SLIT 可产生更高比例的高亲和力 IgG4 抗体, 与 IgE 竞争能力更强。SCIT 产生的高、低亲和力 IgG4 都增多, 而只有高亲和力的功能性 IgG4

抗体可长期存在。

在—项大样本多中心随机双盲安慰剂对照临床试验中,严重药物抵抗的季节性变应性鼻炎患者接受牧草花粉提取液或安慰剂注射,可以观察到:血清 IgG 相关的阻断活性(阻断 IgE-FAB 活性和 IgE 阻断因子)和 sIgG4 水平与治疗前相比,在注射剂量上升期、花粉季节顶峰和治疗结束时皆增高,且呈时间和剂量依赖性升高。症状药物联合评分与血清阻断活性呈负相关,而与血清 IgG4 水平不存在相关性^[23]。

尽管需要进一步的研究,目前这些发现支持这一观点:功能性 IgG 相关的阻断抗体,尤其是功能性 IgG4 阻断抗体可能是成功 SIT 的潜在标志。

2.5.2 IgE 阻断因子 IgE 阻断因子是阻断抗体存在时实际被阻断的应与变应原结合的 IgE 量^[20,24],可用功能性固相分析测定,是功能性分析的结果。最近 3 项牧草花粉 SIT 研究表明,与对照组相比,SIT 组血清 IgG4 水平和 IgE 阻断因子都升高^[1,22,24]。对哮喘患者进行的标准化屋尘螨 SCIT 研究表明:IgE 阻断因子在 3 年治疗中一直保持增高^[10]。Wurtzen 等^[20]评价了 IgE 阻断因子和血清阻断 IgE-FAB 活性及组胺释放间的关系:1 年治疗后观察到 IgE-FAB 和组胺释放明显降低,IgE 阻断因子增高,且这种效果在治疗后第 2 年仍能保持,三者有明显的相关性。IgE 阻断因子代表在固相检测系统血清中所有能与 IgE 竞争的阻断抗体。与之相比,血清阻断 IgE-FAB 活性更能代表功能性 IgG1 和 IgG4 的生理学功能,其与症状药物联合评分的关系似乎更紧密。

3 小 结

本文评价了多个可用来评估 SIT 临床疗效的血清学生物标志物。其中,IgE-FAB 分析和 IgE 阻断因子与临床疗效有较为明确的相关性,与临床疗效更紧密相关。

参考文献

- [1] Durham SR, Emminger W, Kapp A, et al. Long-term clinical efficacy in grass pollen-induced rhinoconjunctivitis after treatment with SQ-standardized grass allergy immunotherapy tablet [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2010, 125(1):131-138.
- [2] Jacobsen L, Wahn U, Bilo MB. Allergen-specific immunotherapy provides immediate, long-term and preventive clinical effects in children and adults: the effects of immunotherapy can be categorized by level of benefit—the centenary of allergen specific subcutaneous immunotherapy [J]. *Clin Transl Allergy*, 2012, (13):2-8.
- [3] James LK, Shamji MH, Walker SM, et al. Long-term tolerance after allergen immunotherapy is accompanied by selective persistence of blocking antibodies [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2011, 127(2):509-516.
- [4] Scadding GW, Shamji MH, Jacobson MR, et al. Sublingual grass pollen immunotherapy is associated with increases in sublingual Foxp3-expressing cells and elevated allergen-specific immunoglobulin G4, immunoglobulin A and serum inhibitory activity for immunoglobulin E-facilitated allergen binding to B cells [J]. *Clin Exp Allergy*, 2010, 40(4):598-606.
- [5] Wei W, Liu Y, Wang Y, et al. Induction of CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ IL-10⁺ T cells in HDM-allergic asthmatic children with or without SIT [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2010, 153(1):19-26.
- [6] Pilette C, Nouri-Aria KT, Jacobson MR, et al. Grass pollen immunotherapy induces an allergen-specific IgA2 antibody response associated with mucosal TGF-beta expression [J]. *J Immunol*, 2007, 178(7):4658-4666.
- [7] van Neerven RJ, Wikborg T, Lund G, et al. Blocking antibodies induced by specific allergy vaccination prevent the activation of CD4⁺ T cells by inhibiting serum-IgE-facilitated allergen presentation [J]. *J Immunol*, 1999, 163(5):2944-2952.
- [8] Tseng SH, Fu LS, Nong BR, et al. Changes in serum specific IgG4 and IgG4/IgE ratio in mite-sensitized taiwanese children with allergic rhinitis receiving short-term sublingual-swallow immunotherapy: a multicenter, randomized, placebo-controlled trial [J]. *Asian Pac J Allergy Immunol*, 2008, 26(1):105-112.
- [9] Kim ST, Han DH, Moon IJ, et al. Clinical and immunologic effects of sublingual immunotherapy on patients with allergic rhinitis to house-dust mites: 1-year follow-up results [J]. *Am J Rhinol Allergy*, 2010, 24(4):271-275.
- [10] Blumberg G, Groes L, Dahl R. SQ-standardized house dust mite immunotherapy as an immunomodulatory treatment in patients with asthma [J]. *Allergy*, 2011, 66(1):178-185.
- [11] Karakoc GB, Yilmaz M, Altantas DU, et al. Can Serum-Specific IgE/Total IgE Ratio Predict Clinical Response to Allergen-Specific Immunotherapy in Children Monosensitized to House Dust Mite [J]. *J Allergy (Cairo)*, 2012:694094.
- [12] Fujimura T, Yonekura S, Horiguchi S, et al. Increase of regulatory T cells and the ratio of specific IgE to total IgE are candidates for response monitoring or prognostic biomarkers in 2-year sublingual immunotherapy (SLIT) for Japanese cedar pollinosis [J]. *Clin Immunol*, 2011, 139(1):65-74.
- [13] Chen J, Zhou N, Huang Z. The changes of serumal eosinophil cationic protein of patients with allergic rhinitis with specific immunotherapy [J]. *Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi*, 2011, 25(8):347-348.
- [14] Jutel M, Jaeger L, Suck R, et al. Allergen-specific immunotherapy with recombinant grass pollen allergens [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2005, 116(3):608-613.
- [15] Nayak AS, Atiee GJ, Dige E, et al. Safety of ragweed sublingual allergy immunotherapy tablets in adults with allergic rhinoconjunctivitis [J]. *Allergy Asthma Proc*, 2012, 33(5):404-410.
- [16] Wahn U, Klimek L, Ploszczuk A, et al. High-dose sublingual immunotherapy with single-dose aqueous grass pollen extract in children is effective and safe: a double-blind, placebo-controlled study [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2012, 130(4):886-893.
- [17] Keles S, Karakoc-Aydiner E, Ozen A, et al. A novel approach in allergen-specific immunotherapy: combination of sublingual and subcutaneous routes [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2011, 128(4):808-815.
- [18] Yukselen A, Kendirli SG, Yilmaz M, et al. Effect of one-year subcutaneous and sublingual immunotherapy on clinical and laboratory parameters in children with rhinitis and asthma: a randomized, placebo-controlled, double-blind, double-dummy study [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2012, 157(3):288-298.
- [19] Wachholz PA, Soni NK, Till SJ, et al. Inhibition of allergen-IgE binding to B cells by IgG antibodies after grass pollen immunotherapy [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2003, 112(5):915-922.
- [20] Wurtzen PA, Lund G, Lund K, et al. A double-blind placebo-con-

trolled birch allergy vaccination study II: correlation between inhibition of IgE binding, histamine release and facilitated allergen presentation[J]. Clin Exp Allergy, 2008, 38(8): 1290-1301.

[21] Francis JN. The facilitated antigen binding (FAB) assay—a protocol to measure allergen-specific inhibitory antibody activity[J]. Methods Mol Med, 2008, 138(2): 255-261.

[22] Durham SR, Emminger W, Kapp A, et al. SQ-standardized sublingual grass immunotherapy: Confirmation of disease modification 2 years after 3 years of treatment in a randomized trial[J]. J Allergy Clin Immunol, 2012, 129(6): 717-725.

[23] Shamji M, Ljörning C, Francis JN, et al. Functional rather than immunoreactive levels of IgG4 correlate closely with clinical response to grass pollen immunotherapy[J]. Allergy, 2012, 67(2): 217-226.

[24] Nelson HS, Nolte H, Creticos P, et al. Efficacy and safety of timothy grass allergy immunotherapy tablet treatment in North American adults[J]. J Allergy Clin Immunol, 2011, 127(1): 72-80.

(收稿日期: 2013-10-13)

• 综 述 •

乏养菌属和颗粒链菌属实验室诊断方法的研究进展

徐金莲, 金小希 综述, 杨 燕 审校

(荆门市第一人民医院检验科, 湖北荆门 448000)

关键词: 乏养菌属; 颗粒链菌属; 实验室诊断

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.07.033

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)07-0876-03

乏养菌属和颗粒链菌属为兼性厌氧、触酶阴性的革兰阳性球菌,原来是链球菌属中营养变异菌种,基于 DNA 杂交和 16S rRNA 序列分析比较,分类及命名历经数次较正。目前乏养菌属仅有缺陷乏养菌一个菌种,颗粒链菌属包括 4 个菌种:毗邻颗粒链菌、细长颗粒链菌、副毗邻颗粒链菌和豹鲸颗粒链菌。近年来随着细菌培养分离能力的提高,各种鉴定方法的应用,颗粒链菌属和乏养菌属检出率随之增加,由于它们可引起感染性心内膜炎,引起了临床的普遍关注。本文就这两类细菌的实验室诊断方法的研究进展作一综述。

1 表型鉴定法

1.1 培养特性及形态 细菌成功的分离培养及镜下形态识别是正确鉴定的前提。临床标本或者血培养物涂片可见细菌而普通培养基中不生长,应考虑乏养菌属和颗粒链菌属感染的可能,可接种在添加半胱氨酸或盐酸吡多醛培养基中,同时加做卫星试验以免漏诊或误诊。

1.1.1 特殊营养需求 乏养菌属和颗粒链菌属对营养要求苛刻,培养基中需要特别添加 L-半胱氨酸、盐酸吡多醛或其他含巯基化合物以促进生长。在 5% 马血的心脑浸液、巯基乙酸盐肉汤,以及哥伦比亚琼脂、Schaefer 琼脂、布氏琼脂及巧克力琼脂中可生长,在大多数血培养肉汤中也能生长,这与入血含有的微量吡多醛有关。在 5%~10% CO₂ 及厌氧环境中乏养菌属和颗粒链菌属生长较好,经 18~24 h 培养后可见针尖大小、α-溶血或不溶血菌落,有的需延长至 48~72 h 观察结果。

1.1.2 卫星现象 羊血琼脂中浸有吡多醛的纸片或助养菌(如金黄色葡萄球菌)周围,颗粒链菌属和乏养菌属呈“卫星现象”生长,是区别孪生球菌及其他触酶阴性革兰阳性球菌的重要特征。营养丰富的培养基中助养菌远处菌落生长良好,“卫星现象”阴性,易被鉴定为孪生球菌。也有孪生球菌出现“假卫星现象”、懒惰球菌属呈卫星现象及孤单球菌属为吡多醛依赖性的报道^[1-3]。

1.1.3 形态与染色 受所需营养成分、含量及不利培养环境因素的影响,此类菌革兰染色及形态多变。革兰染色时易过度

脱色,镜下同时可见革兰阳性菌和阴性菌,成双或短链状排列,菌体具多形性,如圆形、球形或杆状,细菌类型的错误判断可致细菌鉴定不出或鉴定错误。营养良好时,菌体形态和染色较典型。采用含 0.001% 盐酸吡多醛的 Todd-Hewitt 或巯基乙酸盐等肉汤培养,大多数菌株呈革兰阳性链球菌样排列,由此可确定细菌形态。

1.2 生化鉴定 临床实验室常用生化表型鉴定细菌,但根据生化反应准确鉴定颗粒链菌属和乏养菌属却比较困难,存在的问题有:(1)生化反应谱不典型,与数据库中相应菌株表型不相符;(2)重复性差,同一菌株重复测试,结果可能不相同;(3)数据库未包括菌株信息,仪器不能鉴定数据库未收纳的菌株;(4)检测结果与工作人员读取和解释生化反应所具有的专业知识相关。

目前微生物实验室多采用 API20 Strep、rapid ID32 Strep、VITEK2 等系统鉴定肠球菌、链球菌及相关细菌。由于前二种系统菌库只收录了缺陷乏养菌和毗邻颗粒链菌信息,因而细长颗粒链菌无法鉴定。其中 API20 Strep 系统对这类菌的鉴定性能优于 rapid ID32 Strep 系统。即便如此,3 种系统对数据库中已涵盖的菌株也常会出现种属鉴定错误或未能鉴定出结果^[4]。

2 分子生物学方法

由于分子生物学方法不断发展及其在微生物领域的广泛应用,为不能培养、培养要求高、表型检测不可靠及不能鉴定菌株的快速正确鉴定提供了新思路和新方法。

2.1 16S rRNA 基因测序分析 16S rRNA 基因为细菌所共有,含保守序列及可变序列,后者是细菌种属鉴定的分子基础。16S rRNA 测序分析广泛用于细菌鉴定,是临床少见、表型异常、生长缓慢、不能培养及培养阴性的细菌鉴定常用方法^[5]。目前 16S rRNA 测序分析主要有 2 种方法:(1)利用设计的引物进行基因扩增测序;(2)采用商业化鉴定系统,如 MicroSeq 500 细菌鉴定系统。16S rRNA 测序法对细菌鉴定优于 API20 Strep 系统,是触酶阴性革兰阳性球菌(除肺炎链球菌及溶血链