

- [16] Asha NJ, Tompkins D, Wilcox MH. Comparative analysis of prevalence, risk factors, and molecular epidemiology of antibiotic-associated diarrhea due to clostridium difficile, clostridium perfringens, and Staphylococcus aureus[J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(8):2785-2791.
- [17] Ford AC, Spiegel BM, Talley NJ, et al. Small intestinal bacterial overgrowth in irritable bowel syndrome[J]. Clin Gastroenterol Hepatol. 2009, 7(12):1279-1286.
- [18] Raul A, Wapnir, Zinc Deficiency, Malnutrition and the Gastrointestinal Tract[J]. J Nutr. 2000, 130(5):1388-1392.
- [19] Crane JK, Naeher TM, Shulgina I, et al. Effect of zinc in enteropathogenic Escherichia coli infection[J]. Infect Immun, 2007, 75(12):5974-5984.
- [20] Prasad AS. Zinc: role in immunity, oxidative stress and chronic inflammation[J]. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2009, 12(6):646-652.
- [21] 任韵清, 杨森, 张学军. 肠病性肢端皮炎的研究进展[J]. 国外医学: 皮肤性病学分册, 2005, 31(4):226-228.
- [22] Schmitt S, Küry S, Giraud M, et al. An update on mutations of the SLC39A4 gene in acrodermatitis enteropathica[J]. Hum Mutat, 2009, 30(6):926-933.
- [23] Dong P, Tao Y, Yang Y, et al. Expression of retinoic acid receptors in intestinal mucosa and the effect of vitamin A on mucosal immunity[J]. Nutrition, 2010, 26(7-8):740-745.
- [24] Ahmad SM, Haskell MJ, Raqib R, et al. Vitamin A status is associated with T-cell responses in Bangladeshi men[J]. Br J Nutr, 2009, 102(6):797-802.
- [25] Ahmad SM, Haskell MJ, Raqib R, Stephensen CB. Markers of innate immune function are associated with vitamin a stores in men[J]. J Nutr. 2009, 139(2):377-385.

(收稿日期:2010-05-21)

• 综 述 •

缺血修饰白蛋白的测定和临床应用进展

刘运双, 曾 平 综述, 俸家富 审校

(四川省绵阳市中心医院检验科 621000)

关键词: 白蛋白类; 心肌缺血; 冠状动脉疾病**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.02.047**文献标识码:** A**文章编号:** 1673-4130(2011)02-0238-03

40%~60%的急性冠脉综合征(ACS)患者表现为初始肌钙蛋白(cTn)浓度低于临床判定限^[1],一部分为急性心肌梗死(AMI),发病后早期不能检出 cTnI/T,另一部为无心肌坏死的急性心肌缺血(如不稳定心绞痛),如何在有胸痛症状患者鉴别两者仍存在疑问。如何利用心肌缺血标志物在没有发生心肌坏死和/或 cTn 升高以前对疾病进行诊断是研究热点^[2-3],目前的研究集中于髓过氧化物酶(MPO)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)、可溶性 CD40 配体(sCD40L)、妊娠前相关血浆蛋白 A(PAPP-A)、胆碱(Ch)、缺血修饰清蛋白(IMA)、未结合游离脂肪酸(FFA)、糖原磷酸化同工酶 BB(GPBB)、胎盘生长因子(PIGF)等^[4]。其中对 IMA 的研究最为全面,并成为首个获得美国食品药品监督管理局认可的心肌缺血生物标记物^[5]。

1 IMA 测定原理和方法

1.1 产生的机制 人类清蛋白 N 末端有结合过渡金属离子的位点。心肌缺血时可产生自由基,发生酸中毒,释放铁离子和铜离子,导致 N 末端结合过渡金属离子的能力降低。清蛋白 N 末端天门冬氨酸-丙氨酸-组氨酸-赖氨酸序列结合钴(II),该位点被乙酰化修饰或者残基(一个或多个)缺失后会失去结合钴(II)的能力^[6]。

1.2 检测原理 常以清蛋白钴结合试验(ACB)测定 IMA。在血清样本中加入定量的钴(II),再加入二硫苏糖醇与未结合钴(II)反应,测定颜色变化。正常的清蛋白能够结合钴(II),未结合钴(II)的量与 IMA 的浓度成比例^[6]。

1.3 测定方法 Bhagavan 等^[7]报道了一种手工方法,结果以 470 nm 处测定的吸收值(ABSU)表示。以混合血清做精密度分析, $\bar{X}_{ABSU} = 0.520$, 批内变异系数(CV)为 2.5%~6.0%; $\bar{X}_{ABSU} = 0.536$, 日间 CV 为 3.8%。受试工作者曲线(ROC 曲线)下面积为 0.95[95%置信区间(CI)为 0.92~0.99],以 0.50

为临界值,其灵敏度和特异性分别为 88%(95%CI:78%~94%)和 94%(95%CI:86%~98%),阳性预测值 92%(95%CI:83%~97%),阴性预测值 91%(95%CI:83%~96%)。目前,IMA 自动检测技术已十分成熟。最早采用 Ischemia Technologies 公司商品试剂的自动分析方法首先应用于 Cobas Mira 分析仪^[8],后来应用于 Roche Modular Analytical System^[9]和 Beckman Coulter LX-20 分析仪^[10],在这些分析仪上都显示了良好的性能。

2 临床应用进展

2.1 鉴别急性胸痛 急性胸痛患者入院时测定 IMA 和 cTnT,以 IMA(>85 kU/L)、心电图和 cTnT(>0.05 μg/L)进行联合评价,结果显示,在所有患者以 IMA 诊断缺血性胸痛的灵敏度、特异性、阴性预测值和阳性预测值分别为 82%、46%、59%和 72%,IMA、ECG、cTn 联合检查能够证实 95%的胸痛患者归因于缺血性心脏疾病^[11]。cTn 与 IMA 的检测结果具有相关性,二者与 ACS 临床表现相结合在胸痛患者的鉴别诊断中具有十分重要的临床意义^[12-13]。

2.2 诊断经皮经腔冠脉血管形成术(PTCA)时短暂心肌缺血 Sinha 等^[14]以 PTCA 作为人类轻微短暂心肌缺血的体内试验模型,对选择性 PTCA 后即刻及 30 min、12 h 后患者 IMA 和 cTnT 水平进行了比较,结果发现,在 19 例研究对象中,18 例的血清 IMA 浓度在 PTCA 后即刻(101 kU/L)和 30 min 后(87 kU/L)高于基线(72 kU/L),12 h 后回到基线水平以下,证实 IMA 是反映 PTCA 时短暂心肌缺血的早期标记物。

2.3 提示心肌缺血的严重性 Quiles 等^[15]对 34 例清蛋白浓度在参考范围内的研究对象进行了选择性单脉管 PCI,均在 PCI 前 10 min、最后 1 个气囊充气后 5 min 内采集股动脉血液。结果发现,PCI 后 IMA 明显升高(59.9~80.9 kU/L),气

囊充气数量多、充气压力高、充气时间长的患者 IMA 更高,心肌细胞受损程度和范围以及并行血液供应的出现或缺失等因素均可影响 IMA 浓度,不仅证实 IMA 是 PCI 时心肌缺血的早期标记物,而且与心肌缺血严重程度密切相关。Garrido 等^[16]比较了 90 例实施了 PCI、有/无冠脉并行患者的 IMA 浓度,以造影术评估侧支血管,并在 PCI 前和最后 1 个气囊充气后 10 min 后立即从股动脉鞘留取血液样本,发现与没有侧支血管的患者和有侧支血管的患者 IMA 明显升高的比例分别为 14.0% 和 4.8%,两者比较差异有统计学意义,证实 IMA 轻度升高反映了 PCI 诱导的缺血侧支循环的保护作用。

2.4 反映直流电心脏复律(DCCV)后短暂心肌缺血 有研究测定了 24 例患者 DCCV 前及 1 h、6 h 后的 IMA 水平,14 例患者 DCCV 后发生 ECG 改变(ST 降低和/或 T 波反转),其 IMA 浓度高于 ECG 未发生改变者,两组患者间其他心肌酶谱指标间无差异,证实对心房纤颤患者进行心脏复律后,IMA 浓度升高可反映短暂心肌缺血^[17]。

2.5 其他临床价值 IMA 在部分有中风症状的患者中也升高,提示 IMA 并非特定于心肌缺血,可以将 IMA 作为急性缺血事件的标记物^[12]。对马拉松运动员的研究显示,运动期间骨骼肌缺血不影响 IMA 浓度,然而在运动后 24~48 h,IMA 明显升高,可能与运动诱导的潜在性胃肠缺血有关^[18]。

3 局限性和挑战

对剧烈运动、其他病理情况后液体转移以及清蛋白浓度变化等因素造成的 IMA 变化需要作更加充分的了解。IMA 临床应用所面临的问题还包括不同性别和种族的参考范围、诊断临界值的确定、有或无并发心脏疾病的普通疾病状态和并存有心脏缺血的普通疾病(例如心衰、糖尿病、慢性肾衰、高血压)之间 IMA 浓度的比较等^[4]。作为氧化应激物出现时,IMA 反映心脏缺血是非特异的,无对照的证据提示,中风、终末期肾病、肝病及某些肿瘤患者 IMA 浓度也会升高^[4]。体内、外试验都证实乳酸对 IMA 测定的负干扰,因此,在控制差的糖尿病、脓毒症、和/或肾功能衰竭等可能有高乳酸存在的情况下,应高度关注 IMA 阴性结果的意义^[4]。外伤使 IMA 水平升高,限制了 IMA 用于外伤患者心肌缺血的诊断^[19]。非 AMI 缺血与 AMI 缺血患者 IMA ROC 曲线面积均为 0.66(0.53~0.79),提示 IMA 不能很好地区分两种缺血^[7]。

目前还不清楚是否 ECG 和心肌坏死标记物(如 cTn)为阴性,IMA 为阳性,就有益于对患者进行早期分类和干预。在临床应用中,时常出现由于信息缺乏导致对 IMA 阳性的低危险度患者进行过度治疗的情况。非心脏疾病患者的 IMA 阳性结果与其他临床症状的相关性也需进一步探索。

4 结 语

目前关于 IMA 临床应用的疑问较多。对 IMA 的最高期望是在坏死标记物和 ECG 阴性情况下能够排除 ACS。IMA 检测有一定的特异性,但仍存在假阳性结果。在正常和缺血性 IMA 浓度之间也有一定重叠。IMA 阳性不能显示不稳定心绞痛和早期心肌坏死的差异,而坏死标记物仍然升高。对 IMA 认识的深入还需要更多的临床证据。

参考文献

[1] Morrow DA, Cannon CP, Jesse RL, et al. National academy of clinical biochemistry laboratory medicine practice guidelines: Clinical characteristics and utilization of biochemical markers in acute

coronary syndromes[J]. *Clin Chem*, 2007, 53(4): 552-574.

[2] Jesse RL, Kukreja R. Rationale for the early clinical application of markers of ischemia in patients with suspected acute coronary syndromes[J]. *Cardiovasc Toxicol*, 2001, 1(2): 125-133.

[3] Morrow DA, de Lemos JA, Sabatine MS, et al. The search for a biomarker of cardiac ischemia[J]. *Clin Chem*, 2003, 49(4): 537-539.

[4] Apple FS, Wu Alan HB, Mair J, et al. Future biomarkers for detection of ischemia and risk stratification in acute coronary syndrome[J]. *Clin Chem*, 2005, 51(5): 810-824.

[5] FDA. Albumin Cobalt Binding Test (ACB Test) [S/OL]. MD, USA: FDA. 2006, <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfPCD/classification.cfm?ID=612>.

[6] Collinson PO, Gaze DC. Ischaemia-modified albumin: clinical utility and pitfalls in measurement[J]. *J Clin Pathol*, 2008, 61(9): 1025-1028.

[7] Bhagavan NV, Lai EM, Rios PA, et al. Evaluation of human serum albumin cobalt binding assay for the assessment of myocardial ischemia and myocardial infarction[J]. *Clin Chem*, 2003, 49(4): 581-585.

[8] Gidenne S, Ceppa F, Fontan E, et al. Analytical performance of the Albumin Cobalt Binding (ACB) test on the Cobas MIRA Plus analyzer[J]. *Clin Chem Lab Med*, 2004, 42(4): 455-461.

[9] Abadie JM, Blassingame CL, Bankson DD. Albumin Cobalt Binding Assay to Rule Out Acute Coronary Syndrome[J]. *Ann Clin Lab Sci*, 2005, 35(1): 66-72.

[10] Maguire OC, O'Sullivan J, Ryan J, et al. Evaluation of the albumin cobalt binding (ACB) assay for measurement of ischaemia-modified albumin (IMA) on the Beckman Coulter LX-20[J]. *Ann Clin Biochem* 2006, 43(6): 494-499.

[11] Sinha MK, Roy D, Gaze DC, et al. Role of ischemia modified albumin a new biochemical marker of myocardial ischemia, in the early diagnosis of acute coronary syndromes[J]. *Emerg Med J*, 2004, 21(1): 29-34.

[12] Talwalkar SS, Bon-Homme M, Miller JJ, et al. Ischemia modified albumin, a marker of acute ischemic events: a pilot study Ann[J]. *Clin Lab Sci*, 2008, 38(2): 132-137.

[13] Collinson PO, Gaze DC, Bainbridge K, et al. Utility of admission cardiac troponin and "ischemia modified albumin" measurements for rapid evaluation and rule out of suspected acute myocardial infarction in the emergency department[J]. *Emerg Med J*, 2006, 23(4): 256-261.

[14] Sinha MK, Gaze DC, Tippins JR, et al. Ischemia modified albumin is a sensitive marker of myocardial ischemia after percutaneous coronary intervention[J]. *Circulation*, 2003, 107(19): 2403-2405.

[15] Quiles J, Roy D, Gaze D, et al. Relation of ischemia modified albumin (IMA) levels following elective angioplasty for stable angina pectoris to duration of balloon-induced myocardial ischemia[J]. *Am J Cardiol*, 2003, 92(3): 322-324.

[16] Garrido IP, Roy D, Calvino R, et al. Comparison of ischemia-modified albumin levels in patients undergoing percutaneous coronary intervention for unstable angina pectoris with versus without coronary collaterals[J]. *Am J Cardiol*, 2004, 93(4): 88-90.

[17] Roy D, Quiles J, Sinha M, et al. Effect of direct-current cardioversion on ischemia-modified albumin levels in patients with atrial fibrillation[J]. *Am J Cardiol*, 2004, 93(4): 366-368.

[18] Apple FS, Quist HE, Otto AP, et al. Release characteristics of cardiac biomarkers and ischemia-modified albumin as measured by

the albumin cobalt-binding test after a marathon race[J]. Clin Chem, 2002, 48(7):1097-1100.

posed to trauma[J]. Emerg Med J, 2006, 23(7):537-539.

[19] Can M, Demirtas S, Polat O, et al. Evaluation of effects of ischaemia on the albumin cobalt binding (ACB) assay in patients ex-

(收稿日期:2010-07-01)

• 综 述 •

基因芯片在细菌及其耐药检测中的应用

季 芳 综述, 伍 勇 审校

(中南大学湘雅三医院外科教研室, 湖南长沙 410013)

关键词:寡核苷酸序列分析; 细菌; 抗药性, 细菌

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.02.048

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)02-0240-03

广谱抗生素的广泛使用易导致菌株变异和产生耐药性,迫切需要新的技术来解决如何快速、准确诊断病原,正确选择药物和合理用药等问题。基因芯片不仅可以大量快捷地检测出耐药性菌株,进行细菌诊断、鉴别诊断、耐药性监测,而且可以检测引起细菌耐药的基因突变。本文就基因芯片技术在细菌鉴定及其耐药检测、耐药机制研究方面的应用进展作一综述。

1 基因芯片技术

基因芯片又称 DNA 芯片、cDNA 微阵列或寡核苷酸微芯片,可一次性分析多种生物样品。基因芯片技术采用了集成的方式,改变了弥补过去只能孤立研究单个基因在某个特定位置、特定时间表达状况的不足,具有检测范围广、检测速度快、样品用量少等特点。基因芯片技术因其可快速、准确、高效地显示病原体的遗传信息,已广泛应用于基因序列分析、病原微生物的快速诊断、变异及耐药机制研究、基因分型、分子流行病学调查和抗感染药物研制等。

2 基因芯片在细菌诊断及耐药研究中的应用

2.1 细菌鉴定 目前采用的致病菌传统检测方法包括前增菌、选择性增菌、分离、鉴定等程序,一般需要 3~5 d 才能完成,对于一些非典型菌株,需要更长的时间。不同细菌有各自不同的检测程序,是一项繁琐、重复、费时、费力、相互独立的技术劳动。基因芯片具有大规模、高通量的特性,克服了传统分子生物学方法只能对一个或几个基因进行研究的局限性,用极少量的样品,在极短时间内即可获得大量信息。目前该技术已相继应用于不同病原体的诊断。将各种待检微生物基因的特异片段作为核酸探针固定于生物芯片表面,可以制备成微生物检测基因芯片^[1-4],通过一步检测即可确定待检样品中病原微生物的种、属、亚型、毒性、致病性和耐药性^[5-7]。采用基因芯片检测病原菌涉及到两个重要技术环节,其一是特异的基因扩增,其二是准确的基因鉴别。基因扩增依靠的是细菌基因中的保守片段,只有在高度保守的片段中选择引物序列才能在少数几次反应中同时扩增几十种不同细菌的基因。而基因鉴别依靠的是细菌之间互不相同的 SNP 位点,因此检测位点应在基因的高可变区中选择。几乎所有已知细菌 16S rRNA 基因的碱基序列已被测定并存入基因库。由于 RNA 易于降解,因此多采用检测 16S rRNA 所对应染色体上的 16S rDNA 序列。16S rDNA 基因的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,保守区之间存在 9~10 个变异区,不同种属间有不同程度差异,可变区与保守区交错排列。对 16S rDNA 而言,如果出现 3 个碱基以上的差异就可以断定细菌不属于同一种属,因此可用于细菌的分类和鉴别。16S rDNA 广泛存在

于细菌界,能为细菌的鉴定提供具有通用性和特异性的信息。已报导有多个以细菌 16S rDNA 为检测标准制作成功的微生物检测系统。

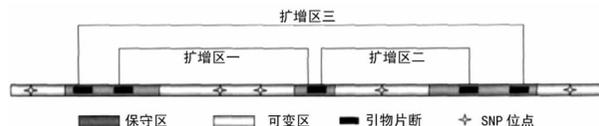


图 1 细菌 16S rRNA 基因的结构示意图

16S-23S rDNA 区间序列是继 16S rDNA 后的另一种分类及鉴别细菌的新方法,它集保守性和可变性于一身,不同种属间隔区的长度和序列有特异性,不但可以用于菌种间鉴别,还能将某些常见的不易用分子生物学方法加以有效区分的细菌鉴别开来,如大肠埃希菌和志贺菌或是葡萄球菌属内细菌^[7]。洪帮兴等^[8]扩增并测定了常见细菌的 23S rRNA 基因片段,并以生物信息学分析了不同种属细菌 23S rRNA 基因的保守序列、变异规律及菌株间种系进化关系,证实 23S rRNA 的保守序列与变异区在种系间呈间隔分布,变异区呈“马赛克”式分布,种系间进化关系与 16S rDNA 分析结果一致,为进行细菌的鉴别诊断及基因芯片的研制提供了重要的理论和实验基础。Carl 等^[9]对大肠埃希菌、痢疾杆菌、伤寒杆菌、空肠弯曲菌进行诊断和鉴别诊断时,采用了基因芯片法。在设计鉴别诊断芯片时,一方面从高度保守基因序列出发,即以各菌种间的差异序列为靶基因,另一方面选择同种细菌不同血清型所特有的标志基因为靶基因,同时以细菌所共有的 16S rDNA 保守序列为感染标志,其检测结果不仅敏感度高于传统方法,且操作简单、重复性好,明显提高了诊断效率。薛建亚等^[10]构建了细菌 16S rRNA 基因芯片,并将其应用于细菌检测,具有良好的特异性及敏感性,且耗时少。翟俊辉和韩俊^[11]建立了含有 20 种细菌探针的基因芯片模型,发现克隆探针具有广泛和灵敏的特点,但交叉反应明显;寡核苷酸探针特异性高,但灵敏度稍差,提示 cDNA 探针和寡核苷酸探针结合或以不同类型探针检测同一株细菌很可能是基因芯片发展的方向。Gingeras 等^[12]以 16S rRNA 基因序列及利福平耐药基因制备高密度寡核苷酸芯片,测定了 121 株分枝杆菌的类型及耐药性突变,并与常规序列测定方法比较,结果表明该寡核苷酸芯片不仅可以用于测序,还可直接鉴定菌种。Wang^[13]利用肺炎链球菌编码血清型和血清组标志蛋白的核酸序列作为探针,为肺炎链球菌的监测提供了一个新的具有更高特异性和灵敏度的血清快速分析方法。顾大勇^[14]针对 7 种肠道传染病病原体设计了特异性引物