

肺炎诊断标志物的研究进展

徐文武¹, 武宇婧², 任 焯³, 彭宇轩³, 高 尚^{3*}

¹河北易县中医医院内科, 河北 保定

²吉林大学白求恩第三临床医学院临床医学, 吉林 长春

³吉林大学白求恩第二临床医学院临床医学, 吉林 长春

收稿日期: 2021年9月25日; 录用日期: 2021年10月18日; 发布日期: 2021年10月27日

摘 要

肺炎常常因为无法早期区分是细菌性还是病毒性的感染, 造成抗生素的滥用和额外的医疗负担, 尽管只有一小部分病人需要使用抗生素, 但高达72%的肺炎患者接受抗菌治疗, 过度使用抗菌药物会增加耐药细菌的流行性, 引起并发症, 如艰难梭菌相关性腹泻。准确诊断是病毒还是细菌感染对于肺炎的治疗尤为重要。尽管临床目前有相关病原学的辅助检测, 但肺炎的感染可能是单一性的, 也可能是病毒和细菌共同感染, 单一临床指标的检测不能解决这个问题。本文主要论述目前临床常用的肺炎诊断标志物及其研究进展。

关键词

肺炎, 病毒, 细菌, 标志物

Research Progress on Diagnostic Markers of Pneumonia

Wenwu Xu¹, Yujing Wu², Xuan Ren³, Yuxuan Peng³, Shang Gao^{3*}

¹Department of Internal Medicine, Hebei Yixian Hospital of Traditional Chinese Medicine, Baoding Hebei

²Clinical Medicine, Bethune Third Clinical Medical School, Jilin University, Changchun Jilin

³Clinical Medicine, Bethune Second Clinical Medical School, Jilin University, Changchun Jilin

Received: Sep. 25th, 2021; accepted: Oct. 18th, 2021; published: Oct. 27th, 2021

Abstract

Pneumonia often causes antibiotic abuse and additional medical burden because it is unable to

*通讯作者。

文章引用: 徐文武, 武宇婧, 任焯, 彭宇轩, 高尚. 肺炎诊断标志物的研究进展[J]. 临床医学进展, 2021, 11(10): 4789-4802. DOI: 10.12677/acm.2021.1110703

distinguish bacterial or viral infection at an early stage. Although only a small number of patients need to use antibiotics, up to 72% of pneumonia patients receive empirical antibacterial treatment. Excessive use of antibiotics will increase the prevalence of drug-resistant bacteria and cause complications, for example, *Clostridium difficile* associated diarrhea. Therefore, accurate diagnosis of virus or bacterial infection is particularly important for the treatment of pneumonia. Although there are relevant etiological auxiliary tests in clinic, the infection of pneumonia is likely to be the co-infection of virus and bacteria. The detection of a single clinical index cannot solve this problem. This paper mainly discusses the commonly used clinical diagnostic markers of pneumonia and its research progress.

Keywords

Pneumonia, Virus, Bacteria, Markers

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 宿主对感染的反应

目前, 没有精确地诊断而滥用抗生素引起各种并发症如艰难梭菌腹泻[1]等现象时有发生, 但人们一直没放弃寻找精确的感染诊断标记物。在 1917 年发现了红细胞沉降率[2], 之后不久在 1930 年又发现了 C 反应蛋白[3]。这些指标确实反映了机体的变化, 但却是非特异性的, 无法区分感染和非感染, 更不用说病原体的类型。宿主面对感染的免疫反应为寻找生物标志物提供了思路。当机体感染脓毒症, 会激活体液免疫和细胞免疫, 释放免疫介质到血液中。基于它们的作用机制, 研究了几种生物标志物的能力, 用于诊断败血症, 可以鉴定细菌感染。最有前景的生物标志物是降钙素原, 这是一种多种细胞分泌的、出现在细菌性败血症中的急性期反应物[4]。降钙素原与其他生物标志物相比具有多项优势, 它在感染早期就出现, 并且具有很长的半衰期, 可以非常方便地在医院中检测[5]。在多种临床环境中进行研究, 观察到病毒感染不会刺激降钙素原的释放, 而细菌可以, 因此这种生物标志物非常适合区分是细菌性感染还是病毒性感染。在降钙素原的指导下, 在门诊和住院病例中减少了约 50% 的抗菌处方[6]。尽管有这些令人鼓舞的发现, 但降钙素原的应用仍存在不确定性。例如, 根据临床情况估计细菌感染的可能性存在不同的临界值, 并且很少有前瞻性验证。在细菌感染中, 尽管降钙素原比其他生物标志物具有更高的特异性, 但仍然存在假阳性的可能。尽管存在这些问题, 降钙素原仍然是肺炎感染的重要辅助检查手段。它的发现与应用, 说明探索宿主反应标志物对于区分细菌与病毒的感染具有重要意义。

针对宿主面对细菌和病毒感染作出的反应, 利用系统生物学方法探索出其它可以用于快速检测的生物标志物, 例如 mRNA、miRNA、蛋白质、代谢物或几种标志物的组合, 将鉴别诊断的发展提升到了新的高度。

2. 诊断肺炎标志物的发展状况

2.1. 病原体诊断测试

目前用于细菌感染的诊断几乎完全依靠病原体进行鉴定。鉴定呼吸道细菌病原体的金标准是培养, 这通常需要数天才能拿到结果, 并且产量低[7]。除此之外还有, 还可以对抗原进行检测(例如肺炎链球菌和军团菌), 也可以对病原体做特异性的 PCR。尽管分子诊断技术有所发展, 但肺炎衣原体和肺炎支原体

等病原体仍然没有美国食品和药物管理局(FDA)批准的分子检测试验,并且检测结果并不能百分百表明疾病的原因[8]。因此,尽管有这些检测方法,大多数肺炎病例的病原体仍然是未知的。无法明确鉴定病原体,抗菌素变成了“以防万一”的一种手段,造成了抗生素的过度使用[9]。因此,我们想要寻找的生物标志物能快速诊断的,具有敏感性和特异性,对治疗和预后起到有效的作用[10]。另一方面,呼吸道病毒病原体的分子检测更加可行。第一代以分子为基础的检测方法进入临床,重点是检测抗原。其中流感快速抗原检测的应用较为普及,因为这种检测需要大约 15 分钟就能确定结果。但是这些测试的灵敏度较差(40%~59%),在 2009 年 H1N1 流感大流行期间这个问题变得非常突出[11]。研究人员对病毒性病原体进行免疫荧光检测是快速,灵敏和特异的。但这需要必要的实验室支持,因此无法广泛应用于临床。另外还有多重 PCR 技术,这是一种同时可以检测多种病原体的技术。例如, FilmArray 可以检测 20 种病原体(其中包括 3 种细菌病原体),只需 2 分钟的操作时间,1 小时后即可获得结果。此产品的灵敏度为 84%~100%,特异性为 89%~100% [12]。但是,病毒检测并不等同于病毒感染。无症状病毒携带率很高,高达 27%的健康人体携带病毒[13]。并且,检测出病毒的存在并不排除细菌的感染。多重 PCR 分析的另一个局限是,它们仅限于检测面板上的病毒,新出现或者突变的病原体并不能检测到。

2.2. 宿主外周血基因的表达用于诊断感染类型

2.2.1. 测量和分析基因表达的技术性进展

随着几项重要技术的发展,应用外周血白细胞基因表达来鉴定肺炎病原体成为了可能。明确人类基因组序列是首要步骤,随后出现了基因表达阵列。收集样本时保持 RNA 稳定(例如, PAXgene1 血液 RNA 管)使得样品库在各种条件下都能够保持标准一致,这一技术对于跨实验比较是至关重要的[13]。“全转录组测序法”能够量化基因表达的变化,并且能够在不同条件下进行比较。如果继续发展这些技术,加快检测的速度并且降低成本,这些测序方法就可以得到普及。要做到处理分析数量庞大的复杂数据,计算和统计工具的发展也是至关重要的。现在有许多方法可用于降低数据维度,将表型与转录变化相匹配,在组间进行比较并且做预测。成功应用的算法有稀疏因子建模[14],弹性网络的贝叶斯构造[15],稀疏主成分分析[16],惩罚矩阵分解[17],模块化转录分析[18]这些技术与方法在动物模型中应用,并得到发展。例如系统病毒学在动物模型中的应用,这些方法学的进步促进了人体的研究进展[19]。

2.2.2. 以基因表达为特征的疾病状态

肿瘤学是应用基因表达变化的第一个领域,例如, OncotypeDX1 乳腺癌检测可测量 21 种基因的表达用以判断预后,指导乳腺癌的治疗决策。心脏病学[20]也有类似的进展,其中 Corus1 CAD 能够测试 23 种基因的表达,用来鉴定阻塞性冠状动脉疾病。另外环境暴露,比如电离辐射,也会诱导基因表达的变化[21]。这说明建立基于基因表达的分类器,有助于诊断疾病判断预后。

2.2.3. 病原体诱导宿主反应

对各种病原体免疫应答的特异性是一个具有特点的现象。多种生物学产物对先天性和适应性免疫反应进行调节,包括基因表达, miRNA 和蛋白质产物(包括细胞因子)。尽管先天免疫的特异性不如适应性免疫,仍然有相当数量的病原体特异性。病原体相关分子模式(PAMPs)与 Toll 样受体(TLRs)和其他在介导先天免疫应答的细胞上表达的模式识别受体结合[22]。例如在两项研究中显示, TLR-4 与革兰氏阴性细菌的脂多糖(LPS)结合,而 TLR-3 结合病毒的双链 RNA [23] [24]。此外,在体外用细菌刺激人外周血白细胞,利用宿主的免疫反应来区分病原体[25]。这些机制提供了生物标志物开发的潜在着手点。

Ramilo 等人首次发表了这一成果,从感染 A 型流感病毒,金黄色葡萄球菌,肺炎葡萄球菌和大肠杆菌的患者中取外周血细胞,从人外周血细胞中获得基因表达特征,区分细菌和病毒的感染[26]。病毒感染

和细菌感染可以通过 854 个差异表达基因区分。在病毒感染中过表达的基因, 例如 2050 寡腺苷酸合酶(OAS)蛋白和 I 型干扰素(IFN)标签。K 近邻算法(K-NN), 是一种具有 35 个基因的分类器, 用以区分急性甲型流感和急性细菌感染。在 37 名患者的独立队列(7 种甲型流感和 30 种细菌感染)中进一步验证了这一点, 准确率达 94.5% [27]。这项研究证明系统生物学策略可以准确鉴别临床相似患者的生物标志物。

2.2.4. 基因表达谱和传染性疾病

人类挑战实验提供了一个可控环境, 可以以协调和全面的方式研究对特定刺激的反应。在接种呼吸道合胞病毒(RSV), 甲型流感(H3N2/Wisconsin/67/2005)或鼻病毒(HRV)之一的健康成人志愿者中进行了几次这样的攻击实验[28]。大约有一半的受试者出现症状, 可以进行几项相关的比较: 有症状者与无症状者, 有症状者与自身基线, 以及两组患者的时间变化[29]。贝叶斯因子回归模型(BRFM)降低了数据的维数, 将具有相似表达模式的基因组合成“因子”[30]。标签(即“有症状”或“无症状”)仅在因子生成后才被分配。在 RSV, 流感或 HRV 的患者中用一些因子区分有症状患者和无症状者。确定了表现最佳的因子, 以及生物学上可信的基因, 它们包括 IFN 信号传导中的基因, OAS 和自由基 S-腺苷甲硫氨酸结构域(RSAD2)途径。然后使用 28 个基因(由 30 个探针代表)构建用于一次性交叉验证的稀疏概率回归模型。分类器正确识别了 84 名受试者中的 81 名(96.5%)在病毒攻击后有症状或无症状。这些结果在三个不同的病毒攻击实验中都是一致, 说明了宿主对病毒性肺炎反应的保守性[31]。

然后将病毒性肺炎标签应用于上述 Ramilo 研究队列中的数据[32], 根据对“病毒”或“非病毒”的分类, 在流感和肺炎球菌感染之间区分性达到 93%, 可以通过泛病毒基因表达分类器建立他们的区别。

另外设计针对细菌和病毒的探针更有特异性, 囊括细菌性肺炎(71 种探针), 病毒性肺炎(33 种探针)或非感染性疾病(26 种探针)的分类器。总体准确率为 87% (238/273 与临床判断一致), 比原降钙素(78%, $p < 0.03$)和三个已发表的细菌与病毒感染分类(78%~83%)更准确[33]。

2.2.5. 基因表达特征可以在高峰临床症状出现之前识别病毒感染

区分有症状和无症状病毒感染的分子分类器似乎没有很大的临床意义。然而, 人类挑战实验提供了机会来确定, 生物介质是否能在它们引起的临床表型之前检测得到。使用上述相同的挑战模型, 有症状性病毒感染的基因表达标签在接触感染 29 小时就能检测到, 并且在高峰临床症状出现前约 40 小时达到最大精确度[34]。人类挑战模型的另一个特征是大约 50%的挑战对象仍然无症状[35]。因此, 人们可能会认为无症状宿主的生物学与基线保持一致。这并不只是观察得出, 使用自组织映射算法将基因表达变化分为 8 个簇, 并强调了有症状组和无症状组随着时间的推移一些基因簇仅在有症状的受试者中随着时间显示出强烈的变化, 一些仅在无症状的受试者中是动态的, 而另一些则在两个临床组中显示相互变化[36]。这些相互变化突出显示的途径包括核苷酸结合结构域和富含亮氨酸重复序列的含有基因家族(NLR)相关基因, 其在病原体模式识别和先天免疫中起作用。尤其是, 核苷酸结合寡聚化结构域 2 (NOD2)在有症状组中高度表达, 将其与无症状的个体区分开来。NOD2 识别流感和 RSV 的单链 RNA (ssRNA), 导致活化的 B 细胞(NFkB)的丝氨酸 - 苏氨酸激酶 2 (RIPK2)和核因子 κ -轻链增强剂的激活, 两者在有症状组中增加。然而, 无症状组显示超氧化物歧化酶(SOD1)和丝氨酸/苏氨酸激酶 25 (STOK25)的表达显着且持续增加, 这与抗氧化剂和应激反应有关。另一个突出显示有症状和无症状受试者不同反应的途径是细胞因子信号传导抑制因子(SOCS)。SOCS 基因通常负责调节对细胞因子和生长因子信号传导的免疫应答[37]。在这项研究中, 一些 SOCS 基因在有症状的受试者(SOCS1 和 SOCS3)中上调, 而另一些 SOCS 基因在无症状宿主中上调(SOCS2 和 SOCS5), 表明随着时间的推移调节免疫反应的不同角色。这些结果突出了参与病毒攻击的不同反应的生物学途径, 为正在进行的基础研究提供原理信息, 并为临床研究确定新的领域。

2.2.6. 病毒特异性基因表达模式

到目前为止描述的基因表达分类器主要集中在病原体类别辨别(病毒和细菌)或有症状和无症状。使用流感的病毒攻击实验, HRV 和 RSV 没有识别病毒特异性标签[38]。相反, 最近对严重 RSV 感染患儿的前瞻性观察研究表明不同于流感或 HRV 感染的不同基因表达特征。使用 K 近邻算法(K-NN), 70 基因分类器区分 RSV 与 HRV 和流感感染, 在儿科人群中验证显示 91% 的准确性。与 HRV 或流感病毒感染相比, RSV 应答包括嗜中性粒细胞相关基因的过表达, 抑制淋巴系和抗微生物应答基因。这些数量的变化与疾病严重程度相关。这些发现很重要, 因为它们表明宿主基因表达的变化不仅反映了对病原体类的反应, 而且反映了对特定病原体的反应。此外, 宿主基因表达谱可能提供与疾病严重程度相关的预后信息, 为临床决策提供支持[39]。

脓毒症是一种全身炎症反应综合症, 每年在美国有 75 万人死亡[40]。这也是美国医疗最昂贵的病症, 每年花费超过 200 亿美元[40]。迅速诊断和治疗对于降低死亡率至关重要, 每延迟一小时都会增加死亡率风险。SIRS 是一种非特异性的脓毒症, 因此, 在临床上脓毒症难以与无菌性炎症区分, 如组织创伤。利用基因的差异表达可以解决这一问题, 对严重外伤后患者检测基因表达。值得注意的发现是(i) 超过 80% 的表达基因在创伤性损伤后表现出差异表达; (ii) 不同的基因簇在明显不同的时间段恢复, 创伤后基因表达谱与健康对照的差异程度以及它们随时间推移的基因表达恢复程度与临床结果相关[41]。确定了 11 个保守基因, 可以将非感染性炎症和急性感染性炎症区分开。

IFI27 是一种单基因生物标志物, 体外研究表明 IFI27 在浆细胞样树突状细胞中是 TLR7 上调的, 抗原呈递细胞对流感病毒起反应。体内研究证实, IFI27 在流感患者中表达, 但在细菌感染中表达, 在多个患者队列(n = 521)中已经证明。IFI27 显示 88% 的诊断准确性(AUC)和 90% 的特异性区分病毒和细菌感染[42]。

2.3. 蛋白质用于肺炎诊断标志物

2.3.1. 蛋白质组学和代谢组学

蛋白质组学和代谢组学分析的目的是对宿主基因组蛋白质和/或肽和化学产物的综合评估, 包括表征与其他生物分子的任何修饰或相互作用。蛋白质组学和代谢组学主要利用质谱(MS)的方法用于全系统检测蛋白质和代谢物分析物。样品可以通过不同的特性分离, 如 pK, 疏水性和离子迁移率。MS 质量电荷比测量的分辨率现在足以区分两种相同的分析物[23]。这种细化水平增加了分析的复杂性, 但提供了在不同生理状态之间精确区分的手段。

2.3.2. 蛋白质组学和代谢组学生物标志物的发现和临床应用

MS 技术和分析方法的不断发展, 可以更准确地鉴定和定量更大量的蛋白质和代谢物[24]。然而, 检测低丰度, 疏水性或碱性分析物能力的局限性往往导致蛋白质组或代谢组覆盖率不完全, 动态范围受限[43]。尽管存在技术挑战, 但仍有可能成为简单, 快速, 低成本的基于宿主蛋白质或代谢物的诊断分析方法。与目前需要扩增的核酸检测相比, 蛋白质和代谢物生物标志物适用于临床应用, 例如侧流免疫层析(例如妊娠或快速 A 组链球菌)。

蛋白质组学应用于体外病毒感染模型的例子, 包括腺病毒[44], 人类 RSV 病毒[45]和甲型 H1N1 流感[46]。这些主要使用 2D 凝胶电泳或细胞培养物中氨基酸(SILAC)的稳定同位素标记以及液相色谱(LC)-MS 来鉴别差异表达的蛋白质。反相蛋白阵列技术与裂谷热病毒(RVSV)的离体模型一起使用以鉴定和分析在感染期间调节的磷蛋白信号传导途径[47]。这提示了通过有丝分裂原活化蛋白激酶(MAPK)和细胞外信号调节激酶(ERK)途径针对凋亡的转录控制的病毒策略。诸如此类的研究已经产生了可用于理解感染生物学和宿主反应的综合数据集, 并且可能导致临床上有用的治疗靶点或诊断工具, 但尚未在临床环

境中被验证为诊断工具。

使用上述相同的病毒攻击实验, LC-MS/MS 用于分析在基线时从流感 H3N2 攻击的受试者获得的血浆。得到的 MS 痕迹被用于估计每个样品约 40,000 个同位素组的浓度, 其中约 10% 映射到已知蛋白质。用贝叶斯稀疏因子建模降维确定了 109 个蛋白质组(因子)。突出这种方法的生物合理性, AGL2 是与症状性流感感染高度相关的[48]。这种蛋白质与脂多糖结合蛋白和 C-反应蛋白有关, 两者都是急性期反应物。因此, 虽然蛋白质组学数据的发展与基因表达谱分析不同, 但有望找到表征病毒感染的生物标志物, 并且可以更容易地转化为临床平台。

代谢组学分析流感病毒感染模型提供了洞察感染动态和宿主细胞代谢之间的关系。在流感感染的培养细胞模型中, 发现用 LC/MS 检测培养细胞感染后, 糖酵解和三羧酸(TCA)循环[49]以及脂肪酸生物合成和胆固醇代谢[50]中间体显著改变和气相色谱(GC)/MS 方法。另一项研究应用基于 LC/MS 的代谢组学方法对鼠肺中流感病毒感染期间调节的宿主脂质因子进行综合分析[51]。来自 5-脂氧合酶和 12/15-脂氧合酶途径的脂质代谢物通过感染作为菌株毒力和感染阶段的函数而被差异调节。此外, 13 至 9 羟基十八碳二烯酸的比率成为流感感染状态的潜在生物标志物。

2.3.3. 细胞因子和急性期蛋白

宿主对抗感染的炎症反应的特征在于促炎细胞因子和急性期蛋白的释放, 驱动免疫应答的先天性和适应性免疫。对于病毒(IL-18/铁蛋白)和细菌(IL-6/CRP)感染的炎症反应呈现出免疫生物标志物的特定血浆模式。

炎症是身体的一种保护性反应, 旨在消除侵入性病原体, 中和有害刺激物并启动组织修复。当先天性免疫细胞通过种系编码的模式识别受体(PRR)感知病原体(病原体相关分子模式[PAMPs])或内源性应激信号(损伤相关分子模式[DAMPs])上的进化保守结构时触发炎症。PRR 主要由巨噬细胞和树突状细胞表达, 尽管它们也表现为其他免疫和非免疫细胞, 包括嗜中性粒细胞, 淋巴细胞, 成纤维细胞和上皮细胞[52]。在感染期间, 入侵病原体引起的细胞应激也导致与 PAMP 协同作用以活化 PRR 的 DAMP 的释放。PRR 的激活通过释放促炎细胞因子触发复杂的炎症过程, 急性期蛋白(APPs)的诱导是炎症级联的突出特征。血浆炎性细胞因子和 APPs 已被确立为炎症性疾病的诊断指标, 因为它们对全身性炎症具有特殊的敏感性[53], 能够帮助治疗和判断预后。

1) 血浆细胞因子标志物

分析炎症患者的血浆细胞因子以确定病理生理学表型, 从而在诊断和治疗决策中起关键作用。促炎性细胞因子 IL-1 α , IL-1 β 和 IL-18 是属于细胞因子 IL-1 家族的炎性血浆标志物, 其全部被合成为前体蛋白, IL-1 α 前体(pro-IL-1 α)具有生物活性[54]。Pro-IL-1 α 从死亡或受伤的非凋亡细胞中释放出来, 并作为能够引发强烈炎症反应的主要 DAMP [4]。IL-1 β 和 IL-18 主要由单核细胞/巨噬细胞响应 PRR 对 PAMP/DAMP 的识别而产生[55]。与 pro-IL-1 α 不同, IL-1 β 和 IL-18 (pro-IL-1 β 和 pro-IL-18)的前体在生物学上无活性, 需要蛋白水解切割成具有生物活性的成熟细胞因子。这种蛋白水解切割主要依赖于通过形成称为炎性体的多聚体蛋白质复合物的胱天蛋白酶-1 活化。因此, 已经提出了两步模型: 首先, 宿主细胞上的 PRR 的激活诱导原-IL-1 β 和原-IL-18 的转录; 其次, 通过 PAMP 或 DAMP 激活炎性体导致原细胞因子翻译后切割成成熟的 IL-1 β 和 IL-18 [56]。

虽然 IL-1 β 和 IL-18 的释放具有相似的过程, 但他们的功能不同。在与 IL-12 的协同作用中, IL-18 起到连接先天性免疫的桥梁的作用, 通过驱动 T 辅助细胞(Th) 1 极化和启动 NK 细胞来响应 IFN- γ 的产生, 二者均导致 IFN- γ 水平升高[57]。IFN- γ 通过刺激吞噬作用在细胞内杀灭病原体, 是细胞内细菌和真菌抵抗感染的早期宿主防御。IFN- γ 在通过诱导关键抗病毒酶(最显着的是蛋白激酶 R [58]建立长期控制的抗

病毒状态。此外, IL-18 具有诱导 Fas 配体在 NK 细胞表达的独特性质, 促进其通过 Fas 介导的细胞凋亡杀死感染细胞[59]。

与 IL-18 相反, IL-1 β 负调节 IFN- γ 介导的应答。IL-1 β 是 COX-2 表达的有效诱导剂, 导致产生大量的前列腺素 E2(PGE2)。反过来, PGE2 直接作用于 T 细胞以抑制 IFN- γ 产生, 从而抑制 Th1 免疫并驱动 Th17 极化[60]。IL-1 β 的另一个下游作用涉及 IL-6 的多效性细胞因子的上调, IL-6 是引发初始 T 细胞 Th17 分化的关键因子[61]。IL-6 还可以抑制调节性 T 细胞的免疫抑制功能, 并阻止 Th17 细胞转化为调节性 T 细胞, 说明 IL-6 在形成适应性免疫反应中起关键作用, 有利于 Th17 的免疫性[44]。Th17 反应以 IL-17 和 IL-22 的产生和释放为特征, 对于上皮细胞和粘膜宿主防御细胞外细菌和真菌至关重要[45]。IL-17 和 IL-22 通过刺激抗菌肽的表达和诱导嗜中性粒细胞募集来协同增强粘膜屏障功能[62]。有趣的是, Th17 反应可能通过上调抗细胞凋亡分子来促进对病毒的最佳宿主防御, 从而阻止细胞毒性 T 细胞破坏靶细胞并提高病毒感染细胞的存活率[63]。因此, 尽管 Th17 应答在协调细胞外细菌和真菌的清除方面非常有效, 但杀死细胞内病原体 Th1 的应答可能更有效。

2) 急性期蛋白

实验室通常将各种急性期蛋白(APPs)的血浆浓度作为评估炎症的生物标志物。尽管 IL-18 也与 APP 的释放有关[64], 但 APPs 主要由肝细胞产生, 最显着的是 IL-1 β 和 IL-6。C-反应蛋白(CRP)是人 APPs 的原型。在健康个体中, 发现微量 CRP 的中位血浆浓度为 0.8 mg/L, 而 CRP 值在炎性刺激后急剧升高达 1000 倍[65]。CRP 在长时间内保持稳定, 半衰期为 19~20 小时[19]。由于这种半衰期在健康和疾病条件下保持不变, 循环 CRP 的唯一决定因素是其合成速率, 其直接反映炎症过程的强度[66]。这使得 CRP 成为传染性疾病和炎症疾病活动的有力标志物。

CRP 在天然免疫中扮演重要角色, 作为抗感染的早期防御机制。结合受损细胞的微生物多糖或配体后, CRP 可通过与吞噬细胞上的 Fc 受体结合直接介导其吞噬作用[50]。配体结合的 CRP 也可以通过与 C1q 相互作用激活经典补体途径间接介导吞噬作用[67]。该激活过程导致病原体和凋亡细胞的 C3/C4 调理作用, 增强补体受体介导的吞噬作用。然而, CRP 通过募集因子 H 减弱入侵微生物或受损细胞表面上下游膜攻击复合物的形成, 从而保护细胞免于裂解[68]。因此, 通过 CRP 激活补体级联通过促进调理作用来限制炎症反应, 同时避免细胞溶解的促炎效应。

在临床中广泛使用的另一种炎症血浆标志物是急性期铁蛋白。铁蛋白是一种无处不在的细胞内铁储存蛋白, 由 24 个轻(L)和重(H)铁蛋白单体组成。通过以无毒的形式存储铁, 铁蛋白通过 Haber-Weiss 或 Fenton 化学防止铁催化自由基形成。在感染和炎症过程中, 铁从循环中被排出, 并被重新导向肝细胞和巨噬细胞, 从而减少了这种必需营养素侵入病原体的可用性[69]。肝细胞和巨噬细胞产生的铁超载增强了铁蛋白通过铁应答蛋白的翻译[70]。巨噬细胞中部分升高的铁蛋白可能易位至溶酶体区室, 从而保护该室免受反应性铁, 随后通过分泌 - 溶酶体途径分泌铁蛋白[71]。铁蛋白也可通过肝细胞中经典的 ER/高尔基体依赖性分泌途径进入循环[72]。另一种可能的铁蛋白分泌机制涉及受损细胞的渗漏, 解释了血清铁蛋白与肝细胞损伤标记之间的牢固关联[73]。

除了 CRP 和铁蛋白之外, 其他各种 APP 已经用于临床实践。血清淀粉样蛋白 A (SAA)在炎症刺激下, 其血浆浓度可以迅速增加到 1000 倍[74]。SAA 主要在肝脏中产生, 并作为调理革兰氏阴性细菌吞噬作用的先天识别分子[75]。SAA 还通过单核细胞和巨噬细胞诱导促炎性细胞因子的强大和快速分泌, 从而增强宿主对入侵病原体的早期反应[38] [76]。还有降钙素原, 降钙素原在正常情况下由甲状腺的滤泡旁 C 细胞分泌, 但可通过促炎性刺激使身体的其他细胞分泌, 最终导致血清降钙素原水平显著升高[77]。然而, 降钙素原在急性期反应中的确切生理功能仍不明确, 需要进一步研究。

3) 血浆炎症因子面对病毒和细菌的感染

呼吸科医生最常见的挑战是难以区分是病毒还是细菌的感染。通过循环细胞因子和 APP 来监测宿主免疫反应,这是协助诊断感染性疾病的一种快速有力的手段。许多细菌性疾病的特征是循环 IL-1 β 和 IL-6 的水平升高,同时伴随血浆 CRP 升高,说明血浆 IL-6 和 CRP 水平之间有良好的相关性[78]。另外,与病毒性肠炎相比,血浆 IL-6 和 CRP 浓度在细菌性小肠结肠炎中显着升高[79]。重要的是,IL-6 诱导的 CRP 水平能够区分特定的病毒和细菌感染[80]。

与细菌感染不同,病毒感染通常以促炎细胞因子 IL-18 的血浆水平升高为特征,以及增加的循环铁蛋白浓度。在健康成人中,IL-18 的循环浓度相对较低,低于 200 pg/mL,而循环铁蛋白浓度通常在 120 μ g/L 范围内[68]。然而,在 Epstein-Barr 病毒(EBV)感染的急性阶段,血浆 IL-18 浓度很容易超过 1000 pg/mL,中位铁蛋白浓度高达 431 μ g/L [67]。慢性乙型和丙型肝炎病毒感染期间,IL-18 和铁蛋白也被强烈诱导[68]。人类免疫缺陷病毒(HIV)疾病是另一种病毒感染,其特征是 IL-18 和铁蛋白的循环水平增加[68] [81]。循环铁蛋白最显着的升高见于患有急性登革热感染的患者,中位血浆铁蛋白水平高达 1264 μ g/L [81]。此外,IL-18 和铁蛋白的循环水平显示与登革热疾病的严重程度有很强的相关性,因此可以作为预测疾病进展的标志物[82]。然而,重要的是要注意,登革热病毒中循环 IL-18 的水平升高与拮抗性 IL-18 结合蛋白(IL-18BP)的水平增加一致,导致游离的生物活性 IL-18 的血浆浓度不变[82]。这表明在研究感染性疾病中的 IL-18 应答时应特别注意游离 IL-18 分子的循环水平。

细菌感染通常以诱导 IL-6、TNF α 和 CRP 为特征,病毒感染通常与血浆 IL-18 和铁蛋白显着升高伴随低循环 CRP 水平相关[83]。IL-18 还刺激 Th1 免疫应答,其通过 IFN- γ 的诱导在宿主防御细胞内微生物方面发挥关键作用。相反,细菌感染通常与 IL-1 β 的广泛释放相关,从而通过诱导 IL-6 刺激肝细胞 CRP 分泌。反过来,CRP 通过促进细菌的吞噬作用在早期宿主防御中起到先天武器的作用。IL-1 β 还刺激 Th17 免疫应答,这对于针对细胞外细菌的上皮和粘膜防御至关重要。因此,病毒感染中的 IL-18 应答导致高铁蛋白血症,而细菌感染以 IL-1 β /IL-6 应答为特征,最终导致 CRP 升高。

在细菌和病毒感染中还有几种其他细胞因子血浆标志物和急性期蛋白。其中,血清淀粉样蛋白 A (SAA)相比在细菌感染患者中,病毒感染患者 SAA 显着增加[83]。这种增加与循环 CRP 水平呈正相关,一些研究者认为在临床中 SAA 等同于 CRP,并且 SAA 可能是低炎症活性感染中更敏感的指标[84]。在早期鉴定细菌感染,降钙素原的诊断准确性已被证实优于 CRP 和 SAA,并且降钙素原能作为脓毒症的预后指标[85]。细菌感染期间,细胞因子血浆标志物(如 IL-6 和肿瘤坏死因子- α)刺激了降钙素原的分泌,而病毒感染通常会降低降钙素原的反应,这可能是由于 IFN- γ 的产生增加[85]。另外,肿瘤坏死因子(TNF α)是参与全身炎症的细胞信号传导蛋白,并且是组成急性期炎症反应的细胞因子之一。它主要由激活的巨噬细胞产生,TNF 的主要作用是调节免疫细胞,一般在细菌感染中升高。脂多糖结合蛋白和嗜中性粒细胞脂质转运蛋白,相比于病毒感染在面对细菌感染的上升水平更高[86]。

2.4. miRNA 用于诊断肺炎标志物

miRNA 是高度保守的,参与转录后调控的小非编码 RNA。在细胞内,miRNA 作为 RNA 诱导沉默复合物(RISC)的一部分在胞质溶胶中发挥作用,与成熟 mRNA 的 3' 非翻译区(UTR)中的共有序列靶标结合以抑制其翻译。miRNAs 能够稳定地存在于细胞外空间(包括血液)中。它能够耐受沸腾,反复冻融循环和随时间推移的衰减,具有显着的吸引力作为诊断靶点[87]。而且,miRNA 高度保守,因此动物模型中的发现可能更成功地转化为人类疾病[88]。miRNA 在各种疾病过程中的作用已进入临床诊断检测(例如,用于乳腺癌[89],前列腺癌和结肠癌。此外,miRNA 也被成功用作治疗靶点,例如 miR-122 在丙型肝炎病毒(HCV)感染中的例子。Miravirsin 是 miR-122 的一种锁定的核酸修饰的 DNA 反义寡核苷酸,导致它

的隔离和 HCVRNA 水平的 log-times 降低[90]。

2.4.1. miRNA 表达对病毒感染的反应

miRNA 表达是一种“用于评估宿主对病毒感染反应的组学套件”[91]。将 miRNA 与呼吸道病毒感染相关的早期工作大部分是在体外完成的。例如, 肠道病毒 71 (EV71)感染的喉上皮细胞模型鉴定了 64 种 miRNA, 表达改变超过两倍[92]。根据共有序列预测这 64 种 miRNA 靶向 5765 个独特基因。这是非常大量的基因, 它们映射肠道病毒感染, 包括神经过程, 免疫反应和细胞死亡途径。

在患有手足口病的患者中发现了基于 miRNA 的诊断性生物标志物[92]。作者确定了六种 miRNA (miR-148a, miR-143, miR-324-3p, miR-628-3p, miR-140-5p 和 miR-362-3p), 从健康对照中区分 EV71 感染患者。结合在一起 6-miRNA 分类器对 EV71 感染具有 97.1%的灵敏度和 92.7%的特异性。这种人类 EV71 感染队列也提供了一个比较机会, 它与上述的体外 EV71 模型一致。在儿童中发现的六个最相关的 miRNA 中, 在 64 个 miRNA 体外图谱中也只有两个被鉴定[91]。这个说明了定义方法学效果(体外与体内), 人口统计学(儿童与成人), 疾病特征(轻度与重度)以及其他可能影响结果的参数的重要性。

miRNA 对 A 型流感病毒的暴露和与未暴露的细胞相比, 表现出较高水平的 miR-7, miR-132, miR-146a, miR-187, miR-200c 和 miR-1275 的表达[81]。这些 miRNA 不是由 IFNs, IL-6 或肿瘤坏死因子 α (TNF α)诱导的, 表明它们在上游或与这些途径平行。其中下游的 mRNA 靶标和通路是 MAPK3 和白细胞介素-1 受体相关激酶 1 (IRAK1), 信号蛋白调节细胞对感染的反应[93]。

最近几项研究测量了来自各种流感病毒感染患者的 miRNA, 包括 2009 年 H1N1 [82], H7N9 [83]以及 H1N1 和 H3N2 混合感染[84]。与健康对照相比, 微阵列用于鉴定确诊流感患者血液中差异表达的 miRNA。然后使用 RT-PCR 验证候选 miRNA 并用于构建分类器。三种流感分类器之间没有一个 miRNA 重叠; 这些体内衍生的 miRNA 分类器中的任何一个都没有与上述体外结果重叠。这种缺乏一致性的现象值得关注, 可能检测方法不同, 结果也会有差异[94]。随后, 进行通路分析和蛋白质相互作用网络构建, 识别多种相关途径, 包括 MAPK 信号传导, 凋亡, TLR 信号传导和 B 细胞受体信号传导。虽然这些途径与病毒发病机制和抗病毒免疫反应有关, 但它们是多效性的, 也很难解释。

2.4.2. miRNA 在细菌感染反应中的表达

关于细菌性呼吸道感染中 miRNA 的研究较少, 大多数已发表的报告集中在脓毒症[85] [86] [95] [96] [97] [98]百日咳或结核病[99]。miRNAs 作为常见的细菌呼吸道病原体的诊断工具尚未见报道。此类研究正在进行中, 可能会采取与呼吸道感染相似的方法。

2.4.3. 转录水平标志物的应用

有 2 种转录组宿主 RNA 标签: FAM89A 和 IFI44L, 能够鉴别发热儿童细菌和病毒的感染。RNA 表达数据的分析鉴定了 38 个转录本标记区分细菌和病毒感染。130 名儿童, 23 例确诊细菌, 28 例确诊病毒, 79 例不确定感染), 在 23 位患者中区分病毒还是细菌(敏感性, 100% [95% CI, 100%~100%]和特异性, 96.4% [95% CI, 89.3%~100%]) [100]。

3. 总结和展望

目前用于诊断肺炎的标记物, 大体分为三类, DNA 层面的差异表达基因, 转录层面的 mRNA 和蛋白质层面的多种炎性蛋白。另一方面, 感染后宿主与病原体相互作用是由大量的分子、途径、细胞和组织介导的。随着统计分析的进展, 构建分类器的能力也会提高[101], 而将这些变化通过基因表达、蛋白质组学、代谢组学和 miRNA 表现出来。对于诊断标志物, 蛋白质比基因具有很好的前景, 具有简单、快速、低成本的特点。单一的标记物特异性和敏感性不强, 最近的研究在于将几种标记物进行组合以增强

诊断效力,如 CRP 与其他循环生物标志物(例如 IL-6、IL-18 和降钙素原)的组合改善了对下呼吸道感染患者病原学的预测[50] [67]。这强调了使用炎症血浆标志物辅助诊断不可或缺的重要组成部分,但影像学检测和病史仍然是诊断的根本。本文阐明了由 IL-6、CRP、IL-18 和铁蛋白组成的血浆炎症标记在区分病毒感染和细菌感染方面的敏感性和特异性。另外研究过程中也有奇怪的现象有待探索,流感感染患者的生物学标记物更接近细菌感染,而不是病毒感染的炎症反应[50],这种差异也可能是由于(未检测到)细菌共感染引起的免疫反应改变或流感与胱天蛋白酶-1 激活的干扰[68]。因此,需要针对更大群体进行多种类型的感染研究。要投入临床应用我们要面对的技术困难依然有很多,收集、保存和分析 RNA 的能力有待提高,微阵列能够同时评估多种 RNA 序列,然而它不适合用作快速临床检测。新一代测序(NGS)的发展,避开了一些限制。但是 NGS 需要创建大量的数据进行编目和分析,也不适合用于临床。另外,PCR 扩增得到的阳性结果是否具有原本的感染效力,即使区分出病毒和细菌的感染,还存在先后感染的情况,那么检测的时间窗和指南又该如何界定,宿主对感染的反应是代表真正的感染还是无症状携带呢,这一系列的问题都有待解决。

参考文献

- [1] Hong, C.Y., *et al.* (2004) Acute Respiratory Symptoms in Adults in General Practice. *Family Practice*, **21**, 317-323. <https://doi.org/10.1093/fampra/cmh319>
- [2] Johnstone, J., Majumdar, S.R., Fox, J.D. and Marrie, T.J. (2008) Viral Infection in Adults Hospitalized with Community-Acquired Pneumonia: Prevalence, Pathogens, and Presentation. *Chest*, **134**, 1141-1148. <https://doi.org/10.1378/chest.08-0888>
- [3] Cantrell, R., Young, A.F. and Martin, B.C. (2002) Antibiotic Prescribing in Ambulatory Care Settings for Adults with Colds, Upper Respiratory Tract Infections, and Bronchitis. *Clinical Therapeutics*, **24**, 170-182. [https://doi.org/10.1016/S0149-2918\(02\)85013-5](https://doi.org/10.1016/S0149-2918(02)85013-5)
- [4] Shapiro, D.J., Hicks, L.A., Pavia, A.T. and Hersh, A.L. (2014) Antibiotic Prescribing for Adults in Ambulatory Care in the USA, 2007-09. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **69**, 234-240. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt301>
- [5] Angus, D.C., *et al.* (2001) Epidemiology of Severe Sepsis in the United States: Analysis of Incidence, Outcome, and Associated Costs of Care. *Critical Care Medicine*, **29**, 1303-1310. <https://doi.org/10.1097/00003246-200107000-00002>
- [6] Dowell, S.F. and Schwartz, B. (1997) Resistant Pneumococci: Protecting Patients through Judicious Use of Antibiotics. *American Family Physician*, **55**, 1647-1654, 1657-1658.
- [7] Kunin, C.M. (1993) Resistance to Antimicrobial Drugs—A Worldwide Calamity. *Annals of Internal Medicine*, **118**, 557-561. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-118-7-199304010-00011>
- [8] Neu, H.C. (1992) The Crisis in Antibiotic Resistance. *Science*, **257**, 1064-1073. <https://doi.org/10.1126/science.257.5073.1064>
- [9] Cohen, M.L. (1992) Epidemiology of Drug Resistance: Implications for a Post-Antimicrobial Era. *Science*, **257**, 1050-1055. <https://doi.org/10.1126/science.257.5073.1050>
- [10] Coenen, S., Gielen, B., Blommaert, A., Beutels, P., Hens, N. and Goossens, H. (2014) Appropriate International Measures for Outpatient Antibiotic Prescribing and Consumption: Recommendations from a National Data Comparison of Different Measures. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **69**, 529-534. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt385>
- [11] Evans, A.T., Husain, S., Durairaj, L., Sadowski, L.S., Charles-Damte, M. and Wang, R.N.Y. (2002) Azithromycin for Acute Bronchitis: A Randomised, Double-Blind, Controlled Trial. *The Lancet*, **359**, 1648-1654. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)08597-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)08597-5)
- [12] van Kooyk, Y. and Rabinovich, G.A. (2008) Protein-Glycan Interactions in the Control of Innate and Adaptive Immune Responses. *Nature Immunology*, **9**, 593-601. <https://doi.org/10.1038/ni.f.203>
- [13] Warren, H.S., *et al.* (2009) A Genomic Score Prognostic of Outcome in Trauma Patients. *Molecular Medicine*, **15**, 220-227. <https://doi.org/10.2119/molmed.2009.00027>
- [14] Desai, K.H., *et al.* (2011) Dissecting Inflammatory Complications in Critically Injured Patients by Within-Patient Gene Expression Changes: A Longitudinal Clinical Genomics Study. *PLoS Medicine*, **8**, e1001093. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001093>
- [15] Cvijanovich, N., *et al.* (2008) Validating the Genomic Signature of Pediatric Septic Shock. *Physiological Genomics*, **34**, 127-134. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00025.2008>

- [16] Shanley, T.P., *et al.* (2007) Genome-Level Longitudinal Expression of Signaling Pathways and Gene Networks in Pediatric Septic Shock. *Molecular Medicine*, **13**, 495-508. <https://doi.org/10.2119/2007-00065.Shanley>
- [17] Wong, H.R., *et al.* (2007) Genome-Level Expression Profiles in Pediatric Septic Shock Indicate A Role for Altered Zinc Homeostasis in Poor Outcome. *Physiological Genomics*, **30**, 146-155. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00024.2007>
- [18] Wong, H.R., *et al.* (2009) Genomic Expression Profiling across the Pediatric Systemic Inflammatory Response Syndrome, Sepsis, and Septic Shock Spectrum. *Critical Care Medicine*, **37**, 1558-1566. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e31819fcc08>
- [19] Wong, H.R., Freishtat, R.J., Monaco, M., Odoms, K. and Shanley, T.P. (2010) Leukocyte Subset-Derived Genome-wide Expression Profiles in Pediatric Septic Shock. *Pediatric Critical Care Medicine*, **11**, 349-355.
- [20] Wong, H.R., *et al.* (2011) Validation of a Gene Expression-Based Subclassification Strategy for Pediatric Septic Shock. *Critical Care Medicine*, **39**, 2511-2517. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e3182257675>
- [21] Almansa, R., *et al.* (2014) Transcriptomic Evidence of Impaired Immunoglobulin G Production in Fatal Septic Shock. *Journal of Critical Care*, **29**, 307-309. <https://doi.org/10.1016/j.jcrc.2013.11.020>
- [22] Bermejo-Martin, J.F., *et al.* (2010) Host Adaptive Immunity Deficiency in Severe Pandemic Influenza. *Critical Care*, **14**, Article No. R167. <https://doi.org/10.1186/cc9259>
- [23] Zarkesh, M., Sedaghat, F., Heidarzadeh, A., Tabrizi, M., Bolooki-Moghadam, K. and Ghesmati, S. (2015) Diagnostic Value of IL-6, CRP, WBC, and Absolute Neutrophil Count to Predict Serious Bacterial Infection in Febrile Infants. *Acta Medica Iranica*, **53**, 408-411.
- [24] Lannergård, A., Larsson, A., Kraghsbjerg, P. and Friman, G. (2003) Correlations between Serum Amyloid A Protein and C-Reactive Protein in Infectious Diseases. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, **63**, 267-272. <https://doi.org/10.1080/00365510310001636>
- [25] Martin-Loeches, I., Papiol, E., Almansa, R., López-Campos, G., Bermejo-Martin, J.F. and Rello, J. (2012) Intubated Patients Developing Tracheobronchitis or Pneumonia Have Distinctive Complement System Gene Expression Signatures in the Pre-Infection Period: A Pilot Study. *Medicina Intensiva*, **36**, 257-263. <https://doi.org/10.1016/j.medin.2011.10.009>
- [26] Tsalik, E.L. and Woods, C.W. (2009) Sepsis Redefined: The Search for Surrogate Markers. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **34**, S16-S20. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(09\)70560-6](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(09)70560-6)
- [27] Assicot, M., Bohuon, C., Gendrel, D., Raymond, J., Carsin, H. and Guilbaud, J. (1993) High Serum Procalcitonin Concentrations in Patients with Sepsis and Infection. *The Lancet*, **341**, 515-518. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(93\)90277-N](https://doi.org/10.1016/0140-6736(93)90277-N)
- [28] Müller, B., White, J.C., Nylén, E.S., Snider, R.H., Becker, K.L. and Habener, J.F. (2001) Ubiquitous Expression of the Calcitonin-i Gene in Multiple Tissues in Response to Sepsis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **86**, 396-404.
- [29] Moyer, M.W. (2012) New Biomarkers Sought for Improving Sepsis Management and Care. *Nature Medicine*, **18**, 999. <https://doi.org/10.1038/nm0712-999>
- [30] Wacker, C., Prkno, A., Brunkhorst, F.M. and Schlattmann, P. (2013) Procalcitonin as a Diagnostic Marker for Sepsis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *The Lancet Infectious Diseases*, **13**, 426-435. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(12\)70323-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(12)70323-7)
- [31] Dandona, P., Nix, D., Wilson, M.F., Aljada, A., Love, J., Assicot, M. and Bohuon, C. (1994) Procalcitonin Increase after Endotoxin Injection in Normal Subjects. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **79**, 1605-1608.
- [32] Schuetz, P., *et al.* (2012) Procalcitonin to Initiate or Discontinue Antibiotics in Acute Respiratory Tract Infections. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, **2012**, CD007498. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD007498.pub2>
- [33] Carvalho, C.M., *et al.* (2008) High-Dimensional Sparse Factor Modeling: Applications in Gene Expression Genomics. *Journal of the American Statistical Association*, **103**, 1438-1456. <https://doi.org/10.1198/016214508000000869>
- [34] Chen, M., *et al.* (2011) Detection of Viruses via Statistical Gene Expression Analysis. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, **58**, 468-479. <https://doi.org/10.1109/TBME.2010.2059702>
- [35] Wu, Y. and Liu, Y. (2013) Functional Robust Support Vector Machines for Sparse and Irregular Longitudinal Data. *Journal of Computational and Graphical Statistics*, **22**, 379-395. <https://doi.org/10.1080/10618600.2012.680823>
- [36] Witten, D.M., Tibshirani, R. and Hastie, T. (2009) A Penalized Matrix Decomposition, with Applications to Sparse Principal Components and Canonical Correlation Analysis. *Biostatistics*, **10**, 515-534. <https://doi.org/10.1093/biostatistics/kxp008>
- [37] Chaussabel, D. and Baldwin, N. (2014) Democratizing Systems Immunology with Modular Transcriptional Repertoire Analyses. *Nature Reviews Immunology*, **14**, 271-280. <https://doi.org/10.1038/nri3642>

- [38] Pankla, R., *et al.* (2009) Genomic Transcriptional Profiling Identifies a Candidate Blood Biomarker Signature for the Diagnosis of Septicemic Melioidosis. *Genome Biology*, **10**, Article No. R127. <https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-11-r127>
- [39] Smith, C.L., *et al.* (2014) Identification of a Human Neonatal Immune-Metabolic Network Associated with Bacterial Infection. *Nature Communications*, **5**, Article No. 4649. <https://doi.org/10.1038/ncomms5649>
- [40] Vassiliou, A.G., *et al.* (2013) Induced Expression and Functional Effects of Aquaporin-1 in Human Leukocytes in Sepsis. *Critical Care*, **17**, Article No. R199. <https://doi.org/10.1186/cc12893>
- [41] Khatri, P., *et al.* (2013) A Common Rejection Module (CRM) for Acute Rejection across Multiple Organs Identifies Novel Therapeutics for Organ Transplantation. *Journal of Experimental Medicine*, **210**, 2205-2221. <https://doi.org/10.1084/jem.20122709>
- [42] Chen, R., *et al.* (2014) A Meta-Analysis of Lung Cancer Gene Expression Identifies *PTK7* as a Survival Gene in Lung Adenocarcinoma. *Cancer Research*, **74**, 2892-2902. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-2775>
- [43] Custer, E.M., Finch, C.A., Sobel, R.E. and Zettner, A. (1995) Population Norms for Serum Ferritin. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, **126**, 88-94.
- [44] Jain, S., *et al.* (2014) Procalcitonin as a Prognostic Marker for Sepsis: A Prospective Observational Study. *BMC Research Notes*, **7**, Article No. 458. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-7-458>
- [45] Qu, J., *et al.* (2015) Evaluation of Procalcitonin, C-Reactive Protein, Interleukin-6 & Serum Amyloid A as Diagnostic Biomarkers of Bacterial Infection in Febrile Patients. *Indian Journal of Medical Research*, **141**, 315-321. <https://doi.org/10.4103/0971-5916.156617>
- [46] Kleiner, G., Marcuzzi, A., Zanin, V., Monasta, L. and Zauli, G. (2013) Cytokine Levels in the Serum of Healthy Subjects. *Mediators of Inflammation*, **2013**, Article ID: 434010. <https://doi.org/10.1155/2013/434010>
- [47] van de Veerdonk, F.L., *et al.* (2012) IL-18 Serum Concentration Is Markedly Elevated in Acute EBV Infection and Can Serve as a Marker for Disease Severity. *The Journal of Infectious Diseases*, **206**, 197-201. <https://doi.org/10.1093/infdis/jis335>
- [48] Vecchiet, J., *et al.* (2005) Association between Plasma Interleukin-18 Levels and Liver Injury in Chronic Hepatitis C Virus Infection and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, **35**, 415-422.
- [49] Stacey, A.R., *et al.* (2009) Induction of a Striking Systemic Cytokine Cascade Prior to Peak Viremia in Acute Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection, in Contrast to More Modest and Delayed Responses in Acute Hepatitis B and C Virus Infections. *Journal of Virology*, **83**, 3719-3733. <https://doi.org/10.1128/JVI.01844-08>
- [50] ten Oever, J., Tromp, M., Bleeker-Rovers, C.P., Joosten, L.A.B., Netea, M.G., Pickkers, P. and van de Veerdonk, F.L. (2012) Combination of Biomarkers for the Discrimination between Bacterial and Viral Lower Respiratory Tract Infections. *Journal of Infection*, **65**, 490-495. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2012.08.004>
- [51] Sharma, A., Chakraborti, A., Das, A., Dhiman, R.K. and Chawla, Y. (2009) Elevation of Interleukin-18 in Chronic Hepatitis C: Implications for Hepatitis C Virus Pathogenesis. *Immunology*, **128**, e514-e522. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2008.03021.x>
- [52] Wu, J., Chen, L.L., Chen, Y.M., Yang, J. and Wu, D.Q. (2014) Serum Ferritin Concentration Predicts Mortality in Patients with Hepatitis B Virus-Related Acute on Chronic Liver Failure. *Archives of Medical Research*, **45**, 251-256. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2014.03.004>
- [53] Stylianou, E., *et al.* (2003) Raised Serum Levels of Interleukin-18 Is Associated with Disease Progression and May Contribute to Virological Treatment Failure in HIV-1-Infected Patients. *Clinical & Experimental Immunology*, **132**, 462-466. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2003.02179.x>
- [54] Wiercinska-Drapalo, A., Jaroszewicz, J., Flisiak, R. and Prokopowicz, D. (2004) Plasma Interleukin-18 Is Associated with Viral Load and Disease Progression in HIV-1-Infected Patients. *Microbes and Infection*, **6**, 1273-1277. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2004.07.009>
- [55] Riera, A., Gimferrer, E., Cadafalch, J., Remacha, A. and Martin, S. (1994) Prevalence of High Serum and Red Cell Ferritin Levels in HIV-Infected Patients. *Haematologica*, **79**, 165-167.
- [56] Gupta, S., Imam, A. and Licorish, K. (1986) Serum Ferritin in Acquired Immune Deficiency Syndrome. *Journal of Clinical & Laboratory Immunology*, **20**, 11-13.
- [57] van de Weg, C.A., *et al.* (2014) Hyperferritinaemia in Dengue Virus Infected Patients Is Associated with Immune Activation and Coagulation Disturbances. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **8**, e3214. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003214>
- [58] Soundravalley, R., Agieshkumar, B., Daisy, M., Sherin, J. and Cleetus, C.C. (2015) Ferritin Levels Predict Severe Dengue. *Infection*, **43**, 13-19. <https://doi.org/10.1007/s15010-014-0683-4>
- [59] Mustafa, A.S., Elbishbishi, E.A., Agarwal, R. and Chaturvedi, U.C. (2001) Elevated Levels of Interleukin-13 and IL-18

- in Patients with Dengue Hemorrhagic Fever. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, **30**, 229-233. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2001.tb01575.x>
- [60] Michels, M., *et al.* (2015) Normal Free Interleukin-18 (IL-18) Plasma Levels in Dengue Virus Infection and the Need to Measure Both Total IL-18 and IL-18 Binding Protein Levels. *Clinical and Vaccine Immunology*, **22**, 650-655. <https://doi.org/10.1128/CVI.00147-15>
- [61] Dinarello, C.A., Novick, D., Kim, S. and Kaplanski, G. (2013) Interleukin-18 and IL-18 Binding Protein. *Frontiers in Immunology*, **4**, 289. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00289>
- [62] Gilbert, D.N. (2011) Procalcitonin as a Biomarker in Respiratory Tract Infection. *Clinical Infectious Diseases*, **52**, S346-S350. <https://doi.org/10.1093/cid/cir050>
- [63] Whicher, J., Bienvenu, J. and Monneret, G. (2001) Procalcitonin as an Acute Phase Marker. *Annals of Clinical Biochemistry*, **38**, 483-493. <https://doi.org/10.1177/000456320103800505>
- [64] Mazodier, K., *et al.* (2005) Severe Imbalance of IL-18/IL-18BP in Patients with Secondary Hemophagocytic Syndrome. *Blood*, **106**, 3483-3489. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-05-1980>
- [65] Shakoory, B., *et al.* (2016) Interleukin-1 Receptor Blockade Is Associated with Reduced Mortality in Sepsis Patients with Features of Macrophage Activation Syndrome: Reanalysis of a Prior Phase III Trial. *Critical Care Medicine*, **44**, 275-281. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000001402>
- [66] Toldo, S., *et al.* (2014) Interleukin-18 Mediates Interleukin-1-Induced Cardiac Dysfunction. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, **306**, H1025-H1031. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00795.2013>
- [67] Salonen, E.M. and Vaheri, A. (1981) C-Reactive Protein in Acute Viral Infections. *Journal of Medical Virology*, **8**, 161-167. <https://doi.org/10.1002/jmv.1890080302>
- [68] Stasakova, J., *et al.* (2005) Influenza A Mutant Viruses with Altered NS1 Protein Function Provoke Caspase-1 Activation in Primary Human Macrophages, Resulting in Fast Apoptosis and Release of High Levels of Interleukins 1beta and 18. *Journal of General Virology*, **86**, 185-195.
- [69] Cannon, J.G., *et al.* (1990) Circulating Interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor in Septic Shock and Experimental Endotoxin Fever. *The Journal of Infectious Diseases*, **161**, 79-84. <https://doi.org/10.1093/infdis/161.1.79>
- [70] Giuffrida, M.J., *et al.* (2014) Increased Cytokine/Chemokines in Serum from Asthmatic and Non-Asthmatic Patients with Viral Respiratory Infection. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, **8**, 116-122. <https://doi.org/10.1111/irv.12155>
- [71] Tschoeke, S.K., Oberholzer, A. and Moldawer, L.L. (2006) Interleukin-18: A Novel Prognostic Cytokine in Bacteria-Induced Sepsis. *Critical Care Medicine*, **34**, 1225-1233. <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000208356.05575.16>
- [72] Mangiarotti, P., Moulin, F., Palmer, P., Ravilly, S., Raymond, J. and Gendrel, D. (1999) Interferon-Alpha in Viral and Bacterial Gastroenteritis: A Comparison with C-Reactive Protein and Interleukin-6. *Acta Paediatrica*, **88**, 592-594. <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.1999.tb00004.x>
- [73] Stoycheva, M. and Murdjeva, M. (2005) Serum Levels of Interferon-Gamma, Interleukin-12, Tumour Necrosis Factor-Alpha, and Interleukin-10, and Bacterial Clearance in Patients with Gastroenteric Salmonella Infection. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, **37**, 11-14. <https://doi.org/10.1080/00365540410026068>
- [74] Katti, M.K. (2011) Assessment of Serum IL-1, IL-2 and IFN- γ Levels in Untreated Pulmonary Tuberculosis Patients: Role in Pathogenesis. *Archives of Medical Research*, **42**, 199-201. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2011.04.012>
- [75] Nakayama, T., Sonoda, S., Urano, T., Yamada, T. and Okada, M. (1993) Monitoring Both Serum Amyloid Protein A and C-Reactive Protein as Inflammatory Markers in Infectious Diseases. *Clinical Chemistry*, **39**, 293-297. <https://doi.org/10.1093/clinchem/39.2.293>
- [76] van de Geijn, F.E., *et al.* (2008) Mannose-Binding Lectin Polymorphisms Are Not Associated with Rheumatoid Arthritis—Confirmation in Two Large Cohorts. *Rheumatology (Oxford)*, **47**, 1168-1171. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/ken226>
- [77] Gendrel, D., *et al.* (1999) Comparison of Procalcitonin with C-Reactive Protein, Interleukin 6 and Interferon-Alpha for Differentiation of Bacterial vs. Viral Infections. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, **18**, 875-881. <https://doi.org/10.1097/00006454-199910000-00008>
- [78] Thurnham, D.I., McCabe, G.P., Northrop-Clewes, C.A. and Nestel, P. (2003) Effects of Subclinical Infection on Plasma Retinol Concentrations and Assessment of Prevalence of Vitamin A Deficiency: Meta-Analysis. *The Lancet*, **362**, 2052-2058. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)15099-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)15099-4)
- [79] Speer, C., Bruns, A. and Gahr, M. (1983) Sequential Determination of CRP, α_1 -Antitrypsin and Haptoglobin in Neonatal Septicaemia. *Acta Paediatrica Scandinavica*, **72**, 679-683. <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.1983.tb09793.x>
- [80] Venge, P., Douhan-Håkansson, L., Garwicz, D., Peterson, C., Xu, S.Y. and Pauksen, K. (2015) Human Neutrophil Lipocalin as a Superior Diagnostic Means to Distinguish between Acute Bacterial and Viral Infections. *Clinical and*

- Vaccine Immunology*, **22**, 1025-1032. <https://doi.org/10.1128/CVI.00347-15>
- [81] Netea, M.G., Kullberg, B.J. and Van der Meer, J.W. (2000) Circulating Cytokines as Mediators of Fever. *Clinical Infectious Diseases*, **31**, S178-S184. <https://doi.org/10.1086/317513>
- [82] Bradley, J.R. (2008) TNF-Mediated Inflammatory Disease. *The Journal of Pathology*, **214**, 149-160. <https://doi.org/10.1002/path.2287>
- [83] Wang, X., Feuerstein, G.Z., Gu, J.-L., Lysko, P.G. and Yue, T.-L. (1995) Interleukin-1 β Induces Expression of Adhesion Molecules in Human Vascular Smooth Muscle Cells and Enhances Adhesion of Leukocytes to Smooth Muscle Cells. *Atherosclerosis*, **115**, 89-98. [https://doi.org/10.1016/0021-9150\(94\)05503-B](https://doi.org/10.1016/0021-9150(94)05503-B)
- [84] Andoh, A., *et al.* (2000) Cytokine Regulation of Chemokine (IL-8, MCP-1, and RANTES) Gene Expression in Human Pancreatic Periacinar Myofibroblasts. *Gastroenterology*, **119**, 211-219. <https://doi.org/10.1053/gast.2000.8538>
- [85] Hollenberg, S.M., Cunnion, R.E. and Parrillo, J.E. (1991) The Effect of Tumor Necrosis Factor on Vascular Smooth Muscle. *In Vitro Studies Using Rat Aortic Rings*. *Chest*, **100**, 1133-1137. <https://doi.org/10.1378/chest.100.4.1133>
- [86] Gabay, C. and Kushner, I. (1999) Acute-Phase Proteins and Other Systemic Responses to Inflammation. *The New England Journal of Medicine*, **340**, 448-454. <https://doi.org/10.1056/NEJM199902113400607>
- [87] Anh, D.D., *et al.* (2006) *Haemophilus influenzae* Type B Meningitis among Children in Hanoi, Vietnam: Epidemiologic Patterns and Estimates of *H. influenzae* Type B Disease Burden. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **74**, 509-515. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2006.74.509>
- [88] Dubos, F., Moulin, F., Gajdos, V., Breart, G., Gendrel, D. and Chalumeau, M. (2006) Serum Procalcitonin and Other Biologic Markers to Distinguish between Bacterial and Aseptic Meningitis. *The Journal of Pediatrics*, **149**, 72-76. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2006.02.034>
- [89] Cunha, B.A. (2006) Distinguishing Bacterial from Viral Meningitis: The Critical Importance of the CSF Lactic Acid Levels. *Intensive Care Medicine*, **32**, 1272-1273; author reply 1274. <https://doi.org/10.1007/s00134-006-0210-x>
- [90] Huy, N.T., Thao, N.T.H., Diep, D.T.N., Kikuchi, M., Zamora, J. and Hirayama, K. (2010) Cerebrospinal Fluid Lactate Concentration to Distinguish Bacterial from Aseptic Meningitis: A Systemic Review and Meta-Analysis. *Critical Care*, **14**, Article No. R240. <https://doi.org/10.1186/cc9395>
- [91] Sakushima, K., Hayashino, Y., Kawaguchi, T., Jackson, J.L. and Fukuhara, S. (2011) Diagnostic Accuracy of Cerebrospinal Fluid Lactate for Differentiating Bacterial Meningitis from Aseptic Meningitis: A Meta-Analysis. *Journal of Infection*, **62**, 255-262. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2011.02.010>
- [92] Rajs, G., Finzi-Yeheskel, Z., Rajs, A. and Mayer, M. (2002) C-Reactive Protein Concentrations in Cerebral Spinal Fluid in Gram-Positive and Gram-Negative Bacterial Meningitis. *Clinical Chemistry*, **48**, 591-592. <https://doi.org/10.1093/clinchem/48.3.591>
- [93] Gerdes, L.U., Jørgensen, P.E., Nexø, E. and Wang, P. (1998) C-Reactive Protein and Bacterial Meningitis: A Meta-Analysis. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, **58**, 383-394. <https://doi.org/10.1080/00365519850186364>
- [94] Prasad, K. and Sahu, J.K. (2011) Cerebrospinal Fluid Lactate: Is It a Reliable and Valid Marker to Distinguish between Acute Bacterial Meningitis and Aseptic Meningitis? *Critical Care*, **15**, Article No. 104. <https://doi.org/10.1186/cc9396>
- [95] Hofmann, S., Grasberger, H., Jung, P., Bidlingmaier, M., Vlotides, J., Janssen, O.E. and Landgraf, R. (2002) Tumour Necrosis Factor-Alpha Induced Vascular Permeability Is Associated with a Reduction of VE-Cadherin Expression. *European Journal of Medical Research*, **7**, 171-176.
- [96] Samad, T.A., *et al.* (2001) Interleukin-1 β -Mediated Induction of Cox-2 in the CNS Contributes to Inflammatory Pain Hypersensitivity. *Nature*, **410**, 471-475. <https://doi.org/10.1038/35068566>
- [97] Tosato, G. and Jones, K.D. (1990) Interleukin-1 Induces Interleukin-6 Production in Peripheral Blood Monocytes. *Blood*, **75**, 1305-1310. <https://doi.org/10.1182/blood.V75.6.1305.1305>
- [98] Falasca, K., *et al.* (2006) Cytokine Patterns Correlate with Liver Damage in Patients with Chronic Hepatitis B and C. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, **36**, 144-150.
- [99] Kapasi, A.J., Dittrich, S., González, I.J. and Rodwell, T.C. (2016) Host Biomarkers for Distinguishing Bacterial from Non-Bacterial Causes of Acute Febrile Illness: A Comprehensive Review. *PLoS ONE*, **11**, e0160278. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160278>
- [100] Sparano, J.A., *et al.* (2015) Prospective Validation of a 21-Gene Expression Assay in Breast Cancer. *The New England Journal of Medicine*, **373**, 2005-2014. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1510764>
- [101] Castelli, G.P., Pognani, C., Meisner, M., Stuani, A., Bellomi, D. and Sgarbi, L. (2004) Procalcitonin and C-Reactive Protein during Systemic Inflammatory Response Syndrome, Sepsis and Organ Dysfunction. *Critical Care*, **8**, R234-R242.